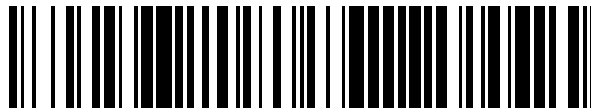


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 367**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2011 E 11305122 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2492340**

54 Título: **Substrato blando para cultivo celular y procedimiento para preparar el mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2015

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**TSENG, QINGZONG y
THERY, MANUEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 538 367 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

Substrato blando para cultivo celular y procedimiento para preparar el mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir un substrato blando y al substrato blando producido por él, en particular un substrato blando microimpreso, siendo dicho substrato particularmente útil para el cultivo celular

Antecedentes de la invención

Las propiedades geométricas y mecánicas del micromedio celular tienen un profundo impacto en la morfogénesis y funciones celulares. Afectarán a la arquitectura del citoesqueleto celular, polaridad, migración, división, crecimiento y diferenciación. Se han preparado biomateriales para revelar estos efectos, investigar los mecanismos por los que regulan las funciones celulares y finalmente controlarlas para diseñar nuevas herramientas para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

La geometría del micromedio se ha controlado con técnicas de microimpresión. Se usaron para controlar la localización de moléculas adhesivas de la matriz extracelular (ECM) y por ello controlar la posición y forma de la célula individual (Damljanovic V, et al., *Biotechniques* 2005; 39, 847-851). El control de la forma celular usando micropatrones adhesivos es un método eficiente. De hecho, los micropatrones adhesivos revestidos con ECM permiten la normalización de la forma de células individuales y un control preciso de la distribución espacial de la adhesión focal y cables de actina (Parker et al., 2002, *FASEB J* 16, 1195-1204; They et al., 2006, *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 341-355; They et al., 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19771-19776). Las geometrías apropiadas pueden imponer restricciones de orientación exigentes al ensamblaje de actina, y reducir la variabilidad célula-célula.

La mecánica del micromedio también se ha controlado con substratos blandos. Ambos parámetros, geometría y mecánica, se deben controlar sobre el mismo material para recapitular fielmente las condiciones fisiológicas que encuentran las células en el tejido y controlar totalmente las señales físicas a las que son sensibles. El control de la forma celular en substratos deformables se ha realizado usando varias herramientas microfabricadas en geles de poliacrilamida (PAA) o conjuntos de micropilares. Sellos micromoldeados (Damljanovic V, et al., *supra*), estarcidos (Parker et al., 2002, *FASEB J* 16, 1195-1204; Wang et al., 2002, *Cell Motil Cytoskeleton* 52, 91-106) o canales microfluídicos (Engler AJ, et al., 2004, *J Cell Biol*, 166, 877-887) se usaron para depositar localmente proteínas del ECM sobre PA químicamente activada. La impresión por microcontacto se usó para imprimir proteínas de la ECM sobre conjuntos de micropilares (Liu et al., 2002, *FASEB J*, 16, 1195-1204; Ruiz et al., 2008, *Stem Cells*, 26, 2921-2927; Tan et al., 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 1484-1489; Fu et al., 2010, *Nat Methods*, 7, 733-736). El documento WO 2010/011407 describe también métodos para generar substratos blandos impresos.

La geometría y mecánica del micromedio afectan a la arquitectura celular y funcionan notablemente modulando la producción celular de fuerzas. Las células se unen a su micromedio y ejercen fuerzas de tracción vía la contracción dependiente de miosina de su citoesqueleto de actina. En células no migratorias espacialmente confinadas, se forman fibras de tensión a lo largo de bordes celulares y se aplican fuerzas de tracción en los ápices celulares. Las fibras de tensión parecen más fuertes cuando no hay disponible ECM para la adhesión celular en ápices celulares. La rigidez del micromedio afectará a la magnitud de las fuerzas: cuanto más rígido el sustrato, mayores las fuerzas de tracción. El nivel de orientación de las fuerzas de tracción afecta a la organización intracelular, notablemente al posicionamiento del núcleo, posicionamiento del centrosoma, crecimiento del cilium primario y al tráfico intracelular. Por tanto, es un importante regulador de la polaridad celular. La contractilidad celular también gobierna la extensa remodelación del citoesqueleto durante la migración celular y la división. La contractilidad celular no sólo regula la arquitectura celular y la organización interna, sino también afecta el destino celular. Promueve el crecimiento celular y dirige la diferenciación de células madre. Considerando este amplio impacto de la contractilidad del citoesqueleto de actina en la fisiología celular, no es de extrañar que la mala regulación de la producción de fuerza esté implicada en la transformación tumoral. La desorientación de la polaridad, el posicionamiento celular desordenado y el crecimiento amplificado son características tumorales que se pueden inducir por la contractilidad celular elevada.

Dos métodos principales para medir fuerzas de tracción celular se basan en la deformación del substrato de cultivo celular. Sin embargo, ambos tienen limitaciones en la fabricación del sustrato y el análisis de la fuerza.

Entre los diferentes métodos que se están desarrollando para la medición de fuerza, la microscopía de fuerza de tracción (TFM) es uno de los más utilizados. Sin embargo, debido a su bastante complicada etapa de procesamiento de datos, esta técnica aún es exclusiva de algunos grupos especializados. No obstante todos los materiales necesarios para realizar TFM son casi equipos y reactivos de rutina en un laboratorio biológico ordinario.

La TFM clásica propuesta por Dembo and Wang (1999, *Biophys J* 76, 2307-2316) se realizaba en gel de poliacrilamida (PAA). Básicamente, el gel de PAA se preparaba con micropartículas fluorescentes añadidas a la disolución. A continuación, el gel formado sobre un cubreobjetos activado se activaba con un reactivo bifuncional, Sulfo-SANPAH) y exposición a luz ultravioleta, El gel se revestía a continuación homogéneamente con proteína de matriz extracelular (ECM) para hacer el gel disponible para adhesión celular. Cuando las células se unían al gel,

5 debido a la fuerza de tracción ejercida por la célula, el sustrato blando se deformaba y de este modo las partículas se desplazaban. Comparando la imagen de las partículas desplazadas y otra imagen de la posición original de las partículas tomada después de separar la célula (por ejemplo, por tratamiento con tripsina), se puede obtener el campo de desplazamientos. La fuerza de tracción se podría por lo tanto obtener resolviendo un problema inverso desplazamiento-fuerza.

La activación del gel de PAA con sulfo-SANPAH es una etapa bastante variable que da como resultado una activación no homogénea y no reproducible del sustrato

10 Un segundo método, cultivo celular sobre pilares microfabricados, permite un cálculo de la fuerza mucho más simple y de este modo más rápido (du Roure et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102, 2390-2395; Tan et al., 2003, Proc Natl Acad Sci Usa 100, 1484-1489. Sin embargo el sustrato requiere varias etapas de microfabricación no triviales. Además, los micropilares no soportan la desecación del disolvente, y la topografía del sustrato puede afectar al comportamiento celular.

15 La microimpresión sobre gel de PAA se ha realizado con estarcidos (Parker et al., 2002, supra; Wang et al., 2002, Cell Motil Cytoskeleton 52, 91-106), o sellos microestructurados (Engler et al., 2004, Cell 126, 677-689; Tan et al., 2003, supra), pero la resolución de microimpresión es relativamente baja. En ambos casos, la microimpresión requiere varias etapas de microfabricación, haciendo todo el procedimiento largo y difícil de realizar.

Por consiguiente, el desarrollo de sustrato con blandura ajustable, en particular sustrato microimpreso, constituye un importante paso adelante hacia la fabricación de un micromedio controlado que es muy similar a las condiciones in situ.

20 Por lo tanto aún existe una necesidad en la técnica de métodos para producir geles blandos que se puedan diferenciadamente funcionalizar, microimprimir y activar homogéneamente, y que se puedan producir fácilmente con una reproducibilidad y resolución mejoradas.

25 Los inventores desarrollaron un nuevo método rápido y eficiente de microimpresión sobre sustrato blando en el que no se requería herramienta microfabricada excepto la fotomáscara comercialmente disponible. El método ha sido validado controlando la forma, arquitectura del citoesqueleto y producción de fuerza de tracción de células epiteliales mamarias humanas.

Sumario de la invención

30 El principal objetivo de esta invención es proporcionar nuevos sustratos que permiten el cultivo celular, en particular el cultivo celular sobre sustratos blandos microimpresos. Los sustratos blandos de la presente invención presentan una mayor resolución espacial y permiten una mejor absorción de biomoléculas, tales como proteínas, que los sustratos usados actualmente. Adicionalmente, el procedimiento para producir sustratos blandos de la invención es más simple y más rápido que los procedimientos ya descritos ya que implica menos etapas de microfabricación.

35 En esta invención los inventores diseñaron un nuevo procedimiento para preparar sustratos blandos particularmente útiles para cultivo celular, que incluyen una etapa clave de polimerización de gel in situ sobre la máscara.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1: Comparación de un gel de poli(acrilamida) impresa con fibronectina fluorescente según la invención (Fig. 1A) y un gel polimerizado antes de ser puesto en contacto con la máscara para la exposición a UV (Fig. 1B). La barra de escala representa 30 μm .

45 En la Fig. 1C: Las células se han tripsinizado y depositado sobre geles de PA activados con el método de activación de sulfo-SANPAH sobre geles de PA activados con UV profundo y en placa Petri (hecha de poliestireno tratado con plasma) como control. Se tomaron imágenes 2 horas así como 72 horas después de la deposición de las células. Aunque las células solo han comenzado a unirse sobre PA tratado con sulfo-SANPAH después de 2 h, la mayor parte de ellas han comenzado o completado su fase de expansión sobre PA tratada con UV profundo sobre placa Petri. 72 horas después de la deposición, pocas células se han expandido localmente sobre PA tratada con sulfo-SANPAH pero no proliferaron, mientras que han proliferado por toda la PA tratada con UV profundo o placa Petri.

Figura 2 – Microimpresión de gel de PAA.

50 FIG. 2A: Método de microimpresión de PAA. El gel se polimeriza sobre la fotomáscara, se expone a UV profundo y se reviste con proteínas de ECM. Las células se unen específicamente a las regiones expuestas a UV.

FIG. 2B: Revestimiento de fibronectina y fibrinógeno-A546 sobre PAA microimpresa. La barra de escala representa 10 μm .

FIG. 2C: Revestimiento de fibronectina y fibrinógeno-A546 sobre PAA microimpresa. La barra de escala representa

500 μm .

FIG. 2D: Células MCF10A (contraste de fase) depositadas en micropatrón de forma de ballesta (rojo) sobre PAA. Las células se unen específicamente y sobre micropatrones. La barra de escala representa 100 μm .

Figura 3 -. El dibujo del contorno del citoesqueleto de actina normaliza el campo de fuerza de tracción celular.

5 FIG. 3A: La geometría del micropatrón orienta la arquitectura de la red de actina. Se depositaron células MCF10A individuales en portaobjetos de vidrio, revestidos de fibronectina, no impresos, o en micropatrones de fibronectina en forma de disco, o come cocos (pacman) o ballesta. Las células se fijaron y se tiñeron con faloidina para revelar filamentos de F-actina. Las células forman preferentemente manojos de F-actina contráctil, o fibras de tensión, sobre regiones no adhesivas.

10 FIG. 3B: Se usaron partículas incrustadas en gel para calcular la fuerza de tracción celular con citometría de tracción por transformada de Fourier. Las imágenes de partículas se tomaron antes y después de la separación de las células con tripsina para visualizar la deformación del gel por las fuerzas de tracción celular. El desplazamiento de las partículas se detectó y procesó automáticamente para inferir el campo de fuerza de tracción correspondiente (ver Materiales y Métodos). La imagen derecha es una imagen con zoom de la zona cuadrada mostrada en la imagen de la izquierda.

15 FIG. 3C: El cálculo del campo de fuerza de tracción muestra que la célula exhibe una distribución espacial de tensión impredecible en células no impresas e impresas con forma de disco. Las células impresas sobre come cocos y ballesta, desarrollan fuerzas de tracción mejoradas en los sitios de adhesión que flanquean las regiones no adhesivas.

20 FIG. 3D: La superposición y el promediado de los campos de fuerza de tracción destacan la variabilidad de campo de fuerza de tracción en las células sin patrones. Las células no impresas se alinearon usando la posición de su núcleo. Los campos de fuerza se cuantificaron más precisamente en las células microimpresas. Los micropatrones de forma de ballesta concentran reproduciblemente la localización de las fuerzas de tracción celular en la parte inferior de la barra vertical.

25 La barra de escala es de 10 μm . La magnitud de la tracción se da en Pascales.

Figura 4 – La medida simple de la deformación del micropatrón permite una fácil, rápida y precisa cuantificación de la fuerza.

30 Figura 4A: Se usó revestimiento de Fibrinógeno-Alexa 546 para medir la deformación del micropatrón. Las imágenes de micropatrones se tomaron antes y después de la separación celular con tripsina para visualizar la deformación del micropatrón por fuerzas de tracción celular.

35 FIG. 4B: Los dibujos representan la forma del micropatrón antes y después de la separación de la célula. La longitud de deformación del micropatrón correspondía a la distancia entre las dos flechas. A continuación, la deformación del micropatrón se representó frente a la fuerza de tracción total ejercida por la célula. Los puntos de los datos se ajustaron con una regresión lineal (línea continua). En discos, la deformación del micropatrón no podía predecirse. Se midió a lo largo de un eje vertical arbitrario. La correlación en este caso entre la tracción total y la deformación del micropatrón no era buena.

FIG. 4C: Cuando la deformación del disco se midió a lo largo del eje que muestra la mayor deformación, la correlación era mejor.

40 FIG. 4D: En micropatrones de forma de come cocos la correlación no era buena dado que la deformación era bastante pequeña y estaba asociada a grandes errores.

FIG. 4E: En micropatrones de forma de ballesta la fuerza de tracción total de la célula se podía correlacionar directamente con la deformación del micropatrón con una pequeña desviación del ajuste lineal. Esta curva de calibración se usó en los siguientes experimentos.

45 FIG. 4F: Nueva metodología para medir fuerzas de tracción celular sin medidas de desplazamiento de partículas o cálculo del problema inverso.

Figura 5 - Aplicaciones de medidas de fuerza a gran escala para el análisis de la transformación tumoral.

50 FIG. 5A: Fuerzas de tracción celular en respuesta a blebistatina calculadas con el método ilustrado en la figura. 4F. Se aplicaron concentraciones crecientes de fármaco sucesivamente a 6 células. Los contornos del micropatrón muestran una relajación del micropatrón representativa al incrementar las concentraciones de fármaco. En el gráfico, se renormalizaron las tracciones celulares máximas en ausencia de blebistatina. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se ajustaron con un sencillo decaimiento exponencial (línea continua) para calcular la IC50, es decir, la concentración de fármaco para la mitad de efecto.

FIG. 5B: Fuerzas de tracción celular con el tiempo en respuesta a 50 μM de blebistatina calculadas con el método ilustrado en la figura. 4F. Los contornos del micropatrón muestran una relajación representativa del micropatrón con el tiempo. Las medidas se realizaron en una sola célula. Los datos se ajustaron con un sencillo decaimiento exponencial (línea continua).

- 5 FIG. 5C: Fuerzas de tracción celular calculadas con el método ilustrado en la figura. 4F en células MCF10A mutantes o tratadas con fármaco que imitan la transformación tumoral. Las células MCF10A WT se compararon con células "knockdown" CK2b, células inducibles ErbB2 y células tratadas TGF β 1. La comparación entre dos conjuntos de medidas se realizó usando un test de la t de Student: con dos colas, intervalo de confianza del 95%: * = $P < 0,05$ ** = $P < 0,01$ *** = $P < 0,001$.

10 Descripción detallada de la invención

Un primer objetivo de la presente invención es un procedimiento para producir un sustrato blando particularmente útil para cultivo celular, preferentemente un sustrato blando microimpreso, que comprende las etapas de:

- (a) producir un polímero entre una capa base y una máscara de transparencia que comprende por lo menos un área transparente y opcionalmente por lo menos un área no transparente,
- 15 (b) exponer el polímero a UV profundo a través de la máscara,
- (c) separar la máscara del polímero,
- (d) poner en contacto el polímero con una biomolécula, y
- (e) opcionalmente retirar por lavado el exceso de biomolécula.

Descripción de las etapas del procedimiento:

- 20 Etapa (a):

La etapa (a) comprende la producción de un polímero entre una capa base y una máscara de transparencia.

- La capa base puede ser cualquier sustrato apropiado para soportar el polímero. Preferentemente, el sustrato puede estar formado de un material rígido o semirígido, tal como plástico, metal, cerámica, vidrio o sus combinaciones. Preferentemente, el material es conveniente para microcopias confocal, óptica y/o fluorescente. En la realización más preferida, el sustrato está hecho de vidrio, preferentemente vidrio silanizado. Típicamente, el sustrato es plano. Por ejemplo, un sustrato conveniente según la presente invención es un cubreobjetos o un portaobjetos.
- 25

- El polímero producido puede ser cualquier polímero sintético biocompatible, en particular polímero que forma gel. La polimerización se puede efectuar por cualquier medio conocido por uno de experiencia media en la técnica mediante la aplicación de los reactivos de polimerización. Por ejemplo, el polímero producido según la etapa (a) puede ser un polietilenglicol o poli(acrilamida) (PAA). También puede ser un copolímero formado con acrilamida y cualquier otro polímero, tal como polietilenglicol o polipirrol.
- 30

- Según la invención, los reactivos de polimerización se añaden preferentemente en forma de disolución sobre la máscara y a continuación, se le aplica la capa base, para formar un "sándwich" entre la capa base y la máscara. La polimerización se produce a continuación y el polímero formado puede presentar rigidez finamente ajustada.
- 35

- El polímero puede ser más particularmente cualquier hidrogel basado en ácido acrílico construido por polimerización de radicales libres, tal como poli(acrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), o poli(metacrilato de 2-hidroxietilo). La acrilamida monomérica se puede reticular con cualquier grupo diacrilato, tal como dimetacrilato de etilenglicol y dimetacrilato de 1,4-butanodiol, o preferentemente con N,N'-metilbisacrilamida. La rigidez de la acrilamida polimerizada se puede ajustar variando la relación de agente de reticulación a la subunidad de acrilamida. A modo de ejemplo, cuando se prepara una poli(acrilamida), variando las cantidades relativas de acrilamida monomérica y bisacrilamida, la rigidez del gel de poli(acrilamida) resultante se puede incrementar (usando una cantidad relativa más alta de bisacrilamida) o disminuir (usando una menor cantidad relativa de acrilamida) (ref.: Yeung et al., Cell Motility and the Cytoskeleton 60:24-34, 2005).
- 40

- Además, la rigidez del gel producido se puede modificar copolimerizando la acrilamida con otros polímeros, tales como polipirrol y polietilenglicol. La acrilamida se puede copolimerizar con grupo poli(acetileno) tal como polipirrol y polianilina para dar lugar a un polímero conductor.
- 45

- Por ejemplo, una relación en peso preferida de acrilamida y bisacrilamida monoméricas está en el intervalo entre 10:1 y 100:1, preferentemente entre 20:1 y 60:1, más preferentemente entre 30:1 y 50:1, en particular alrededor de 40:1.
- 50

En una realización, el polímero es poli(acrilamida) y la polimerización se realiza por polimerización de radicales en

presencia de tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio.

El grosor del polímero producido (o gel producido) puede variar en gran medida. El grosor varía generalmente de alrededor de 20 a alrededor de 200 μm , el grosor preferido está entre alrededor de 50 y alrededor de 100 μm .

5 En una realización, los marcadores de referencia tales como partículas marcadas, partículas preferentemente marcadas fluorescentemente, se pueden añadir durante la etapa (a). Los marcadores se mezclan generalmente con por lo menos uno de los reactivos de polimerización antes de la polimerización. Por ejemplo, se pueden usar partículas fluorescentes de poliestireno modificado con carboxilato. Las micropartículas convenientes son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Dembo and Wang, 1999, Biophys J 76, 2307-2316; Marganski et al., 2003, Methods Enzymol 361, 197-211).

10 Como se mencionó antes, el polímero se puede producir sobre la máscara de transparencia que comprende por lo menos un área transparente y opcionalmente por lo menos un área no transparente. Las áreas transparentes corresponden a superficies de la máscara que son transparentes a la luz UV profundo usada en la etapa (b). Las áreas transparentes están hechas de cualquier material que es transparente a la luz UV profundo utilizada en la etapa (b). Por ejemplo, las áreas transparentes de la máscara pueden estar hechas de cuarzo. La máscara de
15 transparencia (también llamada simplemente la máscara en la presente descripción) también puede estar definida por la posibilidad de coexistencia de dos tipos de áreas: áreas transparentes y no transparentes. Si están presentes las áreas no transparentes, están hechas de cualquier material que sea opaco a la luz ultravioleta profunda usada en la etapa (b). Por ejemplo, las áreas no transparentes de la máscara pueden estar hechas de cromo. Según esta realización, la capa de cromo define las áreas no transparentes.

20 Cuando la máscara de transparencia comprende por lo menos un área transparente y por lo menos un área no transparente, la máscara puede ser una placa de cuarzo revestido con una capa de cromo, en la que la capa de cromo está ausente en áreas específicas, definiendo por ello las áreas transparentes. En esta realización particular, la máscara es una placa de cuarzo parcialmente revestido con una capa de cromo. En esta realización particular, la máscara comprende áreas no transparentes, en las que la placa de cuarzo se reviste con una capa de cromo y
25 áreas transparentes, en las que la placa de cuarzo no está revestida con una capa de cromo. Las áreas transparentes definen áreas potencialmente activadas por UV y por lo tanto en las que se desean patrones adhesivos.

La máscara puede comprender áreas transparentes y áreas no transparentes de cualquier forma deseada.

30 Las áreas transparentes tienen la forma deseada para el patrón, en particular para el micropatrón. De hecho, la forma de las áreas transparentes definirá la forma del micropatrón adhesivo. El área transparente puede tener cualquier forma y tamaño deseado.

35 En una realización particular, el tamaño del área transparente está entre 100 y 4.000 μm^2 , más preferentemente entre 200 y 2.000 μm^2 , aún más preferentemente entre 500 y 1.500 μm^2 . El área dependerá del número de células que se van a adherir en ella y del tamaño de las células consideradas. De hecho, el área del área transparente puede corresponder al área de la expansión celular sobre el micropatrón adhesivo.

40 Por ejemplo, la forma de las áreas transparentes puede tener, por ejemplo, una forma geométrica tal como un cuadrado, círculo, estrella, rombo, triángulo, línea o sus combinaciones. Las áreas transparentes pueden formar también líneas rectas o curvas, paralelas o ramificadas. Un experto en la técnica conoce la ventaja de ciertos micropatrones. Por ejemplo, se describen micropatrones adhesivos particulares de interés en los siguientes documentos: WO2005/026313, WO2010/046459, y para una revisión, Thery, 2010, J Cell Science, 123.

Para la medida de la fuerza de tracción, la forma de las áreas transparentes puede tener una forma de ballesta, como se ilustra en los ejemplos.

45 Preferentemente, la máscara presenta varias áreas transparentes, que definen de aquí en adelante micropatrones adhesivos dispuestos sobre el gel. Por consiguiente, el substrato blando resultante forma una matriz celular. Más particularmente, dicha máscara comprende por lo menos 2 áreas transparentes, preferentemente por lo menos 5, 10, 100, 1.000, 10.000, o 100.000 áreas transparentes. En una realización preferida, dicha máscara comprende entre 10 y 50.000 áreas transparentes/cm², más preferentemente entre 5.000 y 15.000 áreas transparentes/cm², aún más preferentemente alrededor de 10.000 áreas transparentes/cm². Preferentemente, las áreas transparentes están separadas por lo menos por alrededor de 10 μm , preferentemente por lo menos por alrededor de 20, 30, o 50 μm .

50 Por "alrededor" se entiende el valor más o menos el 5%.

En otra realización, la máscara comprende solo áreas transparentes. El procedimiento de la invención entonces conduce a la formación de un substrato blando cubierto con la biomolécula, sin ningún patrón.

Etapa (b):

La etapa (b) corresponde a la irradiación del polímero formado a través de la máscara con UV (ultravioleta)

profundo. En la presente invención, el UV profundo se refiere a la radiación UV con una longitud de onda inferior a 200 nm, en particular inferior a 190 nm y más específicamente igual a 180 nm.

La etapa (b) se puede, por ejemplo, realizar en un limpiador de ozono/UV.

5 La irradiación UV desencadena la activación del gel de polímero en las áreas de polímero expuestas a la irradiación UV a través de las áreas transparentes de la máscara. Además de la irradiación, en dichas áreas, el polímero se puede activar por lo menos por una biomolécula. El polímero se puede activar alternativamente para la funcionalización con un agente de copulación (o conector) que activará el polímero funcionalizado para por lo menos una biomolécula.

Una ventaja del uso de la radiación UV profunda es que no es necesario fotoiniciador para crear radicales libres.

10 Etapa (c):

El desprendimiento de la máscara se puede realizar por cualquier medio conocido por uno de experiencia media en la técnica. La retirada de la máscara se puede simplemente realizar por retirada manual.

Etapa (d):

15 El contacto del polímero con la disolución que comprende una biomolécula se puede realizar por cualquier medio conocido por uno de experiencia media en la técnica.

20 En la presente invención, el término "biomolécula" se refiere a cualquier proteína, carbohidrato, lípido, ácido nucleico, o sus combinaciones tales como una glicoproteína, un glicolípido o un proteolípido. En una realización preferida, la biomolécula puede comprender o estar hecha de cualquier molécula que promueve la unión celular. Estas moléculas son bien conocidas por los de experiencia media en la técnica y comprenden antígenos, anticuerpos, moléculas de adhesión celular tales como cadherina o sus fragmentos, moléculas de la matriz extracelular tales como laminina, fibronectina, vitronectina, colágeno, péptidos sintéticos, carbohidratos y similares. Preferentemente, las biomoléculas están marcadas, preferentemente marcadas fluorescentemente, o están mezcladas con moléculas marcadas, preferentemente marcadas fluorescentemente.

25 La biomolécula se pone en contacto preferentemente con el polímero en forma de disolución en un disolvente apropiado. Entre los disolventes apropiados se pueden citar agua y tampones tales como HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico). La disolución puede comprender adicionalmente por lo menos otra biomolécula, tal como fibrinógeno.

La etapa (d) se puede dividir preferentemente en dos etapas:

30 (d1): poner en contacto el polímero con un agente de copulación (o un conector), opcionalmente en presencia de un catalizador, y

(d2): poner en contacto el polímero funcionalizado obtenido después de la etapa (d1) con la biomolécula.

35 El agente de copulación puede ser un agente de reticulación heterobifuncional como EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), o SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo); o un agente de reticulación homobifuncional como DSG (glutarato de disuccinimidilo). Según una realización preferida, el agente de copulación es EDC.

El catalizador puede ser, por ejemplo, NHS (N-hidroxisuccinimida).

Etapa (e):

40 El exceso de biomolécula y opcionalmente otros componentes químicos de la etapa (d) se pueden eliminar por lavado, por ejemplo, con agua o cualquier otro disolvente apropiado, incluyendo disolvente alcohólico, tal como isopropanol.

El procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa que comprende separar el polímero de la capa base. Esta etapa se puede realizar en particular después de la etapa (e).

45 Contrariamente a los procedimientos implementados en la técnica para producir sustratos blandos usados en la actualidad, este procedimiento no incluye ningún intermedio entre la máscara y el gel. El procedimiento de fabricación implica generalmente el uso de una máscara para crear un molde tal como un estarcido o sello, y a continuación la aplicación del molde sobre el gel polimérico.

50 El procedimiento presentemente reivindicado avanza por la aplicación directa de la disolución que forma polímero sobre la máscara. La ausencia de intermedio y la polimerización in situ desencadenan una alta resolución espacial. De este modo, los contornos de los patrones de la biomolécula sobre el gel, que corresponden a las áreas transparentes de la máscara que han sido afectadas por la irradiación con UV, se definen con precisión.

La Figura 1 compara los patrones de un gel obtenidos según la invención con los patrones obtenidos por una técnica clásica que no implica polimerización in situ, es decir, en la que la polimerización del gel se realiza antes del contacto con la máscara para la exposición a UV.

5 Además, como el procedimiento de la invención comprende menos etapas de microfabricación que los procedimientos descritos previamente, es más rápido y más fácil de implementar.

10 El procedimiento de la invención finalmente proporciona sustratos blandos de mejor calidad porque se obtiene mejor adhesión de la biomolécula sobre el polímero que los sustratos blandos descritos previamente. Esto es esencialmente debido a un mejor contacto entre el gel y la máscara, que a su vez aseguraba la activación por UV profundo. En particular, la activación y la adhesión de la biomolécula son más homogéneas y más reproducibles que las de sustratos blandos comparables previamente descritos.

El sustrato blando obtenido es un material que es deformable, en particular flexible, plegable, o maleable, cuando se expone a una fuerza externa. Otras características físicas apropiadas para los sustratos blandos apropiados para uso en el procedimiento de la invención incluyen elasticidad lineal e incompresibilidad.

15 Los sustratos blandos según la invención tienen un módulo de Young en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 100 kilopascales (kPa). Los sustratos blandos de la presente invención incluyen aquellos que pueden ser ajustables a la rigidez de los tejidos fisiológicos con un módulo de Young de alrededor de 0,1 a alrededor de 100 kPa, preferentemente de 0,5 a alrededor de 50 kPa, más preferentemente de alrededor de 1 a alrededor de 20 kPa, y aún más preferentemente de alrededor de 1 a alrededor de 10 kPa. Se entiende que un experto en la técnica adaptará este valor a la contractilidad de las células estudiadas. Por ejemplo, para una célula con una alta capacidad de contracción, se usará un sustrato blando menos flexible. En el caso opuesto, si la célula tiene una débil capacidad de contracción, el sustrato blando será muy flexible.

Otro objetivo de la presente invención es un sustrato blando obtenible por el procedimiento según la invención. En una realización, el sustrato blando se obtiene por el procedimiento según la invención. En particular, el sustrato blando comprende uno o varios micropatrones.

25 Los sustratos blandos según la invención se pueden usar para el cultivo celular sobre sustratos blandos, con una geometría controlada opcional. Los sustratos blandos según la invención se pueden usar también para medir fuerzas de tracción celular.

30 Para el cultivo celular o para medir fuerzas de tracción celular, el sustrato blando de la invención se expone a por lo menos un tipo de célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se unan al sustrato blando.

35 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para cultivar células que comprende proporcionar un sustrato blando con patrones de la invención, exponer dicho sustrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se unan al sustrato blando, y cultivar dicha(s) célula(s). La presente invención se refiere al uso del sustrato blando según la invención para el cultivo celular. También se refiere al uso de un sustrato con patrones de la invención para cultivar células.

En una realización particular, la presente invención se refiere también a un método de fabricación de tejidos. En este método, las células se unen al sustrato blando, en particular al micropatrón y se permiten proliferar, para adoptar una organización definida por la geometría del micropatrón adhesivo, opcionalmente para diferenciar y/o crear una estructura multicelular de interés.

40 La presente invención se refiere adicionalmente a un método para ensayar la actividad celular o las propiedades de una célula que comprende proporcionar un sustrato blando con patrones de la invención, exponer dicho sustrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se una(n) al sustrato blando, y medir la actividad celular o propiedades de dicha célula. La actividad celular de la célula puede incluir la contractilidad celular, la motilidad celular, la migración celular, el crecimiento celular, la división celular, la capacidad para completar la citoquinesis, la interacción celular con otras células, la diferenciación celular, la autofagia celular, la apoptosis celular y similares. Las propiedades celulares pueden incluir la posición o disposición de los orgánulos (aparte de Golgi, núcleo, mitocondria, centrosoma), la arquitectura del citoesqueleto, red de actina, red de microtúbulos, red de filamentos intermedios, polaridad celular, la composición de la membrana plasmática, el tráfico interno celular, la orientación del huso mitótico, la posición del plano de división y similares.

50 La presente invención se refiere adicionalmente a un método para identificar una molécula que modula una actividad celular o propiedades de una célula que comprende proporcionar un sustrato blando con patrones de la invención, exponer dicho sustrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se una(n) al sustrato blando, y medir la actividad celular o propiedades de dicha célula en presencia y en ausencia de la molécula, y determinar el efecto de la molécula sobre la actividad o propiedades celulares, en la que una modulación de la actividad o propiedades celulares indica que la molécula es capaz de modular la actividad celular o propiedades de una célula.

La molécula puede ser de varios orígenes, naturaleza y composición. Puede ser una sustancia orgánica o inorgánica, tal como un lípido, péptido, polipéptido, ácido nucleico, azúcar, molécula pequeña, agentes químicos, fármacos, etc., aislada o mezclada con otras sustancias. Por ejemplo, el compuesto de ensayo puede ser un anticuerpo, un oligonucleótido antisentido, o un siRNA. La molécula puede ser toda o parte de una librería combinatorial de productos, por ejemplo.

Por "modulando" o "modular" se entiende que la actividad se puede incrementar o estimular, o disminuir o inhibir; y que la propiedad cambia. Por ejemplo, cuando está implicada la localización de un orgánulo, la posición del orgánulo cambia cuando se incuban las células con la molécula de ensayo.

Por ejemplo, el método puede ser útil para descubrimiento de fármacos, para analizar la toxicidad de la molécula candidata/de ensayo en células, para identificar moléculas que modulan la actividad o propiedades celulares, para identificar moléculas útiles para tratar o prevenir una enfermedad, y similares. En particular, la enfermedad puede ser un cáncer.

Se puede usar cualquier tipo de célula en la presente invención. Preferentemente, las células son eucariotas. Las células pueden ser de animal, mamífero o ser humano. Las células pueden ser por ejemplo fibroblastos, células mesenquimales, células endoteliales y epiteliales. Las células pueden ser también células musculares o células nerviosas. Las células musculares incluyen células de músculo liso, células de músculo estriado, o células cardíacas. Las células pueden ser también células madre tales como células madre embriónicas (primarias y líneas celulares), células fetales (primarias y líneas celulares), células madre adultas y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células se pueden derivar de un tejido u organismo sano o patológico. Por consiguiente, las células pueden ser normales o anormales. Las células pueden ser células naturales o modificadas (células físicamente o genéticamente alteradas). En un ejemplo particular, las células pueden ser células tumorales. Por ejemplo, se puede inactivar un gen y estos métodos permiten el estudio del gen inactivado

Esta invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitantes. El contenido de todas las referencias citadas en toda la memoria descriptiva se incorpora aquí como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

La capacidad de la célula para ejercer fuerzas de tracción en su micromedio por el desarrollo de tensión intracelular impacta fuertemente sobre la fisiología celular y notablemente sobre la transformación tumoral. Los métodos actuales para medir las fuerzas de tracción celular se basan en la deformación de sustratos blandos. Las fuerzas exactas no se pueden inferir directamente de la deformación dado que la deformación local es el resultado de sitios de aplicación de fuerza tanto locales como distantes. Las medidas precisas requieren ya sea cálculos largos o etapas de microfabricación sofisticadas para separar física o numéricamente sitios de aplicación de la fuerza.

Los inventores desarrollaron un nuevo método para asociar el control de la distribución espacial de las fuerzas de tracción celular en micropatrones adhesivos con la medida de la fuerza sobre sustratos blandos deformables. Las células tiran del micropatrón y, en geometrías apropiadas, contraen la longitud del micropatrón de una manera estandarizada. Después de una calibración de la relación fuerza-deformación, las fuerzas de tracción celular se podrían cuantificar rápidamente y con precisión por la adquisición de una sola imagen del micropatrón y medida de la longitud.

Los inventores aplicaron este método para medidas de fuerza de tracción de células epiteliales mamarias en diversas condiciones que imitan transformaciones tumorales específicas. Encontraron que, contrariamente a la visión actual, todos los fenotipos de transformación no estaban asociados al nivel incrementado de la contractilidad celular.

Resultados

Nuevo método de microimpresión sobre sustrato blando

Los inventores usaron la exposición directa de PAA a UV profundo a través de una máscara óptica para lograr rápidamente la microimpresión con alta resolución espacial y reproducibilidad para orientar con precisión el citoesqueleto de actina celular en experimentos a gran escala (ver Materiales y Métodos). Una gota de disolución de acrilamida se colocó directamente sobre la máscara óptica de cromo y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio silanizado. Después de la polimerización de PAA, el sándwich se expuso a UV profundo para oxidar el PAA a través de las regiones transparentes microimpresas de la máscara óptica (Fig. 2A). El cubreobjetos junto con el gel de PAA se retiró de la máscara y se revistió con fibronectina, que adsorbía solo en las regiones expuestas a UV. El contacto directo con la máscara óptica durante la polimerización de PAA y la exposición a UV permitió una reproducción fiel de sus características espaciales y aseguró una buena resolución espacial subcelular (Fig. 2B). El revestimiento era bastante homogéneo sobre todo el cubreobjetos (Fig. 2C). Todo el procedimiento, desde la preparación de PAA hasta el final del revestimiento de proteína, dura 2 horas, incluyendo 1 hora de polimerización de PAA, y es muy

robusto.

Localización controlada y enfoque de los sitios de aplicación de la fuerza

Células epiteliales humanas no tumorigenas de la glándula mamaria, MCF10A, se depositaron en los substratos de PAA microimpresa. Las células se unieron específicamente a los micropatrones revestidos de fibronectina dado que las regiones no expuestas de PAA prevenían la adsorción de proteína (Fig. 2D). El efecto de la geometría del micropatrón en la orientación de las fuerzas de tracción celular se ensayó en varias formas: disco, comecocos y ballesta (Fig. 3A). Las células expandidas ejercían fuerzas de tracción sobre el micropatrón que podrían medirse observando el desplazamiento de las partículas fluorescentes incrustadas en el gel de PAA (véase la Fig. 3B y Material y Métodos). La velocimetría de imágenes de partículas seguida del seguimiento de partículas individuales se usaron para medir los desplazamientos de partículas ((Marganski et al. (2003) *Methods Enzymol* 361: 197-211; Sabass et al. (2008) *Biophys J* 94 (1): 207-220) Los campos de fuerza se calcularon a partir de los campos de desplazamiento de partículas usando citometría de tracción por transformada de Fourier ((Sabass et al., supra; Butler et al. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (3): C595-605). Los campos de fuerza ejercida por las células individuales se superpusieron y promediaron para cuantificar su reproducibilidad (Fig. 3C,D). En las regiones revestidas homogéneamente las células desarrollaron fuerzas que se distribuyeron aleatoriamente de una célula a la otra. En las células restringidas en micropatrones en forma de disco, las fuerzas todavía estaban orientadas al azar, pero sus magnitudes se redujeron debido a la reducida expansión celular. En las células restringidas en micropatrones en forma de comecocos, la distribución de fuerzas estaba geoméricamente sesgada debido a una mejorada contracción celular encima de regiones no adhesivas. La capacidad de la célula para ejercer fuerzas de tracción estaba aún más estimulada en micropatrones en forma de ballesta, en los que la fuerza de tracción total por célula era mayor que en cualquier otra forma de micropatrón (Fig. 3D). Importamente, la mayor parte de las fuerzas de tracción se orientaron de forma reproducible hacia arriba, a lo largo de la barra adhesiva recta en el extremo de la cual los inventores midieron la presión más alta (Fig. 3D). Estos resultados demostraron que las geometrías adecuadas de micropatrón pueden tanto estimular la contracción celular como orientar la aplicación de la fuerza. Tales geometrías colocan células en condiciones convenientes para revelar la contractilidad celular potencial y medir su fuerza de contracción.

El dibujo del contorno del campo de fuerza permite la relación reproducible fuerza-deformación

Cuando los cables de actina tienen una distribución espacial impredecible, una deformación dada no se puede asignar directamente a una magnitud de fuerza definida. De hecho, las fuerzas aplicadas en los sitios de adhesión adyacentes ambas afectan a deformaciones locales, debido a la naturaleza continua del substrato. Cada deformación es el resultado de fuerzas locales y distantes. De modo que el cálculo del campo de fuerza es altamente dependiente de la distribución espacial de los sitios de aplicación de la fuerza y la relación entre la deformación y las fuerzas varía de una célula a la otra. Los inventores plantearon la hipótesis de que en células que desarrollan una arquitectura reproducible y un patrón controlado de aplicación de la fuerza, una deformación local dada podría ser asignada a un valor definido de la fuerza contráctil. Para probar esta hipótesis, usaron cálculos de campo de fuerza clásicos con partículas incrustadas en el gel de PAA (Fig. 3B) y la observación de la deformación del micropatrón (Fig. 4A) para establecer la relación fuerza-deformación en las células microimpresas. En disco, la orientación de la deformación era impredecible y no se pudo encontrar buena correlación entre la deformación a lo largo de un eje de referencia y la fuerza media de tracción en toda la célula (Fig. 4B). Cuando la deformación se midió a lo largo del más corto, y por lo tanto el más contraído, eje celular, la correlación mejoró (Fig. 4C). Sin embargo, esta forma no estimuló la contracción celular y por lo tanto no reveló completamente el potencial de la contractilidad celular (Fig. 3D). Las magnitudes de la fuerza de tracción celular eran ligeramente superiores en las formas de comecocos, pero la fuerza y la deformación no estaban correlacionadas con precisión (fig. 4D). En la ballesta, la longitud de la barra recta se comprime en respuesta a las fuerzas de tracción celular (Fig. 4A). Los inventores encontraron una buena correlación lineal entre el acortamiento de la barra de la ballesta, una medida local, y la tracción celular media, un estado global de la célula (Fig. 4E). Cada variación de la longitud se podría asignar a un valor de fuerza definido. Esto mostró que la longitud de la barra de la ballesta se podría tomar como un indicador directo del nivel de contracción celular. En la ballesta, la adquisición de una sola imagen era suficiente para medir la longitud de la barra y leer la fuerza de tracción celular media correspondiente usando la curva de calibración (Fig. 5F). Ya no era necesario medir los desplazamientos de partículas incrustadas o realizar largos cálculos numéricos para resolver el problema inverso y obtener el valor de la fuerza correspondiente. La medida de la fuerza no sólo era más fácil y más rápida, comparado con cualquier método previo, también se convirtió en susceptible de automatización.

Validación de la medida de la fuerza

Los inventores validaron esta metodología analizando los bien descritos efectos de blebistatina en la contractilidad celular. Se ha mostrado que la blebistatina inhibe la miosina-II ATPasa. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de blebistatina. Se usaron medidas de longitud de la barra de la ballesta en imágenes umbralizadas de micropatrón fluorescente para medir las fuerzas de tracción celular (Fig. 5A). El perfil de inhibición de la fuerza en respuesta a la dosis creciente de blebistatina coincidía con el perfil de inhibición de la miosina II y el perfil de la fuerza celular medido con otras técnicas (Mitrossilis D, et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106(43): 18243-18248). Los efectos de fármacos sobre la contractilidad celular se podrían cuantificar fácil y rápidamente de este

modo usando esta nueva metodología.

Otra aplicación que requiere mediciones numerosas, y de este modo rápidas, medidas de la fuerza es el análisis de la relajación de la fuerza con el tiempo. Los inventores también podrían seguir la disminución de la magnitud de la fuerza en respuesta a blebistatina 50 μM y encontraron que sigue un sencillo decaimiento exponencial (Fig. 5B).

5 Toda transformación tumorigéna no incrementa la contractilidad celular

Los inventores a continuación usaron su método para comparar el nivel de contracción de las células (WT) MCF10A naturales con el de las células MCF10A tratadas con fármaco o genéticamente modificadas que imitan alguna transformación tumoral. De hecho se ha mostrado que la transformación tumoral está asociada a altos niveles de contracción celular. Esto sugería que se requieren medidas del nivel de contracción celular para entender la regulación de la progresión del tumor y para desarrollar tratamientos mejorados. Se sabe que la exposición de la célula a TGF β 1 induce la transición de epitelial a mesenquimal, que imita algunas de las características de la transformación tumoral. Las células tratadas con TGF β 1 no son capaces de formar estructuras acinares apropiadas cuando se cultivan en geles de colágeno. En lugar de eso proliferan y forman grupos de células sin estructurar que recapitulan el crecimiento del tumor. Las células MCF10A fueron tratadas durante 2 días con 2 ng/ml de TGF β 1 antes de ser depositadas en sustratos de PAA microimpresa. Como era de esperar, las células exhibieron un nivel significativamente más alto de contracción celular como se revela por el acortamiento de la ballesta (Fig. 5C). Se sabe que la activación del receptor ErbB2 induce las primeras etapas de la carcinogénesis mamaria y previene la formación de estructura acinar apropiada en geles de colágeno. Los inventores activaron los receptores ErbB2 con el ligando AP1510 en MCF10A que expresan el receptor ErbB2 inducible. Sorprendentemente, no encontraron cambios significativos en el nivel de contracción celular. Se ha mostrado también que la inactivación de la proteína quinasa CK2 (previamente conocida como caseína quinasa 2) induce la transición de epitelial a mesenquimal y participa en la transformación y propagación del tumor. Curiosamente, en células CK2b knockdown, el nivel de contracción era significativamente menor que en las células WT (Fig. 5C). Estos resultados muestran que varios tipos de transformación tumorigénica pueden promover o reducir el nivel de contracción celular. También demuestran que el método de los inventores se puede usar fácilmente a mayor escala para caracterizar con más precisión esta compleja correlación entre la contracción celular y la transformación tumoral.

Discusión

El uso de la exposición a UV profundo sobre PAA en contacto con la fotomáscara es, hasta donde saben los inventores, el método más robusto y más fácil para crear micropatrones homogéneos y reproducibles sobre sustratos deformables blandos. El dibujo de la red de actina y la normalización del campo de fuerza en respuesta a la geometría apropiada de micropatrón permite una calibración precisa de la relación entre la deformación de la forma del micropatrón y las fuerzas de tracción. Cuando los sitios de aplicación de la fuerza están aislados de otros sitios por regiones no adhesivas, se recupera la relación lineal natural entre la fuerza y la deformación del sustrato blando, probablemente porque los campos de deformación de cada uno de los sitios de aplicación de la fuerza no se cruzan. Gracias a esta relación lineal entre fuerza y deformación, la medida de la fuerza se obtiene simplemente midiendo la longitud del micropatrón. Aún se requieren métodos clásicos de medida de la fuerza para obtener la curva de calibración. Pero, después, la adquisición de una sola imagen es suficiente para medir la longitud del micropatrón y leer la fuerza de tracción correspondiente. Por lo tanto, la medida de la fuerza es tan simple como con el uso de micropilares (Tan JL, et al. (2003) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100(4): 1484-1489) sin la restricción de la microfabricación y los problemas de células que se expanden entre los pilares. Además, el método de los inventores es fácilmente susceptible de automatización dado que la posición celular y la localización subcelular de la producción de la fuerza se controlan con precisión. Este método prepara el camino al análisis a gran escala y de alto rendimiento del estado de contracción celular.

El trabajo inicial de los inventores identificó transformaciones tumorigénicas que no estaban asociadas al nivel incrementado de la contractilidad celular. Se observaron altos niveles de contractilidad en células epiteliales que forman estructuras multicelulares desorganizadas o se separan entre sí. Tales fenotipos son característicos de las etapas avanzadas o finales de la transformación tumoral. La activación del receptor ErbB2 es una característica de la transformación tumoral temprana que afecta a la tasa de crecimiento. La CK2 también está implicada en el efecto anti-apoptótico y la CK2beta knockdown afecta específicamente a la supervivencia celular dependiente de p53. Aunque la contractilidad activa el crecimiento celular, las primeras fases de la progresión del cáncer que implican la estimulación del crecimiento celular podrían no estar asociadas sistemáticamente a alto nivel de la contractilidad. Ahora sería necesario analizar más específicamente el nivel de contracción celular en varias fases de la transformación tumoral para aclarar la relación entre la progresión del cáncer y la contracción celular. La caracterización de las propiedades mecánicas de células sanas y transformadas se podría usar a continuación para establecer un nuevo ensayo de diagnóstico médico.

Materiales y métodos

Microimpresión de PAA

Cubreobjetos de vidrio redondos de 25 mm se limpiaron primero con disolución piraña durante 2 horas y se

silanizaron por inmersión en disolución de etanol que contiene metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo al 2% (v/v) (Sigma) y ácido acético al 1% (v/v) durante 5 min. Después de limpiar con etanol para retirar el exceso de residuo de silano, los cubreobjetos se incubaron a 120°C durante una hora.

5 Las partículas fluorescentes de poliestireno modificado con carboxilato (de color rojo oscuro, de 200 nm, Invitrogen F-8807) se pasivaron con polietilenglicol de la siguiente manera: las partículas fluorescentes se diluyeron 25 veces en tampón MES (10mM, pH 5,5) que contiene 8 mg/ml de N-hidroxisuccinimida (NHS; Fluka) y 4 mg/ml de EDC (1-
10 etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida; Pierce) antes de la mezcla 1:1 con disolución de PLL-PEG (PLL(20)-g[3,5]-PEG (2); Susos) (4 mg/ml en 10 mM de tampón HEPES, pH 8,5). La mezcla se incubó con rotación a 4°C durante la noche. Las partículas se separaron por centrifugaron subsecuentemente y se resuspendieron en tampón HEPES (10 mM, pH 7,4).

15 Disolución de acrilamida que contiene 6,67% de acrilamida y 0,167% de bis-acrilamida se mezcló con partículas fluorescentes pasivadas por sonicación antes de la adición de APS y TEMED. Una gota de disolución de acrilamida se puso directamente sobre el lado de cromo de la fotomáscara (Toppan). La fotomáscara se limpió con n-hexano antes de su uso para mantener una superficie hidrófoba. Se colocó un cubreobjetos silanizado sobre la gota y se dejó polimerizar durante 45 minutos. A continuación, el sándwich se expuso a UV profundo en un limpiador de UV/Ozono (Jelight) durante 3 minutos. El cubreobjetos con gel se retiró cuidadosamente de la máscara y se incubó con 10 mg/ml de EDC y 17 mg/ml de disolución acuosa de NHS durante 15 minutos, y a continuación se revistió con 20 µg/ml de fibronectina (Sigma) y 5 µg/ml de fibrinógeno conjugado Alexa546 (Invitrogen) en tampón HEPES (10 mM, pH 8,5) durante una hora. La fotomáscara se lavó con agua y a continuación con isopropanol.

20 Medida por AFM de la elasticidad de PAA microimpresa

Todas las medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) se llevaron a cabo en PBS usando un AFM PicoPlus (Agilent Technologies, EE.UU.). La constante del muelle de cada cantilever se determinó utilizando el método de ruido térmico (Butt and Jaschke (1995) Nanotechnology 6(1): 1-7). Se registraron los perfiles de fuerza-penetración usando cantiléver con punta de esfera de borosilicato con un radio $R=2,5\ \mu\text{m}$ (Bioforce Nanoscience, IA, EE.UU.) y una constante de muelle de 60 mN/m. Para delimitar las zonas aisladas y no aisladas, primero se generaron imágenes de topografías de $60 \times 60\ \mu\text{m}^2$ en el modo de contacto con $512 \times 512\ \text{pixels}^2$ a velocidades de línea de 0,5 Hz y con los mismos cantilevers. La sonda esférica se retiró por encima de la zona de interés antes de la penetración. Los módulos de Young E se extrajeron de los perfiles anteriores usando el modelo de esfera de Hertz para la penetración de un sólido semi-infinito. Se supone que todas las muestras de poli(acrilamida) son incompresibles (Boudou et al. (2006) Biorheology 43: 721-728). La expresión de la fuerza de penetración está dada de este modo por:

$$F = \frac{16E}{9} R^{1/2} \delta^{3/2}$$

35 en la que δ es la penetración. δ se obtiene restando la desviación d del movimiento de la cerámica piezoeléctrica ($Dz = z - z_0$) en la dirección z , en la que z_0 es el punto de contacto, que se determinó siguiendo el método propuesto por Crick and Yin (2007, Biomechanics and Modeling in Mechanobiology 6(3): 199-210). Para cada muestra investigada, se tomaron dos medidas en cinco posiciones. Se obtuvo una superposición perfecta de dos penetraciones sucesivas realizadas en cada posición, lo que indica que las muestras fueron deformadas sólo elásticamente y no plásticamente. Los módulos de Young se calcularon por ajuste de mínimos cuadrados de las curvas experimentales fuerza-penetración. El módulo de Young medido de las regiones expuestas a UV era $7,29 \pm 0,42\ \text{kPa}$. El módulo de Young medido de las regiones no expuestas era $6,64 \pm 0,59\ \text{kPa}$.

40 Medida de la fuerza de tracción

Análisis del desplazamiento de partículas

45 Los campos de desplazamiento que describen la deformación del sustrato de PAA se determinan del análisis de las imágenes de partículas fluorescentes antes y después de la retirada de las células que se adhieren con el tratamiento de tripsina. En primer lugar, las imágenes se corrigen para cualquier desplazamiento de traslación que pueda haber ocurrido durante el experimento por correlación cruzada de las imágenes completas. La distancia del máximo de la función de correlación desde el origen representa la traslación global entre las imágenes, que se puede corregir a continuación desplazando una imagen con respecto a la otra.

50 El campo de desplazamiento se obtiene en dos etapas (Sabass et al. (2008) Biophys J 94(1): 207-220; Butler et al. (2002) Am J Physiol Cell Physiol 282(3): C595-605). Ambas imágenes se dividen en ventanas que no se solapan ($5,76\ \mu\text{m}$ cuadrados). En la primera etapa, las deformaciones gruesas se calculan correlacionando cada ventana en una imagen con la ventana en la misma localización en la otra imagen. El resultado se usa para desplazar una ventana con respecto a la otra, de modo que se compensa el desplazamiento global y sólo permanecen los

desplazamientos locales. La segunda etapa del análisis consiste en la detección y el seguimiento de las partículas en las ventanas alineadas, para recuperar los desplazamientos de partículas con la máxima resolución espacial. La suma de los desplazamientos obtenidos para cada etapa da el desplazamiento total en la posición de las partículas detectadas. El presente método de dos etapas proporciona resultados más fiables en el caso de grandes desplazamientos o de partículas densamente compactadas comparado con el seguimiento de partículas estándar. De hecho, dado que parte del desplazamiento total se puede corregir tras el análisis basado en la correlación, la distancia de corte en el procedimiento de seguimiento se puede reducir de manera que no se mezclasen diferentes partículas. Además, comparado con el análisis de correlación pura, la presente técnica se beneficia de la precisión espacial intrínseca del seguimiento de partículas dado que la información relativa a cada partícula individual se puede recuperar potencialmente.

Se usa un procedimiento especial para evaluar los desplazamientos en el área del patrón adhesivo donde se espera que la deformación del gel sea la más grande. Dependiendo de la forma del patrón, las fuerzas de tracción pueden estar muy localizadas conduciendo a grandes desplazamientos en áreas muy pequeñas. En este caso, el fracaso en el seguimiento correcto de unas pocas partículas en tales áreas alteraría significativamente la magnitud de la fuerza calculada. Por lo tanto, el área del patrón está dividida en ventanas más pequeñas que se permite que se solapen, antes de aplicar la correlación cruzada y el análisis de seguimiento. La reducción del tamaño de las ventanas hace que sea posible recuperar desplazamientos más grandes con correlación cruzada y, usando ventanas solapadas, podemos evitar partículas perdidas cerca de los límites de las ventanas. Además, los parámetros de detección de partículas se ajustan independientemente en el área del patrón, dado que las partículas son generalmente menos brillantes bajo el patrón debido a fotoblanqueo durante la irradiación UV. De este modo, los inventores obtienen una buena eficiencia de seguimiento en la región del patrón. Dado que el método de citometría de tracción por transformada de Fourier (FTTC) requiere que los desplazamientos se deben conocer en una rejilla rectangular regular, usan una interpolación lineal basada en triángulos para obtener tal campo partir de los desplazamientos de partículas. Se elige que la abertura de la rejilla sea de 0,72 μm en las direcciones x e y.

Todo el procesado y análisis de imágenes se realizó usando Matlab. La parte relativa a la localización y seguimiento de partículas se basa en un paquete de Matlab desarrollado por el grupo de Maria Kilfoil (Gao & Kilfoil (2009) Optics Express 17(6): 4685 a 4704) (disponible en: www.physics.mcgill.ca/~Kilfoil/Downloads.html).

Cálculo de la fuerza de tracción

Para calcular la tensión de tracción inducida por células a partir de datos de desplazamiento, los inventores han usado las siguientes suposiciones: se supone que el substrato exhibe un comportamiento elástico lineal y, dado que el grosor de la película es grande en comparación con los típicos desplazamientos y tamaños de adhesión, se puede aproximar como un semiespacio isótropo elástico, de modo que se puede aplicar la solución de Boussinesq Green. Además, las fuerzas de tracción se supone que son tangenciales al plano del substrato. En este caso, dado un gel incompresible (relación de Poisson cerca de 0,5), no hay desplazamiento fuera del plano y todo el problema es bidimensional. El campo de tensiones (fuerza local por unidad de área) $F(r)$ y el campo de desplazamientos $u(r)$ están relacionados por:

$$u_i(r) = \int dr' G_{ij}(r-r') F_j(r')$$

en la que la suma implícita se aplica con $i, j = 1, 2$ para dos dimensiones. G_{ij} es la función de Boussinesq Green. Para resolver el problema inverso de calcular las fuerzas a partir de desplazamientos, aplicamos el método de la citometría de tracción por transformada de Fourier (FTTC) (Butler et al. (2002) Am J Physiol Cell Physiol 282(3): C595-605). La integral se aproxima en una malla computacional discreta y el método FTTC se aprovecha del hecho de que el sistema resultante de ecuaciones lineales se puede resolver más fácilmente en el espacio de Fourier, en el que la convolución se convierte en un simple producto. Comparado con los algoritmos que consisten en invertir el sistema de ecuaciones en el espacio real, el FTTC es computacionalmente mucho más rápido y más fácil de aplicar, proporcionando resultados comparables (Sabass et al., supra). A diferencia del trabajo original de Butler et al., los inventores utilizaron un esquema de regularización de Tikhonov de orden cero dado que la solución del problema inverso es muy sensible al ruido en los datos de desplazamiento, lo que conduce a un comportamiento errático. La regularización de orden cero consiste en minimizar $\{|GF-u|^2 + \lambda^2|F|^2\}$ en la que se añade una restricción lateral que limita la amplitud de las fuerzas. El parámetro de regularización λ gobierna la importancia relativa entre los dos términos: si la solución debe concordar mejor con los datos de desplazamiento o más regularizada. En la práctica, los inventores realizan la regularización directamente en el espacio de Fourier (Sabass et al., supra), usando la siguiente expresión para cada vector de onda k de la malla:

$$\overset{t}{F}(k) = \left[\overset{t}{G}(k)\tilde{G}(k) + \lambda^2 I \right]^{-1} \tilde{G}(k) \overset{f}{u}(k) \quad \text{en la que } \tilde{F} \text{ y } \tilde{u} \text{ son}$$

la transformada de Fourier 2D de los vectores de tensión y desplazamiento,

\tilde{G}

es la transformada de Fourier de la función de Boussinesq Green 2D e I es la matriz de identidad 2-por-2. Se efectúa a continuación una transformada de Fourier inversa final para recuperar el campo de tensiones en el espacio real. El parámetro de regularización λ se ajustó al valor más bajo que permite que se calcule una solución razonable. Incrementar el parámetro de regularización tiene el efecto de suavizar las altas frecuencias espaciales en el campo de tensiones. Los inventores mantuvieron λ a valores pequeños ($\lambda < 10^{-9}$) para mantener la mejor resolución espacial, que se estima que es de alrededor de 5 μm en el presente caso.

Los campos de tracción inducida por las células sobre patrones adhesivos equivalentes se pueden promediar para dar resultados estadísticamente relevantes. Antes de promediar los campos de tensiones calculados, es preferible corregir las desviaciones de translación entre las imágenes. Para este uso, los inventores utilizan las imágenes de fluorescencia del patrón (fibronectina) que se correlacionan cruzadas para determinar su desplazamiento relativo. Las series de imágenes de tensión se alinean a continuación según este criterio antes de ser promediadas.

Cultivo celular

Cultivo de MCF10A

El cultivo de células MCF10A y la generación de la línea celular $\Delta\text{CK2}\beta$ se describieron previamente (Deshiere et al. (2008) Mol Cell Biochem 316(1-2): 107-113). La célula MCF10A que expresa los receptores de Erb2 inducibles por ligando se obtuvieron de Ariad Pharmaceuticals (Muthuswamy et al. (2001) Nat Cell Biol 3(9): 785-792). Las células se sembraron sobre un sustrato microimpreso con una densidad de $8 \times 10^4/\text{cm}^2$. Las células no unidas a la región adhesiva sobre el sustrato se separaron por lavado 1~2 horas después de la siembra. Todas las medidas de la fuerza de tracción se realizaron 6 horas después de la siembra para asegurar la plena expansión de las células. Se evaluó la relajación del sustrato separando células con tripsina.

Para inducir la línea celular Erb2, se añadió AP1510 (Ariad Pharmaceuticals) al medio de cultivo hasta una concentración final de 1 μM , 48 h antes de la medida de la fuerza de tracción.

Se añadió TGF β (R&D systems) a 2 ng/ml al medio de cultivo durante 48 h antes de la deposición de las células en PAA microimpresa y de la medida de la fuerza de tracción.

Se añadió progresivamente blebistatina(-) (Sigma) a 100 μM a la cámara de observación para obtener gradualmente la concentración final específica para el experimento de respuesta a la dosis de fármaco. Mientras que para el experimento del tiempo de respuesta, se añadió blebistatina para llegar directamente a una concentración final de 100 μM . La adquisición de imágenes se inició directamente después de la adición del fármaco.

Fijación e inmuno-tinciones

Seis horas después de la siembra sobre gel microimpreso o cubreobjetos de vidrio, las células se extrajeron primero en tampón de citoesqueleto (MES 10 mM, KCl 138 mM, MgCl 3 mM, EGTA 2 mM, pH 6.1) que contiene Triton X-100 al 0,5%, a continuación, se fijaron en paraformaldehído al 4%. Las muestras fijadas se lavaron 3 veces en PBS. Después, las muestras se incubaron durante 1 hora en PBS que contiene 0,1% de Tween, 3% de BSA, y 10 mM de faloidina-FITC (Sigma) para teñir los filamentos de actina. En vidrio, las células se inmunomarcaron con anticuerpos primarios dirigidos contra paxilina (BD Transduction Laboratories), seguido de inmunomarcado con anticuerpos secundarios marcados con Cy3 (Jackson Immuno Research). Todos los cubreobjetos se tiñeron con Hoechst 33342 (Sigma) para revelar y contar los núcleos celulares. Después del lavado con PBS, los cubreobjetos se montaron en medio de montaje Mowiol.

Microscopía y procesamiento de Imágenes

Se tomaron imágenes de células fijadas con un objetivo x100 (NA = 1,35) en un microscopio directo Olympus BX-61, montado con cámara CDD (HQ2, Ropper Scientific) y controlado con Metamorph (Molecular Devices). Se obtuvieron imágenes en vivo del desplazamiento de partículas y deformación del micropatrón con un objetivo x63 (NA = 1,4) en un microscopio Zeiss 200M invertido, montado con cámara CDD (HQ2, Ropper Scientific) y controlado con Metamorph (Molecular Devices). El control de temperatura y CO $_2$ se garantizó mediante el Cubo y la Caja de LIS Imaging.

Todas las imágenes obtenidas se procesaron por ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las imágenes de tinción fluorescente promediadas se alinearon automáticamente usando imágenes de micropatrón con unos plugins escritos a medida. La detección del patrón y la medida de longitud se realizaron automáticamente por medio de macrorutinas escritas a medida.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un substrato blando, que comprende las etapas de:
 - (a) producir un polímero entre una capa base y una máscara de transparencia que comprende por lo menos un área transparente y opcionalmente por lo menos un área no transparente,
 - 5 (b) exponer el polímero a UV profundo a través de la máscara,
 - (c) separar la máscara del polímero,
 - (d) poner en contacto el polímero con una biomolécula, y
 - (e) opcionalmente separar por lavado el exceso de biomolécula,en el que el substrato tiene un módulo de Young en el intervalo de 0,1 a alrededor de 100 kPa,
10 en el que la polimerización se efectúa in situ, y
en el que la biomolécula es una proteína, un carbohidrato, un lípido, un ácido nucleico, o una de sus combinaciones.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la capa base es vidrio silanizado.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el polímero es poliacrilamida.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que los reactivos de
15 polimerización implementados para la producción del polímero de la etapa (a) se añaden en forma de una disolución sobre la máscara y a continuación se aplica sobre ella la capa base
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la máscara es una placa de cuarzo revestida con una capa de cromo, en la que la capa de cromo está ausente sobre áreas específicas.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la máscara comprende
20 entre 10 y 50.000 áreas transparentes/cm².
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la biomolécula es una proteína, en particular escogida entre proteínas fluorescentes, proteínas de la matriz extracelular, y proteínas que permiten que se fijen células a ella.
8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que la proteína es fibronectina.
9. Un substrato blando obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones previas.
25
10. Un uso de un substrato blando según la reivindicación 9, para cultivo celular.
11. Un método para ensayar una actividad celular o propiedades de una célula, que comprende proporcionar un substrato blando según la reivindicación 9, exponer dicho substrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se una(n) al substrato blando, y medir la actividad celular o propiedades de dicha célula.
30
12. Un método para identificar una molécula que modula una actividad celular o propiedades de una célula que comprende proporcionar un substrato blando según la reivindicación 9, exponer dicho substrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la(s) célula(s) se una(n) al substrato blando, y medir la actividad celular o propiedades de dicha célula en presencia y en ausencia de la molécula, y determinar el efecto de la molécula sobre la actividad o propiedades celulares, en el que una modulación de la actividad o propiedades celulares indica que la molécula es capaz de modular la actividad celular o propiedades de la célula.
35

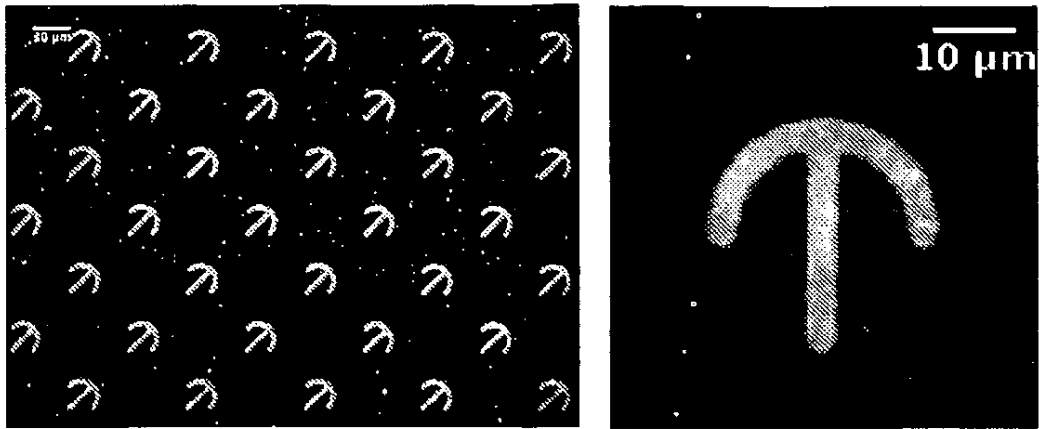


FIGURA 1A

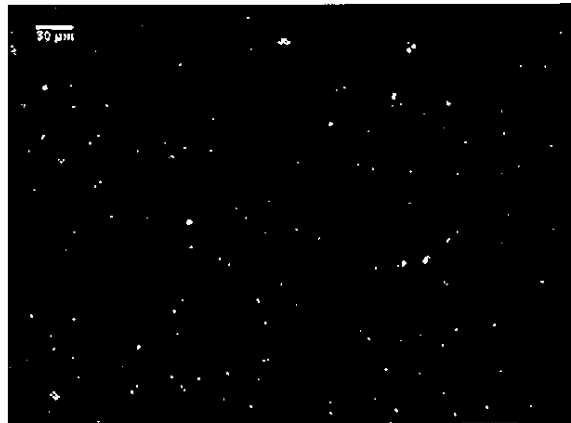


FIGURA 1B

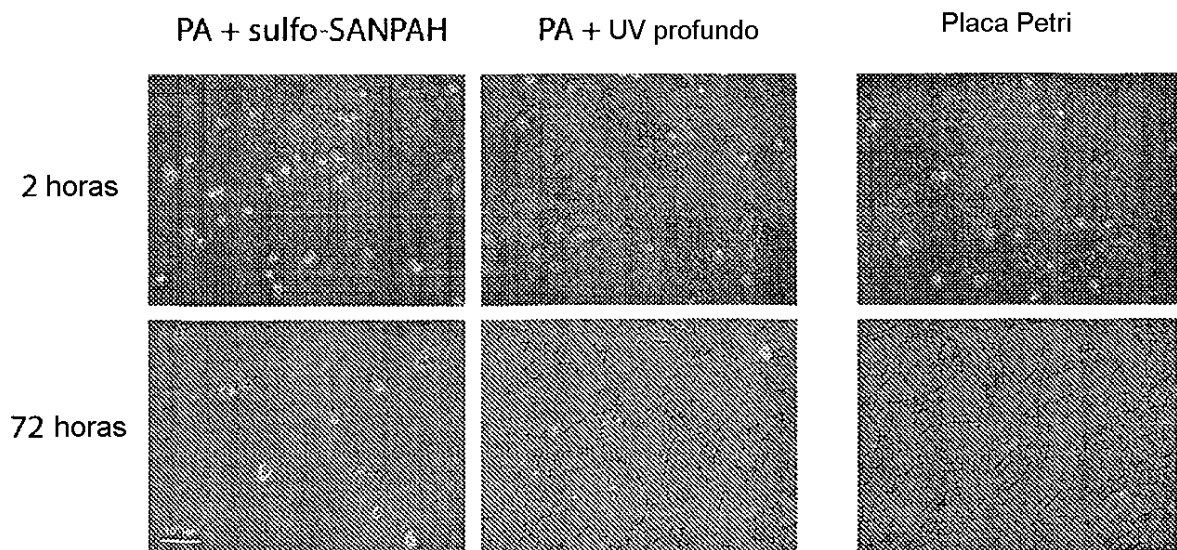


FIGURA 1C

FIGURA 1

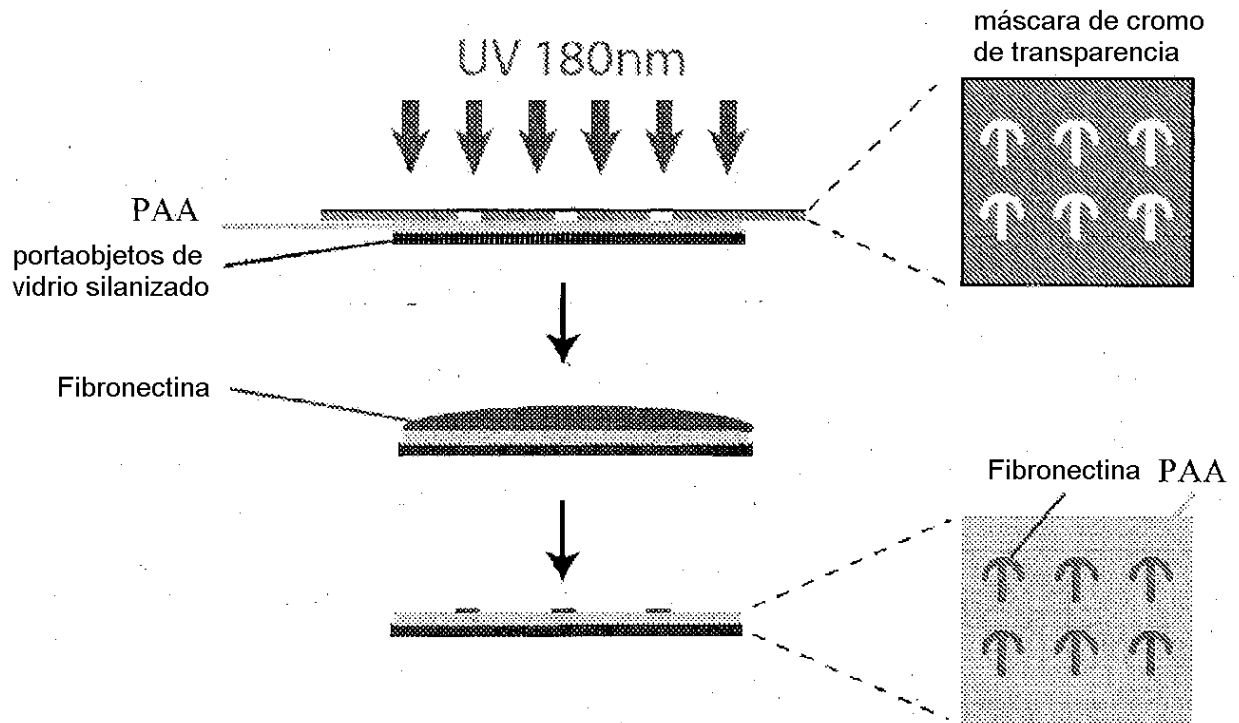


FIGURA 2A

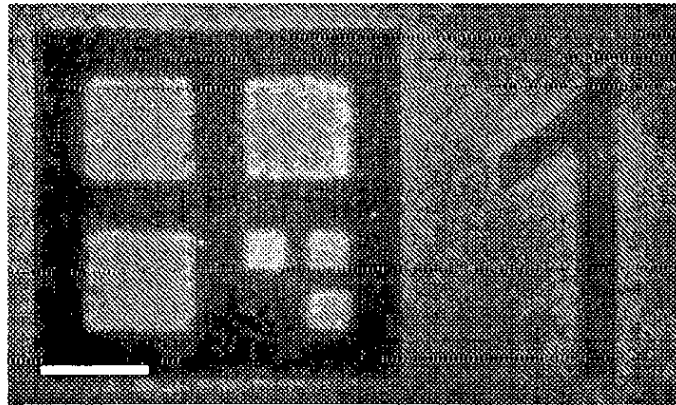


FIGURA 2B

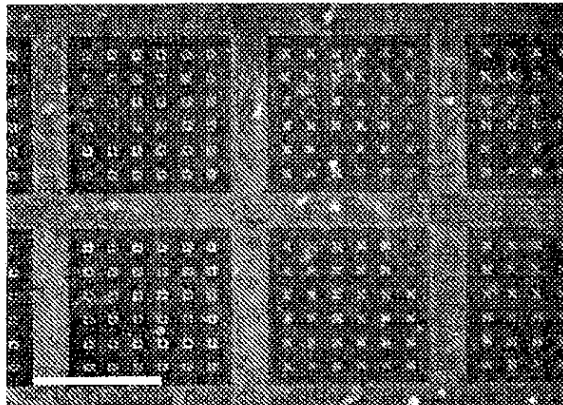


FIGURA 2C

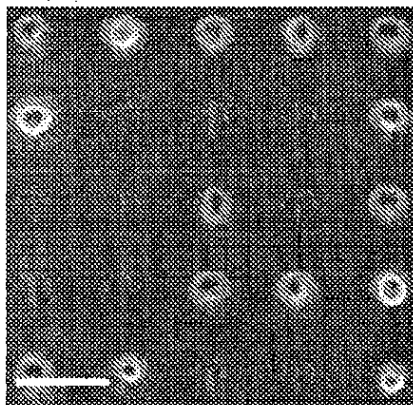


FIGURA 2D

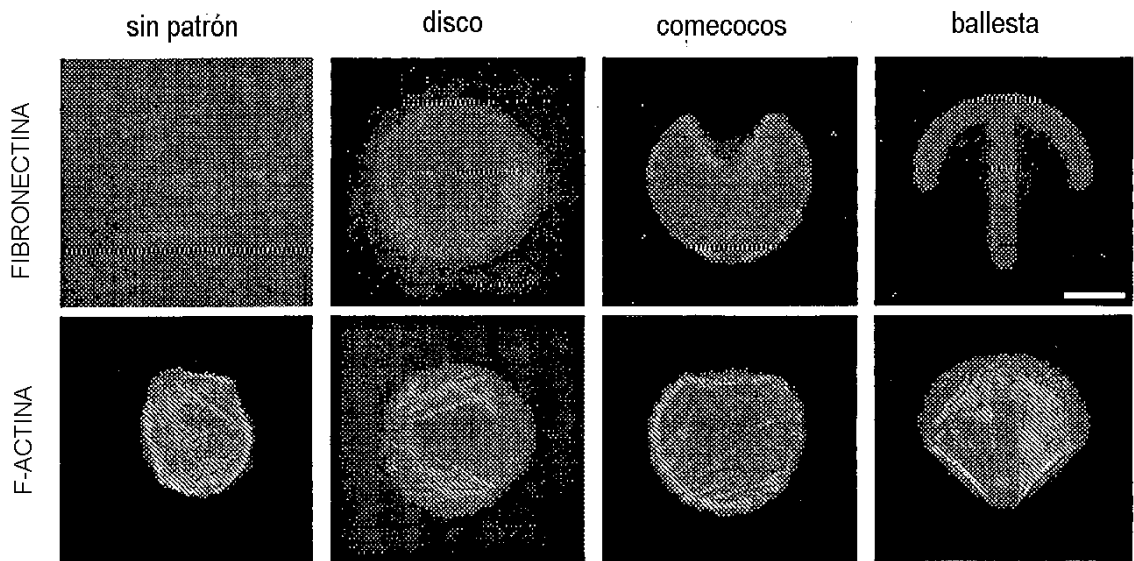


FIGURA 3A

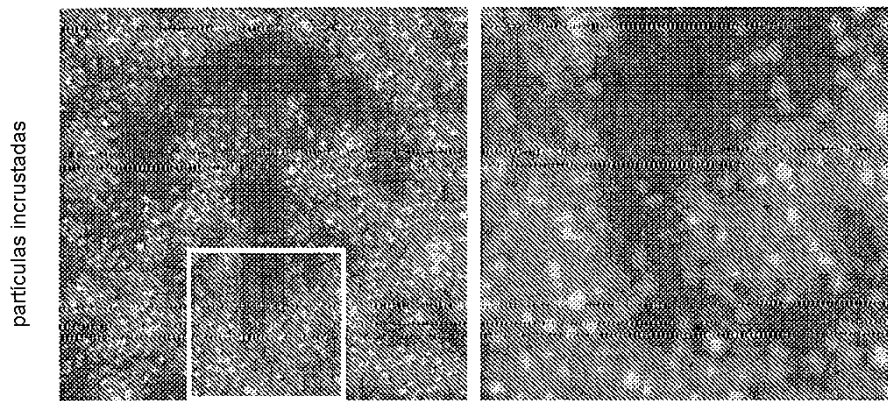


FIGURA 3B

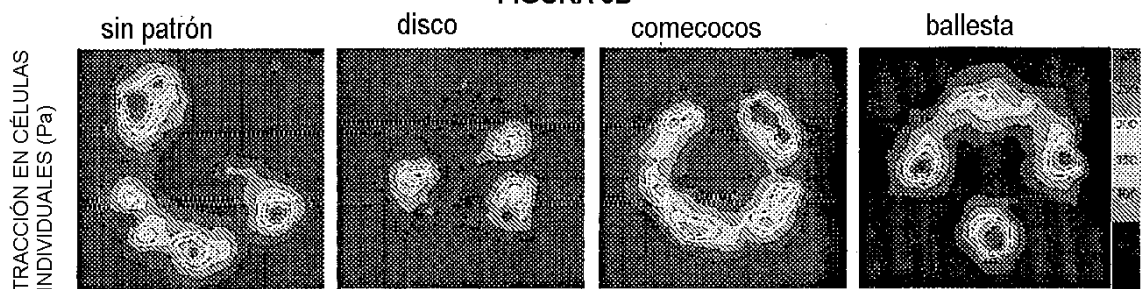


FIGURA 3C

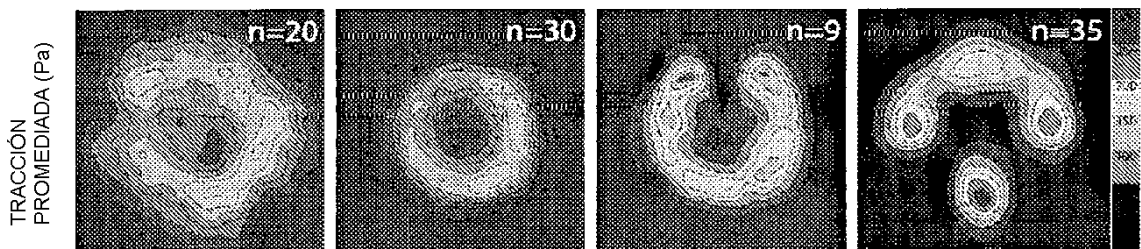


FIGURA 3D

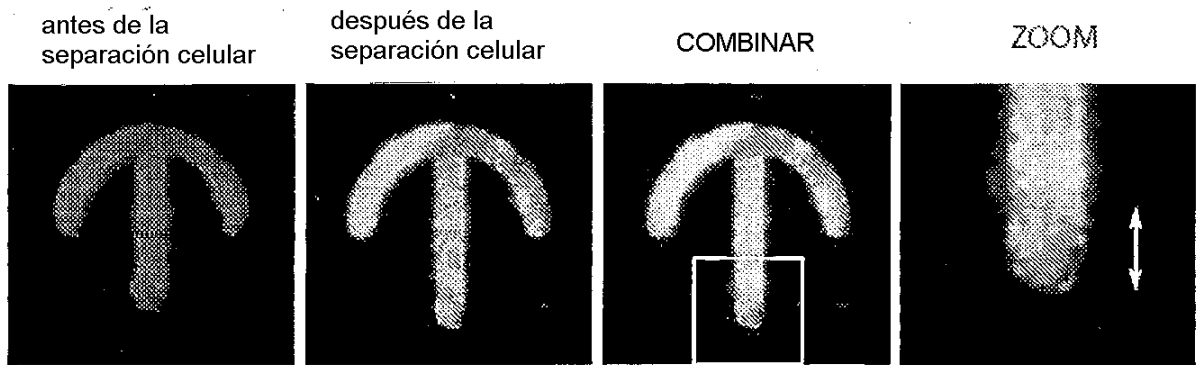


FIGURA 4A

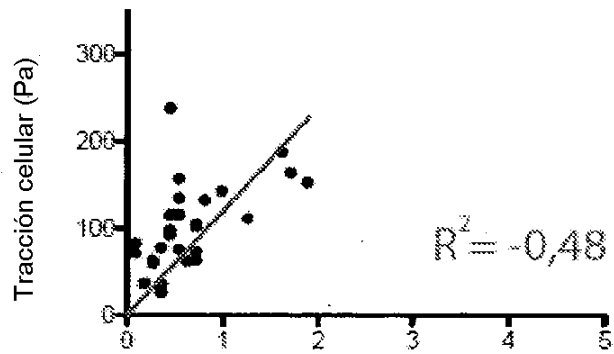
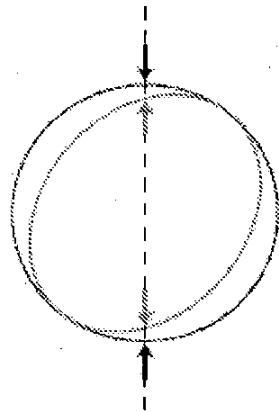


FIGURA 4B

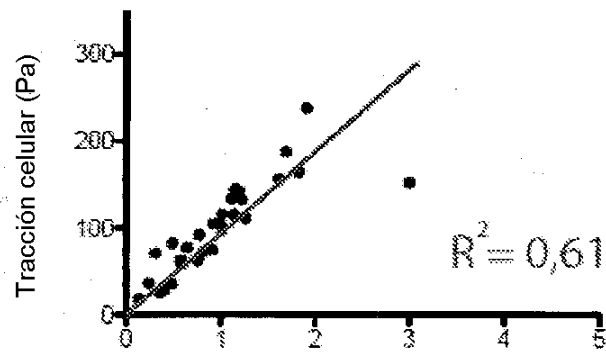
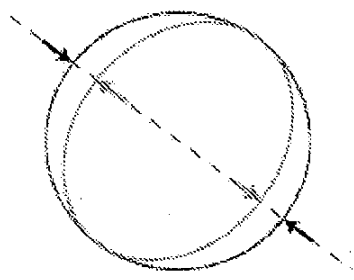


FIGURA 4C

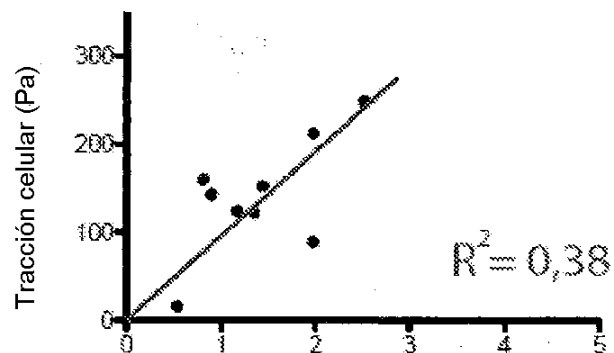
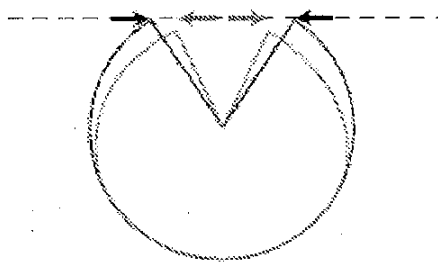


FIGURA 4D

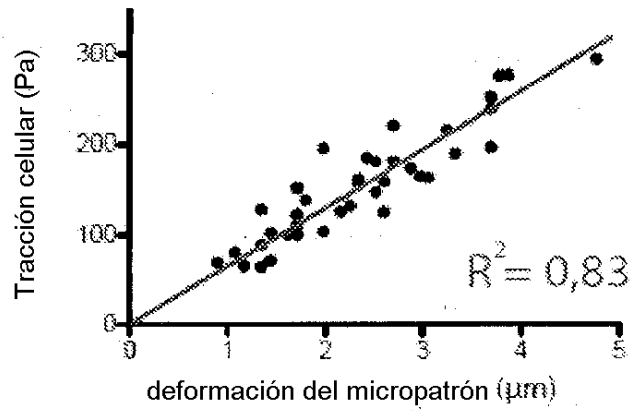
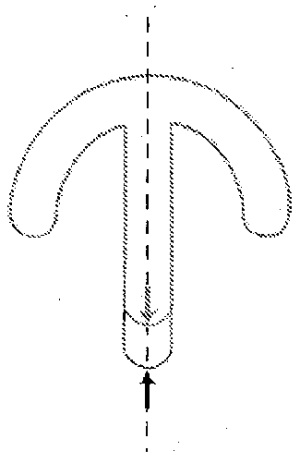
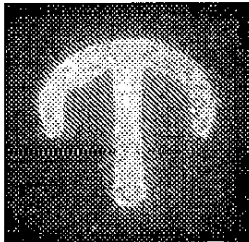


FIGURA 4E

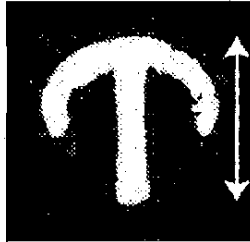
adquisición de la imagen



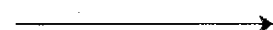
umbralizado de la imagen



medida de la longitud



cálculo de la tracción a partir de la curva de calibración



magnitud de la tracción celular

FIGURA 4F

Dosis-respuesta

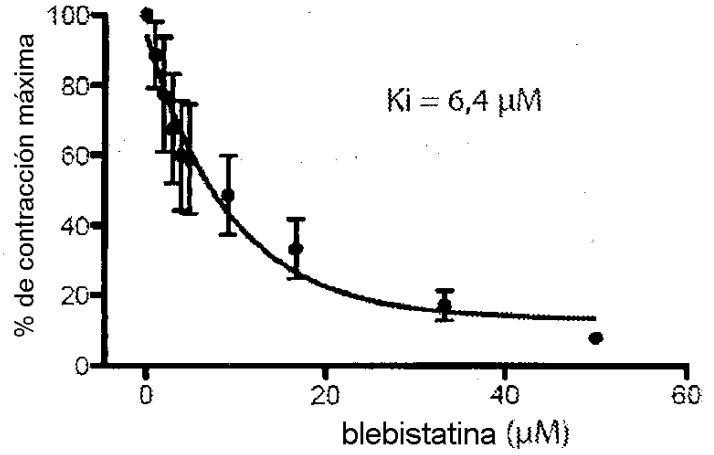
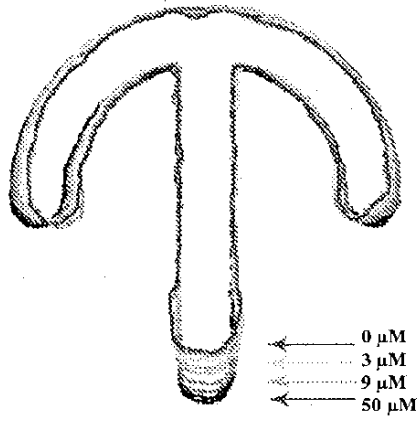


FIGURA 5A

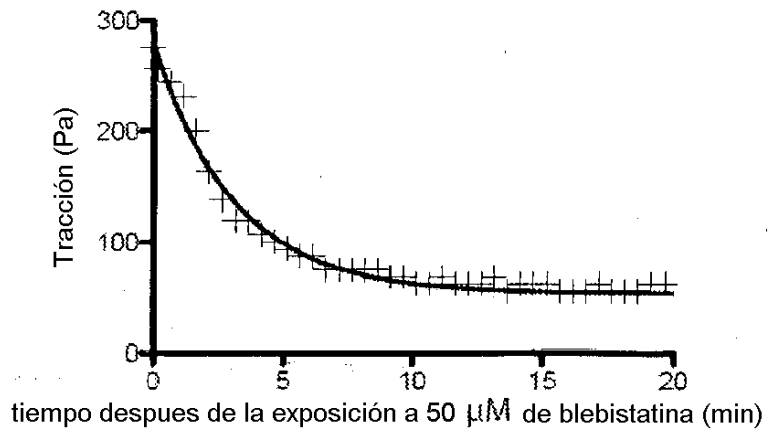
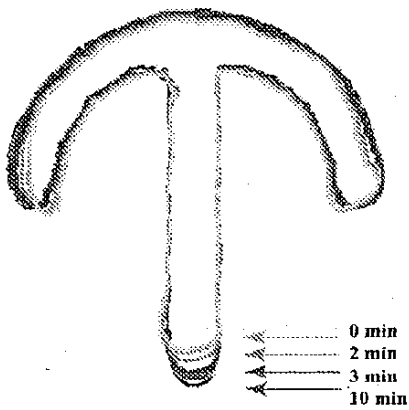


FIGURA 5B

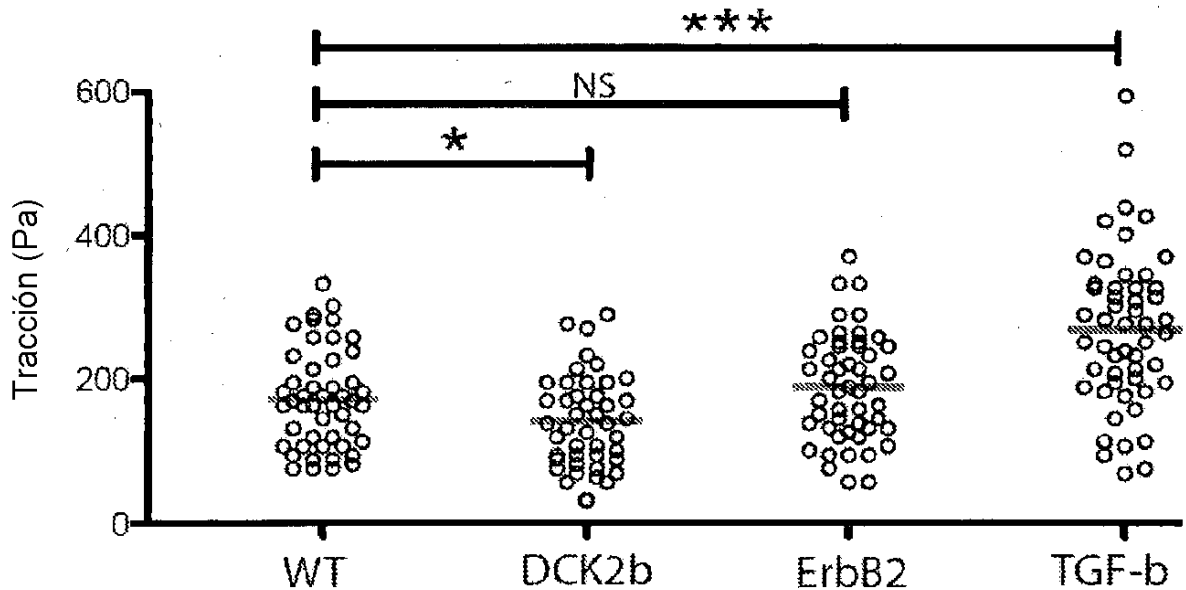


FIGURA 5C