

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 985**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2011 E 11305123 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2485050**

54 Título: **Uso de sustrato blando microimpreso para la medida de fuerzas de tracción celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.06.2015**

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:

**THERY, MANUEL y  
TSENG, QINGZONG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 538 985 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

Uso de sustrato blando microimpreso para la medida de fuerzas de tracción celular

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo y método para la medida de fuerzas de tracción celular

**5 Antecedentes de la invención**

La homeostasis tisular es muy dependiente de la organización espacial celular y del equilibrio mecánico. Las células se unen a su micromedio y ejercen fuerzas de tracción vía la contracción dependiente de miosina de su citoesqueleto de actina. Se ha mostrado recientemente que el nivel de contracción celular tiene un impacto drástico en la fisiología celular. Dirige la diferenciación de las células madre (Engler et al., 2006, Cell 126, 677-689). También promueve el crecimiento celular y se ha mostrado que es responsable de la transformación tumoral (Paszek et al., 2005, Cancer Cell 8, 241-254). Es necesario de este modo desarrollar métodos fiables y fáciles de emplear para medir el nivel de contracción celular.

Los dos métodos principales para medir las fuerzas de tracción celular están basados en la deformación del sustrato de cultivo celular. Ambos tienen limitaciones en la fabricación del sustrato y el análisis de la fuerza.

15 Entre los diferentes métodos desarrollados para la medida de fuerzas, la microscopia de fuerza de tracción (TFM) es uno de los más usados. 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.

20 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 incorporadas dentro. A continuación, el gel se activaba con reticuladores químicos (por ejemplo, Sulfo-SANPAH) y se revestía homogéneamente con proteína de matriz extracelular (ECM) para hacer el gel disponible para adhesión celular. Cuando las células se unían al gel, 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 desplazamiento. La fuerza de tracción se podría por lo tanto obtener resolviendo un problema inverso desplazamiento-fuerza.

30 Debido a la colocación al azar de las partículas de marcador de referencia, una imagen de la posición de las partículas relajadas, que se puede obtener solo después de separar la célula, se requiere siempre para obtener el campo de desplazamiento. Esto prohíbe la inmediata visualización de la tracción celular. Además, el seguimiento de las partículas colocadas al azar entre imágenes tensionadas y relajadas inevitablemente requiere intervención manual para corregir la falsa detección y unión de partículas que consume bastante tiempo. Este método requiere largos cálculos numéricos y regularizaciones específicas del caso para deducir el campo de fuerzas de tracción del campo de deformación del gel. Además, 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. La medida experimental del desplazamiento de las partículas fluorescentes es muy sensible al desplazamiento del foco (Marganski et al., 2003, Methods Enzymol 361, 197-211). Los subsecuentes defectos en el seguimiento automatizado de partículas conducen a grandes errores en la medida de las fuerzas (Sabass et al., 2008, Biophys J 94, 207-220).

40 Los errores asociados a la detección de partículas se podrían superar usando un conjunto de puntos microimpreso sobre la superficie del gel (Balaban, 2001, Nat Cell Biol 3, 466-472).

45 Un segundo método, cultivo celular sobre pilares microfabricados, permite un cálculo de la fuerza mucho más simple y de este modo más rápido. Este método está basado en el uso de un sustrato recubierto por un microconjunto tridimensional de pilares (o líneas) flexibles que actúan como sensor y revestido con proteínas adhesivas para permitir que las células se expandan. Las fuerzas aplicadas por las células sobre el sustrato se determinan por medio de la medida de la desviación de los pilares. Este método se describe, entre otros, en 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, Ghibaudo et al. Lab on Chip, 2011, 805-812, Buguin et al. Medecine/Science 2005, 21, 765-767, Saez et al. Journal of Physics Condensed Matter, 2010, 1-9. 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.

Con ambas técnica, las células se pueden mover libremente sobre el sustrato. Por lo tanto, adoptan todo tipo de formas. Esta ausencia de restricciones geométricas imposibilita cualquier procedimiento automatizado para la medida de la fuerza celular. Por lo tanto no son apropiadas para experimentos a gran escala.

55 El control de la forma celular usando micropatrones adhesivos es un método eficiente para superar las anteriormente

mencionadas limitaciones. Azioune et al. (Methods in Cell Biology, 2010, 97, 133-146) describen un método para preparar micropatrones de proteína por medio de un protocolo de impresión directa usando UVs profundos.

5 De hecho, los micropatrones adhesivos revestidos con ECM permiten la normalización de la forma de la célula individual 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 exigentes restricciones de orientación al ensamblaje de actina, reducir la variabilidad célula-célula y simplificar el método de cálculo de fuerzas controlando la localización de la aplicación de la fuerza.

10 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 del micropatrón es relativamente baja.

En ambos casos, la microimpresión requiere varias etapas de microfabricación, haciendo todo el procedimiento largo y difícil de realizar. Además, las geometrías de patrón que se han intentado hasta ahora no proporcionaron un control preciso del campo de fuerza celular.

15 La extracción de la fuerza de los datos de desplazamiento aún requiere cálculo no trivial. Además del cálculo numérico no triviales, la forma y distribución de fuerza celular eran muy variables. Esto hace imposible el análisis cuantitativo a gran escala. En particular, la medida de fuerzas se hacía aun a partir del desplazamiento de partículas, teniendo de este modo los inconvenientes mencionados anteriormente. Aunque se controlaba la forma de la célula, las geometrías escogidas en su trabajo no podían regularizar la distribución de la fuerza de tracción. De este modo, las fuerzas aún estaban distribuidas al azar, y la deformación del sustrato era compleja y diferente de una célula a otra.

### Sumario de la invención

25 El principal objetivo de esta invención es simplificar, automatizar y acelerar la medida de la fuerza de tracción usando micropatrones adhesivos que pueden regularizar las fuerzas de tracción celular y al mismo tiempo servía como marcador de referencia. El complicado cálculo de la fuerza, por lo tanto, se puede reemplazar por una simple medida de la deformación del patrón. La medida de la fuerza de tracción de este modo se vuelve no solo accesible para todos los laboratorios de biología, sino también se vuelve compatible con métodos de alto rendimiento y de este modo se podría incorporar en la selección de fármacos a gran escala.

30 Los inventores introducen micropatrones adhesivos especialmente diseñados que pueden estandarizar la distribución de fuerzas de tracción así como la forma celular. Por consiguiente, los micropatrones tienen una forma apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular en una única región o punto. El micropatrón también se marca fluorescentemente lo que permite una lectura directa y rápida de la fuerza de tracción midiendo solo la imagen del patrón deformado. La imagen relajada después de separar la célula ya no se requiere así como la problemática etapa de seguimiento de las partículas y el complicado cálculo numérico.

35 La presente invención se refiere a un método para medir una fuerza de tracción celular de una célula, que comprende:

- proporcionar un sustrato blando plano con un módulo de Young de alrededor de 0,1 a 100 kPa, que tiene dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar reproduciblemente la fuerza de tracción celular en una única región o punto, en el que:
- 40 - el tamaño de dicho micropatrón adhesivo es tal que se puede adherir una sola célula; y
- el micropatrón adhesivo incluye un área adhesiva que comprende un área de expansión adhesiva y dos conjuntos de dos puntos adhesivos, en el que
- los puntos adhesivos están sobre o cerca de la envoltura convexa del micropatrón adhesivo;
- cada conjunto contiene un punto sobre cada lado de un eje en el plano de la envoltura convexa;
- 45 - los dos puntos localizados en el mismo lado del eje están separados por una región no adhesiva que forma entre 15% y 35% de la longitud total de la envoltura convexa;
- el primer conjunto de puntos adhesivos está esencialmente localizado cerca o sobre el eje para formar una región adhesiva de no más del 10% de la longitud total de la envoltura convexa; y
- 50 - el área de expansión adhesiva está dispuesta sobre cada lado del eje entre el segundo conjunto de puntos adhesivos para conectar los dos puntos y hacia el primer conjunto de puntos adhesivos entre las dos regiones no adhesivas de c).

- exponer el sustrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que una célula se una al micropatrón adhesivo;

- medir la posición de dicha única región o punto de dicho micropatrón; y

5 - calcular el desplazamiento de dicha única región o punto de dicho micropatrón, determinando por ello la fuerza de tracción celular.

Preferentemente, la fuerza de tracción celular se determina a partir de una curva de calibración que muestra la relación entre la fuerza de tracción celular y el desplazamiento de dicha única región o punto de dicho micropatrón.

10 La presente invención se refiere también a un dispositivo apropiado para el método anteriormente mencionado. El dispositivo de la invención es como se describe anteriormente. El dispositivo comprende un sustrato blando y dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular en una única región o punto.

En una realización preferida del método y del dispositivo, el micropatrón adhesivo tiene un tamaño de modo que solo una célula humana o animal individual se puede adherir sobre dicho micropatrón.

15 Preferentemente, el micropatrón es un micropatrón como se define en la Fig. 1B. Más preferentemente, el micropatrón adhesivo puede tener una forma de ballesta. Más preferentemente, la única región o punto está marcada, preferentemente marcada con fluorescencia. Aún más preferentemente, el micropatrón adhesivo está marcado, preferentemente marcado por fluorescencia.

En una realización más preferida del método y del dispositivo, el sustrato comprende varios micropatrones adhesivos, idénticos o diferentes.

20 En una realización preferida del método y del dispositivo, el sustrato blando tiene un módulo de Young de alrededor de 1 a alrededor de 10 kPa. En otra realización, el sustrato blando es un gel de poliacrilamida. Más preferentemente, el sustrato blando es un gel de poliacrilamida y tiene un módulo de Young de alrededor de 1 a alrededor de 10 kPa.

25 La presente invención también se refiere a un kit para medir una fuerza de tracción celular de una célula, comprendiendo dicho kit un dispositivo como se describe aquí y una curva de calibración que muestra la relación entre la fuerza de tracción celular y el desplazamiento de la única región o punto del micropatrón.

La presente invención se refiere adicionalmente el uso de un dispositivo como se describe aquí para medir una fuerza de tracción celular de una célula.

30 La presente invención se refiere a un método para determinar el efecto de una molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de una célula, que comprende:

- medir la fuerza de tracción de una célula por el método como se define anteriormente;

- medir la fuerza de tracción de la célula que se incubó con la molécula candidata/de ensayo por el método como se define anteriormente; y

35 - comparar la fuerza de tracción de la célula que se incubó o no con la molécula candidata/de ensayo, determinando por ello el efecto de la molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de la célula.

La presente invención se refiere también a un método para determinar la diferencia de tracción celular de dos tipos de células, que comprende:

- medir la fuerza de tracción de un primer tipo de células por el método como se define anteriormente;

- medir la fuerza de tracción de un segundo tipo de células por el método como se define anteriormente; y

40 - comparar la fuerza de tracción del primer y segundo tipo de células, determinando por ello la diferencia de tracción celular de los dos tipos de células.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1 – representación esquemática de los micropatrones adhesivos

45 Fig 1 A: Este diagrama resalta los parámetros críticos que gobiernan la estimulación y orientación de las fuerzas de tracción celular de modo que el nivel global de contractilidad celular se puede evaluar por la medida de un solo punto de la célula. El micropatrón incluye un área adhesiva, connata o no, para soportar la expansión celular y orientarla hacia los puntos adhesivos (área adhesiva de expansión). Sobre cada uno de dos lados opuestos de este área adhesiva, el micropatrón incluye adicionalmente dos puntos adhesivos separados por una región no adhesiva para

- 5 estimular la formación y contracción de fibras de tensión. Las fuerzas de tracción se aplican sobre estos puntos. Uno de los dos puntos adhesivos está localizado en el fondo del área adhesiva de expansión. Los dos puntos adhesivos del fondo (para cada lado) están cerca entre sí, lo que conduce a una proximidad geométrica entre los dos sitios de aplicación de la fuerza, induciendo por ello la concentración de la producción de la fuerza en una única región o punto. Los dos puntos adhesivos del fondo (para cada lado) se pueden combinar en un solo punto. Por supuesto, el área adhesiva de expansión y los cuatro puntos adhesivos; o el área adhesiva de expansión y los dos puntos adhesivos se pueden combinar o condensar en un micropatrón adhesivo connotado como se ilustra en la Fig. 1B. La línea discontinua ilustra el contorno de la expansión de las células sobre el micropatrón.
- 10 Fig. 1B: Ejemplos de geometrías de micropatrón que se pueden usar para estimular y enfocar fuerzas de tracción celular en una única región o punto. La línea discontinua ilustra el contorno de la expansión de las células sobre el micropatrón.
- Fig. 1C-G: Ejemplos de geometrías de micropatrón que no tienen la propiedad de orientar y enfocar las fuerzas de tracción celular en una única región o punto. La línea discontinua ilustra el contorno de la expansión de las células sobre el micropatrón.
- 15 Fig. 1C: Los puntos adhesivos están muy separados entre sí. La célula no se expandirá en todos ellos y no tirará del punto del fondo.
- Fig. 1D: No hay borde adhesivo para estimular y colocar las fuerzas de tracción.
- FIG. 1E: Sólo hay un borde no adhesivo. Las fuerzas de tracción no serán estimuladas completamente. Tampoco estarán enfocadas en un solo punto.
- 20 FIG. 1F: Los dos bordes no adhesivos son demasiado cortos. Las fuerzas de tracción no serán estimuladas completamente.
- FIG. 1G: Los dos bordes no adhesivos están demasiado alejados entre sí. Las fuerzas de tracción no estarán enfocadas en un solo punto.
- La Fig. 1H describe las características de un micropatrón adhesivo simplista ilustrativo. El micropatrón adhesivo presenta una envoltura convexa que tiene dos partes no adhesivas, cada una por lo menos del 15% de la longitud total de la envoltura separada por una parte adhesiva de no más de 10% de la longitud total de la envoltura.
- 25 Figura 2 – Microimpresión de gel de PAA.
- FIG. 2A: Método de microimpresión de PAA. El gel se polimeriza sobre la fotomáscara, se expone a UV profundo y se reviste con proteínas ECM. Las células se unen específicamente a las regiones expuestas a UV.
- 30 FIG. 2B: Revestimiento de fibronectina y fibrinógeno-A546 sobre PAA microimpresa. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .
- FIG. 2C: Revestimiento de fibronectina y fibrinógeno-A546 sobre PAA microimpresa. La barra de escala representa 500  $\mu\text{m}$ .
- 35 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  $\mu\text{m}$ .
- Figura 3 -. El dibujo del contorno del citoesqueleto de actina normaliza el campo de fuerza de tracción celular.
- 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, sin patrón, o en micropatrones de fibronectina en forma de disco, o comeccocos (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.
- 40 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).
- 45 FIG. 3C: El cálculo de 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 comeccocos y ballesta, desarrollan fuerzas de tracción mejoradas en los sitios de adhesión que flanquean las regiones no adhesivas.
- 50 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 sin patrones 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.

5 La barra de escala es de 10  $\mu\text{m}$ . 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

10 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.

15 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.

20 FIG. 4D: En micropatrones de forma de comecocos 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.

25 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.

30 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.

35 FIG. 5B: Fuerzas de tracción celular con el tiempo en respuesta a 50  $\mu\text{M}$  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).

40 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 $\beta$ 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%: \* =  $P < 0,05$  \*\* =  $P < 0,01$  \*\*\* =  $P < 0,001$ .

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a un dispositivo apropiado para medir la fuerza de tracción celular, a un kit que lo incluye, a un método para medir la fuerza de tracción celular usando tal dispositivo, y a métodos para cribar o estudiar moléculas. Una ventaja de la invención es que una medida local permite la evaluación del estado global de contracción de la célula.

Dispositivo para medir la fuerza de tracción celular

50 Se describe aquí un dispositivo apropiado para medir la fuerza de tracción celular de una o varias células, comprendiendo dicho dispositivo un sustrato blando y dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular en un solo punto.

Preferentemente, el sustrato presenta varios micropatrones adhesivos dispuestos sobre él. Más particularmente,

dicho dispositivo comprende por lo menos 2 micropatrones adhesivos, preferentemente por lo menos 5, 10, 100, 1.000, 10.000, o 100.000 micropatrones adhesivos. En una realización preferida, dicho dispositivo comprende entre 10 y 50.000 micropatrones adhesivos/cm<sup>2</sup>, aún más preferentemente entre 5.000 y 15.000 micropatrones adhesivos/cm<sup>2</sup>, aún más preferentemente alrededor de 10.000 micropatrones adhesivos/cm<sup>2</sup>. Preferentemente, los patrones adhesivos están separados por lo menos por 10 µm, preferentemente por lo menos por 20, 30, o 50 µm.

Por “alrededor de” se entiende el valor más o menos el 5%.

#### Substrato blando

Por “substrato blando” se entiende un substrato que sea deformable (flexible, plegable o maleable) cuando se expone a una fuerza externa, en particular a una fuerza de tracción celular. Generalmente, los substratos blandos se definen por un módulo de Young en pascuales (Pa). Los substratos blandos están adaptados al intervalo de fuerzas de tracción celular a determinar. Por lo tanto, en el contexto de la invención, los substratos blandos tienen un módulo de Young de alrededor de 0,1 a alrededor de 100 kPa, preferentemente de alrededor 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 substrato blando menos flexible. En el caso opuesto, si la célula tiene una débil capacidad de contracción, el substrato blando será muy flexible.

En una realización, el substrato blando está hecho de un solo material. En otra realización, el substrato blando está hecho de una mezcla de varios materiales.

El substrato puede estar hecho de cualquier polímero que no es apropiado para la adhesión celular o que se trata para convertirse en citóforo (por ejemplo, mediante el revestimiento con un derivado de oligo- o poli-etilenglicol). Preferentemente, el substrato está hecho de cualquier polímero que no es apropiado para la adhesión celular.

Los ejemplos no limitantes de substratos blandos incluyen geles de poliacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (pHEMA), colágeno, fibrina, gelatina, alginato, PDMS (polidimetilsiloxano) y PVA (poli(acetato de vinilo)). El polímero del substrato blando puede ser cualquier polímero que forma hidrogel. Por ejemplo, el polímero puede ser polietilenglicol o poliacrilamida (PAA). La polimerización se puede efectuar por cualquier medio conocido por uno de experiencia media en la técnica.

En una realización particularmente preferida, el substrato es un gel de poliacrilamida. La polimerización se puede realizar a partir de una mezcla de acrilamida y un agente de reticulación, tal como N,N-metilenbisacrilamida. Alternativamente, la polimerización también se puede efectuar por polimerización por radicales. Más particularmente, la polimerización de poliacrilamida se puede realizar por polimerización por radicales en presencia de tetrametiletilendiamina (TMEDA) y persulfato de amonio.

La ventaja de la acrilamida es que se puede polimerizar en un gel con una rigidez finamente escogida. De hecho, variando las cantidades relativas de acrilamida y bisacrilamida monoméricas, la rigidez del gel de poliacrilamida resultante se puede incrementar (usando una cantidad relativa más alta de bisacrilamida) o disminuir (usando una cantidad relativa menor de acrilamida). Además, la adición de aditivos tales como polipirrol y poli-etil-glicol alterará la rigidez de un gel de poliacrilamida. 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.

De otra manera, el substrato blando puede ser cualquier hidrogel acrílico basado en ácido construido por polimerización de radicales libres, tal como poliacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida), y poli(metacrilato de 2-hidroxietilo). La acrilamida monomérica puede ser reticulada por cualquier grupo diacrilato, tal como dimetacrilato de etilenglicol y dimetacrilato de 1,4-butanodiol, o por N,N'-metilenbisacrilamida. La rigidez de la acrilamida polimerizada se puede ajustar variando la relación de agente de reticulación a la subunidad de acrilamida. Además, la rigidez del gel se puede modificar copolimerizando la acrilamida con otros polímeros, tales como polipirrol y polietilenglicol. La acrilamida se puede copolimerizar con grupo poliácetileno tal como polipirrol y polianilina para dar lugar a un polímero conductor.

Los substratos blandos también pueden ser otros geles blandos biocompatibles tales como hidrogeles compuestos de proteínas tales como gelatina, colágeno, arginina, fibrina, y fibronectina, y glicoproteína tal como hialuronato.

Típicamente, el substrato blando es plano. Sin embargo, un substrato curvo también puede ser contemplado por la invención.

Opcionalmente, el substrato blando puede incluir, además, las micro-partículas marcadas homogéneamente dispersas en él, micropartículas preferentemente marcadas fluorescentemente. 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.).

El sustrato blando se coloca en una placa. Preferentemente, la placa puede estar formada de un material rígido o semi-rígido, tal como plástico, metal, cerámica, vidrio o combinaciones de los mismos. Preferentemente, el material es conveniente para microscopias confocal, óptica y/o de fluorescencia. En la realización más preferida, la placa es vidrio, preferentemente vidrio silanizado. Por ejemplo, una placa conveniente según la presente invención es un cubreobjetos o una lámina.

El dispositivo puede comprender varios grupos de micropatrones adhesivos sobre el mismo sustrato o placa separados entre sí de tal modo que cada grupo se puede incubar en un medio diferente. Por ejemplo, un grupo de micropatrones adhesivos se puede poner en contacto con un compuesto de ensayo y otro grupo se puede poner en contacto con otro compuesto de ensayo o con ningún compuesto de ensayo. Esta separación se puede proporcionar por una barrera física tal como un sello de teflón. Por ejemplo, véase Teflon® SPI de SPI Supplies, láminas impresas de Teflon® de Aname.

#### Micropatrones adhesivos

Para normalizar la producción de fuerza en células, de modo que la magnitud de la fuerza se pueda cuantificar con una simple medida de la posición de una única región o punto, la geometría del micropatrón debe concentrar la mayoría de los sitios de aplicación de la fuerza en esa única región o punto. Por "una única región" o "un único punto" se entiende un pequeño área, preferentemente de menos de 100  $\mu\text{m}^2$ , más preferentemente de menos de 25  $\mu\text{m}^2$  y aún más preferentemente de alrededor de 1-10  $\mu\text{m}^2$ . Por "concentrar" se entiende que se refiere al hecho de que una única región o punto presenta la más alta aplicación de la fuerza. Por ejemplo, esta única región o punto presenta una fuerza de por lo menos 300 Pa.

En algunos aspectos, los micropatrones adhesivos son tales que presentan una forma apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular en una única región o punto. Los inventores establecieron las reglas para obtener tales micropatrones.

El micropatrón adhesivo de la invención incluye un área adhesiva que comprende un área de expansión adhesiva y dos conjuntos de dos puntos adhesivos, en el que

a) los puntos adhesivos están sobre o cerca de la envoltura convexa del micropatrón adhesivo;

b) cada conjunto contiene un punto en cada lado de un eje en el plano de la envoltura convexa;

c) los dos puntos localizados en el mismo lado del eje están separados por una región no adhesiva que forma entre 15% y 35% de la longitud total de la envoltura convexa;

d) el primer conjunto de puntos adhesivos está esencialmente localizado cerca o sobre el eje para formar una región adhesiva de no más de 10% de la longitud total de la envoltura convexa; y

e) el área de expansión adhesiva está dispuesta sobre cada lado del eje entre el segundo conjunto de puntos adhesivos para conectar los dos conjuntos y hacia el primer conjunto de puntos adhesivos entre las dos regiones no adhesivas de c).

Por "envoltura convexa" se entiende el mínimo polígono convexo que contiene el patrón adhesivo. Más particularmente, la envoltura convexa de dicho micropatrón corresponde al área cubierta por una célula expandida sobre este micropatrón adhesivo.

De hecho, como se ilustra en la Fig. 1A y 1H, el micropatrón adhesivo se puede describir que comprende un área adhesiva de expansión y cuatro puntos adhesivos. Por "punto adhesivo" se entiende que se refiere a un área pequeña, preferentemente de menos de 100  $\mu\text{m}^2$ , más preferentemente de menos de 25  $\mu\text{m}^2$  y aún más preferentemente de alrededor de 1-10  $\mu\text{m}^2$ . Con respecto a un eje (por ejemplo, un eje que divide la superficie inscrita de la envoltura convexa en dos partes iguales), el micropatrón incluye dos conjuntos de dos puntos adhesivos, cada uno localizado en cada lado del eje (por ejemplo, los puntos a y b en el primer conjunto y los puntos c y d en el segundo conjunto, con los puntos a y c en un lado del eje, y los puntos b y d en el otro lado), siendo no adhesiva la superficie entre dos puntos localizados en el mismo lado del eje y un conjunto de puntos adhesivos (por ejemplo, los puntos a y b) estando sustancialmente localizados cerca o sobre el eje y que forman la única región o punto que concentra la fuerza de tracción celular. El área adhesiva de expansión es tal que soporta la expansión de la célula y la orienta hacia los cuatro puntos adhesivos y permite la adhesión de la célula sobre ellos. Opcionalmente, el área de expansión adhesiva dispuesta sobre cada lado del eje entre el segundo conjunto de puntos adhesivos puede estar localizada también opuesta al primer conjunto de puntos adhesivos (por ejemplo, por encima de la línea que une los puntos del segundo conjunto c y d de la Fig. 1A; véase Fig. 1B). Opcionalmente, el eje es un eje de simetría para el micropatrón adhesivo. Los puntos adhesivos se pueden combinar opcionalmente con el área adhesiva de expansión. Los puntos localizados cerca o sobre el eje se pueden combinar opcionalmente.

El micropatrón incluye un área adhesiva, connata o no, para soportar la expansión de la célula en una forma

apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular en una única región o punto. En particular, el área de expansión adhesiva puede estar unida o no. En la adición, el área de expansión adhesiva y uno, varios o todos los puntos adhesivos se pueden combinar.

5 Esta forma se puede definir adicionalmente por uno varios de los siguientes parámetros, a saber 1) la distribución del área adhesiva con respecto a la envoltura convexa del micropatrón, 2) el porcentaje de área adhesiva con respecto a la superficie inscrita por la envoltura convexa, y 3) la distribución del área adhesiva con respecto a la superficie inscrita por la envoltura convexa.

10 1) El micropatrón adhesivo es tal que la envoltura convexa de dicho micropatrón incluye dos partes no adhesivas cada una por lo menos de 15% de la longitud de la envoltura total separada por una parte adhesiva de no más del 10% de la longitud total de la envoltura, formando la última parte adhesiva la única región o punto sobre la que se concentran las fuerzas de tracción. En una realización preferida, la envoltura convexa tiene dos y solo dos partes no adhesivas de por lo menos 15% cada una. Sin embargo, la envoltura convexa puede comprender adicionalmente otras partes no adhesivas, pero pequeñas (por ejemplo, menos de 10% de la longitud total de la envoltura, preferentemente menos de 5%). En una realización particular, la envoltura convexa incluye dos partes no adhesivas de 20% por lo menos cada una de la longitud total de la envoltura separadas por una parte adhesiva de no más de 5% de la longitud total de la envoltura. Por ejemplo, la envoltura convexa incluye dos partes no adhesivas cada una de entre 15% a 35%, preferentemente entre 20% y 30%. Más particularmente, cada una de las dos partes no adhesivas representa alrededor de 15, 20, 25, 30 o 35% de la longitud total de la envoltura, más preferentemente alrededor de 20, 25, o 30%. En una realización preferida, la parte adhesiva de la envoltura convexa entre sus dos partes no adhesivas es de alrededor de 2-10% de la longitud total de la envoltura, preferentemente alrededor de 5%.

25 2) La superficie inscrita por la envoltura convexa incluye por lo menos 10% de área no adhesiva, preferentemente por lo menos 15, 20, 25% de área no adhesiva. Por ejemplo, la superficie inscrita comprende entre 10 y 60% de área no adhesiva, preferentemente entre 15 y 50%, y más preferentemente entre 25 y 50%. En una realización particular, la superficie inscrita por la envoltura convexa incluye alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60% de área no adhesiva, preferentemente alrededor de 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50% de área no adhesiva.

30 3) La distribución del área adhesiva con respecto a la superficie inscrita por la envoltura convexa se puede definir por dos superficies unidas del micropatrón: la primera está inscrita en las dos partes no adhesivas de la envoltura convexa y la parte adhesiva que separa las dos partes no adhesivas (superficie inferior con respecto a la línea que une los puntos del segundo conjunto c y d de la Fig. 1A), y la segunda se inscribe por el resto de la envoltura convexa (superficie superior con respecto a la línea que une los puntos del segundo conjunto c y d de la Fig. 1A). La primera superficie incluye menos del 50% de área adhesiva, preferentemente menos de 45, 40, 35 o 30%. Por ejemplo, 5-50% de la primera superficie puede ser un área adhesiva, preferentemente 10-30%. La primera superficie tiene que incluir un área adhesiva que permite que la célula durante la expansión llegue y se adhiera a la parte adhesiva de la envoltura convexa que separa las dos partes no adhesivas. Sin embargo, esta superficie es preferente y esencialmente no adhesiva para crear un desequilibrio que permite concentrar la fuerza de tracción celular sobre la parte adhesiva de la envoltura convexa que separa las dos partes no adhesivas. La segunda superficie incluye más de 50% de área adhesiva, preferentemente más de 55, 60, 65, 70 o 75%. Por ejemplo, el área adhesiva de la segunda superficie representa 50-100% de la segunda superficie, preferentemente 60-100%.

Las reglas deducidas de las figuras se ilustran en la Fig. 1H.

40 En una realización preferida, el micropatrón puede presentar un eje de simetría, incluyendo este eje el único punto o región que concentra la fuerza de tracción celular (es decir, la parte adhesiva de la envoltura convexa que separa las dos partes no adhesivas). Más preferentemente, el micropatrón puede presentar un único eje de simetría.

45 Preferentemente, el eje en el plano de la envoltura convexa es un eje medio de la envoltura convexa. Más preferentemente, este eje es un eje de simetría. Se puede describir que los micropatrones adhesivos también incluyen, como se ilustra en la Fig. 1A:

1) un área de expansión adhesiva;

2) en cada uno de los dos lados opuestos de esta área de expansión, dos puntos adhesivos separados por una región no adhesiva (por ejemplo, a y c, y b y d, respectivamente), estando uno de los dos puntos adhesivos en el fondo del área de expansión (por ejemplo, a y b).

50 La anterior descripción del micropatrón adhesivo indica una parte superior e inferior del área de expansión solo por conveniencia. Por supuesto, la definición se puede adaptar si el micropatrón se hace rotar, por ejemplo, 90 o 180°. El área adhesiva 1) soporta la expansión de la célula y la orienta hacia los puntos adhesivos. Puede estar unida o no. Se puede combinar con alguno o todos los puntos adhesivos de 2).

55 Cualquiera que sea el modo de describir los micropatrones adhesivos, se cree que, sin estar vinculados a la teoría, las dos partes no adhesivas de la envoltura convexa estimulan la formación y contracción de fibras de tensión. Las fuerzas de tracción se aplican sobre los puntos o regiones adhesivas que bordean las dos partes no adhesivas de la

envoltura convexa. La concentración de la producción de fuerza sobre una única región o punto (a saber la parte adhesiva de la envoltura convexa entre sus dos partes no adhesivas) es el resultado de la proximidad geométrica entre los dos sitios de aplicación de la fuerza.

5 Los ejemplos ilustrativos de micropatrones apropiados se muestran en la Fig. 1B. Al contrario, la Fig. 1C-G ilustra micropatrones no apropiados y explica porqué tales micropatrones no son apropiados para este uso.

10 Se puede describir que el micropatrón adhesivo alternativamente o además comprende un área elongada adhesiva, connata o no, y otro elemento adhesivo en uno de los extremos del elemento adhesivo elongado, en particular aproximadamente perpendicular al área adhesiva elongada. Por área elongada se entiende una forma que tiene un factor de forma superior a 3, siendo el factor de forma la relación entre la longitud del área y su anchura. Este otro elemento no puede estar presente en ambos extremos del elemento elongado. El área elongada es importante para la lectura directa y rápida de la fuerza de tracción celular porque permite colocar la más alta fuerza de tracción en los extremos del área elongada y orientarla. A continuación, la etapa de medida de la fuerza está limitada a la medida del desplazamiento del extremo y de la longitud del área elongada.

15 En una realización preferida, el micropatrón adhesivo presenta solo un eje de simetría. Preferentemente, el área o elemento elongado es el eje de simetría del micropatrón adhesivo.

En una realización particular, el micropatrón adhesivo es uno de los micropatrones definidos en la Fig. 1B. En una realización preferida, el micropatrón adhesivo tiene una forma de ballesta.

20 Los micropatrones adhesivos comprenden o están hechos de moléculas que promueven la unión de la célula. 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 uno de sus fragmentos, moléculas de la matriz extracelular tales como laminina, fibronectina, vitronectina, colágeno, péptidos sintéticos, carbohidratos y similares. Preferentemente, dichos patrones adhesivos comprenden moléculas de la matriz extracelular, más preferentemente fibronectina.

25 Preferentemente, para facilitar la medida de la posición de un único punto o área, o de la longitud del área elongada, los micropatrones están marcados, preferentemente marcados fluorescentemente. Sin embargo, también se puede contemplar aquí otro marcado tal como radioactividad o luminiscencia. En una realización preferida, las moléculas que promueven la unión celular están marcadas, preferentemente marcadas fluorescentemente. En una realización muy particular, las moléculas que promueven la unión celular son fibronectina fluorescente. Alternativamente, las moléculas que promueven la unión celular se pueden mezclar o usar en combinación con otras moléculas marcadas, preferentemente moléculas fluorescentes. Por ejemplo, las moléculas que promueven la unión celular se pueden mezclar con fibrinógeno conjugado con un colorante fluorescente. En una realización muy particular, las moléculas que promueven la unión celular son fibronectina y se usan en combinación con fibrinógeno fluorescente.

También se podría contemplar que el micropatrón esté solo marcado (preferentemente marcado fluorescentemente) en su único punto o área, o en su área elongada.

35 En un cierto aspecto, el patrón adhesivo puede ser apropiado para la unión de varias células. Las células se adherirán sobre el patrón adhesivo u organizarán entre sí para orientar y concentrar la fuerza de tracción en la única región o punto. Entonces la fuerza de tracción determinada corresponde a la fuerza global del grupo de células.

En una realización preferida de la invención, el tamaño del patrón adhesivo es tal que solo una célula individual humana o animal se puede adherir sobre dicho patrón.

40 Preferentemente, el área de la envoltura convexa del micropatrón adhesivo está entre 100 y 4.000  $\mu\text{m}^2$ , más preferentemente entre 200 y 2.000  $\mu\text{m}^2$ , aún más preferentemente entre 500 y 1.500  $\mu\text{m}^2$ . El área dependerá del número de células que se van a adherir sobre ella y del tamaño de las células consideradas. De hecho, el área de la envoltura convexa generalmente corresponde al área de la expansión de la célula sobre el micropatrón adhesivo.

Preparación del dispositivo

45 El dispositivo como se describe aquí se puede preparar por cualquier tecnología conocida en la técnica. Por ejemplo, el dispositivo se puede preparar como se describe en el documento WO 2010/011407.

50 Sin embargo, el dispositivo se prepara preferentemente por el método anteriormente detallado que da una mayor calidad de micropatrón. De hecho, los inventores diseñaron un nuevo procedimiento para la preparación de sustratos blandos para medidas de tracción celular que implican una etapa clave de polimerización del gel in situ y activación con UV profundo. El nuevo procedimiento permite la preparación de sustratos blandos homogéneos superiores que tienen micropatrones adhesivos de mayor resolución espacial. El procedimiento se ilustra en la Figura 2A.

Los dispositivos de la presente invención se pueden preparar por un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) producir un polímero entre una placa y una máscara no transparente que comprende por lo menos un área transparente que tiene la forma del micropatrón adhesivo como se define anteriormente,

(b) exponer el polímero a UV profundo a través de la máscara,

(c) separar la máscara del polímero,

5 (d) poner en contacto el polímero con una molécula que promueve la unión celular, y

(e) opcionalmente retirar por lavado el exceso de moléculas.

La etapa (a) comprende la producción de un polímero entre una placa y una máscara. La placa puede ser como se define anteriormente en la sección del dispositivo.

10 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. Los reactivos de polimerización se añaden preferentemente en forma de disolución sobre la máscara y a continuación, se le aplica la placa, para formar un "sándwich" entre la placa y la

15 máscara. La polimerización se produce a continuación y el polímero formado puede presentar rigidez finamente ajustada. 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-hidroxi-etilo). 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'-metileno-bisacrilamida. La rigidez de la acrilamida polimerizada se puede ajustar variando la relación de agente de reticulación a la subunidad de acrilamida.

20 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). 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. 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. En una realización, el polímero es poli(acrilamida) y la polimerización se realiza por polimerización de radicales en presencia de tetrametil-etilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio. El grosor de gel podría variar de 20 a 200  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 50-100  $\mu\text{m}$ .

25

30

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.). Sin embargo, una vez que la curva de calibración se determina para un tipo de micropatrón adhesivo y sustrato blando, no hay necesidad de partículas marcadas dentro del sustrato. Por consiguiente, esta realización se contempla para preparar la curva de calibración.

35

Como se mencionó antes, el polímero se puede producir sobre la máscara de área no transparente que comprende por lo menos un área transparente que tiene la forma del micropatrón adhesivo. 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 no transparente (también llamada simplemente la máscara en la presente descripción) también puede estar definida por

40 la posibilidad de coexistencia de dos tipos de áreas: áreas transparentes y no transparentes. 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. 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

45 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 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. Preferentemente, la máscara presenta varias áreas transparentes, que definen micropatrones adhesivos dispuestos sobre el gel. 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/cm<sup>2</sup>, más preferentemente entre 5.000 y 15.000 áreas transparentes/cm<sup>2</sup>, aún más preferentemente alrededor de 10.000 áreas transparentes/cm<sup>2</sup>. Preferentemente, las áreas transparentes están separadas por lo menos por alrededor de

50

55

10  $\mu\text{m}$ , preferentemente por lo menos por alrededor de 20, 30, o 50  $\mu\text{m}$ .

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

En la 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.

En la etapa (d), el contacto del polímero con la disolución que comprende una molécula que promueve la unión celular se puede realizar por cualquier medio conocido por uno de experiencia media en la técnica. La molécula puede ser como se define anteriormente. La etapa (d) se puede dividir preferentemente en dos etapas: (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 molécula. 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). En la presente invención, un "conector" o "agente de copulación" se refiere a una molécula que se puede asociar con el polímero para conectar el polímero a la molécula que promueve la unión celular.

En la etapa (e), el exceso de moléculas que promueve la unión celular 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 placa. Esta etapa se puede realizar, en particular, después de la etapa (e).

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. Clásicamente, los procedimientos de fabricación implican 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. La ausencia de intermedio y la polimerización in situ desencadenan una alta resolución espacial. De este modo, los contornos de los micropatrones 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. Además, como el procedimiento comprende menos etapas de microfabricación que los procedimientos descritos previamente, es más rápido y más fácil de implementar.

Método para medir la fuerza de tracción celular

El dispositivo como se detalla anteriormente se puede usar para evaluar la contracción celular, en particular para medir una fuerza de tracción celular de una célula.

Se describe un método para medir una fuerza de tracción celular de una o varias células, que comprende:

- proporcionar un sustrato blando que tiene dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar la fuerza de tracción celular sobre una única región o punto;
- exponer el sustrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula(s) se una(n) al micropatrón adhesivo;
- medir la posición de dicha única región o punto de dicho micropatrón; y
- calcular el desplazamiento de dicha única región o punto de dicho micropatrón, determinando por ello la fuerza de tracción celular.

El uso de un área de micropatrón definida aquí permite la determinación de la fuerza de tracción celular solo por la medida del cambio de posición de la única región o punto sobre la que se concentra la contracción celular. Consecuentemente, las fuerzas de tracción celular se podrían cuantificar rápida y precisamente por una sola adquisición de imagen de micropatrón y medida de la posición.

De hecho, se puede establecer una curva de calibración y proporciona una relación entre el cambio de posición de la única región o punto del área adhesiva y la fuerza de tracción celular. En una realización preferida, la relación es lineal. Esta curva de calibración depende del sustrato blando y del patrón adhesivo.

5 Para preparar la curva de calibración, la fuerza de tracción se mide por métodos usuales bien conocidos por un experto en la técnica, en particular por microscopía de fuerza de tracción (TFM) (por ejemplo, Dembo and Wang, 1999, Biophys J 76, 2307-2316). Para preparar esta curva de calibración para un dispositivo con un sustrato blando definido y micropatrones definidos, un sustrato blando con micropartículas marcadas homogéneamente dispersas en él, preferentemente micropartículas fluorescentemente marcadas, se prepara y usa para TFM. Brevemente, cuando las células se unieron al sustrato blando, debido a la fuerza de tracción ejercida por la célula, el sustrato blando se deformó y de este modo las partículas se desplazaron. 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 u opcionalmente antes de la unión de la célula), se puede obtener el campo de desplazamiento. La fuerza de tracción se podría obtener por lo tanto resolviendo un problema inverso de desplazamiento-fuerza. En particular, la sección de ejemplos proporciona detalles para preparar la curva de calibración.

15 Es importante advertir que una curva de calibración preparada para un sustrato blando definido y micropatrones definidos se puede usar para cada dispositivo que tiene el sustrato blando definido y micropatrones definidos. No es necesario preparar una curva de calibración para cada dispositivo. Esto es por lo que la presente invención se refiere también a un kit que comprende un dispositivo como se detalla anteriormente con un sustrato blando definido y micropatrones definidos y una curva de calibración correspondiente. Por lo tanto, las micropartículas marcadas ya no son necesarias una vez que se ha establecido la curva de calibración para un dispositivo específico.

20 Por lo tanto, la fuerza de tracción celular se determina de una curva de calibración que muestra la relación entre la fuerza de tracción celular y el cambio de posición de la única región o punto de dicho micropatrón.

Alternativamente, el cambio de posición se puede evaluar también por la medida de la longitud del área elongada cuando se describe que el micropatrón adhesivo comprende un área elongada adhesiva, connata o no, y otro elemento adhesivo en uno de los extremos del elemento adhesivo elongado.

25 En algunos aspectos, las células se adherirán sobre el patrón adhesivo o se organizarán entre sí para orientar y concentrar la fuerza de tracción en la única región o punto. Entonces la fuerza de tracción determinada corresponde a la fuerza global del grupo de células.

En una realización preferida, el método de la invención es para medir una fuerza de tracción celular de una célula y el micropatrón es tal que solo una célula animal o humana individual se puede adherir a dicho micropatrón.

El dispositivo usado en el método es como se define en la sección anterior.

30 En cierto aspecto, la célula a estudiar se siembra sobre el micropatrón exponiendo el sustrato a ella durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula(s) se una(n) al micropatrón adhesivo. A continuación, se cultivan en las condiciones apropiadas para las células definidas.

35 Preferentemente, los micropatrones están marcados, preferentemente marcados fluorescentemente. La determinación de la posición de la única región o punto, o de la longitud del área elongada se efectúa por una adquisición de la imagen del micropatrón por microscopía.

40 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 embrionarias (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 naturales o células modificadas (células físicamente o genéticamente alteradas). En un ejemplo particular, las células pueden ser células tumorales. Por ejemplo, un gen puede ser inactivado y estos métodos permiten la identificación de genes que están implicados en la fuerza de tracción celular.

50 En una primera realización, se siembra un solo tipo de célula sobre los micropatrones del sustrato. Alternativamente, se pueden sembrar varios tipos de células sobre los micropatrones del sustrato para determinar la fuerza de tracción celular para cada tipo de célula. Por ejemplo, se pueden comparar las células normales y anormales; o células de tipo natural y modificadas, y similares.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para determinar la diferencia de tracción celular de dos tipos de células, que comprende:

- medir la fuerza de tracción de un primer tipo de células por el método como se define anteriormente;
- medir la fuerza de tracción de un segundo tipo de células por el método según se define anteriormente; y

- comparar la fuerza de tracción del primer y segundo tipo de células, determinando por ello la diferencia de tracción celular de los dos tipos de células.

Por ejemplo, el método puede ser útil para investigar la patología de una enfermedad, para estudiar la biología tisular, y similares.

- 5 En otra realización, se siembra un solo tipo de células sobre los micropatrones del sustrato pero las células se pueden poner en contacto con una o varias moléculas para determinar el impacto de la(s) molécula(s) sobre la fuerza de tracción celular de las células.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para determinar el efecto de una molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de una célula, que comprende:

- 10 - medir la fuerza de tracción de una célula por el método como se define anteriormente;
- medir la fuerza de tracción de la célula incubando con la molécula candidata/de ensayo por el método como se define anteriormente; y
- comparar la fuerza de tracción de la célula incubando o no con la molécula candidata/de ensayo, determinando por ello el efecto de la molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de la célula.
- 15 Opcionalmente, el efecto de la molécula candidata/de ensayo se puede comparar con una molécula de referencia que tiene un efecto bien definido. La molécula candidata/de ensayo puede incrementar la fuerza de tracción de la célula o disminuirla.

- La molécula candidata/de ensayo se puede incubar con una célula por cualquier medio apropiado. Por ejemplo, se puede añadir gota a gota sobre la célula y dejar difundir en la célula. Se puede añadir con el medio de cultivo. Se puede contemplar también un sistema más complejo de alto rendimiento con sistema de manejo de microfluidos.
- 20

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

- 25 En una realización adicional, se pueden sembrar varios tipos de células sobre los micropatrones del sustrato y poner en contacto con una o varias moléculas para determinar el impacto de la(s) molécula(s) sobre la fuerza de tracción celular de cada tipo de célula.

En estas realizaciones, un dispositivo que comprende varios grupos de micropatrones adhesivos sobre el mismo sustrato o placa separados entre sí tal que cada grupo puede ser útil.

- 30 La molécula candidata/de ensayo puede ser de varios orígenes, naturaleza y composición. Puede ser cualquier 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 RNAi. La molécula puede ser toda o parte de una librería combinatorial de productos, por ejemplo.

- 35 Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitantes.

### 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 mediciones precisas requieren ya sea cálculos largos o etapas de microfabricación sofisticadas para separar física o numéricamente sitios de aplicación de la fuerza.
- 40

- 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.
- 45

- 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
- 50

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

5 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 tumorigénicas de la glándula mamaria, MCF10A, se depositaron en los sustratos 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* 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). Importantemente, 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 apropiadas geometrías 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

45 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 sustrato. 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. 4F). 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.

#### 10 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, medias 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  $\mu\text{M}$  y encontraron que sigue un sencillo decaimiento exponencial (Fig. 5B).

Toda transformación tumorigena no incrementa la contractilidad celular

Los inventores a continuación usaron su método para comparar el nivel de contracción de las células naturales (WT) MCF10A con el de las células MCF10A tratadas con fármaco o genéticamente modificadas que imitan alguna transformación del tumor. De hecho se ha mostrado que la transformación del tumor 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 $\beta$ 1 induce la transición de epitelial a mesenquimal, que imita algunas de las características de la transformación del tumor. Las células tratadas con TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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.

#### 45 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 apropiada geometría 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 tumorígenas 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.

## 15 Materiales y métodos

### Formación de micropatrones 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.

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-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 subsiguientemente y se resuspendieron en tampón HEPES (10 mM, pH 7,4).

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.

### 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 la fuerza-penetración usando cantilevers con punta de esfera de borosilicato con un radio R= 2,5 µm (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 × 60 µm<sup>2</sup> en el modo de contacto con 512 × 512 pixels<sup>2</sup> 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:

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

50 en la que  $\delta$  es la penetración.  $\delta$  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  $7,29 \pm 0,42$  kPa. El módulo de Young medido de las regiones no expuestas era  $6,64 \pm 0,59$  kPa.

Medida de la fuerza de tracción

5 Análisis del desplazamiento de partículas

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.

10

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 mezclen 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.

15  
20  
25

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  $0,72 \mu\text{m}$  en las direcciones x e y.

30  
35  
40

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](http://www.physics.mcgill.ca/~Kilfoil/Downloads.html)).

Cálculo de la fuerza de tracción

45 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 sustrato 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 sustrato. 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:

50

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

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

55

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  $\lambda$  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:

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

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  $\lambda$  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  $\lambda$  a valores pequeños ( $\lambda \sim 10^{-9}$ ) para mantener la mejor resolución espacial, que se estima que es de alrededor de 5  $\mu\text{m}$  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 tensión 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 de ligando se obtuvieron de Ariad Pharmaceuticals (Muthuswamy et al. (2001) Nat Cell Biol 3(9): 785-792). Las células se sembraron sobre un substrato microimpreso con una densidad de 8 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>. Las células no unidas a la región adhesiva sobre el substrato 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 la célula. Se evaluó la relajación del substrato 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  $\mu\text{M}$ , 48 h antes de la medida de la fuerza de tracción.

Se añadió TGF $\beta$  (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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ . 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 contenía 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 procesado de Imágenes

5 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<sub>2</sub> se garantizó mediante el Cubo y la Caja de LIS Imaging.

10 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 método para medir una fuerza de tracción celular de una célula, que comprende:
- 5 - proporcionar un dispositivo que comprende un substrato blando plano con un módulo de Young de alrededor de 0,1 a 100 kPa, que tiene dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar reproduciblemente la fuerza de tracción celular en una única región o punto, en el que:
- el tamaño de dicho micropatrón adhesivo es tal que se puede adherir una sola célula; y
- dicho micropatrón adhesivo incluye un área adhesiva que comprende un área de expansión adhesiva y dos conjuntos de dos puntos adhesivos, en el que
- 10 (a) los puntos adhesivos están sobre o cerca de la envoltura convexa del micropatrón adhesivo;
- (b) cada conjunto contiene un punto sobre cada lado de un eje en el plano de la envoltura convexa;
- (c) los dos puntos localizados en el mismo lado del eje están separados por una región no adhesiva que forma entre 15% y 35% de la longitud total de la envoltura convexa;
- 15 (d) el primer conjunto de puntos adhesivos está esencialmente localizado cerca o sobre el eje para formar una región adhesiva de no más del 10% de la longitud total de la envoltura convexa; y
- (e) el área de expansión adhesiva está dispuesta sobre cada lado del eje entre el segundo conjunto de puntos adhesivos para conectar los dos puntos y hacia el primer conjunto de puntos adhesivos entre las dos regiones no adhesivas de c),
- 20 - exponer el substrato a por lo menos una célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que una célula se una al micropatrón adhesivo;
- medir la posición de dicha única región o punto de dicho micropatrón; y;
- calcular el desplazamiento de dicha única región o punto de dicho micropatrón, determinando por ello la fuerza de tracción celular.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fuerza de tracción celular se determina a partir de una curva de calibración que muestra la relación entre la fuerza de tracción celular y el desplazamiento de dicha única región o punto de dicho micropatrón.
3. Un dispositivo para medir una fuerza de tracción celular de una sola célula, en el que el dispositivo comprende un substrato blando plano con un módulo de Young de alrededor de 0,1 a 100 kPa y dispuesto sobre él un micropatrón adhesivo que tiene una forma apropiada para concentrar reproduciblemente la fuerza de tracción celular sobre una única región o punto, en el que:
- 30 - el tamaño de dicho micropatrón adhesivo es tal que se puede adherir una sola célula; y
- dicho micropatrón adhesivo incluye un área adhesiva que comprende un área de expansión adhesiva y dos conjuntos de dos puntos adhesivos, en el que
- (a) los puntos adhesivos están sobre o cerca de la envoltura convexa del micropatrón adhesivo;
- 35 (b) cada conjunto contiene un punto sobre cada lado de un eje en el plano de la envoltura convexa;
- (c) los dos puntos localizados en el mismo lado del eje están separados por una región no adhesiva que forma entre 15% y 35% de la longitud total de la envoltura convexa;
- (d) el primer conjunto de puntos adhesivos está esencialmente localizado cerca o sobre el eje para formar una región adhesiva de no más del 10% de la longitud total de la envoltura convexa; y
- 40 (e) el área de expansión adhesiva está dispuesta sobre cada lado del eje entre el segundo conjunto de puntos adhesivos para conectar los dos puntos y hacia el primer conjunto de puntos adhesivos entre las dos regiones no adhesivas de c).
4. El método de la reivindicación 1 o 2 o el dispositivo de la reivindicación 3, en el que la célula es una célula humana o animal.
- 45 5. El método o dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el micropatrón es un micropatrón como se define en la Fig. 1B.

6. El método o dispositivo de la reivindicación 5, en el que el micropatrón adhesivo tiene una forma de ballesta.
7. El método o dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el la única región o punto está marcada, preferentemente marcada por fluorescencia.
- 5 8. El método o dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el sustrato comprende varios micropatrones adhesivos, idénticos o diferentes.
9. El método o dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el sustrato blando es un gel de poliacrilamida.
10. El método o dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el sustrato blando tiene un módulo de Young de alrededor de 1 a alrededor de 10 kPa.
11. Un kit para medir una fuerza de tracción celular de una célula, comprendiendo dicho kit un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 3-10 y una curva de calibración que muestra la relación entre la fuerza de tracción celular y el desplazamiento de dicha única región o punto del micropatrón.
- 15 12. El uso de un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 3-10 para medir una fuerza de tracción celular de una célula.
13. Un método para determinar el efecto de una molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de una célula, que comprende:
- medir la fuerza de tracción de una célula por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-9;
  - medir la fuerza de tracción de la célula incubándola con la molécula candidata/de ensayo por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-9; y,
  - comparar la fuerza de tracción de la célula incubándola o no con la molécula candidata/de ensayo, determinando por ello el efecto de la molécula candidata/de ensayo sobre la fuerza de tracción de la célula.
- 20
14. Un método para determinar la diferencia de tracción celular de dos tipos de células, que comprende:
- medir la fuerza de tracción de un primer tipo de células por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-9;
  - medir la fuerza de tracción de un segundo tipo de células por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-9; y
  - comparar la fuerza de tracción del primer y segundo tipo de células, determinando por ello la diferencia de tracción celular de los dos tipos de células.
- 25
- 30

FIG 1A

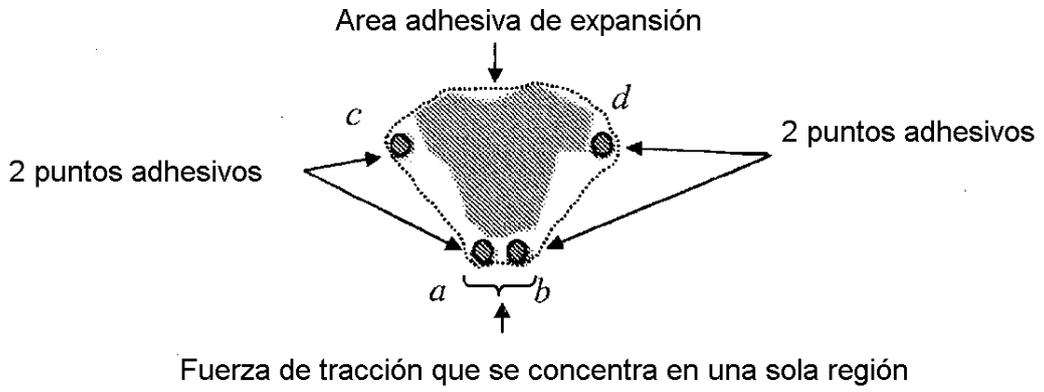


FIG 1B

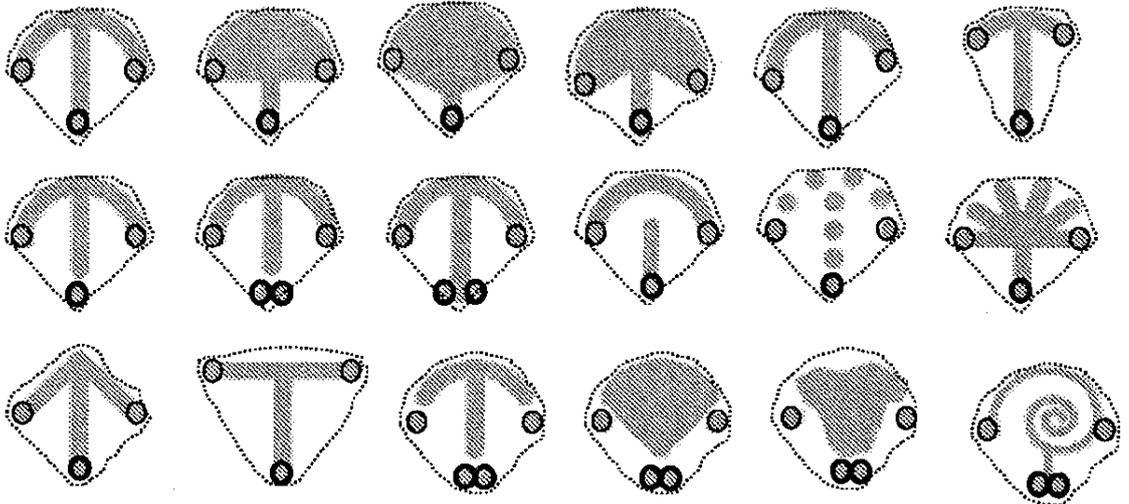


FIG 1C

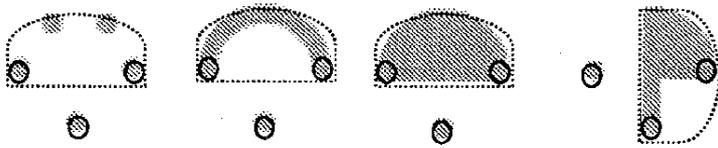


FIG 1D



FIG 1E



FIG 1F



FIG 1G



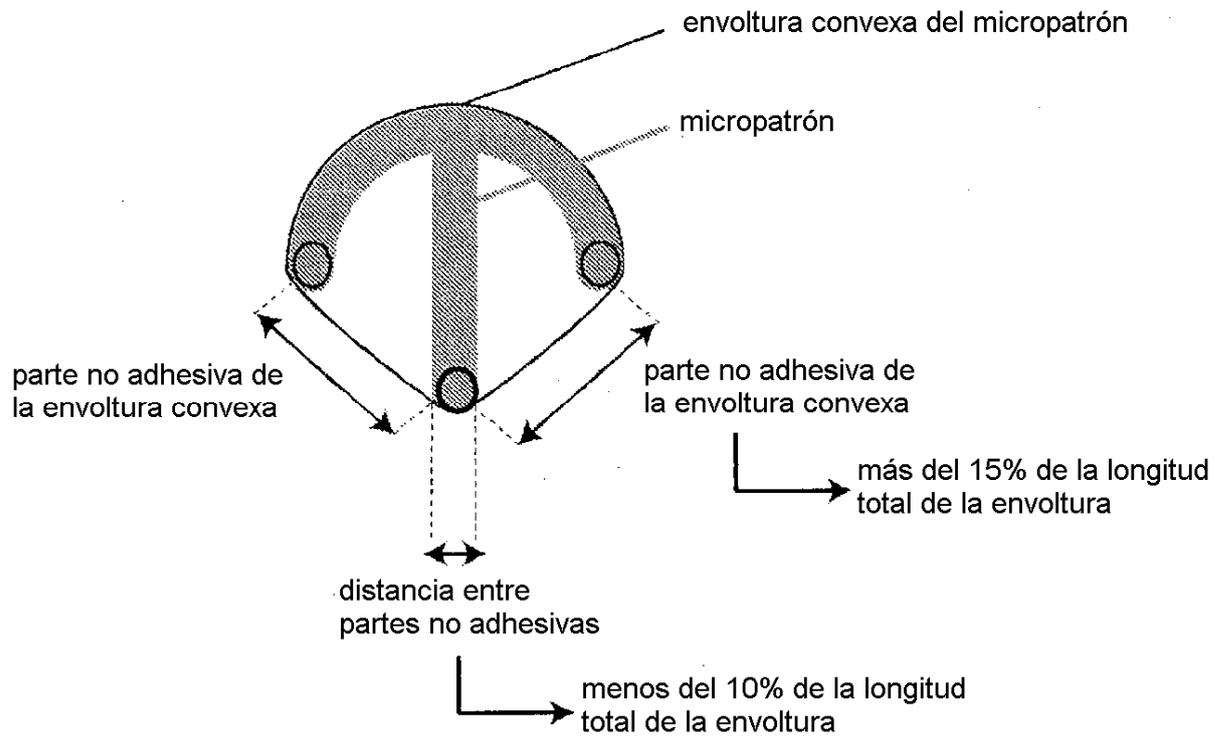


FIGURA 1H

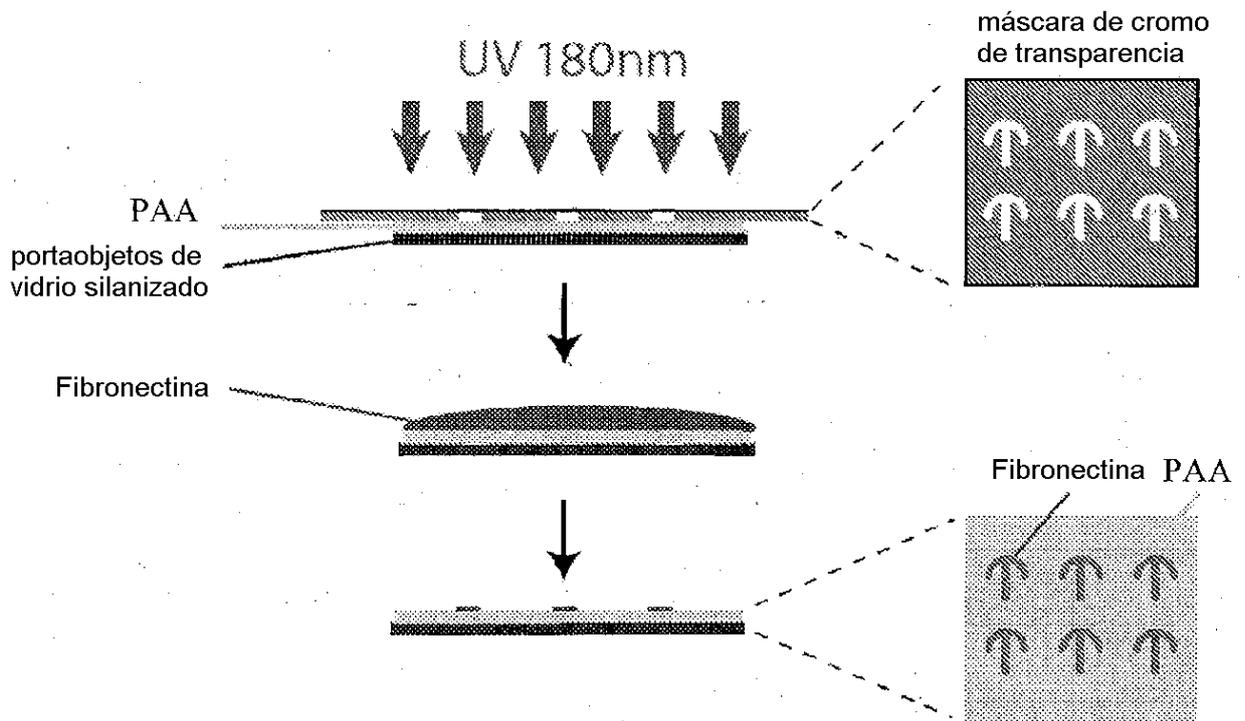


FIGURA 2A

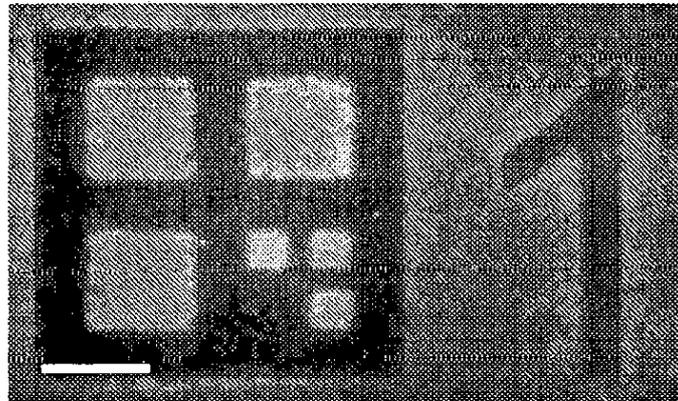


FIGURA 2B

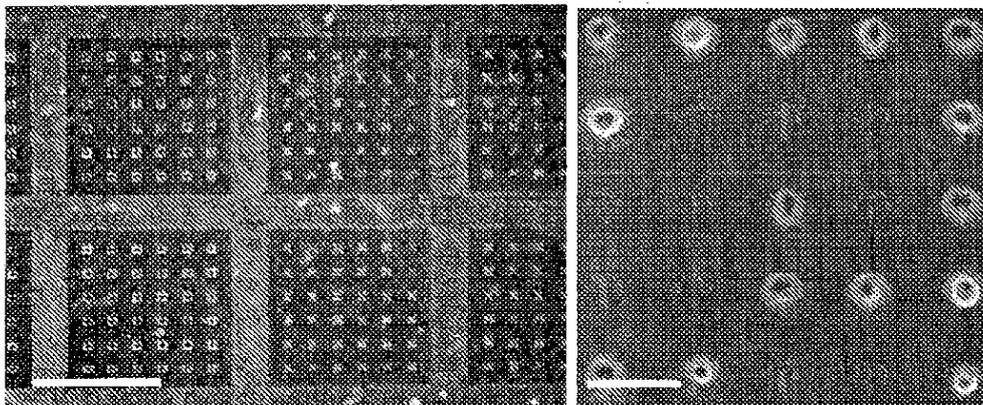


FIGURA 2C

FIGURA 2D

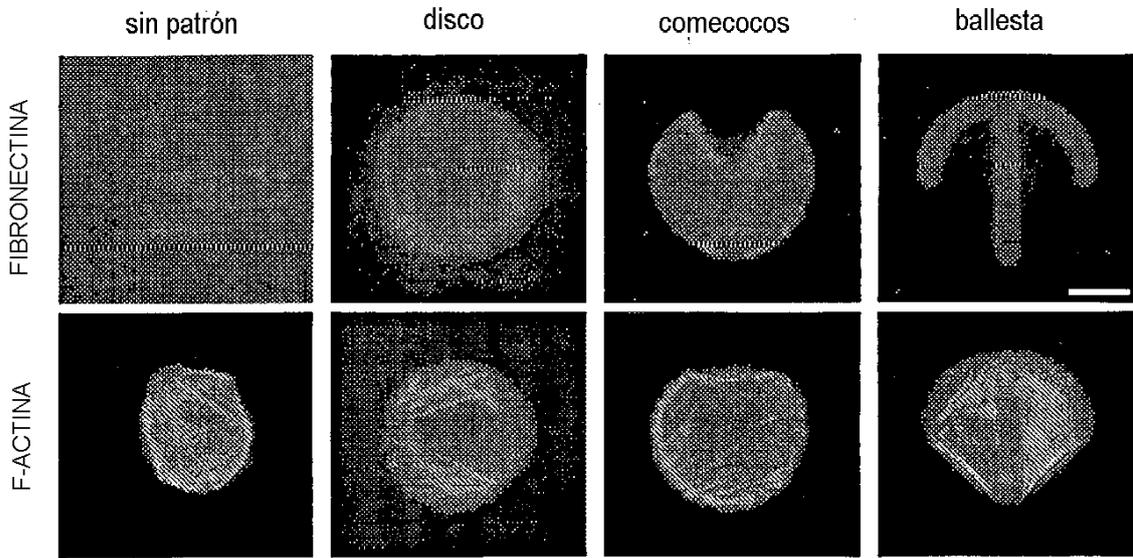


FIGURA 3A

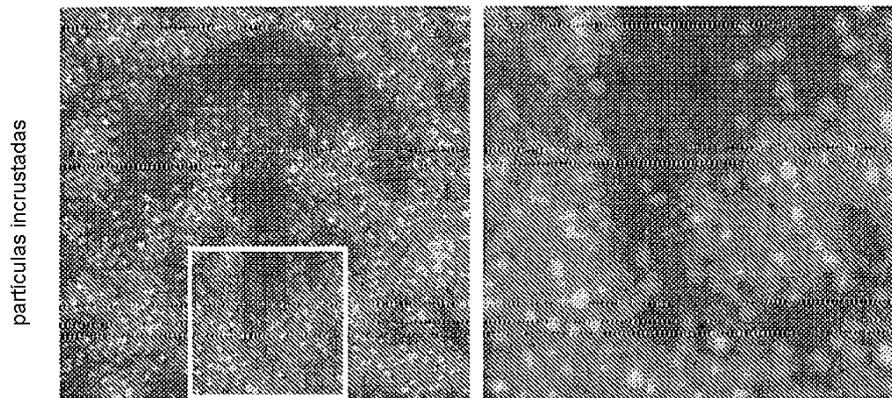


FIGURA 3B

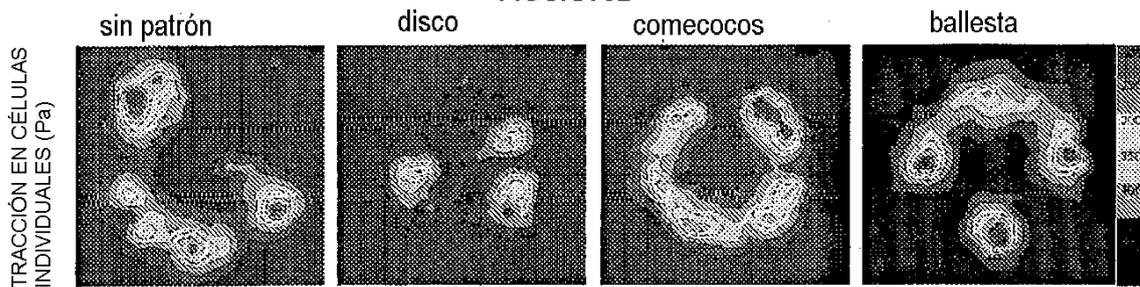


FIGURA 3C

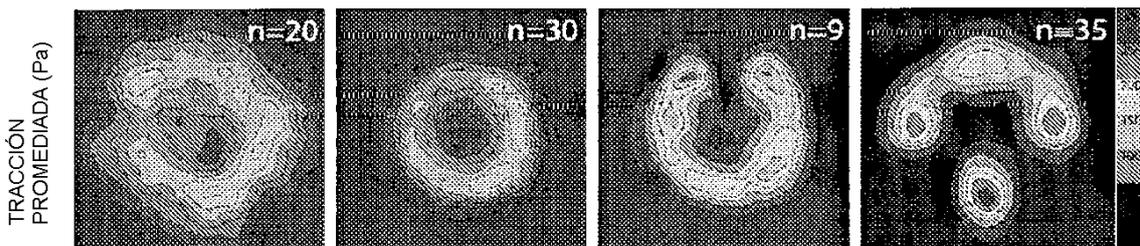


FIGURA 3D

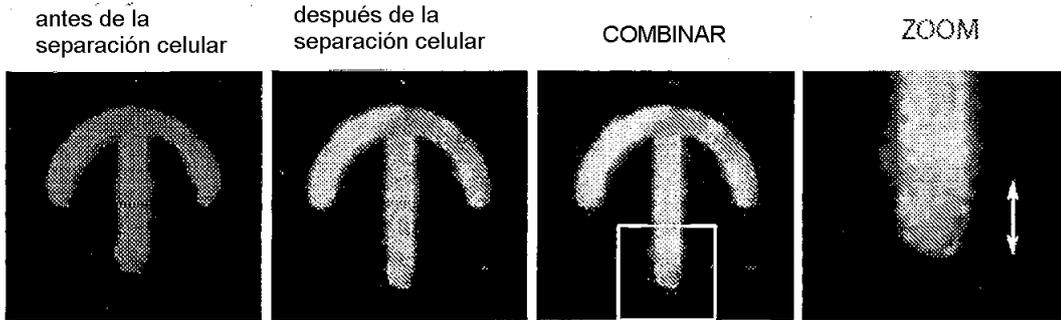


FIGURA 4A

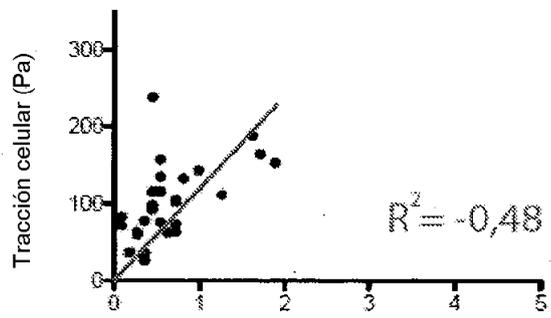
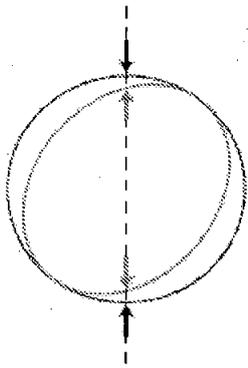


FIGURA 4B

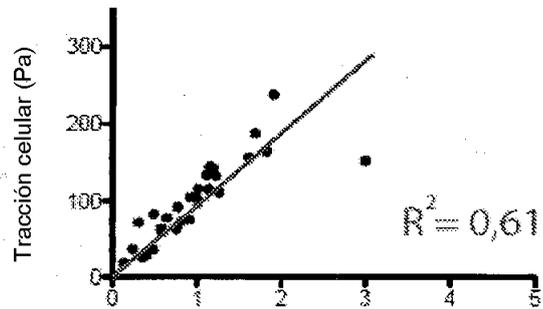
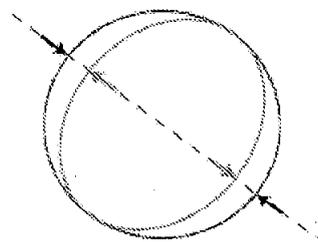


FIGURA 4C

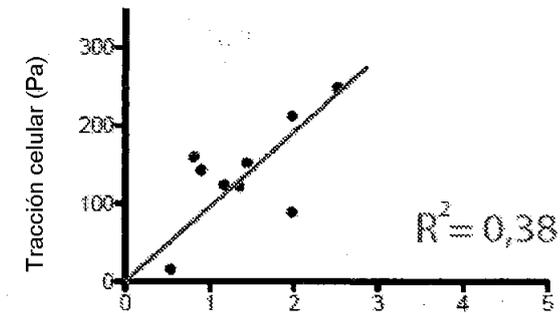
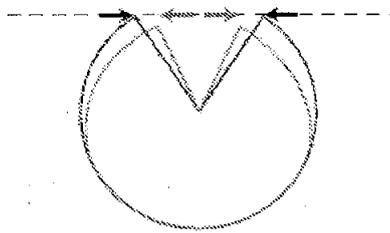


FIGURA 4D

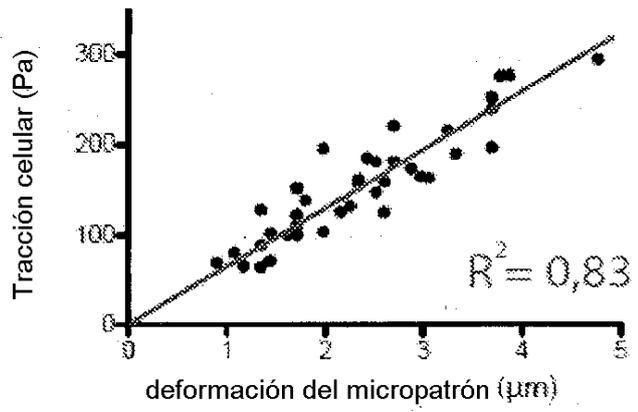
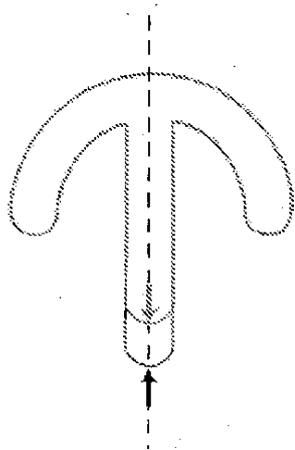
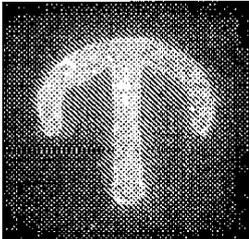


FIGURA 4E

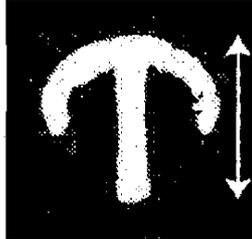
adquisición de la imagen



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

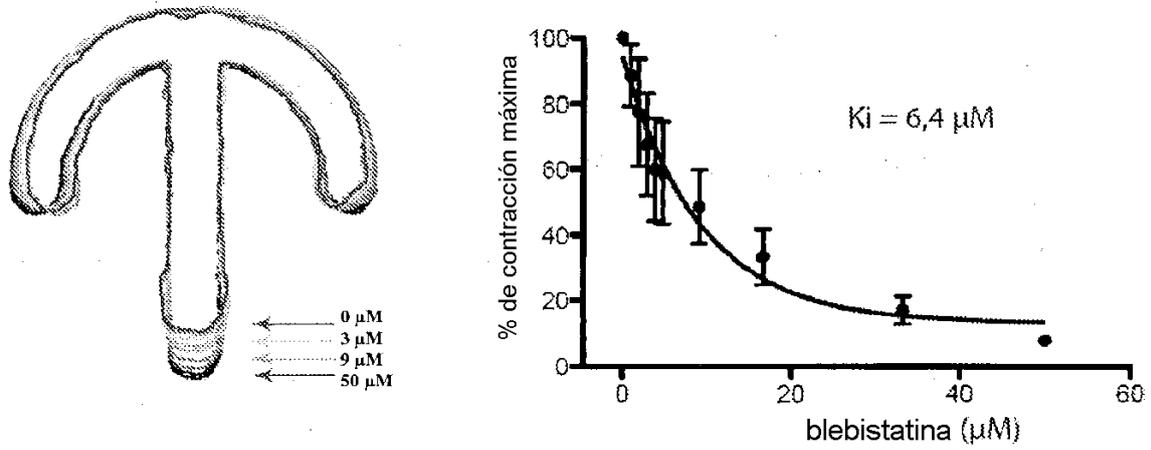


FIGURA 5A

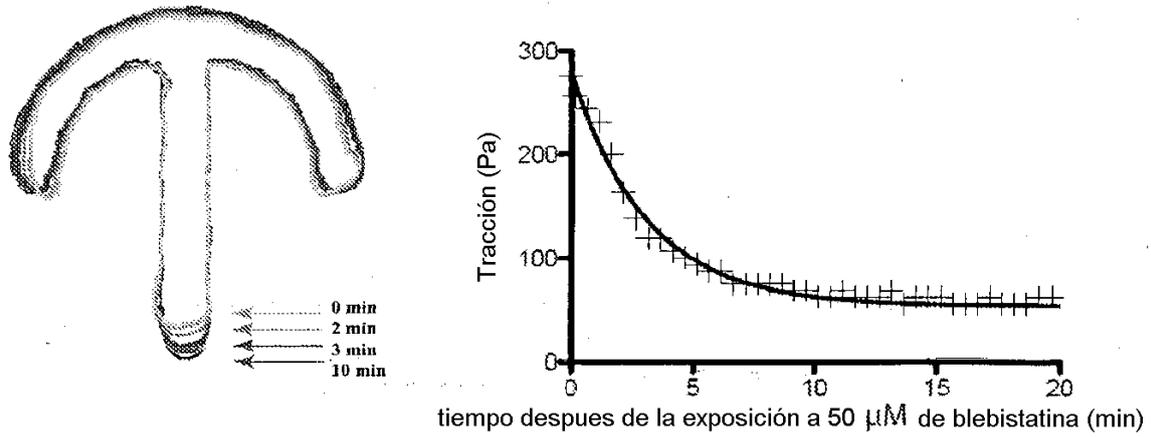


FIGURA 5B

