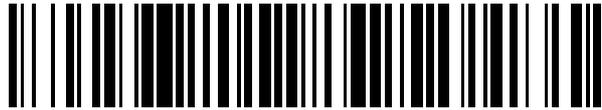


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 034**

51 Int. Cl.:

B82Y 15/00 (2011.01)

B82Y 35/00 (2011.01)

G01Q 30/04 (2010.01)

G01Q 60/42 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10725647 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2435829**

54 Título: **Método de imagenología y uso del mismo**

30 Prioridad:

28.05.2009 GB 0909128

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.11.2014

73 Titular/es:

**RIETHMÜLLER, CHRISTOPH (100.0%)
Rostockweg 25
48147 Münster, DE**

72 Inventor/es:

RIETHMÜLLER, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 523 034 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Método de imagenología y uso del mismo

- 5 Campo de la invención
- La presente invención se relaciona con un método basado en la microscopía de fuerza atómica y el uso del mismo en superficies biológicas.
- 10 Antecedentes de la invención
- Se conocen muchos métodos de imagenología para los propósitos de diagnóstico, que incluyen el uso de radioisótopos o imágenes de rayos x. Además de estos métodos, la imagenología diagnóstica se realiza en biopsias de tejidos o líquidos del cuerpo vivo para determinar la existencia o la causa de una enfermedad. En la última década se han desarrollado sistemas de formación de imágenes usando cultivos celulares de células tomadas de un paciente, con el fin de detectar marcadores que se correlacionan con las enfermedades. Estos sistemas se basan principalmente en el acoplamiento de las muestras biológicas a epitopos definidos en los que las muestras biológicas se marcan con un colorante, preferentemente un colorante fluorescente.
- 15
- 20 Las pruebas farmacológicas y los ensayos de selección de bajo rendimiento se basan también cada vez más en el cultivo de células de mamíferos (selección de alto contenido, HCS). En comparación con las pruebas de afinidad bioquímicas usadas en la selección de alto rendimiento molecular (HTS), estos bioensayos HCS ofrecen la unidad viva más pequeña para la detección de efectos adversos en un nivel menor de daño. Por lo tanto, estos pueden ayudar a evitar el estrés de los animales con compuestos farmacéuticos de plomo. Usualmente, también en ensayos basados en células, la lectura es un producto bioquímico como en chips de ADN, ARN y proteínas o inmunocitoquímica o algunas veces en experimentos electrofisiológicos.
- 25
- La microscopía de fuerza atómica (AFM) se inventó hace dos décadas y se ha convertido en una herramienta versátil para los estudios biológicos en biomoléculas sencillas, agregados, virus, células o tejidos. El método salva la brecha entre la técnica de microscopía electrónica (EM) con resolución en nm y la microscopía óptica (OM) en escala de μm . Como tal, combina las ventajas de alta resolución y la capacidad de investigar células bajo condiciones fisiológicas tamponadas. Al mismo tiempo, no se necesitan las etapas desventajosas de secado o recubrimiento de la muestra para EM o el marcaje con cromóforo como en la microscopía de fluorescencia (FM). Adicionalmente, pueden obtenerse propiedades mecánicas locales de la muestra (Riethmuller C., Schaffer T.E., Kienberger F., Stracke W. y Oberleithner H.; 2007; Ultramicroscopy 107:895-901; Rotsch C. y Radmacher M.; 2000; Biophys. J. 78:520-535). Por lo tanto, la investigación de una muestra biológica muy cercana a las condiciones fisiológicas es posible sólo con un mínimo de artefactos derivados del procedimiento.
- 30
- El registro de la topografía de la muestra biológica, incluidas las superficies celulares - vivas o fijadas - ha sido la base de los estudios de AFM biológicamente inspirados desde entonces (Braet F., de Zanger R. y Wisse E.; 1997; J. Microsc. 186 (Pt 1):84-87.; Oberleithner H., Giebisch G. y Geibel, J.; 1993; Pflugers Arch. 425:506-510; Chang L., y otros; 1993; BiophysJ. 64:1282-1286).
- 35
- La US 6,357,285 B1 describe un método para investigar la topografía de un objetivo biológico entero mediante la descripción de nuevos métodos de representación de los datos obtenidos por mediciones de AFM convencionales. Técnicamente hablando, los perfiles bidimensionales de la altura (o secciones transversales) - como los proporcionados por el programa informático del instrumento de AFM - se usan sin procesamiento adicional de los datos para un fenotipado. Después de eso, el volumen del objeto entero se calcula con la ayuda del programa informático del instrumento suministrado por el fabricante. Más específicamente, el volumen del objeto entero se obtiene al sumar todas las representaciones numéricas (valores de altura) con respecto al plano X-Y de fondo para generar el volumen. Las diferencias de altura se refieren al mínimo global de la imagen entera.
- 40
- 45
- 50
- 55 Sin embargo, aún son difíciles de identificar estructuras definidas, especialmente sobre células completas, donde sólo las estructuras del citoesqueleto se reconocen de manera obvia. Ellas se componen casi exclusivamente de actina fibrilar; las contribuciones de los microtúbulos pueden despreciarse. Sin embargo, dado que las características morfológicas son difíciles de clasificar, es difícil realizar una cuantificación reproducible. Por lo tanto, la mayoría de los estudios usan un enfoque cualitativo, más que descriptivo, de manera que frecuentemente se desea una superposición de AFM y un marcador de fluorescencia para demostrar la estructura reivindicada.
- 60 Sin embargo, la identificación de fluorescencia se ve obstaculizada por la perturbación mutua de los protocolos de fijación

5 para AFM y FM. Las características estructurales aceptadas de manera inequívoca son las fibras de estrés de actina (Haga H., Sasaki S., Kawabata K., Ito E., Ushiki T. y Sambongi T.; 2000; Ultramicroscopy 82:253-258), microvellosidades (Poole K., Meder D., Simons K. y Muller D.; 2004; FEBS Lett. 565:53-58) y uniones celulares (Riethmuller C., Oberleithner H., Wilhelmi M., Franz J., Schlatter E., Klokkers J. y Edemir B.; 2008; Biophys. J. 94:671-678). Recientemente, los organelos intracelulares también podrían ser identificados a través de sus mecánicos específicos (Riethmuller C., Schaffer T.E., Kienberger F., Stracke W. y Oberleithner H.; 2007; Ultramicroscopy 107:895-901). Más allá de eso, sólo las configuraciones muy delicadas pueden ofrecer una información más detallada; en modelos de células especiales, donde un tipo de receptor se expresa abundantemente, algunos agregados se pueden explorar sin marcador (Hoogenboom, B.W., Suda K., Engel A. y Fotiadis D.; 2007; J. Mol. Biol. 370:246-255) o con el procedimiento de TREC, donde la topografía puede registrarse simultáneamente con la localización de un objetivo específico con el uso de puntas modificadas con anticuerpos (Kienberger F., Ebner A., Gruber H.J. y Hinterdorfer P.; 2006; Acc. Chem. Res. 39:29-36).

Resumen de la invención

15 Partiendo de este estado de la técnica, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para determinar y cuantificar los elementos topográficos de superficies biológicas.

La invención proporciona un método para determinar y cuantificar los elementos topográficos de superficies biológicas usando los datos recibidos por microscopía de fuerza atómica, que comprende las etapas de

- 20 a. Preparar, in vitro, una sola célula, una monocapa celular o una sección de tejido;
 b. Predefinir una máscara en el plano xy para estructuras subcelulares de dicha célula única, monocapa celular o sección de tejido;
 25 c. Determinar el volumen de desviación local (LDV) de dichas estructuras subcelulares en dicha máscara predefinida en el plano xy, en donde el volumen de desviación local se define como una excursión a nanoescala en la dirección z sobre dicha máscara predefinida en el plano xy, en donde se evalúa el volumen local protuberante, positivo o deprimido, negativo, en comparación con el nivel promedio de la superficie de dicha máscara predefinida;
 d. Normalizar el volumen positivo o negativo dentro del área de dicha máscara predefinida;
 e. Cuantificar el volumen de desviación local;
 30 f. Analizar los datos comparándolos con los elementos topográficos característicos de una muestra calibrada;
 g. Evaluar los elementos estructurales cuantificados para obtener los conjuntos de parámetros.

35 Se pretende que el área analizada sea menor que la superficie de una célula, en donde la célula es preferentemente una célula eucariota analizada, con mayor preferencia una célula de mamífero. El uso de áreas de superposición para el análisis hace posible obtener la información general sobre un área más grande mediante el montaje de estas.

40 Los conjuntos de parámetros que se producen con el método de la invención pueden usarse para producir una imagen. Además, se pretende que la imagen que muestra los volúmenes de desviación pueda combinarse con imágenes obtenidas con el uso de fluorescencia por ejemplo, u otro marcador visible ópticamente.

45 Para la evaluación de los datos obtenidos durante la determinación del LDV puede usarse una red neuronal, en donde la red neuronal comprende preferentemente al menos tres capas. Para la persona experta en la técnica es obvio que cualquier otro algoritmo conocido es aplicable para la evaluación de los datos, incluso en la etapa de analizar los datos.

50 La determinación del LDV tiene lugar en una parte predefinida de la superficie celular, en donde la parte subdividida de la célula o de la superficie celular comprende una longitud de preferentemente 2 a 20 μm . Con respecto a la determinación del LDV se pretende que la parte subdividida de la célula comprenda un volumen de desviación en el intervalo de 0.2 a 20 μm en los ejes xy y <500 nm en el eje z.

55 La máscara predefinida en el plano xy para la determinación del LDV puede seleccionarse mediante el uso de métodos ópticos, que comprenden microscopía por contraste de fase, fluorescencia o Raman. Por lo tanto, se elige la zona de aplicación del método descrito en una modalidad adicional por microscopía óptica antes de que tenga lugar la determinación y cuantificación de los elementos topográficos de las superficies biológicas.

60 Se pretende que la muestra calibrada comprenda los datos de las estructuras topográficas o morfológicas o marcador de superficie celular. Los datos de la muestra calibrada o estándar se obtienen preferentemente por la identificación óptica de las estructuras morfológicas o marcador de superficie celular. Se usan patrones específicos para la generación de un conjunto de clasificación o una matriz de clasificación que se relaciona con una o más enfermedades. Además es posible que los datos de la muestra calibrada se obtengan al analizar la interacción del marcador bioquímico con estructuras topográficas o morfológicas.

De acuerdo con la invención, el marcador de superficie celular comprende estructuras topográficas o morfológicas como protuberancias, depresiones u otras estructuras morfológicas o combinaciones de estas o patrones específicos de tales estructuras.

5 Se pretende que el método de acuerdo con la invención se use para producir un mapa de elementos topográficos o para mapear in vivo e in vitro y cuantificar el marcador de superficie celular, las estructuras topográficas o morfológicas en las superficies celulares o las superficies de uniones celulares.

10 Se pretende que el método de acuerdo con la invención se use para la detección de un marcador de superficie celular específico, de estructuras topográficas o morfológicas relacionadas con enfermedades, en donde las enfermedades se eligen del grupo de enfermedades tumorales, cardiovasculares, nefríticas, fibróticas, inflamatorias, arterioscleróticas o auto-inmunes. Para una persona experta en la técnica es obvio que la presente invención no se limita a las enfermedades enumeradas, sino que además es aplicable a cualquier enfermedad que se acompañe de cambios topográficos o morfológicos de la superficie celular.

15 Con el método de acuerdo con la invención se pretende además determinar un marcador de superficie celular, estructuras topográficas o morfológicas como marcador diagnóstico o para dar seguimiento a los cambios del marcador de superficie celular, de las estructuras topográficas o morfológicas en la profilaxis, el diagnóstico, la terapia, el seguimiento y/o el cuidado después de una terapia en cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente. Además de esto el método es adecuado y destinado para determinar las fuerzas mecánicas o contráctiles celulares.

20 El método de acuerdo con la invención puede usarse en la producción o selección de un fármaco para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente, que comprende composiciones farmacéuticas, anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o productos químicos, pero sin limitarse a estas sustancias.

25 El método de acuerdo con la invención está destinado además a un sistema de clasificación basado en cultivos celulares para el diagnóstico. Los patrones específicos de estructuras topográficas o morfológicas estarán relacionados con cambios de la superficie celular inducidos por la enfermedad, de manera que los cambios de la superficie celular pueden usarse para la identificación de patrones específicos de la enfermedad. Adicionalmente es posible determinar la extensión local de una enfermedad, si se usan muestras de células a partir de diferentes partes del cuerpo como plantilla para el método de acuerdo con la invención.

30 La presente invención proporciona un método para determinar el volumen de desviación local (LDV) de estructuras subcelulares definidas independientemente de su caracterización bioquímica sin tener en cuenta la falta de conocimiento sobre su función exacta en la célula. El LDV definirá una excursión a nanoescala en la dirección z (altura) sobre una máscara esperada en el plano xy, sin importar si son circulares o no y si son positivas o negativas en z. Se usa una definición difusa de elementos patrones. Después, se evalúa el volumen local protuberante o deprimido en comparación con el nivel promedio de la superficie. El nuevo método se basa en la observación de que la textura superficial cambia dentro de un intervalo nanométrico en z (altura), cuando las células están en crecimiento, en desarrollo, en diferenciación o se han estresado o sufrido una transformación. Además, su función fisiológica se correlaciona algunas veces con el LDV en algún aspecto.

El tipo de estímulo conduce a alteraciones definidas en los modelos celulares objetivo. Algunos ejemplos son:

- 45 a. Las células epiteliales de los conductos colectores no sólo muestran bordes protuberantes, sino además cilios centrales, que indican el grado de diferenciación dentro de la preparación celular.
 b. Prácticamente todas las células endoteliales forman fibras de estrés, cuando se someten a un reto, lo que resulta en un citoesqueleto marcadamente estructurado, cuya cuantificación daría un factor de estrés.
 50 c. Las células del túbulo renal reaccionan a un aumento de la tensión intracelular mediante el refuerzo de sus uniones (no publicado). El LDV en el borde celular puede tomarse como una medida de la reactancia de una capa de células contra el estrés.
 d. Las células endoteliales son la clave para el control de la invasión de leucocitos en un tejido inflamado. El proceso de la trans migración no se entiende totalmente, pero el papel del endotelio se ha subestimado.

55 Recientemente, encontramos que la célula endotelial se ablanda por debajo del leucocito para dejarlo pasar (no publicado). Para iniciar este paso, el endotelio se prepara al alterar su LDV en los sitios putativos de la trans migración. La cuantificación de este LDV puede usarse para dar un índice (pro-) inflamatorio.

60 Cuando se cuantifican, las alteraciones enumeradas anteriormente pueden usarse para determinar el estado de una célula en diversos tipos de modelos celulares de enfermedades hasta el desarrollo de ensayos de diagnóstico. Una ventaja de este

método es su aplicabilidad a las células en biomateriales, los cuales no son adecuados para la microscopía óptica como los metales, minerales o membranas microporosas. La unión exitosa de Bio-AFM con procedimientos de diagnóstico no se ha reportado hasta ahora.

5 Es posible aplicar el método de la invención en datos conocidos del eje xy con el objetivo de registrar los datos para el eje z o para obtener el volumen de desviación local.

10 Los datos de la muestra estándar se obtienen preferentemente mediante la identificación óptica de un marcador de superficie celular o de estructuras morfológicas. Se usan patrones específicos para la generación de un conjunto de clasificación o una matriz de clasificación que se relaciona con una o más enfermedades.

Aquí se abre una posibilidad de clasificar y cuantificar la nanoarquitectura tridimensional de las células como un enfoque holístico para evaluar el estado biológico de la célula.

15 Descripción detallada de la invención

La invención se describirá adicionalmente mediante figuras y ejemplos sin limitarse a las modalidades descritas:

20 La invención se basa en los resultados experimentales de que la textura superficial cambia en la nanoescala cuando las células se desarrollan, se estresan o sufren una transformación. Con el uso del método de acuerdo con la invención por primera vez fue posible mostrar que el tipo de estímulo conduce a alteraciones definidas en los modelos celulares objetivo.

Las muestras y la AFM se realizaron de la siguiente manera:

25 Preparación de muestras

Las células vivas se sometieron a la obtención de imágenes por AFM directamente en el medio de cultivo o en tampón fisiológico HEPES (en el modo de contacto con el uso de puntas estándar de AFM recubiertas con oro) sin preparación adicional.

30

Muestras fijadas

35 Después de intervalos de tiempo determinados por el modelo experimental y la pregunta específica, las muestras de células se fijaron con glutaraldehído (0.05 % a 5 % de concentración final durante 1-100 min en medio de cultivo bajo condiciones fisiológicas (37 °C, 19 % de O₂, 5 % de CO₂) o en tampón a temperatura ambiente. Cuando fue aplicable, las membranas de filtro se cortaron y se sometieron a la obtención de imágenes de AFM por contacto en solución tamponada HEPES a temperatura ambiente (20 °C). Las imágenes se tomaron con un Bioscope (Nanoscope IIIa Controller, Digital Instruments, CA, Santa Bárbara, EUA) con el uso de puntas MLCT-AUNM recubiertas con oro (constante elástica 0,01 N/m) en el modo de contacto.

40

AFM

45 Para obtener la resolución máxima de la altura en z, la AFM se montó en una construcción diseñada especialmente para reducir al mínimo el ruido mecánico ambiental. Para aislar la estructura de instalación de la vibración, se puso en una mesa amortiguada por aire, que a su vez porta una plataforma suspendida en cuerdas de goma. Además, toda la construcción se protegió mediante una campana acústica recubierta con espuma. Adicionalmente, se realizó una cuidadosa conexión a tierra de las partes metálicas para reducir el ruido eléctrico. Los parámetros en el programa informático siempre se optimizaron para el ruido más bajo y la menor generación de artefacto. El ruido de la instrumentación con el uso de condiciones como se indican más abajo se midió en mica atómicamente plana para producir < 0.5 nm de rugosidad promedio. La fuerza ejercida sobre la muestra se mantuvo por debajo de 5 nN, las velocidades de barrido fueron 0.5-10 Hz/línea y la resolución digital usualmente fue de 128² a 1024² píxeles.

50

55 Las imágenes se procesaron con el uso del programa informático Nanoscope, versión 5.12b48 que se suministra por el fabricante (Digital Instruments). El análisis y la presentación de las imágenes se realizó con el programa informático SPIP (Scanning probe image processor V 3.3.9, Image Metrology, Lyngby, Dinamarca).

55

60 Obtención de imágenes de volumen de fuerzas: Para obtener el Módulo de Young (YM) que cuantifica la rigidez de las muestras, se registraron 64*64 conjuntos de curvas de fuerza-distancia en el modo "volumen de fuerzas" que registra la deflexión de la micropalanca (en nm) como una función del alargamiento piezoeléctrico (distancia en z en nm). La velocidad de desplazamiento piezoeléctrico en z se mantuvo por debajo de 10 µm/s. Con el objetivo de reconstruir los mapas

60

respectivos para la altura y el Módulo de Young (YM), los datos en bruto se procesaron con una rutina escrita para el programa informático "Igor Pro" basado en el modelo de elasticidad de Hertz como se describe en estudios anteriores por M. Radmacher y otros (Science, 1992; 257:1900).

5 Los siguientes ejemplos se realizaron usando el método de acuerdo con la invención:

1. Determinación de un "factor de estrés"

10 Prácticamente todas las células reaccionan al estrés cuando se someten a un reto, lo que resulta en un citoesqueleto marcadamente estructurado, cuya cuantificación daría un "factor de estrés".

Aislamiento y cultivo celular:

15 Las células se cultivan por protocolos biológicos estándar aplicables para el cultivo de células específicas. Las células vivas son extremadamente blandas - especialmente a 37 °C cuando la superficie celular básicamente es un fluido, así como el citosol. Por lo tanto, a cargas mecánicas pequeñas, ellas se deforman fácilmente hasta que una estructura más dura se vuelve detectable, la cual representa haces de actina polimérica. Estas fibras se reorganizan rápidamente en las células tras estímulos fisiológicos o nocivos. Los mediadores de esta señalización pro-fibrótica pueden ser citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas (peptídicas), etc. Debido a las características mecánicas alteradas, la función fisiológica de las células puede inhibirse, lo que conduce finalmente a un estado celular fisiopatológico.

Resultados

25 A través de un análisis morfométrico mediante el método de acuerdo con la invención, puede cuantificarse la cantidad de formación de fibras. Además, las mediciones de rigidez (cuantificación mecánica a través de la determinación del módulo de Young) pueden dar la suma de los efectos locales.

30 Hasta ahora las fibras celulares se han investigado mediante microscopía de fluorescencia, que usualmente requiere muestras fijadas y no produce resultados cuantitativos. El último método tiene la desventaja de un fondo con gran fluorescencia debido a la GFP-actina monomérica. Adicionalmente, requiere medios ópticamente transparentes, preferentemente vidrio para cultivar las células sobre ellos.

2. Determinación de la diferenciación celular

35 Las células epiteliales de los conductos colectores exhiben bordes protuberantes, cuando están altamente diferenciadas. Además, los cilios centrales también se desarrollan, lo que puede indicar el grado de diferenciación dentro de la preparación celular.

Aislamiento y cultivo celular:

40 Las células epiteliales de los conductos colectores de la médula interna (IMCD) se prepararon de la siguiente manera: Brevemente, las médulas internas de ratas Wistar sacrificadas se retiraron, se cortaron en piezas pequeñas y se digirieron en PBS (Biochrom, Berlín, Alemania) que contenía 0.2 % de hialuronidasa (Sigma, Alemania) y 0.2 % de colagenasa tipo CLS-II (Sigma, Alemania) a 37 °C durante 90 min. Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágeno tipo IV (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania) a una densidad de aproximadamente 10^5 células/cm² y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml, 0.2 % de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales. La osmolaridad se ajustó a 600 mosmol/l mediante la adición de NaCl 100 mM y urea 100 mM. Para mantener la expresión de AQP2 se añadieron 10 µM de di-butiril-cAMP. Las células se cultivaron durante 5-7 días y el dbcAMP se eliminó 14-18 h antes de los experimentos.

Resultados

55 Las imágenes de AFM de las células IMCD obtenidas con el método de acuerdo con la invención demostraron por primera vez, que las estructuras del borde celular no necesariamente se invaginan, sino que pueden sobresalir hasta 300 nm por encima del nivel del cuerpo celular. El volumen de desviación local (LDV) se correlaciona con el grado de diferenciación del tejido. Este último puede estimarse a partir de la regularidad de la red hexagonal de las células. Otro indicador es la existencia de abultamientos centrales, que miden alrededor de 1 µm (que incluye la circunvolución de la punta) de diámetro y de 0.5 hasta 2 µm de altura. Estas sólo pueden interpretarse como cilios centrales, sensores de flujo de las células, que aparecen preferentemente en regiones muy bien desarrolladas. Estas estructuras pueden tomarse para indicar el grado de diferenciación, tanto por su altura como por el LDV.

3. Determinación de la tensión celular

Las células tubulares renales responden a una tensión intracelular elevada mediante el refuerzo de sus uniones. Posteriormente forman un cierre, cuyo LDV puede tomarse como una medida indirecta de la reactancia al estrés.

Aislamiento y cultivo celular

La línea de células epiteliales NRK-52E (que se clonó de una mezcla de células de riñón de rata normales) se recibió del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las células se propagaron y se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) que contiene 4.5 g/l de D-glucosa y 3.7 g/l de NaHCO₃ (Biochrom, Berlín, Alemania) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (PAA, Linz, Austria), 2 mM de L-glutamina (Biochrom, Berlín, Alemania) así como 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Biochrom). Las células se pasaron rutinariamente una vez a la semana (1:10). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ - 95 % de aire. Las células se sembraron en placas de 6 y 12 pocillos que contenían cubreobjetos de 15 mm o 24 mm que estaban parcialmente recubiertos con oro (50 nm) para los experimentos de AFM. Las células se cultivaron hasta la confluencia en todos los sustratos usados y el medio de cultivo celular se cambió 24 h antes de cualquier experimento.

Resultados

Las células controles aparecen como lo hacen las células epiteliales típicas; forman una capa similar a adoquines con regiones nucleares altas, decoradas por microvellosidades y separadas por bordes celulares como surcos. Después de la estimulación con citocinas durante al menos 30 h, no sólo desarrollan fibras de estrés y su forma se alarga, sino además forman bordes celulares puntuados. Estos bordes finalmente sobresalen por encima del nivel citosólico hasta 300 nm. Este efecto se acompaña de un aumento en la rigidez general de la célula de 70 %. Obviamente las protuberancias son una respuesta contra-reguladora de las células a una tensión intracelular elevada. Una cuantificación del LDV da una medida del grado de transdiferenciación de un estado epitelial a uno mesenquimal. Se ha demostrado que esta medida es sensible a agentes inhibidores de fuerza y por lo tanto puede informar sobre el estado de tensión de un cultivo celular y su función fisiológica de barrera.

4. Determinación del estado inflamatorio

Las células endoteliales son claves para el control de leucocitos que invaden un tejido inflamado. El proceso de trans migración (diapédesis) no se entiende totalmente, pero el papel del endotelio se ha subestimado. Los inventores fueron capaces de demostrar que el citoesqueleto endotelial se ablanda por debajo del leucocito para dejar que este pase (datos no publicados). Para iniciar esta etapa, el propio endotelio se prepara al alterar su LDV en los sitios putativos de la trans migración. La cuantificación del LDV en estas regiones daría un valor estimado de un índice proinflamatorio.

Aislamiento y cultivo celular

Cordones umbilicales humanos se obtuvieron a partir de partos normales. Las células endoteliales (HUVEC) se prepararon como se describió. Brevemente, las venas se trataron con colagenasa y se cultivaron en matraces de cultivo recubiertos con gelatina en una cámara humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂ en Medio M199 (Gibco, comprado a través de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contenía penicilina/estreptomycin, heparina y 10 % de suero humano aislado recientemente. 10 h antes de la obtención de las imágenes, se estimularon con citocinas proinflamatorias, que además pueden reclutar del grupo de las interleucinas, hormonas, factores de crecimiento, etc.

Resultados

Después de haber desarrollado un tipo especial de método de manipulación de AFM ("nano-cirugía") para eliminar específicamente los leucocitos adheridos firmemente (Riethmüller 2008, ver anteriormente), los inventores encontraron el borde del sitio de interacción decorado con protuberancias similares a filopodios. Estas protuberancias capturan al leucocito para envolverlo. Mecánicamente ellos son más blandos que el citosol y miden 150 nm de altura y hasta 2 µm de longitud. Estas protuberancias similares a dedos son propulsadas a partir de la superficie endotelial, lo que demuestra así el papel esencial de las células endoteliales en la diapédesis. Por lo tanto, la cuantificación de estas estructuras morfológicas podría dar un parámetro de lectura disponible para la capacidad trans migratoria (permisividad) de un cultivo de células endoteliales. Esto podría ayudar a estimar el potencial pro- o antiinflamatorio de compuestos farmacéuticos en ensayos basados en células.

Las figuras muestran

- 5 Fig. 1 A) Perfiles de altura sobre la superficie de células epiteliales bajo condiciones fluidas tamponadas como se describe en el ejemplo 3). Se muestra un perfil representativo de una muestra control (izquierda) y una estimulada (derecha). Una protuberancia típica de 150 nm de altura y 1.5 μm de diámetro está marcada por triángulos (derecha).
- 10 B) Distribución de tamaño del volumen de desviación local (LDV) derivado de estructuras superficiales específicas. Los histogramas que muestran el LDV de protuberancias de la membrana se dan en células epiteliales renales control o estimuladas por citocinas en cultivo. El valor más probable de LDV cambia de 0.6 a 1.9 μm^3 después de tres días de tratamiento con citocinas.
- 15 Fig. 2 Intervención farmacológica cuantificada a través de LDV específico. En un modelo celular de inflamación, los valores de LDV se cuantifican y se dividen por la longitud del borde celular para producir el LDV específico independiente del tamaño de la célula. La inhibición de la señalización inducida por citocinas redujo el LDV específico casi a los valores del control.

Reivindicaciones

1. Método para determinar y cuantificar los elementos topográficos de superficies biológicas usando los datos recibidos por microscopía de fuerza atómica, que comprende las etapas de
 - a. Preparar, in vitro, una sola célula, monocapa celular o sección de tejido;
 - b. Predefinir una máscara en el plano xy para estructuras subcelulares de dicha célula única, monocapa celular o sección de tejido;
 - c. Determinar el volumen de desviación local (LDV) de dichas estructuras subcelulares en dicha máscara predefinida en el plano xy, en donde el volumen de desviación local se define como una excursión a nanoescala en la dirección z sobre dicha máscara predefinida en el plano xy, en donde se evalúa el volumen local protuberante, positivo o deprimido, negativo, en comparación con el nivel promedio de la superficie de dicha máscara predefinida;
 - d. Normalizar el volumen positivo o negativo dentro del área de dicha máscara predefinida;
 - e. Cuantificar el volumen de desviación local;
 - f. Analizar los datos comparándolos con los elementos topográficos característicos de una muestra calibrada;
 - g. Evaluar los elementos estructurales cuantificados para obtener los conjuntos de parámetros.
2. Método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el área analizada es menos que la superficie de una célula, en donde la célula es preferentemente una célula eucariota analizada, con mayor preferencia una célula de mamífero.
3. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde las áreas de superficie celular se superponen para agruparlas en un área más grande.
4. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 3, en donde se usa una red neuronal para la evaluación de los datos, en donde la red neural comprende al menos tres capas.
5. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 4, en donde la parte subdividida de la célula comprende una longitud de preferentemente 2 a 20 μm .
6. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 5, en donde la parte subdividida de la célula comprende un volumen de desviación en el intervalo de 0.2 a 20 μm en los ejes xy y <500 nm en el eje z.
7. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra calibrada comprende datos de un marcador de la superficie celular, de estructuras topográficas o morfológicas.
8. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el marcador de superficie celular, las estructuras topográficas o morfológicas comprenden protuberancias, depresiones u otras estructuras morfológicas o combinaciones de estas o patrones específicos de tales estructuras.
9. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los conjuntos de parámetros se usan para producir un mapa de elementos topográficos.
10. El uso de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el mapeo in vivo e in vitro y la cuantificación del marcador de superficie celular, las estructuras topográficas o morfológicas sobre superficies celulares o superficies de uniones celulares.
11. El uso de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la detección de marcador de superficie celular específico, de estructuras topográficas o morfológicas relacionadas con enfermedades, en donde las enfermedades se eligen del grupo de enfermedades tumorales, cardiovasculares, nefríticas, fibróticas, inflamatorias, arterioscleróticas o auto-inmunes.
12. El uso de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para:
 - determinar un marcador de superficie celular como marcador de diagnóstico; o
 - determinar estructuras topográficas como marcador diagnóstico; o
 - determinar estructuras morfológicas como marcador diagnóstico; o
 - determinar fuerzas mecánicas celulares; o
 - determinar fuerzas contráctiles; o
 - un sistema de clasificación basado en cultivo celular para el diagnóstico.

- 5
13. El uso de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para dar seguimiento a los cambios de marcador de superficie celular, las estructuras topográficas o morfológicas en la profilaxis, el diagnóstico, la terapia, el seguimiento y/o cuidados posteriores a una terapia en cualquiera de las enfermedades de la reivindicación 11.
14. El uso de un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la producción o selección de un fármaco para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades de la reivindicación 11, que comprende composiciones farmacéuticas, anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o productos químicos.
- 10
15. El uso de un método de conformidad con las reivindicaciones 1 a 9, en donde la máscara predefinida en el plano xy para la determinación del LDV se determina mediante métodos ópticos, que comprenden microscopía por contraste de fase, fluorescencia o Raman.

Fig. 1

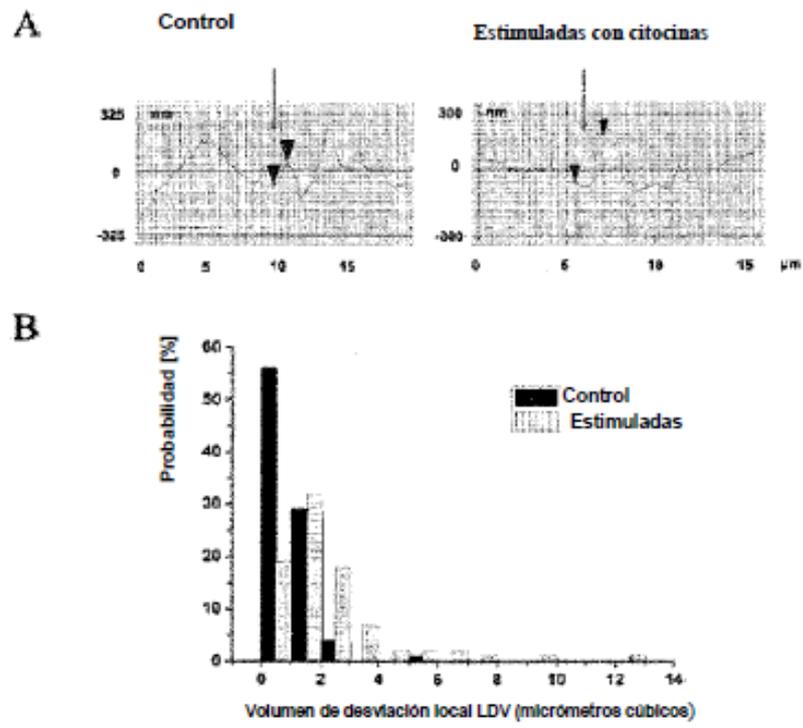


Fig. 2

