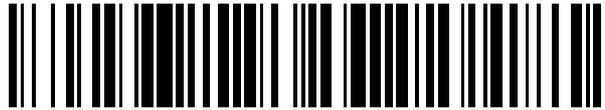


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 425**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07701966 .9**
96 Fecha de presentación: **08.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2027283**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE UN AGENTE CON ACTIVIDADES DE MODULACIÓN ANGIOGÉNICA USANDO UN EMBRIÓN DE TELEÓSTEO.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.01.2012

73 Titular/es:
**CITY UNIVERSITY OF HONG KONG
TAT CHEE AVENUE
KOWLOON, HONG KONG, CN**

72 Inventor/es:
**CHENG, Shuk Han y
CHAN, Pokwok**

74 Agente: **Linage González, Rafael**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 372 425 T3

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de un agente con actividades de modulación angiogénica usando un embrión de teleosteo

5 **Campo antecedente de la invención**

La angiogénesis es un proceso fisiológico de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes (Risau, 1997). Este proceso sólo se da normalmente en el crecimiento y el desarrollo, y la curación de heridas restableciendo el flujo sanguíneo en los tejidos. Sin embargo, la pérdida del control en la angiogénesis es un factor en las enfermedades más importantes tales como cáncer y artritis reumatoide (Liekens y col., 2001). Estas enfermedades pueden ser resultado de u obtenerse de la progresión cuando los nuevos vasos sanguíneos crecen de manera excesiva o insuficiente. Por ejemplo, la angiogénesis excesiva se da en el cáncer por la producción anormal de una cantidad excesiva de los factores de crecimiento angiogénicos para formar nuevos vasos sanguíneos para una demanda excesiva de nutriente. Por otra parte, se produce una angiogénesis insuficiente, por ejemplo, en una enfermedad de las arterias coronarias, causando la lesión y muerte tisular debido a una producción inadecuada del factor de crecimiento angiogénico para un crecimiento suficiente de vasos sanguíneos. Por lo tanto, la terapia tiene por objeto tratar la pérdida del control en la angiogénesis que se persigue activamente por las compañías farmacéuticas de todo el mundo.

20 **Conocimiento antecedente y descripción de la técnica anterior**

Incluso aunque existe un enorme mercado potencial para los productos terapéuticos relacionados con la angiogénesis, es difícil encontrar un ensayo adecuado para evaluar el efecto de la respuesta de la angiogénesis (Staton y col., 2004). Los ensayos más usados ampliamente son ensayos *in vitro* en los que se prueban nuevos fármacos en células endoteliales cultivadas en matraces de plástico. El inconveniente es que es difícil extrapolar la observación hecha en un ensayo *in vitro* para modelar el complejo proceso de la angiogénesis que se da realmente en situaciones *in vivo* (Staton y col., 2004; Taraboletti y Giavazzi, 2004). Por otra parte, los ensayos *in vivo* usando modelos de animales, por ejemplo, ratones, son costosos, consumen mucho tiempo y son difíciles de cuantificar (Staton y col., 2004). Por lo tanto, comúnmente se emplean múltiples ensayos *in vitro* para la identificación de compuestos candidatos y la eficacia de los compuestos candidatos sobre la angiogénesis se validará posteriormente mediante más de un ensayo *in vivo*. Sin embargo, la cuantificación todavía es un parámetro clave importante para los ensayos de angiogénesis. Los criterios para un ensayo de la angiogénesis cuantitativa ideal (Hasan y col., 2004) son que el ensayo debe:

- 1) proporcionar una medición cuantitativa de la estructura de vasos sanguíneos recién formados;
- 2) proporcionar una medición cuantitativa de caracteres funcionales de vasos sanguíneos recién formados;
- 3) poder distinguir los vasos sanguíneos recién formados y los que existen previamente;
- 4) permitir un estudio a largo plazo;
- 5) ser rentable, rápido, fácil de usar, reproducible; y
- 6) no causar ningún daño tisular.

Hasta ahora, ninguno de los ensayos *in vivo* existentes cumplía realmente estos requisitos (Hasan y col., 2004; Taraboletti y Giavazzi, 2004). Parece que un ensayo de detección de fármacos *in vivo* usando pez cebra como modelo cumple los criterios de un ensayo de angiogénesis cuantitativo ideal. El ensayo *in vivo* de pez cebra tiene las ventajas y comodidades de los ensayos *in vitro* (alto rendimiento en comparación con los ensayos *in vitro*) y los ensayos *in vivo* (siendo un organismo intacto), y por lo tanto podrá servir como puente o filtro entre la detección *in vitro* y la validación *in vivo* posterior (Epstein y Epstein, 2005; Goldsmith, 2004; Parng y col., 2002). El ensayo *in vivo* del pez cebra eliminará los componentes candidatos, debido a los efectos tóxicos, de la lista identificada a partir de los ensayos *in vitro* antes de introducir una fase más costosa de la validación *in vivo*. Se ha demostrado que el ensayo *in vivo* del pez cebra es un método útil para detectar fármacos angiogénicos (revisado por (Kidd y Weinstein, 2003)). Por ejemplo, Serbedzija y sus colaboradores describieron una metodología de detección que se basó en el recuento numérico de vasos sanguíneos subintestinales formados sobre la superficie del saco vitelino sobre ambos lados del embrión (Serbedzija y col., 1999). Los vasos sanguíneos se tiñeron para obtener la actividad de la fosfatasa alcalina endógena. Se han desarrollado líneas de pez cebra transgénicas con vasos sanguíneos fluorescentes (Cross y col., 2003; Lawson y Weinstein, 2002) de tal forma que la representación por imágenes y el análisis de la angiogénesis puede simplificarse en gran medida. Sin embargo, todavía no existe una metodología que describa completamente los procedimientos y herramientas sobre cómo usar el pez cebra como una herramienta cuantitativa para el descubrimiento de un fármaco angiogénico junto con la prueba de toxicidad correspondiente.

El documento WO 99/42606 describe sistemas de ensayo de detección biológica en los que se usan teleosteos para

la detección de la actividad de modulación angiogénica y la actividad tóxica de un agente en sistemas de ensayo paralelos.

Sumario de la invención

5 Esta invención se refiere a un método biológico de detección como se define en las reivindicaciones adjuntas. El presente sistema de detección de tres niveles cumple los criterios de un ensayo de angiogénesis cuantitativo enumerado anteriormente y proporciona un sistema de ensayo de detección eficaz para identificar el agente de modulación de la angiogénesis con menos toxicidad. El modelo preferido de la presente invención son embriones de pez cebra o de medaka. La ventaja de la presente invención es que puede identificar rápidamente los agentes de modulación angiogénicos potenciales en el primer nivel y estos agentes de modulación angiogénicos potenciales después se someten a las pruebas de seguridad de los niveles 2 y 3, respectivamente. Por lo tanto, los candidatos finales de los agentes candidatos que pasen los 3 niveles tendrán la actividad angiogénica deseable con la menor toxicidad.

15 En el primer nivel, el objeto es identificar rápidamente cualquier agente capaz de inducir la alteración en el patrón vascular en un teleosteo. En este nivel, los embriones se tratan con el agente en un amplio intervalo de concentración, cubriendo 7 ordenes de magnitud. Para visualizar los vasos sanguíneos en los embriones transparentes, se aplica tinción con color para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina endógena predominantemente en las células endoteliales vasculares. Se selecciona un patrón de vasos intersegmentarios como la diana que se va a examinar ya que el patrón es regular y la variación entre los individuos es muy pequeña, haciendo que la interpretación del efecto angiogénico sea mucho más fácil. La fase preferida de los embriones que se van a examinar es de al menos 72 horas post-fertilización (hpf). Cualquier alteración en el patrón de los vasos intersegmentarios en cualquier concentración del agente concluirá como el agente de modulación angiogénica y el agente pasará al siguiente nivel.

20 En el segundo nivel, se determinará la relación de dosis respuesta del agente. La relación de dosis respuesta describe el cambio en los efectos, es decir, muerte y malformación causados por niveles diferentes de concentraciones del agente. El estudio de la relación de dosis respuesta es fundamental para determinar los niveles seguros y peligrosos del agente en estudio. La relación de dosis respuesta se representa en forma de una gráfica, denominada curva de dosis respuesta. El primer punto a lo largo de la curva en el que se alcanza una respuesta, es decir, efectos totales incluidos muerte y malformación, por encima de 0 se denomina como la concentración umbral, o concentración sin efectos adversos observados (NOAEC). Por encima de la concentración umbral, todavía aparecerán efectos adversos indeseables, es decir, muerte y malformación, y el efecto será mucho más fuerte según aumente la concentración. Por lo tanto, en este nivel, se determina la NOAEC del agente en un teleosteo. La fase preferida de los embriones que se van a examinar es de 24 o 48 hpf.

30 En el tercer nivel, se determina si el agente en el nivel de NOAEC, en lugar de anomalías graves, inducirá algún efecto adverso a nivel de los órganos y a nivel celular. Por lo tanto, se evaluará la seguridad de un agente por medio de una prueba de citotoxicidad, prueba de toxicidad en órganos y una prueba de cardiotoxicidad. Además, se ensayará la actividad de modulación angiogénica en la NOAEC. En este nivel, la visualización de vasos intersegmentarios se hará mediante tecnología de representación de imágenes por microangiografía en la que se inyectan tintes fluorescentes, por ejemplo, microperlas fluorescentes o dextranos fluorescentes, en el riego sanguíneo, de tal forma que se difundirán a todos los vasos sanguíneos registrados por el riego sanguíneo. La alteración de los vasos intersegmentarios será como un indicador para la actividad de modulación angiogénica. Se descartará un agente con cualquier resultado positivo en una de las pruebas o resultados negativos en la actividad de modulación angiogénica. Por otro lado, se considerará como seguro con actividad de modulación angiogénica.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención proporciona un método biológico de detección de un agente para la actividad de modulación angiogénica como se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 Pueden detectarse una diversidad de agentes, fuentes sintéticas o naturales, usando la presente invención. Los agentes pueden ser moléculas pequeñas en forma pura o de extracción en bruto de una hierba o extracción en bruto de una combinación de diferentes hierbas. Los agentes han de administrarse en forma soluble, con una diversidad de disolventes vehículo, por ejemplo, etanol, DMSO. Se indican las concentraciones máximas de estos disolventes en los que no se induce malformación en el pez cebra (Hallare y col., 2006). Por ejemplo, el nivel de DMSO y etanol usado en un ensayo con embriones de pez cebra debe estar por debajo del 1,5% y el 1%, respectivamente. En primer lugar, el agente debe disolverse en el disolvente vehículo, si es necesario. Después, se añade al medio embrionario que contiene 20 huevos fertilizados de embriones sanos a la concentración deseada. El momento de inicio preferido de la adición es antes de la aparición de la angiogénesis, es decir, 24 hpf. Cualquier efecto inducido por la presencia del agente administrado se observará después de cierto periodo de tiempo a intervalos, por ejemplo, 24 horas o 48 horas o más. La recolección de los huevos, recogida de los huevos fertilizados y la identificación de los embriones sanos se conoce bien por los expertos en la técnica (Westerfield, 1995).

En el primer nivel, los huevos fertilizados a 4 hpf se bañan en el medio embrionario que contiene diversas concentraciones de agente que se va a ensayar con un incremento de 10 veces en cada concentración. El número total de concentraciones que se van a ensayar es 7. Por lo tanto, el intervalo de concentraciones que se va a ensayar cubre 7 órdenes de magnitud. Después de la incubación durante un cierto periodo de tiempo (por ejemplo, 96 horas), los embriones se fijan y los vasos sanguíneos se visualizan mediante tinción con color que tiñe específicamente la actividad de la fosfatasa alcalina endógena predominantemente en las células endoteliales vasculares. Se cuenta el número de vasos intersegmentarios en cada embrión individual. Se cuenta en cada concentración el número de embriones que muestran descenso o aumento del número de vasos intersegmentarios. El agente a cualquier concentración que induce la alteración del número de vasos intersegmentarios se indicará como un candidato potencial y pasará al nivel 2. Simultáneamente, también se contará en cada concentración el número de embriones muertos. Estos datos servirán como un intervalo preliminar de concentraciones que se va a ensayar en el segundo nivel a continuación.

En el segundo nivel, se cuenta la aparición de muerte y malformación tras la exposición de los teleósteos a diferentes concentraciones del agente candidato potencial identificado en el nivel 1. El intervalo de concentración que se va a ensayar se determina preliminarmente en el experimento de búsqueda del intervalo del primer nivel. Las concentraciones que se van a ensayar se eligen en igual lugar. El porcentaje de muerte y malformación en cada concentración se determina y se representa en una gráfica para mostrar la relación de dosis respuesta. Una curva de dosis respuesta se corresponde a todos los puntos de datos, y la concentración correspondiente a la mayor concentración a la que no hay un aumento significativo estadísticamente del porcentaje de efectos adversos entre el grupo expuesto y el grupo de control se determina como NOAEC. Después, este nivel de concentración se usará en el tercer nivel. Si para algún agente no puede determinarse la NOAEC, éste se descartará de las pruebas.

El objetivo del tercer nivel es descubrir cualquier efecto adverso del agente a un nivel de concentración que no cause ningún efecto adverso grave, tal como muerte y malformación en un teleósteo. Por lo tanto, las pruebas incluidas en el tercer nivel son pruebas de toxicidad celular, pruebas de toxicidad específicas de órganos y pruebas de cardiotoxicidad. En la prueba de citotoxicidad, el número de células muertas (células apoptóticas) se cuantifica por citometría de flujo. Mediante la citometría de flujo, se puede analizar, además de la cantidad de células muertas, la cantidad de células en diferentes fases de los ciclos celulares en un gran número de tamaños de muestra, como 300 teleósteos en un solo experimento. En la toxicidad específica de órganos, se estudia la morfología de los órganos por hibridación *in situ* fluorescente con una sonda específica de órganos. La morfología del órgano se cuantifica mediante reconstrucción en 3 dimensiones de las secciones ópticas a partir de imágenes confocales. Cualquier cambio en el tamaño y la forma del órgano puede revelar los efectos tóxicos inducidos por el agente ensayado. La cardiotoxicidad es probar si el candidato positivo podrá afectar a las funciones cardíacas, tal como el gasto cardíaco y el ritmo cardíaco. La cardiotoxicidad es una prueba importante porque se demuestra que uno o más fármacos muestran efectos adversos en el corazón, incluso a frecuencias poco frecuentes, y deben retirarse del mercado. Finalmente, el efecto de la actividad de modulación angiogénica del candidato positivo se evalúa en la NOEC. El candidato positivo que no induce ningún efecto citotóxico, tóxico específico de órganos ni cardiotoxicidad, y se dice que muestra una actividad de modulación angiogénica a la NOEC para pasar el tercer nivel y, por lo tanto, este bioensayo de detección.

Ejemplos

1. Material y métodos

a. Recolección de los huevos

Los peces cebra se aparean y engendran con la luz encendida. Con objeto de recoger los huevos, es necesario proteger los huevos para que no se los coman los adultos. La caja de recolección de huevos usada está fabricada de material acrílico con una malla de metal montada sobre la parte superior. Después, ésta se cubre con algas de plástico para que los adultos se apareen en el lugar donde está la malla de plástico, y los huevos que se engendren caigan en la caja acrílica. Los huevos se protegen de su consumo por parte de peces adultos con una malla metálica. La caja de recolección debe retirarse después de 30 minutos de duración del periodo de luz. Después, los huevos se recogerán vertiendo agua del acuario desde la caja de recolección a través de una red de peces. Los huevos deben aclararse con agua corriente del grifo durante 30 segundos y después transferirse a una placa de Petri de 90 mm con 15 ml de medio embrionario (NaCl 19,3 mM, KCl 0,23 mM, MgSO₄·7H₂O 0,13 mM, Ca(NO₃)₂ 0,2 mM, Hepes 1,67 mM (pH 7,2)). Después, la placa debe mantenerse en una incubadora a 28 °C.

b. Administración de agentes

Los agentes se disuelven a una concentración deseada de tal forma que la concentración de prueba más alta contenga la concentración del disolvente vehículo (por ejemplo, DMSO, etanol) de no más de la concentración tolerante recomendada. Los agentes se añadirán directamente a la solución del medio con 4 hpf de embriones de pez. Los ensayos deben realizarse en placas de Petri (60 mm x 15 mm, Falcon, BD Bioscience, San Jose, California). Cada placa de Petri contiene 20 embriones.

Al igual que una detección primaria para los efectos de los compuestos en el nivel 1, cada agente se ensaya a 8 concentraciones diferentes, con 1 orden de magnitud diferente para determinar que concentración proporcionará más cantidad de información. Para el estudio de dosis respuesta en el nivel 2, el intervalo de concentraciones que se va a ensayar cubre desde el inferior en el que no se observa ningún efecto adverso, hasta la concentración más alta a la que todos los embriones mueren.

Para la citotoxicidad, cardiotoxicidad y toxicidad de órganos en el nivel 2 y el estudio mecánico en el nivel 3, la única concentración que se ensaya es la NOAEC determinada a partir de la curva de dosis respuesta. Para cada concentración del agente, se añaden 6 ml de medio de cultivo a veinte embriones cultivados en una placa de Petri. Después, se ensayan 15 réplicas por agente por concentración (es decir, $20 \times 15 = 300$ embriones para cada concentración de un agente). El efecto puede observarse en diferentes puntos de tiempo, por ejemplo, 28 hpf, 52 hpf o 76 hpf. Además, los experimentos adicionales para examinar la toxicidad y la angiogénesis pueden realizarse tras el tratamiento con agentes.

c. Prueba de toxicidad

Para determinar la toxicidad de un compuesto para un sistema biológico, debe identificarse un punto de referencia que pueda observarse y esté bien definido. La mortalidad es uno de estos puntos de referencia ampliamente usados. El índice de efectos letales que describen la potencia de un compuesto se denomina CL50, que se define como la dosis de un producto químico que causa la muerte en al menos el 50% de los animales ensayados. Además de la letalidad, pueden usarse efectos adversos, tales como la malformación en la morfología inducida por un compuesto como un punto de referencia de observación. Estas consecuencias adversas junto con la muerte se agrupan como efectos adversos totales. La potencia de un compuesto para inducir efectos adversos se define como CE50, que es la concentración de un compuesto que causa que al menos el 50% de los animales ensayados muestren un aspecto anormal, así como la muerte.

Se determinó que la mortalidad y los efectos adversos totales eran puntos de referencia de observación en el presente estudio. Después de administrar un compuesto a los embriones de los peces, los embriones se mantienen a 28 °C hasta 28 hpf y 52 hpf, respectivamente. Veinticuatro y cuarenta y ocho horas después de añadir el compuesto al medio en el que se cultivan los embriones de peces, entonces los embriones se inspeccionan visualmente para comprobar su mortalidad, movimientos y defectos morfológicos graves en un microscopio de disección (Zeiss, Jena, Alemania). Después, se anota el número de embriones muerto de los 20 embriones ensayados en cada experimento. Los datos recogidos de las 15 réplicas se ensaya para comprobar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre la mortalidad sobre todas las concentraciones. Después se hacen análisis de varianza, junto con la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey post-hoc para determinar las diferencias de la mortalidad entre las concentraciones de tratamiento y el control no tratado. De forma análoga, se usan tanto los análisis de varianza como la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey post-hoc para determinar las diferencias en los efectos adversos totales entre las concentraciones de tratamiento y el control no tratado. Se usa el Software Statística para Windows (StatSoft, Tulsa, OK, EE.UU.) para realizar los cálculos.

d. Tinción de la fosfatasa alcalina endógena

Pueden usarse embriones mayores de 72 hpf para la tinción de la fosfatasa alcalina endógena. Específicamente, se fijan embriones en paraformaldehído al 4 % (PFA) en PBS y Triton x-100 al 1%. Se fijan embriones durante una noche a 4°C y después se lavan 4 cuatro veces en PBS/Tween-20 al 0,1% (PBT) durante 5 minutos. Para la tinción, los embriones se equilibran tres veces en un tampón TMNT (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; MgCl 50 mM; NaCl 0,1 M; Tween 20 al 0,1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de equilibrar los embriones, se tiñen en una solución de sustrato (4,5 µl de 75 mg/ml de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 3,5 µl de 50 mg/ml de X-fosfato para 1 µl de solución de TMNT). Después de la tinción durante 12 minutos, se marcaron todos los vasos sanguíneos en los embriones de pez. La reacción de la tinción se detiene mediante el lavado tres veces en PBT y los embriones se fijan en paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, los embriones se lavan dos veces brevemente en PBT y durante 4 veces durante 10 minutos. Después del lavado, los embriones deben sumergirse en glicerol al 70% en PBS antes de su examen y la captura de imágenes en una cámara CCD.

Para examinar la actividad pro/anti-angiogénica inducida por un compuesto, se requiere que se cuente el número de vasos intersegmentarios en un estereomicroscopio o un microscopio compuesto. Los embriones teñidos se colocan lateralmente en glicerol. La región de examen es desde los primeros vasos intersegmentarios hasta justo el que está encima del ano. En general, deben ser 12-13 pares. La ventaja es que existe un número constante de vasos intersegmentarios en los embriones de 3 días lo que hace que la comparación entre los grupos de control y de tratamiento sea más fácil. Otra ventaja del uso del pez cebra para este tipo de ensayo es que los vasos subintestinales, que se sitúan sobre el saco vitelino, son tanto sensibles a factores que afectan a la formación de los vasos como fáciles de ensayar mediante este método. Los vasos subintestinales están presentes normalmente sobre la superficie dorsolateral del saco vitelino de los embriones de pez cebra por 48 horas de desarrollo. Forman una forma de cesta distintiva que se extiende 50-100 µm desde el borde ventral del somito sobre el saco vitelino. Ensayando los vasos subintestinales a 72 horas de desarrollo (24 horas después de que aparezcan normalmente los vasos subintestinales), se evita la variación normal en el tiempo de la formación de los vasos.

e. Microangiografía

Los procedimientos de microangiografía se adoptan a partir de Weinstein y col. (Nat Genet, 1995), con modificaciones. Los embriones se montarán lateralmente en agarosa al 0,3% como se describe a continuación.

- 5 Después, se inyectaron microperlas de látex fluoresceinadas y carboxiladas (0,02 μm , N° de cat. F-8787, Molecular Probes, EE.UU.) en los senos venosos. La suspensión de perlas debe diluirse 1:1 con BSA al 2%, sonicarse a máxima potencia durante 5 minutos y después centrifugarse a máxima velocidad durante 5 minutos. Después, el sobrenadante se transferirá a un nuevo tubo para la inyección. Después, se prepararan microagujas de vidrio de capilares de 1 mm OD (World Precision Instruments, N° de cat. TW100-4 o TW100F-4 para vidrio con o sin un filamento interno) usando un tirador de micropipeta Narishige PC-10. Para fabricar estas microagujas, se necesita este tirador de micropipeta para tirar del capilar de vidrio de manera vertical usando la fuerza gravitacional de su propio peso. Se determina un doble tirón en el que el primer tirón está a una temperatura de 76 °C y el segundo tirón está a una temperatura de 64 °C. Después, se romperán las microagujas abriéndolas mediante un micro-forge Narishige MF-900 para proporcionar una apertura de aproximadamente 5 μm de ancho. La punta de la microaguja ha de romperse empujando una pequeña gota de vidrio fundido contra el alambre de platino del micro-forge, controlado a 10 x el objeto del micro-forge. No es necesario sostener la pipeta en este protocolo ya que los embriones se montan en agarosa. Después, la suspensión de perlas se carba en una microaguja en el extremo más ancho con un cargador de micropipeta. Después, se inserta una microaguja de vidrio de manera oblicua en los senos venosos. Deben insertarse muchos pequeños bolos (+20) de la suspensión de perlas sobre el transcurso de hasta un minuto. Se adquieren imágenes confocales después de dejar que el embrión se recubra durante 3-5 minutos. La configuración del instrumento es similar a la describe a continuación. Después de la inyección, las perlas fluorescentes circularán alrededor de toda la red vascular, iluminando cada vaso sanguíneo con el flujo sanguíneo activo desde el corazón. Después, se adquieren imágenes confocales (microscopio confocal Carl Zeiss equipado con LSM versión 5) para realizar una reconstrucción detallada de la estructura 3D del sistema vascular de los embriones de pez cebra.

- El embrión preparado para la microangiografía debe inmovilizarse mediante agarosa. Se prepara una solución de agarosa (0,3%) y se mantiene a aproximadamente 45 °C en un bloque de calor. Los embriones se transfieren a un portaobjetos limpio usando una pipeta Pasteur con una apertura ancha. Para evitar dañar el saco vitelino, debe añadirse una pequeña gota de solución al embrión antes de la adición de la agarosa al 0,3% calentada previamente al embrión. Con una aguja 27G, el embrión se coloca en la posición apropiada justo antes de que se endurezca la agarosa (normalmente esto requiere un minuto o dos).

- Para comenzar, en primer lugar debe encenderse una lámpara láser con la longitud de onda apropiada (por ejemplo, láser de 488 nm para FITC/fluoresceína y naranja de acridina). Después, el tamaño del agujero se ajusta a un valor, por lo que el valor espacioso es 1,00. El botón "Encontrar" en la barra de menú lateral se utiliza para ajustar la ganancia del detector, la compensación y la ganancia del amplificador automáticamente. Si es necesario, la ganancia del detector y la ganancia del amplificador se ajustan para mejorar la intensidad y para que la compensación del detector suprima el ruido de fondo. La posición de la sección óptica de partida ("corte") se define y se marca seleccionando "Markfirst". De forma similar, la posición de la sección óptica final se define y se marca seleccionando "Mark last". El intervalo y el número de corte se definió ajustando "X:Y:Z: = 1:1:1" para que la resolución del eje Z se ajuste como la resolución de X e Y. Después, se capturaron imágenes confocales apiladas en serie, se guardaron y se grabaron en un CD-R para hacer copias de seguridad. Las imágenes confocales pueden exportarse como TIFF (imagen sin procesar de 16 bit) usando la versión autónoma del navegador de imágenes LSM (Carl Zeiss) para su análisis en otro software de análisis de imágenes, por ejemplo, MetaMorph (Universal Imaging, EE.UU.).

f. Hibridación *in situ* de montaje completo

- 50 Además de realizar detecciones visuales, pueden detectarse cambios moleculares específicos en tejidos de teleósteos mediante hibridación *in situ* del ARN o la tinción de anticuerpos de proteínas específicas. Puede usarse un kit de marcaje con digoxigenina de Roche para marcar las sondas de ARN antisentido. Las sondas antisentido se sintetizan linealizando plásmidos pBlueScript (10 μg) con las enzimas de restricción apropiadas en un cóctel de 50 μl . Se usa electroforesis en gel de agarosa como monitor para asegurarse de que el plásmido se digiere totalmente, y se usa un volumen igual de fenol/clorofórmico (Gibco BRL, Life Technology, EE.UU.) para detener la reacción. Después, la mezcla se centrifuga en una microcentrifugadora de laboratorio a temperatura ambiente durante 3 minutos a toda velocidad (13.000 rpm). La fase acuosa debe transferirse a un nuevo tubo seguido de la adición de volúmenes 1/10 de acetato sódico 3 M (pH 8,0) (Sigma, EE.UU.) y 2 volúmenes de etanol (Sigma, EE.UU.) y centrifugarse durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, el sedimento se lava con etanol al 70%, se deja secar al aire sobre la mesa y se suspende de nuevo en una cantidad apropiada de agua libre de ARNasa (DEPC; Sigma, EE.UU.) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

- Después, los plásmidos linearizados se transcriben con ARN polimerasa T3 o ARN polimerasa T7 en un cóctel de transcripción y se incuban durante 2 horas a 37 °C para la preparación de transcritos de digoxigenina no radioactivos. La reacción se detiene añadiendo 1 μl de EDTA (0,5 M, pH 8,0). La adición de 2,5 μl de LiCl (4 M) y 75

µl de etanol frío se hace para precipitar la sonda de ARN mediante centrifugación a toda velocidad durante 30 minutos a 4 °C. Después, el sedimento se lavó con etanol al 70%, se dejó secar al aire en la mesa y se suspendió de nuevo en agua libre de ARNasa (DEPC).

5 La hibridación *in situ* de montaje completo puede realizarse como se describe por Westerfield (1994) con modificaciones (Cheng y col. 2000): A los embriones de 24 hpf se les quita el corión usando un par de pinzas y se fijan en PBS (solución salina tamponada con fosfato) con paraformaldehído al 4% (PFA) y Triton X-100 al 1% a 4 °C durante una noche. En resumen, entonces el ARN antisentido se sintetiza linealizando el plásmido y transcribiéndolo con polimerasa T7 y Digoxigenina-11-UTP (Roche, Basel, Suiza). Los embriones deben transferirse a metanol y almacenarse a -20 °C para aumentar la permeabilidad. Después, se lavan y se digirieron ligeramente con 10 µg/ml de proteinasa K en PBT (PBS con Tween 20 al 0,1%) antes de la incubación con una solución de hibridación *in situ* de sondas antisentido (formamida al 50%, 5 x SSC, 50 µg/ml de heparina, 500 µg/ml de ARNt, ácido cítrico 9 mM, pH 6,0 y Tween 20 al 0,1%) a 65-70 °C durante una noche. Tras la hibridación, las sondas se eliminan con lavados de alto rigor. En resumen, los embriones se lavan dos veces en formamida al 50%: 50% (2 x SSC/Tween-20 al 0,1%), cada uno durante 30 minutos. Seguido de 2 x SSC/Tween-20 al 0,1% a 65 °C durante 15 minutos, 2 x SSC y 0,2 x SSC cada uno dos veces durante 30 min a 65 °C. Los embriones se incubaron posteriormente con fragmentos Fab de anti oveja-digoxigenina-fosfatasa alcalina absorbidos previamente (Roche, Basel, Suiza) en un mezclador nutator a 4 °C durante una noche. Después del lavado 6 veces en PBT, se añadió fosfato de 5-bromo-4-cloroindolilo en forma de sustrato y nitroazul de tetrazolio como acoplador (Roche, Basel, Suiza) para la tinción con color.

20

g. Apoptosis

Los embriones tratados con agentes (15 réplicas) se combinan en una sola placa de Petri de 90 mm recubierta con agarosa al 0,3% y se lavan tres veces en un medio de cultivo embrionario. La eliminación del corión se hace en un estereomicroscopio usando un par de pinzas para arrancar el corión. Después, los embriones se transfieren a un tubo de cultivo de 15 ml cargado con 8 ml de una solución de tripsina (0,5 mg/ml de tripsina en una solución de 0,14 M de NaCl, 0,05 M de KCl, 0,005 M de glucosa, 0,007 M de NaHCO₃ y 0,7 mM de EDTA). Después, los embriones se trituraron a través de una pipeta Pasteur de diámetro estrecho hasta que se desligan con comprobación continua en un microscopio de disección. Después, la suspensión celular se centrifuga a 1000 x g durante 7 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desecha y las células se suspenden de nuevo en 5 ml de PBS para quitar mediante lavado la tripsina. Después, se centrifugaron de nuevo a 1000 x g durante 7 minutos a 4 °C seguido de la suspensión de nuevo en 5 ml de PBS y se centrifugaron a 1000 x g durante 7 minutos a 4 °C. La solución acuosa se desechó y después el sedimento se suspendió de nuevo completamente en 200 µl de PBS. Después de esto, se añadieron 2 ml de etanol al 70% y la mezcla se incubó a -20 °C durante una noche. Después, la muestra se centrifugó a 1000 x g durante 7 minutos a 4 °C y se añadió el sedimento con 100 µl de yoduro de propidio (400 µg/ml) y 100 µl de ARNasa (1 mg/ml), incubado a 28,5 °C durante 30 minutos antes del análisis de citometría de flujo.

35

h. Cardiotoxicidad

40 El embrión preparado para microangiografía debe inmovilizarse mediante agarosa. Se prepara una solución de agarosa (0,3%) y se mantiene a aproximadamente 45°C en un bloque de calor. Los embriones se transfieren a un portaobjetos limpio usando una pipeta de Pasteur con una apertura ancha. Para evitar dañar el saco vitelino, debe añadirse una pequeña gota de solución al embrión antes de la adición de la agarosa al 0,3% calentada previamente al embrión. Con una aguja 27G, el embrión se coloca en la posición apropiada justo antes de que se endurezca la agarosa. Después del endurecimiento de la agarosa, se examina la circulación en la región de la cola en un microscopio de disección con una cámara CCD conectada a un ordenador personal equipado con un dispositivo de adquisición de video o a una cámara de vídeo digital. En el caso de una cámara de vídeo digital, los datos almacenados en una cinta mini-DV se transfieren de nuevo al ordenador personal a través de una conexión i-Link y se guardan en formato AVI para realizar un análisis de las imágenes de video. Después de realizar el análisis de las imágenes de vídeo, se obtienen los datos para el espectro de potencia del movimiento de las células sanguíneas. Se obtienen dos parámetros a partir del espectro de potencia. El primer parámetro que representa la frecuencia cardiaca es el componente de la frecuencia básica que es el valor de la frecuencia con el valor de potencia más grande. El segundo parámetro es la relación del valor de potencia del componente de la frecuencia básica con respecto al valor de potencia total de todo el espectro. Esta relación se correlación con la ritmicidad de los latidos del corazón.

55

2. Resultados

a. Nivel 1

60

En total, se han detectado 1431 compuestos individuales, 107 hierbas singularmente y 13 fórmulas en el nivel 1. Estos agentes se seleccionaron de libros de Medicina Tradicional China. De los 1431 compuestos, hubo 11 que mostraban actividad de modulación anti-angiogénica al menos en una de las concentraciones ensayadas. El fenómeno de la anti-angiogénesis era la ausencia de al menos un vaso intersegmentario. De las 107 hierbas, hubo 11 que mostraban actividad de modulación anti-angiogénica al menos en una de las concentraciones ensayadas. De

65

las 13 fórmulas ensayadas, hubo 4 que mostraban actividad de modulación anti-angiogénica al menos en una de las concentraciones ensayadas mientras que hubo 3 que mostraban actividad de modulación pro-angiogénica al menos en una de las concentraciones ensayadas. Los mismos agentes adquiridos en diferentes proveedores también mostraron una respuesta similar.

5

b. Nivel 2

Veintinueve agentes pasaron el primer nivel y se ensayaron en el segundo nivel. Se han realizado pruebas de toxicidad general. Después, se determinaron las NOAEC para cada agente. Entre ellos, hubo 6 agentes (4 hierbas y 2 fórmulas) que no se pudo determinar la NOAEC y por lo tanto no se ensayaron más en el tercer nivel.

10

c. Nivel 3

Se realizó una prueba de toxicidad en la NOAEC. Los 11 compuestos en sus NOAEC indujeron apoptosis ectópica en los embriones de teleosteos y fallaron la prueba de citotoxicidad. Por lo tanto, fallaron en el tercer nivel y no se realizaron más pruebas de toxicidad. Cinco de 7 hierbas indujeron apoptosis ectópica en sus NOAEC mientras que las 2 restantes pasaron la prueba de citotoxicidad. Entre estos 2, sólo uno mostró actividad antiangiogénica y pasó las pruebas de toxicidad específica de órganos y la cardiotoxicidad en su NOAEC. Además, 3 de las 5 fórmulas no indujeron apoptosis ectópica en sus NOAEC y continuaron con las pruebas adicionales mientras que los 2 restantes fallaron la prueba de citotoxicidad. Entre las 3 que pasaron la prueba de citotoxicidad, una falló al inducir cualquier cambio en la vasculatura en su NOAEC. Pero hubo 1 que mostró actividad anti-angiogénica en su NOAEC mientras que hubo 1 que mostró actividad pro-angiogénica. Estas 2 fórmulas pasaron las pruebas de toxicidad específica de órganos y la prueba de cardiotoxicidad. Por lo tanto, hubo 3 agentes, incluyendo 1 hierba y 2 fórmulas, que pasaron los 3 niveles de pruebas.

15

20

25

Referencias

Cross, L. M., Cook, M. A., Lin, S., Chen, J. N. y Rubinstein, A. L. (2003). Rapid Analysis of Angiogenesis Drugs in a Live Fluorescent Zebrafish Assay. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 911-912.

30

Epstein, F. H. y Epstein, J. A. (2005). A Perspective on the Value of Aquatic Models in Biomedical Research. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 230, 1-7.

35

Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a Pharmacological Tool: The How, Why and When. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 504-512.

Hallare, A., Nagel, K., Kohler, H. R. y Triebkorn, R. (2006). Comparative Embryotoxicity and Proteotoxicity of Three Carrier Solvents to Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 378-388.

40

Hasan, J., Shnyder, S. D., Bibby, M., Double, J. A., Bicknel, R. y Jayson, G. C. (2004). Quantitative Angiogenesis Assays in Vivo--a Review. *Angiogenesis* 7, 1-16.

Kidd, K. R. y Weinstein, B. M. (2003). Fishing for Novel Angiogenic Therapies. *Br. J. Pharmacol.* 140, 585-594.

45

Lawson, N. D. y Weinstein, B. M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development using Transgenic Zebrafish. *Dev. Biol.* 248, 307-318.

Liekens, S., De Clercq, E. y Neyts, J. (2001). Angiogenesis: Regulators and Clinical Applications. *Biochem. Pharmacol.* 61, 253-270.

50

Parg, C., Seng, W. L., Semino, C. y McGrath, P. (2002). Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 41-48.

Risau, W. (1997). Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

55

Serbedzija, G. N., Flynn, E. y Willett, C. E. (1999). Zebrafish Angiogenesis: A New Model for Drug Screening. *Angiogenesis* 3, 353-359.

Staton, C. A., Stribbling, S. M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N. J. y Lewis, C. E. (2004). Current Methods for Assaying Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* 85, 233-248.

60

Taraboletti, G. y Giavazzi, R. (2004). Modelling Approaches for Angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 40, 881-889.

Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory use of Zebrafish.* Eugene: Univ. of Oregon Press.

65

REIVINDICACIONES

1. Un método biológico de detección de un agente para la actividad de modulación angiogénica, que comprende un sistema de ensayo de detección biológica de 3 niveles jerárquicos:
- 5 a. un primer nivel en el que se usan embriones de teleósteos para detectar un agente que tiene actividades de modulación angiogénica;
- 10 b. un segundo nivel en el que se determina la "concentración sin efecto adverso observado (NOAEC)" del agente en embriones de teleósteos a partir de una relación dosis-respuesta que describe el cambio en los efectos de anomalías graves que incluyen la muerte y la malformación causadas por diferentes niveles de concentraciones del agente;
- 15 c. un tercer nivel en el que se determina si el agente en la NOAEC inducirá algún efecto adverso a nivel de órgano y a nivel celular de los embriones de teleósteos, así como la tenencia de actividades de modulación angiogénica.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el embrión de teleósteo es un embrión de pez cebra o de medaka.
3. El método de la reivindicación 2, en el que los embriones de pez cebra o de medaka se tratan con un agente a 20 concentraciones que incluyen 7 órdenes de magnitud en el primer nivel.
4. El método de la reivindicación 2, en el que el primer momento y el último momento para añadir el agente al medio es 4 horas post-fertilización y 20 horas post-fertilización, respectivamente.
- 25 5. El método de la reivindicación 2, en el que el primer nivel comprende una etapa para la visualización y el análisis del patrón del sistema vascular en el pez cebra o en el medaka.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que el pez cebra o el medaka se examina entre 3 a 5 días después de la fertilización, y el patrón del sistema vascular se visualiza mediante la tinción de las células endoteliales con sustratos de colores o sustratos fluorescentes en peces cebra o medakas fijados, o inyectando sustratos fluorescentes en el sistema circulatorio en peces cebra o medakas vivos.
- 35 7. El método de la reivindicación 5, en el que la táctica de análisis se realiza contando el número de vasos sanguíneos intersegmentarios, bien totalmente desde la cabeza hasta la cola o bien en una región particular.
- 40 8. El método de la reivindicación 2, en el que el segundo nivel comprende una etapa para determinar la NOAEC del agente sobre el pez cebra o el medaka a diferentes concentraciones durante al menos un tiempo de exposición de 1 día.
9. El método de la reivindicación 2, en el que el tercer nivel comprende una etapa para medir el tamaño y la forma de los órganos diana.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el órgano se visualiza mediante sustratos específicos de los órganos.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que los sustratos específicos de los órganos son sustratos fluorescentes.
12. El método de la reivindicación 2, en el que la aparición de células muertas se determina en al menos 100 peces cebra o medakas por concentración en el tercer nivel.
- 50 13. El método de la reivindicación 2, en el que el tercer nivel comprende una etapa para determinar la cardiotoxicidad de los agentes.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el pez cebra o el medaka es de al menos 48 horas post-fertilización.
- 55 15. El método de la reivindicación 13, en el que los parámetros que se han a medir son la frecuencia cardíaca y la ritmicidad de los latidos del corazón.