

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 008**

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011** **E 11796686 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 2649444**

54 Título: **Método para estadificar la progresión del cáncer con MFA**

30 Prioridad:

10.12.2010 US 421655 P

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

02.03.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)
Vizerektorat Forschung Petersgraben 35
4003 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**PLODINEC, MARIJA;
LOPARIC, MARKO y
LIM, RODERICK YH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 562 008 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para estadificar la progresión del cáncer con MFA

5 La presente invención se refiere a un método y a un sistema para estadificar la progresión del cáncer de un tumor.

El citoesqueleto, una red supramolecular formada por filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, se remodela de forma dinámica durante la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celulares. Muchos de estos procesos celulares fundamentales se modulan mediante fuerzas mecánicas. Del mismo modo, la génesis tumoral, que resulta de cambios en estos procesos fundamentales, se asocia con alteraciones en la biomecánica.

15 La microscopía de fuerza atómica (MFA) se ha usado para investigar las propiedades mecánicas de células cancerígenas aisladas. La elasticidad celular y la capacidad de deformación se han reconocido como un marcador para las consecuencias fenotípicas de alteraciones en la citoarquitectura y adhesión que se asocian con la transformación maligna. Sin embargo, la rigidez se midió solamente en un sitio específico, y por lo tanto no refleja de forma apropiada la heterogeneidad estructural de una célula. También es probable que la ausencia del entorno del tejido nativo tenga una influencia en el comportamiento mecánico.

20 Los cambios de fuerza que surgen de interacciones con el microentorno desempeñan un papel significativo en el desencadenamiento de cambios genéticos que inducen la génesis tumoral. Se ha mostrado que las propiedades mecánicas de las células vivas son altamente dependientes de muchos factores presentes en su microentorno tridimensional (3D). Algunos estudios realizados en cultivos de células de mamífero y glándulas mamarias de ratón en 3D han sugerido que el aumento de la deposición de matriz y reticulación coherente con la rigidez de la ECM estimula el desarrollo y progresión del cáncer.

25 En este caso, la detección del cáncer se ha conseguido mediante compresión sin confinar de toda la glándula mamaria. Sin embargo, este enfoque solamente consideró la región periférica del tumor, mientras que el volumen del cáncer subyacente no era accesible para someterlo a ensayo.

30 La rigidez relativa del estroma del tumor periférico en comparación con el tejido de glándula mamaria normal adyacente ha llevado a la suposición generalizada de que el cáncer de mama es más rígido que el tejido de glándula mamaria normal o lesiones benignas. La inconsistencia de los datos de rigidez obtenidos a partir de células individuales en cultivo y de tejidos *in situ* enfatiza la importancia de tener en cuenta tanto los enfoques de medida, pero aún más otros factores microambientales que están presentes en un contexto de tejido en 3D.

35 Además, diversos gradientes bioquímicos se desarrolla durante el desarrollo y la progresión tumoral es dentro del tejido. Se considera que el oxígeno y el pH son los factores microambientales fundamentales en el desarrollo y crecimiento de tumores y su respuesta al tratamiento. Por ejemplo, la hipoxia, como un componente del microentorno de las células tumorales, es una característica principal de los tumores malignos, que modificar las rutas que regulan la proliferación celular, angiogénesis y muerte celular.

40 Sin embargo, algunas propiedades mecánicas de células y tejidos cancerígenas todavía no se han evaluado en el contexto de hipoxia. Las herramientas aplicadas hasta ahora han incluido medidas mecánicas de células cancerígenas extraídas del tejido primario o solamente de la periferia tumoral medida, que ha proporcionado una visión limitada de la heterogeneidad estructural y mecánica de un tejido tumoral.

El objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios para estadificar la progresión del cáncer de un tumor.

50 Algunas medidas de elasticidad en tumores de cáncer de mama que usarán un dispositivo para realizar microhendiduras se describen en PHYSICS IN BIOLOGY & MEDICINE, vol 52 (5), páginas 1247-1260, 2007; ISSN 0031-9155, XP020113219.

55 La presente invención se realizó durante el transcurso de una investigación que evaluaba las propiedades nanomecánicas de muestras de biopsia tumoral mediante MFA. De forma sorprendente se encontró que algunos tejidos de cáncer humano y murino presentan un reblandecimiento gradual desde la periferia tumoral (matriz extracelular) hasta el núcleo (células cancerígenas) mientras que el tejido del estroma en la periferia del tumor es más rígido que el tumor subyacente. Otro hallazgo sorprendente fue que este reblandecimiento del tejido se correlaciona con la hipoxia tumoral.

60 Definiciones

65 Rigidez o elasticidad en el sentido de la invención se refiere a la resistencia de una muestra de tejido o tejido a la deformación mediante una fuerza aplicada. La rigidez o elasticidad se mide como el módulo elástico de la muestra de tejido en Pascales (Pa). Una muestra de tejido blando se caracteriza mediante un valor de rigidez bajo y un tejido rígido se caracteriza por un valor de rigidez elevado.

5 Tal fuerza de deformación se puede aplicar a la muestra de tejido o tejido con un estilete (como parte, por ejemplo, de un microscopio de fuerza atómica) que incide en la muestra de tejido o tejido, en la que o el estilete o la muestra de tejido se mueve en una dirección vertical con respecto a la otra. Para medir una pluralidad de puntos en una muestra, el estilete o la muestra se pueden mover adicionalmente en una dirección lateral, en la que una dirección lateral en el sentido de la invención se refiere a una dirección que es ortogonal a la dirección vertical.

10 El estilete puede ser una estructura en voladizo con una punta afilada o una partícula coloidal unida que actúa como una sonda. Una estructura en voladizo en el sentido de la invención se refiere a un rayo o brazo que se ancla solamente en un extremo. Las desviaciones de la estructura en voladizo causadas por fuerzas de repulsión o de atracción entre la superficie de la muestra y la punta se pueden detectar de forma óptica, por ejemplo con un interferómetro o con un láser enfocado en la parte trasera de la estructura en voladizo, y se pueden reflejar en un fotodiodo de separación, en el que el fotodiodo registra la desviación de la estructura en voladizo como una diferencia de voltaje, que se puede convertir en nanómetros. Como alternativa, la desviación de la estructura en voladizo se puede detectar con un sensor piezoeléctrico, en el que la tensión de la estructura en voladizo se convierte en una carga eléctrica.

20 Una área en el sentido de la invención se refiere a un área que se define mediante una rejilla de (medida) puntos, en la que cada punto corresponde a una huella de la hendidura del estilete como se ha descrito anteriormente y cada punto no tiene más de 100 μm , preferentemente 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm de separación de su punto siguiente. A modo de ejemplo no limitante, un área tiene un tamaño de 25 μm^2 , 50 μm^2 , 100 μm^2 , 200 μm^2 , 300 μm^2 , 400 μm^2 , 500 μm^2 , 600 μm^2 , 750 μm^2 , 1000 μm^2 , 5000 μm^2 o 10,000 μm^2 y los puntos centrales geométricos de dos áreas están separados al menos 100 μm , 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm o 1 mm.

25 La fuerza medida y la profundidad de la hendidura para cualquier muestra dada dependen de la constante de resorte de la estructura en voladizo y el radio de la punta.

30 Resolución espacial en el sentido de la invención se refiere a la distancia mínima entre dos puntos en un tejido o muestra de tejido mediante la cual los dos puntos se pueden diferenciar con respecto a su rigidez. Una resolución espacial de al menos 1 mm, preferentemente 100 μm , 10 μm o 1 μm se refiere a que la distancia máxima mediante la que los dos puntos todavía se pueden diferenciar es 1 mm, preferentemente 100 μm , 10 μm o 1 μm . Una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 10 μm o 1 μm también incluye resoluciones más elevadas. Una resolución superior a 1 μm se refiere a dos puntos que tienen una distancia menor que 1 μm que todavía se pueden diferenciar. Algunos ejemplos de resoluciones superiores a 100 μm son 10 μm y 1 μm . Algunos ejemplos de resoluciones superiores a 1 μm son 0,5 μm , 0,1 μm y 10 nm.

35 Una muestra de biopsia del tejido en el sentido de la invención se refiere a una muestra de tejido que se obtiene mediante una biopsia y comprende células contiguas y matriz extracelular.

40 Biopsia en el sentido de la invención se refiere a un método para retirar una parte del tejido o un tejido para examen. Tal biopsia puede ser una biopsia mediante aspiración con aguja, una biopsia mediante punción, una biopsia de núcleo asistida con vacío, una biopsia con aguja de núcleo o una biopsia con fórceps. La retirada se puede realizar con la ayuda de herramientas adecuadas tales como una aguja hueca, un cuchillo afilado de borde redondo o un escalpelo. Una muestra de biopsia de tejido se puede obtener adicionalmente con endoscopias o métodos endoscópicos.

45 La biopsia se puede guiar con un método adecuado tal como ultrasonidos o CT (tomografía computerizada con rayos X), en la que se puede detectar por localizar un tumor o una lesión visible.

50 Tejido normal en el sentido de la invención se refiere a un conjunto de células contiguas con función idénticamente fisiológica que se caracterizan mediante un crecimiento controlado, normal y función celular normal.

55 Un tumor en el sentido de la invención se refiere a una neoplasia o una lesión que se forma con un crecimiento anómalo de células neoplásicas. El tumor puede ser benigno, premaligno o maligno. La clasificación de una muestra de biopsia del tejido de un carcinoma de mama humana es preferente. Una lesión o tumor benignos en el sentido de la invención se refiere a un tumor que carece de la capacidad de experimental metástasis.

60 Malignidad o "un tumor maligno" en el sentido de la invención se refiere a la capacidad de un tumor para penetrar la membrana basal, invadir tejidos vecinales o extenderse a través del organismo. Un tumor maligno es sinónimo de una neoplasia maligna o cáncer, en particular con cáncer invasivo.

65 Una distribución de rigidez en el sentido de la invención se refiere a frecuencia de valores de rigidez diferentes determinada a partir de una muestra de biopsia de tejido individual. Una distribución de rigidez determinada se puede ajustar adicionalmente a una función Gaussiana. Una distribución de rigidez unimodal es una distribución de valores de rigidez separados que tienen un solo pico, que indica una muestra que tiene una rigidez uniforme. Una función de distribución bimodal tiene dos máximos. Tal distribución puede estar causada por una muestra que tiene dos partes diferentemente rígidas, por ejemplo un núcleo de tumor blando y una periferia rígida. Una distribución de

rigidez trimodal en el sentido de la invención se refiere a una distribución caracterizada por tres máximos locales. Una distribución trimodal puede indicar que el tejido normal, una región límite caracterizada por estroma duro y un núcleo de tumor blando han contribuido a los valores que forman la distribución. Una muestra con una distribución de rigidez al menos bimodal tiene una función de distribución bimodal, trimodal o n-modal (con n siendo un número entero > 1).

Una pluralidad en el sentido de la invención se refiere a valores de al menos 5, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000.

10 Por consiguiente, se proporciona un método *ex vivo* para clasificar una muestra de biopsia de tejido obtenida de un tumor, que comprende las etapas:

- determinar una pluralidad de valores de rigidez de la muestra de biopsia tumoral mediante la medida de una pluralidad de puntos en la muestra con una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm , y
- asignar a la muestra una probabilidad de malignidad.

Además, el método para clasificar una muestra de biopsia de tejido obtenida de un tumor comprende la determinación de los valores de rigidez para una pluralidad de puntos en dicha muestra con una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm , dando como resultado una distribución de rigidez, y la asignación a dicha muestra de una probabilidad de malignidad en la base de esta distribución de rigidez, mediante lo cual una muestra que presenta una distribución de rigidez unimodal se asigna a una probabilidad elevada de tejido que es normal o no maligno, y una muestra que presenta al menos una distribución de rigidez bimodal se asigna a una probabilidad elevada de que sea tejido maligno.

Además, se proporciona un método *ex vivo* para clasificar una muestra de biopsia de tejido obtenida a partir de un tumor, que comprende las etapas:

- determinar una pluralidad de valores de rigidez de la muestra de biopsia de tumor para puntos en un área, formando dichos puntos una rejilla de n_1 por n_2 puntos (siendo n_1 y n_2 independientemente números enteros > 1) con una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 10 μm o 1 μm , y
- asignar a la muestra una probabilidad de malignidad.

De acuerdo con una realización de la misma, para un área se mide una rejilla de 5 por 5 puntos (que da como resultado 25 puntos), 7 por 7 puntos, 10 por 10 puntos, 15 por 15 puntos, 20 por 20 puntos, 50 por 50 puntos o 100 por 100 puntos. Cada punto en la misma es una cierta distancia espaciada con respecto al punto siguiente, representando el espaciado de los puntos la resolución. De acuerdo con una realización, la resolución es 100 μm ; de acuerdo con otra realización, la resolución es 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm . Una resolución de 1 μm , por ejemplo, en una rejilla de 50 por 50 puntos da como resultado un área de 2500 μm^2 .

De acuerdo con otra realización, se miden dos, tres o cuatro de tales áreas por rejillas, representando cada rejilla o área una región de la biopsia, en la que la distancia del punto central o centro geométrico de una rejilla o área con respecto al siguiente es 100 μm , 250 μm , 500 μm o 1 mm. En una realización, la distancia geométrica del punto central de una rejilla al siguiente es un múltiplo de al menos 10, 25, 50, 100 o 250 de la resolución espacial de los puntos en la rejilla.

Por lo tanto, como se menciona en la reivindicación 1, se proporciona un método para clasificar una muestra de biopsia de tejido obtenida a partir de un tumor, que comprende

- determinar una pluralidad de valores de rigidez para dicha muestra mediante la medida de una pluralidad de puntos en la muestra con una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 10 μm o 1 μm , y
- asignar a la muestra una probabilidad de malignidad, en la que
- a una muestra que presenta una distribución de rigidez unimodal se le asigna una probabilidad elevada de que no sea maligna, y
- a una muestra que presenta una distribución de rigidez al menos bimodal se le asigna una probabilidad elevada de que sea maligna, en la que dicha distribución de rigidez se caracteriza por un primer pico que presenta un valor de rigidez al menos dos veces más elevado que el de un segundo pico.

Para determinar valores de rigidez con una resolución espacial de al menos 1 μm , 2 μm , 5 μm , 7 μm , 10 μm o 100 μm el estilete o muestra se pueden mover con una precisión submicrométrica o micrométrica en direcciones tanto verticales como laterales, lo que significa en etapas no mayores a 1 μm , 2 μm , 5 μm , 7 μm , 10 μm o 100 μm . En algunas realizaciones de los aspectos de la invención que se definen a continuación, la muestra de tejido se monta en un soporte para muestras tal como un actuador piezoeléctrico que se puede mover en dirección tanto vertical como lateral con una precisión submicrométrica o micrométrica. Como alternativa, la muestra de tejido se monta en

un soporte para muestras, tal como una placa de Petri o un portaobjetos de vidrio, en la que la placa de Petri o el portaobjetos de vidrio se montan en el elemento piezoeléctrico que se ha descrito anteriormente.

5 La rigidez o elasticidad de la muestra se puede determinar mediante la medida de la fuerza necesaria para presionar el estilete en la muestra de tejido hasta una profundidad de la hendidura definible. Como alternativa, la rigidez se puede determinar mediante la medida de la profundidad de la hendidura del estilete presionado en la muestra de tejido con una fuerza definible.

10 De acuerdo con una realización, la huella de la hendidura del estilete en la muestra de tejido no es mayor que 1, 2, 9, 16 o 25 μm^2 , en la que la huella de la hendidura corresponde a un punto individual de la pluralidad de puntos que se han descrito en el aspecto anterior de la invención.

15 De acuerdo con una realización, la estructura en voladizo tiene una constante de resorte de 0,01 Nm^{-1} , 0,025 Nm^{-1} , 0,05 Nm^{-1} , 0,06 Nm^{-1} , 0,075 Nm^{-1} , 0,1 Nm^{-1} , 0,15 Nm^{-1} , 0,2 Nm^{-1} , 0,25 Nm^{-1} , 0,3 Nm^{-1} , 0,5 Nm^{-1} , 0,75 Nm^{-1} , 1 Nm^{-1} o 10 Nm^{-1} .

De acuerdo con una realización, el radio de la punta es 0,01 μm , 0,02 μm , 0,05 μm , 0,07 μm , 0,1 μm , 0,5 μm , 1 μm , 1,5 μm , 2 μm , 2,5 μm , 3 μm , 3,5 μm , 4 μm , 4,5 μm o 5 μm .

20 En una realización, la constante de resorte de la estructura en voladizo, k, y la rigidez de la muestra son de magnitud similar. Esto da como resultado una sensibilidad óptima.

25 De acuerdo con una realización, una fuerza aplicada a la muestra de tejido tiene un valor de 0,05 nN, 0,1 nN, 1 nN, 2 nN, 3 nN, 4 nN, 5 nN, 6 nN, 7 nN, 8 nN, 9 nN, 10 nN, 100 nN, 1000 nN, 10,000 nN, 100,000 nN, y la profundidad de la hendidura aplicada a la muestra de tejido es 100 nm, 300 nm, 500 nm, 700 nm, 1000 nm, 1300 nm, 1500 nm, 1700 nm, 2000 nm, 2200 nm, 2500 nm, 2700 nm, 3000 nm, 3200 nm, 3500 nm, 3700 nm, 4000 nm, 4500 nm, 5000 nm, 5500 nm o 6000 nm.

30 De acuerdo con una realización, la rigidez se calcula a partir de la pendiente de curvas de fuerza-desplazamiento, en las que la estructura en voladizo presenta hendidura en la superficie de la muestra con una fuerza que se puede definir y retraer una o varias veces, y la desviación resultante de la estructura en voladizo se determina con dependencia de la distancia de punta-muestra.

35 De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, a una muestra que presenta una distribución de rigidez unimodal se le asigna una probabilidad elevada de que no sea maligna, y a una muestra que presenta una distribución de rigidez al menos bimodal se le asigna una probabilidad elevada de que sea maligna.

40 En otras palabras, a una muestra caracterizada por una distribución de rigidez unimodal se le puede asignar una probabilidad baja de que represente un tumor maligno, sin embargo, para evaluar si tal muestra representa tejido normal o una lesión precancerígena, se puede tener en cuenta la rigidez absoluta de la muestra. Una lesión benigna por lo general presenta una rigidez más elevada en comparación con el tejido normal. En una realización, una distribución unimodal que representa una lesión benigna tiene un valor máximo (que representa el número más elevado de puntos de medida en la función de distribución) de aproximadamente 1,3 a 2 veces el valor máximo para tejido normal en la misma fuente de muestra.

45 Una distribución de rigidez bimodal probablemente representa un tumor maligno, en el que una región blanda contribuye a una abundancia de valores de rigidez bajos y una periferia rígida tiene un valor de rigidez superior al de los tejidos normales. A una muestra que presenta distribución de rigidez modal trimodal o superior se le puede asignar una probabilidad elevada que representa tumor maligno o una mezcla de tejido normal, una lesión benigna y/o un tumor maligno.

50 De acuerdo con una realización de la invención, la muestra de tejido de biopsia se obtiene de carcinoma de mama humana o una metástasis de un ganglio linfático, de los pulmones, una metástasis ósea, una metástasis hepática, una metástasis cerebral u otra metástasis de tejidos relacionados con carcinoma de mama.

55 De acuerdo con una realización de la invención, a una muestra que presenta una distribución de rigidez al menos bimodal se le asigna una probabilidad elevada de que sea maligna, en la que dicha distribución de rigidez se caracteriza por un primer pico que presenta un valor de rigidez al menos dos veces más elevado que el de un segundo pico.

60 De acuerdo con una realización, la pluralidad de puntos se dispone en forma de una rejilla de n_1 por n_2 puntos, rejilla que define un área, siendo n_1 y n_2 independientemente números enteros > 1 .

65 De acuerdo con una realización, el tumor es un carcinoma de mama humana o una metástasis de ganglio linfático, pulmón, hueso, hígado o cerebro.

De acuerdo con una realización, una rejilla de 5 por 5 puntos (que da como resultado 25 puntos), 7 por 7 puntos, 10 por 10 puntos, 15 por 15 puntos, 20 por 20 puntos, 50 por 50 puntos o 100 por 100 puntos se mide para un área. En una realización preferente, se define el área de una rejilla de 24 x 24 puntos con un tamaño de 400 μm^2 .

5 De acuerdo con una realización, se determinan los valores de rigidez de al menos 2 áreas diferentes de la misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de dichas áreas es un múltiplo de la resolución espacial, siendo dicho múltiplo al menos 10 veces la resolución espacial. De acuerdo con una realización preferente, el múltiplo es 20, 30 o 50.

10 De acuerdo con una realización de la invención, la muestra de tejido de biopsia es una biopsia con un diámetro o espesor $> 5 \mu\text{m}$ y se puede obtener recogiendo la biopsia con una aguja hueca. De acuerdo con una realización, la muestra de tejido de biopsia es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 0,5 mm. En una realización, la muestra de biopsia es una biopsia cilíndrica o prismática que representa al menos una mitad de la sección transversal del tumor que se ha descrito anteriormente y que presenta una orientación distinta desde el núcleo a la periferia del tumor, y las áreas de la muestra de biopsia se colocan en la superficie de la muestra a lo largo del eje longitudinal de la muestra sobre una distancia de 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 15 mm o 20 mm.

20 Más preferentemente, la integridad y la heterogeneidad tridimensional de la muestra obtenida se conservan después de la recogida y la muestra de tejido presenta una orientación distinta desde el núcleo a la periferia del tumor.

De acuerdo con otra realización de la invención, la determinación de los valores de rigidez se realiza en condiciones fisiológicas.

25 Condiciones fisiológicas en el sentido de la invención se refiere a condiciones necesarias para retener la integridad estructural y las propiedades mecánicas de la muestra de tejido de biopsia, manteniendo la viabilidad del tejido con cualquier agente químico o físico e incluyen en particular que después de la recogida de la muestra esta se almacene en un tampón fisiológico tal como solución salina tamponada con fosfato o solución de Ringer, y la determinación de la rigidez se realiza a 20, 25, 30 o 37 °C. La solución de Ringer se puede complementar adicionalmente con glucosa un cóctel de proteasas. Además, la determinación de la rigidez de la muestra de tejido de biopsia se puede realizar a las 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h o 72 h después de la recogida sin cambiar las propiedades mecánicas de la muestra. Las "condiciones fisiológicas" en particular no comprenden tejido congelado ni tejido descongelado, ni muestras embebidas en parafina.

35 De acuerdo con otra realización preferente de la invención, se determina la rigidez de una muestra de biopsia de mama y

- a una muestra que presenta una distribución de rigidez que se caracteriza entre 1,1 kPa y 1,85 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea tejido de mama normal,
- 40 - a una muestra que presenta una distribución de rigidez caracterizada entre 1,9 kPa y 3,7 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea una lesión benigna, y
- a una muestra que presenta una distribución de rigidez caracterizada por picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y a un valor superior a 1,2 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea un tumor maligno.

45 De acuerdo con una realización, a una muestra que presenta una distribución de rigidez caracterizada por picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y 1,2 kPa y 2,0kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea un tumor maligno.

50 Un pico en el sentido de la invención se refiere a un máximo local en la distribución del valor de rigidez y se refiere al valor de rigidez con la frecuencia más elevada dentro de una muestra, o dentro de los valores inmediatamente vecinos.

De acuerdo con una realización, la determinación de una pluralidad de valores de rigidez se realiza midiendo al menos 5 áreas, 10 áreas, 15 áreas, 20 áreas, 25 áreas o 30 áreas de la muestra de biopsia, en la que el área se define como se ha hecho anteriormente. Por ejemplo, el eje longitudinal de la muestra se puede representar por una serie de áreas como se ha establecido anteriormente.

60 Para muestras en bruto, se pueden producir problemas cuando las ondulaciones (desigualdad de la muestra en el eje z) de la superficie de la muestra en la zona de barrido son mayores que el intervalo del nanobarrido dado en el eje z (con las organizaciones actuales, normalmente de 5 μm a 100 μm). Si las ondulaciones son demasiado grandes, el elemento piezoeléctrico se extenderá o se retraerá completamente. La sonda o estructura en voladizo perderá el contacto si el elemento piezoeléctrico se extiende totalmente pero la superficie de la muestra todavía sigue descendiendo. Por otro lado, la fuerza de la estructura en voladizo aumentará con respecto al pico de la fuerza dada si el elemento piezoeléctrico ya está contraído pero la superficie de la muestra todavía sigue ascendiendo. La punta de la estructura en voladizo a continuación se presiona literalmente en la superficie de la muestra. En ambos casos, la fuerza constante de punta-muestra mencionada anteriormente no se mantiene.

De acuerdo con una realización, los valores de rigidez se determinan con un microscopio con sonda de barrido. Este dispositivo tiene una sonda o estructura en voladizo (2) con una punta (21) para interactuar con dicha muestra (4), y adicionalmente comprende un nanoescáner (1) para retener dicha muestra (4) o dicha sonda o estructura en voladizo (2). La extensión de dicho nanoescáner (1) a lo largo de una primera dirección (R), a lo largo de la que dicha punta (21) se mueve hacia dicha muestra (4), se controla. Un nivel de dicha sonda o estructura en voladizo (2) a lo largo de dicha primera dirección (R) se ajusta por medio de un actuador tradicional (3) cuando dicho nanoescáner (1) presenta una extensión por debajo o por encima de un valor umbral.

De acuerdo con una realización, el microscopio con sonda de barrido tiene un poder de resolución de al menos 1 μm . Poder de resolución en el sentido de la invención se refiere a la distancia mínima entre puntos entre los que un microscopio con sonda de barrido todavía es capaz de diferenciar entre dos puntos en una muestra con respecto a sus características investigadas tales como carga, magnetización o una propiedad mecánica. Un poder de resolución de al menos 1 μm se refiere a que el microscopio es capaz de diferenciar dos puntos que no están separados en más de 1 μm . Un poder de resolución de al menos 1 μm también incluye poderes de resolución más elevados. Un poder de resolución superior a 1 μm se refiere a que el microscopio puede diferenciar dos puntos que tienen una distancia inferior a 1 μm . algunos ejemplos de potencias de resolución superiores a 1 μm son 0,5 μm , 0,1 μm , 10 nm y 1 nm.

El ajuste de un nivel de la sonda a lo largo de la primera dirección se configura para evitar que la punta de la sonda llegue a estar cerca de la muestra o para evitar que este demasiado lejos de la muestra. Del ajuste se puede realizar disminuyendo o disipando la sonda o disminuyendo o disipando la muestra a lo largo de la primera dirección.

Un nanoescáner en el sentido de la invención se refiere a un dispositivo para mover la muestra o la sonda con una precisión submicrométrica, o al menos micrométrica, a lo largo de la primera dirección que se ha descrito anteriormente. Tal nanoescáner puede ser un elemento piezoeléctrico o un motor lineal tal como un motor de bobina de voz.

Un elemento piezoeléctrico en el sentido de la invención se refiere a un cuerpo formado por un material piezoeléctrico que se puede deformar mediante aplicación de la corriente eléctrica. Tal elemento piezoeléctrico se puede extender y plegar a lo largo de al menos una dirección. Además, el elemento piezoeléctrico se puede realizar con un material adecuado tal como cristal o cerámica, por ejemplo cuarzo, titanato de bario, titanato de plomo, tungstato sódico, niobato sódico, circonato titanato de plomo o ferrita de bismuto y se puede extender o plegar dentro de un intervalo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 μm .

Un motor de bobina de voz en el sentido de la invención se refiere a un motor que comprende una carcasa magnética y una bobina electromagnética que se pueden mover entre sí. Tal carcasa magnética puede comprender un imán permanente en una carcasa formada por hierro. Tal bobina electromagnética comprende un alambre conductor enrollado alrededor del núcleo. El motor de bobina de voz puede comprender adicionalmente una estructura de bisagra de flexión que se puede usar como un resorte entre la sonda en la carcasa. La aplicación de un voltaje a través de los terminales del motor hace que el motor se mueva en una dirección, a la vez que la inversión de la polaridad del voltaje aplicado moverá el motor en la dirección opuesta. El alcance de un motor de bobina de voz en el sentido de la invención se refiere a su carrera o aumento, en el que el alcance máximo se refiere a la carrera o elevación máximos en la extensión mínima hasta carrera o elevación cero.

Además, el nanoescáner se puede acoplar directamente a la sonda o al montaje de la sonda (configuración TOP-DOWN, véase la Fig. 27). Como alternativa, el nanoescáner se puede acoplar directamente a la muestra o la estructura en voladizo de muestras (configuración BOTTOM-UP, véase la Fig. 28). Acoplamiento directo en el sentido de la invención se refiere a una conexión física entre el nanoescáner y la sonda, el montaje de la sonda, la muestra o la estructura en voladizo de muestras, en el que la conexión física se configura para permitir que el nanoescáner mueva la sonda, montaje de la sonda, muestra de soporte de muestras en al menos la primera dirección como se ha descrito anteriormente. El nanoescáner se puede configurar adicionalmente para mover la sonda, montaje de la sonda, muestra o soporte de muestras en la segunda y tercera dirección que se han descrito anteriormente.

El valor umbral corresponde al intervalo de trabajo óptimo del nanoescáner, en particular de un elemento piezoeléctrico, dependiendo de la construcción, diseño o material usado del nanoescáner. En particular, el valor umbral puede corresponder al límite superior e inferior del intervalo de trabajo óptimo del nanoescáner.

Un actuador en el sentido de la invención se refiere a un dispositivo para mover o controlar un mecanismo o sistema diferente del elemento piezoeléctrico esa descrita anteriormente y que convierte energía en movimiento. Tal actuador puede funcionar con una fuente de energía tal como corriente eléctrica, presión de fluido hidráulico o presión neumática. Algunos ejemplos de un actuador son, sin queda limitado a los mismos, un actuador neumático, un actuador hidráulico, un actuador piezoeléctrico, una unidad con forma peine, un actuador lineal o motor, un polímero electroactivo o un motor eléctrico tal como motor servo, motor de pasos o motor de bobina de voz.

De acuerdo con una realización, el nanoescáner se diseña, con respecto a su extensión, para mantener una fuerza

constante de interacción de punta de la sonda-muestra. Tal fuerza se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con otra realización, la extensión del nanoescáner se configura para que mantenga una distancia constante de punta de la sonda-muestra.

5 De acuerdo con otra realización, la extensión del nanoescáner se configura para que mantenga una profundidad de la hendidura constante de la punta de la sonda en la muestra.

10 De acuerdo con una realización, el control de la extensión del nanoescáner de acuerdo con el aspecto y realizaciones de la invención se realiza en tiempo real. Tiempo real en el sentido de la invención se refiere aquí el tiempo transcurrido entre la extensión del nanoescáner y el registro de la extensión es superior a 1 s, 0,1 s, 10 μ s o 1 μ s. Un control en tiempo real puede permitir en tiempo real el ajuste del nivel de la sonda, en el que el tiempo transcurrido entre la extensión del elemento piezoeléctrico y el ajuste del nivel de la sonda no es superior a 1 μ s, 10 μ s, 100 μ s, 1 s o 5 s.

15 De acuerdo con una realización, el ajuste del nivel de la sonda de acuerdo con el aspecto anterior y realizaciones de la invención se realiza mediante la bajada o elevación de la sonda o bajada o elevación de la muestra.

20 De acuerdo con otra realización, el ajuste del nivel de la sonda de acuerdo con el aspecto mencionado anteriormente y realizaciones de la invención se realiza de forma automática. Tal ajuste de forma automática se puede realizar con el actuador que se destila anteriormente o un microprocesador programado que se configura para que realice el método de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones de la invención.

25 De acuerdo con otra realización, tal microprocesador programado se configura para controlar la extensión del elemento piezoeléctrico y para que el actuador comience automáticamente a ajustar el nivel de la sonda o la muestra, cuando se alcanza un umbral de extensión definido. El microprocesador se configura adicionalmente para parar de forma automática al actuador, cuando se alcanza una cierta distancia de bajada o elevación a lo largo de la primera dirección.

30 De acuerdo con otra realización, el nivel de la sonda se ajusta cuando el nanoescáner presenta una extensión inferior a un 5, 10, 15, o un 20 % o superior a un 80, 85, 90 o un 95 % de su extensión máxima. Tal realización ofrece la ventaja de mantener la extensión del nanoescáner en el intervalo de trabajo óptimo entre un 5, 10, 15 o un 20 % y un 80, 85, 90 o un 95 % de la extensión máxima. A un 0 % de la extensión máxima, el nanoescáner se retrae de forma máxima.

35 Extensión máxima en el sentido de la invención se refiere a la longitud máxima de un nanoescáner a la que se puede extender el nanoescáner mediante aplicación de una corriente eléctrica. De forma análoga, extensión mínima o retracción máxima en el sentido de la invención se refiere a la longitud mínima de un nanoescáner a la que el nanoescáner se puede retraer mediante aplicación de una corriente eléctrica.

40 De acuerdo con otra realización, el nivel de la sonda se ajusta mediante bajada o elevación de la sonda o la muestra en un 5 a un 30 % de la extensión máxima del nanoescáner. Tal realización ofrece la ventaja de restaurar el intervalo de trabajo óptimo del elemento piezoeléctrico.

45 De acuerdo con una realización precedente, a nivel de la sonda se ajusta mediante bajada o elevación de la sonda o la muestra en un 20 % de la extensión máxima del elemento piezoeléctrico.

50 De acuerdo con otra realización, el nivel de la sonda se ajusta cuando el nanoescáner presenta una extensión que está 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 700 nm, 1 μ m, o 2 μ m por encima de la extensión máxima o que está 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 700 nm, 1 μ m, o 2 μ m por encima de la retracción máxima. Tal realización ofrece la ventaja de mantener la extensión del nanoescáner en el trabajo óptimo.

55 De acuerdo con otra realización, el nivel de la sonda se ajusta mediante bajada o elevación de la sonda una muestra al menos en 50 nm.

De acuerdo con una realización preferente, el nivel de la sonda se ajusta mediante bajada o elevación de la sonda o la muestra en 3 μ m. tal realización ofrece la ventaja de restaurar el intervalo de trabajo óptimo del elemento piezoeléctrico.

60 Cuando anteriormente se hace referencia a una realización de la invención, y tal realización solamente se refiere a una característica de la invención, se pretende que tal realización se pueda combinar con otra realización que hace referencia a una característica diferente. Por ejemplo, 15 áreas de 50 por 50 puntos se pueden medir usando una punta de radio de 10 nm.

65 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para clasificar una muestra de tejido tumoral, que comprende

- un dispositivo para determinar valores de rigidez con una resolución espacial de al menos 1 mm, preferentemente 100 μm , 10 μm o 1 μm ,
- un microprocesador programado,

5 en el que el microprocesador programado está equipado y configurado para que realice un método de acuerdo con los aspectos o realizaciones de la invención mencionados anteriormente.

10 Tal dispositivo puede comprender un estilete, un soporte de la muestra, y medios para registro del movimiento del estilete, en el que el estilete se puede mover en una dirección vertical (eje z) y cualquiera del estiletes o el soporte de la muestra se puede mover en una dirección lateral (eje x o y) o cualquiera del estiletes o el soporte de la muestra se puede mover en direcciones tanto verticales como laterales.

15 Tal estilete puede ser una estructura en voladizo con una punta, en el que la estructura en voladizo tiene una constante de resorte de 0,01, 0,025, 0,05, 0,06, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 0,75, 1 o 10 Nm^{-1} y el radio de la punta es 0,01, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 μm .

20 Tal medio para registro del movimiento del estilete puede ser un sistema óptico que comprende un láser y un diodo de rejilla, en el que el láser se enfoca por la parte trasera de la estructura en voladizo y se refleja en el diodo de rejilla y las desviaciones de la estructura en voladizo se registran con un cambio en la posición de la luz láser reflejada en el diodo, o un interferómetro, en el que la interferencia de dos rayos de luz se puede usar para la medida de desviación. Como alternativa, la estructura en voladizo puede comprender un elemento piezoeléctrico, en el que se genera una carga mediante la desviación de la estructura en voladizo.

25 Tal microprocesador programado se puede integrar en el dispositivo que se ha descrito en los párrafos anteriores o puede ser parte de una unidad de control o un ordenador para controlar el dispositivo.

De acuerdo con una realización preferente, el dispositivo para determinación de la rigidez es un microscopio de fuerza atómica.

30 De acuerdo con una realización preferente, el dispositivo (100) es un microscopio de fuerza atómica que comprende una sonda (2) que tiene una punta (21) para interactuar con una muestra (4), en el que dicha sonda (2) se configura para mover dicha punta (21) hacia dicha muestra (4) a lo largo de una primera dirección (R), y un nanoescáner (1) para retener dicha muestra (4) o dicha sonda (2). El dispositivo (100) comprende un medio para controlar la extensión de dicho elemento piezoeléctrico a lo largo de dicha primera dirección (R), un actuador (3) para ajustar un nivel de dicha sonda (2) a lo largo de dicha primera dirección (R) y un controlador (31) para controlar dicho actuador (3), en el que dicho controlador (31) se configura para controlar dicho actuador (3) con el fin de ajustar dicho nivel de dicha sonda (2), cuando dicho nanoescáner (1) presenta una extensión por debajo o por encima de un valor umbral.

40 Tal actuador se configura para bajar o elevar la muestra o la sonda para evitar que la punta de la sonda quiere cerca de la muestra o para evitar que quede demasiado lejos de la muestra.

45 Tal medio para controlar la extensión del nanoescáner puede ser un sistema óptico que comprende un láser o un interferómetro, un sensor piezoeléctrico, que puede registrar el movimiento del elemento piezoeléctrico como una carga eléctrica, o un sensor que controlar no solamente el voltaje aplicado sino también la extensión real posterior con el fin de garantizar una precisión elevada de la extensión.

50 Como alternativa, tal medio para controlar el movimiento puede ser la lectura del voltaje o de la corriente eléctrica aplicada al nanoescáner, que es necesario para mover el nanoescáner a lo largo de la primera dirección o, en particular, para mantener una fuerza constante entre punta y muestra. Por ejemplo, cada elemento piezoeléctrico tiene una sensibilidad específica - nm/V que se usa para convertir el voltaje aplicado a la distancia/movimiento del elemento piezoeléctrico. Cuando el voltaje o la corriente eléctrica y aplicados la extensión resultante del nanoescáner alcanzan un nivel específico, entonces se activa el ajuste del nivel de la sonda como se ha descrito anteriormente.

55 Un controlador en el sentido de la invención se refiere a una unidad de control que se conecta al actuador. Tal controlador puede ser un microprocesador o un ordenador.

60 El nanoescáner se puede acoplar directamente a la sonda o la muestra. En el caso de que la sonda se aparte de un montaje de la sonda, el nanoescáner como alternativa se puede acoplar directamente al montaje de la sonda.

De acuerdo con una realización del aspecto anterior de la invención, el nanoescáner se configura para que mantenga una fuerza constante de interacción de punta de la sonda-muestra. Tal fuerza se ha descrito anteriormente.

65 De acuerdo con otra realización del aspecto anterior de la invención, el nanoescáner se configura para que mantenga una profundidad de la hendidura constante de la punta de la sonda en la muestra.

De acuerdo con una realización de la invención, el nanoescáner es un elemento piezo. El término elemento piezoeléctrico tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente.

5 De acuerdo con un aspecto de la invención, la sonda es una estructura en voladizo. El término estructura en voladizo tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente.

10 De acuerdo con una realización del aspecto anterior de la invención, el nanoescáner se puede mover en una segunda dirección que se extiende ortogonalmente con respecto a dicha primera dirección que se ha descrito anteriormente.

15 De acuerdo con una realización del aspecto anterior de la invención, el dispositivo comprende adicionalmente un soporte de muestra para retener la muestra. El término soporte de muestra tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente. En el caso en el que el soporte de la muestra retenga la muestra, el nanoescáner se puede acoplar directamente al soporte de muestra.

La invención se caracteriza adicionalmente por las figuras y ejemplos siguientes, a partir de los que se pueden derivar características, ventajas y realizaciones:

Descripción de las figuras

- 20 Fig.1 muestra una representación esquemática de un enfoque experimental en biopsias de ensayo de MFA nanomecánico (barra de escala = 500 μm).
- 25 Fig. 2 muestra una biopsia de mano humana fijada a una placa de Petri y una evaluación histológica de la biopsia.
- Fig. 3 muestra las propiedades estructurales de lesiones benignas en comparación con cáncer invasivo evaluado con análisis histopatológico de la muestra después de medidas de MFA y determinación de rigidez de MFA de la muestra.
- 30 Fig. 4 muestra la firma nanomecánica (atribuciones de rigidez) y la evaluación histopatológica de tejido de mama humana (barra de escala = 100 μm).
- 35 Fig. 5 muestra las diferencias histológicas y nanomecánicas entre biopsias de pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas evaluadas con análisis histopatológico y distribuciones de rigidez de muestras de tejido de mama.
- 40 Fig. 6 muestra la correlación de la respuesta nanomecánica con histología en tejidos de glándula mamaria de ratón MMTV-PyMT (barras de escala = 50 μm) con distribuciones de rigidez y análisis histológico.
- Fig. 7, 9- 13, 17, 19, 22, 24-25 se han suprimido.
- 45 Fig. 8 muestra la heterogeneidad de la rigidez relacionada con hipoxia en cáncer de mama invasivo de ratones MMTV-PyMT (barra de escala = 50 μm) en secciones de tejido inmunoetiquetado y en una distribución de rigidez de las muestras de tejido.
- 50 Fig. 14 muestra la firma nanomecánica de tejido de mama humana con mapas representativos de rigidez de alta resolución, distribuciones de rigidez y evaluaciones histológicas de tejido de glándula mamaria normal (a), lesión de fibroadenoma (benigno) (b) y cáncer de mama invasivo (c) (barra de escala = 200 μm).
- 55 Fig. 15 muestra los histogramas globales individuales de los módulos de Young asociados para 21 biopsias humanas incorporadas en la presente invención.
- Fig. 16 muestra la comparación de dos ajustes globales representativos de una biopsia del tejido sano y biopsia de cáncer.
- 60 Fig. 18 muestra la correlación de respuesta nanomecánica y progresión tumoral en ratones MMTV-PyMT (barra de escala = 200 μm).
- 65 Fig. 20 también muestra los marcadores estructurales y nanomecánicos para distinguir entre tejido adiposo y afectado con cáncer (barra de escala = 20 μm).

- Fig. 21 muestra mapas de rigidez, distribuciones de rigidez y evaluación inmunohistológica de cáncer en el estadio tardío en ratones MMTV-PyMT (barra de escala = 200 μm).
- Fig. 23 muestra la caracterización nanomecánica *in situ* de células cancerígenas de ratones MMTV-PyMT.
- Fig. 26 muestra los mapas de rigidez, distribuciones de rigidez y evaluaciones histológicas de pulmones sanos (a) y metástasis en pulmones (b) en ratones MMTV-PyMT (barra de escala = 20 μm).
- Fig. 27 muestra un esquema de una configuración TOP-DOWN de MFA y con un componente de alineación vertical.
- Fig. 28 muestra un esquema de una configuración BOTTOM-UP de MFA y con un componente de alineación vertical.
- Fig. 29 muestra un esquema del movimiento vertical del elemento piezo.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Muestras de tejido de mama y pulmón de ratones MMTV-PyMT

Para obtener ratones hembra heterocigóticos para el transgén PyMT, los ratones PyMT macho en un fondo de C3H/B6 x FVB-C3H/B6 se cruzaron de forma aleatoria con hembras C3H/B6 que carecían del transgén PyMT. Los ratones se palparon dos veces a la semana para evaluar el inicio del tumor de mama. El volumen del tumor se calculó siguiendo medida con calibrador como ancho x largo x 0,4. Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO_2 .

Los ratones transgénicos para MMTV-PyMT presentan múltiples sitios tumorales y varias glándulas se retiraron. Se colocaron inmediatamente en solución de Ringer estéril enfriada con hielo (6,00 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 50 g de glucosa anhidra, 0,27 g de CaCl_2 , 3,20 g de ácido láctico en 1000 ml de agua inyectable) complementada con un cóctel inhibidor de proteasa (Complete). Para el ensayo de MFA nanomecánico, unas muestras de ensayo cilíndricas que representan una sección cruzada de todo el tumor se obtuvieron con una función de biopsia con un diámetro interior de 2 mm. La formación de mapas de rigidez comenzó dentro de 1 h después de la biopsia y continuó hasta dos días. Las propiedades mecánicas de las muestras de tejido de mama permanecieron sin cambiar durante este periodo de tiempo.

Medida de hipoxia *in situ*

Los ratones que portan tumor se inyectaron por vía intraperitoneal con clorhidrato de pimonidazol a 100 mg/ml en solución salina estéril al 0,9 % (120 mg/kg, Hypoxyprobe-1, HPI). Después de 90 minutos, los ratones se sacrificaron y se tomaron biopsias al ensayo nanomecánico como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, la hipoxia se evaluó mediante análisis inmunohistoquímico de incorporación de pimonidazol.

Biopsias humanas

Las biopsias humanas se obtuvieron en el Breast Treatment Center del Basel University Women's Hospital directamente después de retirada. El reclutamiento de los pacientes y el análisis de rigidez se realizaron de acuerdo con requisitos éticos y sin conocimiento previo de datos clínicos. La biopsia del núcleo guiada con ultrasonidos de la lesión visible retiró muestras de ensayo cilíndricas, radiales de aproximadamente 2 mm de diámetro con una longitud entre 0,2 y 1 cm que se transfirieron directamente a un vial que contenía solución de Ringer estéril enfriada con hielo complementada con glucosa y un cóctel inhibidor de proteasa (Complete). Al igual que para los tejidos de murino, el ensayo de MFA comenzó a 1 h después de la biopsia. Las propiedades mecánicas de las muestras de ensayo no cambiaron durante este periodo de tiempo. Las muestras de ensayo se mantuvieron a 4 °C hasta medidas de MFA para minimizar la degradación del tejido. El análisis de MFA se realizó en un periodo no más tarde de tres días después de la retirada para evitar efectos autolíticos (es decir, autodegradación del tejido) en la muestra de ensayo.

Ensayo de MFA nanomecánico

El nivelado automatizado se reguló con un conjunto personalizado de algoritmos durante la adquisición de datos para corregir la desigualdad natural del tejido. Cada muestra se examinó de una manera sistemática desde un borde al otro para tener en cuenta posibles heterogeneidades. Una distancia regular de aproximadamente 500 μm mantuvo entre las regiones de barrido en las que la distancia entre las dos estructuras en voladizo sirvió como una referencia (Fig. 1). Esto dio como resultado de aproximadamente 10 a 15 mapas de FV por muestra de ensayo

dependiendo de la longitud total de la biopsia. Dado que las muestras de ensayo obtenidas para glándulas mamarias de ratón y pulmones no eran cilíndricas como las biopsias humanas, las áreas de barrido se eligieron con el fin de asegurar que las muestras de ensayo se cubrían totalmente.

5 Para el análisis de las muestras de tejido de glándula mamaria con MFA, las biopsias se pegaron en un disco de Teflón redondo usando pegamento de 2 componentes o se fijaron a una placa de Petri con pegamento epoxi de secado rápido en 5 minutos. Después de una etapa de secado previo de 2 minutos (para evitar la mezcla del epoxi y el tampón de la muestra de ensayo), la muestra de ensayo se dejó plana para optimizar el ángulo de la hendidura y para evitar la influencia de componentes externos (por ejemplo, el soporte de la estructura en voladizo). Las puntas de pipeta que actúan como "rampas" se colocaron directamente sobre segmentos desiguales de cada muestra de ensayo para mantener una coherencia del peso. El uso de fuerza excesiva (por ejemplo, rasgado o estiramiento) se minimizó todas las veces durante la manipulación de la muestra de ensayo. Todas las etapas preparativas se realizaron en un entorno de tampón estéril complementado con inhibidores de proteasa para evitar la contaminación y para asegurar que la muestra de ensayo permanecía en un estado cercano al nativo. Las muestras de ensayo montadas se mantuvieron en solución de Ringer enfriada con hielo hasta el ensayo nanomecánico, que se realizó a temperatura ambiente o a 37 °C.

20 Para puntas piramidales afiladas (estructuras en voladizo de nitruro de silicio de 200 nm de longitud, constante de resorte de la estructura en voladizo nominal $k = 0,06 \text{ N m}^{-1}$, frecuencia de resonancia [aire] = 18 kHz). La constante de resorte k exacta de la estructura en voladizo se determinó antes de cada experimento con el método de calibración térmica aunque la sensibilidad de desviación se determinó en fluido usando sustratos de vidrio sólidos como un material de referencia infinitamente rígido.

25 Las medidas de rigidez (módulo elástico, E) de biopsias se derivaron como se indica a continuación; las curvas de carga-desplazamiento, también denominadas curvas de hendidura de fuerza, se registraron en un sitio dado de una forma orientada tanto durante la carga como durante la descarga. Una distancia regular de aproximadamente 500 μm se mantuvo entre las regiones de barrido en las que la distancia entre las dos estructuras en voladizo sirvió como una referencia. Un conjunto de datos individuales consistía en 1.024 curvas de carga-desplazamiento, a una tasa de toma de muestras de 1,5 Hz. Esto dio como resultado de aproximadamente 15 a 20 mapas de volumen de fuerza por muestra. Cuando era posible, se preparaban mapas de fuerza-volumen (FV) sobre una rejilla de 24 x 24 puntos con un tamaño de barrido de 20 x 20 μm a una tasa de aprox. 0,8 ciclos de carga/descarga por segundo. Cada curva de carga-desplazamiento consistía en 512 puntos de datos mientras que la longitud Z se ajustó de 5 μm a 8 μm dependiendo de las propiedades de la región analizada. Cada mapa de FV se ajustó a 20 x 20 μm^2 para (i) optimizar el tiempo experimentar así como (ii) para proporcionar un área lo suficientemente grande como para incorporar todos los componentes dentro del tejido (por ejemplo, células y matriz extracelular). La fuerza de carga máxima aplicada se ajustó a 1,8 nN y una profundidad de la hendidura de aproximadamente 150 a 3000. Se obtuvieron mapas adicionales de 72 x 72 FV (5184 curvas de fuerza-desplazamiento por mapa y un tamaño de píxel de 277 nm) para aumentar la resolución espacial con respecto a las áreas fundamentales de interés.

40 Análisis de datos de MFA

45 Las curvas de hendidura de fuerzas se analizaron usando un método que se ha descrito anteriormente (Oparic, *et al.*, Biophysical Journal, 98 (11): p. 2731-40, 2010, Plodinec, *et al.*, Journal of Structural Biology, 174 (3): p. 476-484, 2011). En resumen, el software se desarrolló en LABVIEW para el análisis automatizado de los datos de FV. El punto de contacto se determinó mediante la aplicación de un ajuste por dinámico ha curvas de fuerza sin ajustar basadas en un algoritmo publicado (Lin, *et al.*, Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme, 129 (6): p. 904-912, 2007). Las curvas de fuerza se obtuvieron mediante la hendidura h , que corresponde a la diferencia entre el desplazamiento del elemento piezoeléctrico y la desviación de la estructura en voladizo, y multiplicando la desviación de la estructura en voladizo d con la constante de resorte k para obtener la carga F . Las curvas de fuerzas sin carga se analizaron para realizar un ajuste lineal hasta la parte superior de un 50 % de la curva de fuerza, que define la rigidez entre la carga máxima $F = 1,8 \text{ nN}$ y la carga mínima de 0,9 nN. Algunos efectos extraños en la curva de fuerza tales como adhesión se pudieron evitar con este procedimiento. La relación de Poisson se ajustó a 0,5. El módulo de Young se determinó de acuerdo con el método de Oliver y Pharr (Oliver *et al.*, Journal of Materials Research, 7 (6), 1564-1583, 1992). Los valores de la pendiente se representaron espacialmente para producir mapas de rigidez codificados con color en Igor Pro 6.22. Una interpolación del eje nervado de segundo grado en 2D se realizó en los mapas de rigidez en 2D para suavizar la presentación visual de los datos.

60 Análisis inmunohistoquímico

65 Después de MFA, todas las muestras se recuperaron, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina de acuerdo con procedimientos histológicos convencionales. Se cortaron secciones de aprox. 5 μm de espesor y se transfirieron en portaobjetos de vidrio. La primera y la última láminas de secciones secuenciales se tiñeron de forma rutinaria con Hematoxilina y Eosina (H & E). El examen histopatológico posterior incluía la evaluación del tipo de lesión (carcinoma ductal invasivo, DCIS, fibroadenoma etc.) y un número de marcadores histopatológicos convencionales (alcance de infiltración tumoral, fibrosis, necrosis, e infiltración linfocítica). Para análisis

inmunohistoquímico (IHC) de las láminas restantes de tejidos de mama humana, se usaron los siguientes anticuerpos: anti colágeno I (1:80; Biologo CO2111, USA), anti laminina (1:25; Thermo RB-082-A, Thermo Scientific, USA), anti vimentina (diluida previamente, Ventana 790-2917, Roche Diagnostics, CH), anti desmina (diluida previamente, Ventana 760-2513, Roche Diagnostics, CH). El análisis IHC de secciones de tejido murino para laminina, desmina y vimentina se realizó de la misma manera que para las secciones humanas. Además, las secciones de murino se tiñeron con anti $\beta 1$ integrina (1:50, Abcam, ab52971, USA) y colágeno I anti-ratón (1:800, Abcam, ab34710, USA). En algunos casos, las secciones se trataron para recuperación de antígeno con calor, o con tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9,0 y tampón de citrato, pH 6,0. Para tinción de colágeno de biopsias humanas, las secciones se trataron previamente con pepsina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear la unión no específica del anticuerpo primario se usó avidina/biotina. Para el inmunoetiquetado, las secciones se incubaron con 100 μ l de anticuerpos que se diluyeron de forma correspondiente en PBS 10 mM, pH 7,6 y azida sódica al 0,1 %. La tinción se visualizó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DakoCytomation, Dinamarca). Las secciones se examinaron con un microscopio de luz en posición vertical (Carl Zeiss, Alemania) con los aumentos indicados.

Análisis estadístico

En la presente invención se analizaron 21 biopsias de ser humano de 20 pacientes diferentes (véase la Tabla 1). Además, se analizaron 32 glándulas mamarias y 6 pulmones obtenidos a partir de 16 ratones MMTV-PyMT. De los 6 pulmones, tres eran sanos y tres presentaban lesiones metastásicas. Todos los valores individuales de rigidez se resumen en OriginPro 8.5 para obtener distribuciones de rigidez para cada muestra de ensayo (en lo sucesivo definidas como histograma global). En la del intervalo se ajustó a 200 Pa para todas las muestras de ensayo de glándula mamaria y a 500 Pa para los pulmones de murino. Los recuentos se normalizaron de acuerdo con la cantidad total de puntos de datos por muestra de ensayo. El ajuste de los datos se realizó mediante una primera distribución de la posición de los picos usando la aplicación para análisis de picos OriginPro y posteriormente aplicando ajustes múltiples picos a las distribuciones de rigidez.

Todos los se proporcionan como media \pm desviación estándar (d.t.). La significancia estadística de las diferencias en los valores medios se evaluó con el ensayo t de Student emparejado - en Origin 7.5. La significancia estadística se ajustó a $P \leq 0,05$.

Ejemplo 1: Ensayo nanomecánico de biopsias de tejido blando con MFA

Las propiedades nanomecánicas de biopsias de tejido de mama blando de ratones transgénicos MMTV-PyMT y de pacientes humanos se evaluaron en condiciones de tampón fisiológico con MFA. La muestra usada para el ensayo de MFA se extirpó de la glándula mamaria en forma de una biopsia cilíndrica, radial (Fig. 1 a). Una muestra de tejido cilíndrica habitual presenta una orientación distinta desde el núcleo la periferia. Las muestras de tejido recién preparadas se unen de forma estable a un soporte sólido de Teflón con un pegamento biocompatible de una manera orientada como se muestra en la Fig. 1 d. En estas muestras, la integridad y la heterogeneidad del tejido en 3D se conserva y la información estructural y nanomecánica correspondiente a través de toda la muestra de ensayo se presenta en un plano 2D con respecto a la sonda de MFA (Fig. 2). Esto permitió a la medida de la respuesta nanomecánica de una manera orientada. Las muestras se mantuvieron en solución de Ringer en todas las ocasiones.

Una biopsia de mama humana se fijó a una placa de Petri junto con la estructura en voladizo superpuesta a la región de barrido pretendida (Fig. 2a). La segunda estructura en voladizo sirve como una referencia para mantener una distancia constante de 500 μ m entre las regiones de barrido. La evaluación histopatológica de la biopsia después del ensayo de MFA combinada con las imágenes adquiridas previamente se puede usar para evaluar las lesiones aproximadas analizadas por MFA (Fig. 2b).

Ejemplo 2: La firma nanomecánica de biopsias de mama humana

Las medidas de rigidez de MFA de biopsias de mama humana recién preparadas se realizaron para esclarecer el diagnóstico y pronóstico potencial de las propiedades nanomecánicas del tejido en cáncer de mama humana (Fig. 3).

El análisis histopatológico de las muestras después de medidas de MFA revela el fenotipo del tejido benigno o maligno (Fig. 3a). Los datos mostrados en el panel en la parte superior se adquirieron a partir de una paciente hembra de 34 años de edad diagnosticada con fibroadenoma. Los datos del panel en la parte inferior se originaron a partir de una paciente hembra de 69 años de edad diagnosticada con carcinoma ductal invasivo. Las lesiones benignas revelan una fuerte distribución uniforme de tejido fibroso, mientras que el cáncer invasivo aparece desorganizado conteniendo mezclas de células tumorales y estroma de tumor fibrótico. Estas propiedades son más visibles con un aumento más elevado (Fig. 3b) y se correlacionan bien con los mapas de rigidez (Fig. 3c) adquiridos con MFA en las regiones indicadas con cuadrados de color negro en (Fig. 3b).

El tejido de glándula mamaria normal ($n = 4$) presenta un intervalo estrecho de valores de rigidez con un pico de E

1,83 ± 0,69 kPa (Figura 4a, panel en la parte superior). La tinción con i.e. de una sección de la misma muestra revelaba la histología habitual de tejido sano de glándula mamaria de una hembra joven. En la estructura lobular, los ácinos consisten en células epiteliales uniformes que se separan mediante una pequeña cantidad de tejido conectivo (Figura 4b). La distribución de rigidez estrecha medida mediante MFA se correlaciona bien con el aspecto histomorfológico homogéneo. Sin embargo, debido a la edad joven y el estadio premenopáusico de la paciente, es posible que esta firma nanomecánica en particular no sea característica para todos los tejidos normales de glándula mamaria. Un intervalo de rigidez bastante estrecho también se encontró en nuestras que demostraban ser lesiones benignas, aún que el $E = 4,07 \pm 1,39$ kPa indica un aumento de la rigidez en las 20 muestras sometidas a ensayo en comparación con la glándula mamaria normal. De forma coherente con esta firma nanomecánica, el examen histológico de la lesión benigna de una paciente de 60 años de edad de muestra tejido predominantemente fibrótico, bastante uniforme con lóbulos esporádicos habituales para fibroadenoma (Figura 4a, panel en la parte media). El tumor benigno presenta proliferación principalmente uniformes de tejido fibroso habitual para fibroadenomas (Fig. 4b, panel en la parte media).

Un número de biopsias humanas ($n = 12$) investigadas con MFA muestra un intervalo significativamente más amplio de valores de rigidez con dos picos distintos como se muestra en el panel en la parte baja de la Fig 4a. El examen histológico de esta biopsia después de medida de MFA confirmaba un carcinoma ductal invasivo, que representa el tipo más habitual de cáncer de mama en las mujeres, como se muestra para la paciente de 70 años de edad (Figura 4b, panel en la parte inferior). Ahí, las áreas centrales están dominadas por células tumorales que infiltran en un patrón similar al de un cordón en el tejido fibrótico denso en la periferia del tumor. El carcinoma de mama ductal invasivo muestra nidos de infiltración de células cancerígenas que han representado una respuesta del tejido fibroso denso. Mediante la correlación de las medidas de MFA con histología, las células cancerígenas de las regiones internas del tumor se identificaron como los contribuyentes principales al pico tenue con $E = 0,87 \pm 0,65$ kPa. Las áreas caracterizadas por aumento de la rigidez con un pico a $E = 11,26 \pm 1,90$ kPa se sitúan principalmente en la periferia del tumor y por lo tanto corresponden a estroma fibrótico.

Una distribución de rigidez ligeramente más ancha pero unimodal con un pequeño aumento de la rigidez global es habitual para lesiones benignas (Fig. 4a, panel en la parte media). Por el contrario, el tejido cancerígeno presenta una distribución de rigidez bimodal con dos picos que representan regiones blandas y relativamente rígidas del tumor (Fig. 4a, panel en la parte inferior). La Fig. 4b muestra la evaluación histopatológica de muestras de tejido después del ensayo de MFA. La histología revela la unidad lobular ductal terminal de una glándula mamaria normal delimitada por tejido conectivo fibroso intersticial y tejido adiposo más distante (Fig. 4b, panel en la parte superior).

El análisis histopatológico revela numerosas células todavía presentes en la muestra obtenida de una paciente premenopáusica de 34 años de edad, mientras que la muestra obtenida de una paciente de 69 años de edad postmenopáusica presenta tejido fibroso principalmente denso (Fig. 5, paneles en la parte izquierda). Una distribución de rigidez unimodal se puede observar en ambas medidas de rigidez (Fig. 5, paneles en la parte derecha), aunque los valores de rigidez y el ancho de distribución varían de forma notable.

El desplazamiento del pico más tenue medido para la paciente premenopáusica se correlaciona bien con el aumento de la densidad celular en la muestra premenopáusica (Fig. 5). De forma importante, los datos obtenidos en biopsias de mama humana proporcionan evidencias de que las propiedades nanomecánicas de las biopsias de tejido se pueden usar como marcador de confianza para detectar transformación maligna y progresión del tumor en pacientes humanos.

Ejemplo 3: Hallazgos histopatológicos de correlación con la respuesta nanomecánica en el modelo de ratón MMTV-PyMT

Las muestras de tejido de glándulas mamarias de ratones transgénicos MMTV-PyMT se retiraron a diferentes estadios tumorales para evaluar los cambios nanomecánicos asociados con la progresión del tumor. Los histogramas que muestran la distribución de frecuencia de valores de rigidez de medidas de MFA se representan en la Fig. 6a. Las medidas de MFA de glándula de mama de ratón normal ($n = 3$) revelaban una distribución homogénea (Gaussiana uniforme) de rigidez con un módulo elástico $E = 1,28 \pm 0,12$ kPa (Fig. 6a, panel en la parte superior). El examen de histología correlativa de la muestra de ensayo confirmaba un aspecto del tejido de glándula mamaria sano, normal con cantidades elevadas de tejido graso que lo más probablemente contribuye a los valores de rigidez bajos (Fig. 6b, panel en la parte superior). En las lesiones premalignas ($n = 3$), la distribución de rigidez es más ancha pero todavía sigue siendo Gaussiana unimodal (Fig. 6a, panel en la parte media) pero la rigidez aumenta a $E = 4,38 \pm 0,55$ kPa. La histología revelaba un epitelio de mama hiperproliferativo, empaquetado densamente que se correlaciona bien con el aumento de la rigidez del tejido (Fig. 6b, panel en la parte media). Sin embargo, la distribución de rigidez uniforme se pierde en lesiones cancerígenas ($n = 8$), y en su lugar, los carcinomas *in situ* presentan una distribución de rigidez bimodal (Fig. 6a, panel en la parte inferior) indicativa de dos fenotipos mecánicos distintos. En estos estadios iniciales del desarrollo tumoral, el $E = 0,54 \pm 0,13$ kPa de las regiones núcleo es 8 veces inferior que el de las lesiones benignas y 3 veces inferior al de la rigidez del tejido normal. El núcleo blando está rodeado por áreas significativamente más rígidas de $E = 16,97 \pm 6,89$ kPa. Aunque la distribución de rigidez bimodal de carcinoma *in situ* sugiere dos poblaciones de células distintas en el tumor, el aspecto histológico de la sección de tejido no revela ninguna diferencia morfológica significativa entre las células cancerígenas que

podrían contribuir a la distribución de rigidez bimodal (Fig. 6b, panel en la parte inferior). En el carcinoma *in situ*, la pérdida de organización tisular y la presencia de que las cancerígenas dentro de los conductos individuales son claramente visibles. Sin embargo, las células cancerígenas parecen citológicamente similares. Es de destacar que en el carcinoma *in situ*, el estroma circundante parece inalterado en comparación con el mioepitelio.

En conclusión, la comparación correlativa de medidas de rigidez de MFA con histología permitían el establecimiento de una asociación entre la respuesta nanomecánica de tejidos de mama de ratón y transformación maligna; la morfología del tejido no proporcionaba una explicación evidente para la distribución de rigidez bimodal y la región de núcleo blando de lesiones cancerígenas primarias.

Ejemplo 4: Reblandecimiento del tejido inducido por hipoxia en cáncer de mama de -MMTV-PyMT

La hipoxia tumoral causada por vascularización ineficaz se ha descrito para una amplia gama de tumores sólidos. Se asocia con un mal pronóstico después de radiación, quimioterapia y cirugía. Del interés en el estado hipóxico de tumores ha aumentado adicionalmente con el descubrimiento de que la hipoxia regula docenas de genes que alteran el comportamiento celular y da como resultado un fenotipo tumoral más maligno. Dado que se sabe que un núcleo hipóxico es una característica fundamental de la progresión del cáncer agresivo, se examinó si la distribución de rigidez bimodal observada desde la periferia hasta el núcleo de la lesión cancerígena primaria se relaciona con una oxigenación reducida. Para correlacionar directamente la hipoxia y la rigidez del tejido en muestras de tumor estadiadas, los ratones MMTVPyMT se inyectaron con agente de pimonidazol que se une de forma selectiva a células privadas de oxígeno antes de la extirpación del tumor. Posteriormente, las propiedades nanomecánicas de las muestras de tejido se sometieron a ensayos mediante MFA y posteriormente los tejidos se procesaron para evaluación de hipoxia. La tinción inmunohistoquímica revelaba que las glándulas normales y las lesiones benignas negativas para hipoxia, mientras que los tumores primarios presentan una hipoxia clara en el núcleo, que se correlaciona bien con la disminución significativa de la rigidez.

Después de la progresión de la malignidad al estadio metastásico invasivo (Fig. 8), se produjo una propagación de hipoxia pronunciada. Además de la hipoxia extensa en el núcleo (Fig. 8a, acercamiento de zoom, panel en la parte derecha), este estadio se caracteriza por una diseminación progresiva de células cancerígenas hipóxicas (teñidas de color gris oscuro) al tejido circundante. En particular, los vasos sanguíneos se revestían con células hipóxicas (Fig. 8a, acercamiento de zoom, panel en la parte media) lo que sugieren intravasación y por último invasión a sitios distantes y células hipóxicas diseminadas en el estroma del tumor periférico (Fig. 8a, acercamiento de zoom, panel en la parte derecha). Las medidas de MFA correspondientes muestran que los carcinomas invasivos ya no presentan dos picos de rigidez distintos sino que en su lugar presentan una distribución de rigidez amplia con rigidez gradual desde el núcleo a la periferia del tumor. El suavizado de la región núcleo y el ensanchamiento general de la distribución de rigidez (Fig. 8b) son coherentes con la evaluación de hipoxia inmunohistoquímica, que muestra células hipóxicas diseminadas desde el núcleo a/y en la periferia. Éste hallazgo sugiere que la hipoxia se asocia de hecho con un fenotipo de cáncer más agresivo, invasivo.

Con aumento bajo, la sección de tejido inmunotiquetado de cáncer de mama invasivo a partir de ratones tratados con pimonidazol presenta diferentes áreas hipóxicas (Fig. 8a, señal de color gris oscuro). El acercamiento del zoom revela una vista más detallada. Las células hipóxicas son abundantes en la región núcleo del tumor (panel en la parte izquierda), son continuas hacia los vasos sanguíneos tumorales (panel en la parte media), y se han diseminado a la periferia del tumor (panel en la parte derecha, marcado con líneas discontinuas). Las barras de escala son de 200 μm y 50 μm , respectivamente. Un histograma que presenta medidas de rigidez muestra una distribución bimodal (Fig. 8b). Existe un aumento de la rigidez desde el núcleo a la periferia en la que los valores de rigidez se distribuyen ampliamente.

Las medidas de rigidez de MFA indican que los aspectos mecánicos son marcadores valiosos para progresión del cáncer. Basándose en la evaluación de hipoxia correspondiente, los inventores llegan a la conclusión de que el tumor

Ejemplo 5: Ensayo nanomecánico adicional de biopsias de mama humana

La MFA se usó para examinar tejidos de mama *ex vivo* en condiciones de tampón fisiológico (Fig. 14). En particular, los respectivos perfiles nanomecánicos para los hallazgos histopatológicos se esclarecieron y se correlacionaron en biopsias benignas y malignas, normales (Fig. 14). La Figura 14a muestra un mapa de FV representativo de tejido de glándula mamaria normal. La representación del histograma global de toda la muestra de ensayo revela distribución de rigidez unimodal de $1,13 \pm 0,78$ kPa (Fig. 14a, parte media). El aspecto histológico en secciones teñidas con H&E de la muestra de ensayo con la que se forman mapas se define con conductos sanos (Fig. 14a, parte derecha) delimitados con dos capas de células epiteliales, que se pueden distinguir por sus núcleos redondos y citoplasma mínimamente teñido. Las lesiones de fibroadenoma benigno muestran un aumento de la rigidez a $3,68 \pm 1,92$ kPa (Fig. 14b, parte media). Las características más suaves (inferior a 2 kPa) dentro del mapa de rigidez parece que delimitan fibroblastos individuales embebidos en el estroma fibrótico (Fig. 14b, parte izquierda). Esto se valida con examen histológico en el que los fibroblastos son el tipo celular dominante dentro de la lesión benigna (Fig. 14b, parte derecha). En comparación, las biopsias de cáncer por lo general presentan una distribución de rigidez bimodal

con dos picos importantes a $0,61 \pm 0,21$ kPa ("primario") y $1,54 \pm 0,30$ kPa ("secundario") (Fig. 14c, parte media). A valores más rígidos que 2 kPa la distribución se ensancha, lo que refleja que la heterogeneidad notable a través de la muestra. El mapa de FV representativo (Fig. 14c, parte izquierda) revela que el pico suave, dominante es habitual para una célula cancerígena rodeada por estroma más rígido. La tinción con H&E confirma la dominancia de células tumorales que infiltran el estroma en un patrón similar al de un cordón (Fig. 14c, parte derecha).

Un mapa representativo de rigidez de MFA de alta resolución (24 x 24 píxeles) muestra tejido de glándula mamaria normal (Fig. 14a, parte izquierda) que presenta distribución de rigidez unimodal (Fig. 14a, parte media). La histología revela la unidad lobular ductal terminal (D) de una glándula mamaria normal delimitada por tejido conectivo fibroso intersticial señalado con flechas (parte derecha). El mapa de rigidez de MFA de alta resolución de lesión de fibroadenoma (benigna) de la estroma fibrótico (S) intermezclado con células de fibroblastos (F) (Fig. 14b, parte izquierda). Una distribución de rigidez más amplia pero unimodal con un aumento de la rigidez es habitual para lesiones benignas (Fig. 14b, parte media). Las flechas apuntan a matriz extracelular (S) y fibroblastos (F) encontrados por lo general en tejidos alterados de fibroadenoma (Fig. 14b, parte derecha). Por el contrario, el mapa de rigidez de tejido cancerígeno muestra células cancerígenas (C) embebidas en una matriz extracelular (ECM) de estroma tumoral (S) (Fig. 14c, parte izquierda). La distribución de rigidez bimodal revelados picos que representan células blandas y estroma periférico relativamente rígido (Fig. 14c, parte media). Esto es coherente con una evaluación histopatológico de carcinoma de mama invasivo. Las flechas apuntan a nidos infiltra antes de células cancerígenas (C) que recuerdan una respuesta de tejido fibroso denso (S).

Una representación esquemática de una retirada de biopsia guiada con ultrasonidos de un paciente con una lesión sospechosa se muestra en la fig. 1a. Un dibujo de una herramienta de biopsia con una muestra de ensayo que presenta dimensiones de una biopsia de mama cilíndrica habitual se representa en la fig. 1 b. Una muestra de tejido cilíndrica representativa que presenta una orientación distinta desde el núcleo la periferia se muestra en la fig. 1 c. Las muestras de tejido recién preparadas se mantienen en solución de Ringer en todas las ocasiones y se unen de forma estable a un soporte sólido de Teflón con pegamento biocompatible de una manera orientada (fig. 1 d).

Las distribuciones de rigidez globales para las 21 biopsias humanas (es decir, 6 muestras sanas, 5 muestras benignas y 10 muestras cancerígenas) examinadas se presentan en la fig. 15 (véase también la Tabla I). Todos los tejidos de mamas sanas presentan una distribución unimodal con una rigidez característica de 1,13 a 1,83 kPa. Una distribución de rigidez uniforme pero más amplia se encontró en cuatro casos (casos 8-11) de lesiones benignas (fibroadenomas). En comparación con las biopsias sanas, los valores de rigidez variaban de 1,91 a 3,68 kPa y por lo tanto indica un fenotipo más rígido en fibroadenomas. En el caso 8, había una abundancia elevada de fibroblastos dentro de la masa de tejido fibrótico, que se refleja en el valor de rigidez más bajo ($1,91 \pm 0,99$). En un caso (7), la distribución global revelaban los picos, uno ($1,33 \pm 0,32$ kPa) que corresponde al valor de rigidez del ejido de mama normal, y un segundo pico a $2,63 \pm 2,06$ kPa. De forma coherente, el diagnóstico histopatológico presentaba dos segmentos distintos de hiperplasia ductal y fibroadenoma respectivamente.

Las once biopsias malignas compartían un perfil de rigidez con un pico dominante de 0,31 a 0,75 kPa que es significativamente más bajo en comparación con la rigidez de la glándula mamaria sana ($P < 0,0001$). Además, el perfil de rigidez de cáncer incluía un segundo pico entre 1,54 y 1,99 kPa que es común para todas las muestras. Otra característica habitual de biopsias malignas es que los valores restantes están ampliamente extendidos hasta ~20 kPa. Esta extensión es indicativa de la pérdida global de arquitectura de glándula mamaria, vascularización e infiltración tumoral, y cambios de la ECM periférica afectada por invasión como consecuencia de la progresión del cáncer. De forma interesante, se observa que un mínimo distinto (~1,1 a 1,5 kPa) permanece entre los picos primario y secundario en varias biopsias de cáncer. Esto parece que se correlaciona de forma inversa con el valor medio de rigidez para tejidos sanos (Fig. 16), que surge de la transformación maligna del epitelio sano. Las distribuciones globales de una biopsia sana y una de cáncer revelan una correlación de rigidez inversa. El tejido sano presenta un pico a $1,13 \pm 0,78$ kPa, mientras que dentro de una biopsia de cáncer, en el intervalo de esta rigidez está presente un mínimo (Fig. 16).

Ejemplo 6: Seguimiento de los cambios nanomecánicos asociados con la progresión del tumor en modelo de ratón MMTV-PyMT para cáncer de mama

Debido a la diversidad genética y epidemiológica en pacientes humanos, el modelo de ratón MMTV-PyMT se eligió para determinar de forma sistemática las huellas nanomecánicas de progresión y metástasis tumoral. De acuerdo con la clasificación histopatológica, la hiperplasia temprana en MMTV-PyMT representa glándulas mamarias humanas normales mientras que una proliferación epitelial extensa limitada dentro de la membrana basal se asemeja a la neoplasia premaligna en seres humanos. Los estadios posteriores de carcinoma temprano se pueden comparar de forma morfológica con el carcinoma ductal humano *in situ*.

Mediante una rigidez media de $1,07 \pm 0,76$ kPa en un mapa de FV representativo de glándula mamaria de ratón normal (Fig. 18a, parte izquierda) se pueden distinguir estructuras celulares redondas. En la glándula sana con su colocación bien organizada de células epiteliales empaquetadas de forma densa y se delinear con una membrana basal distinta (Fig. 18a, parte derecha), el histograma global revela una distribución de rigidez unimodal con un pico característico a través de toda la muestra de ensayo (Fig. 18a, parte media). El perfil de rigidez uniforme encontrado

para glándulas mamarias de ratón normales es coherente con la mama humana normal. Sin embargo, al contrario que en tejidos de mama humana, las glándulas mamarias de murino sano presentan cantidades excesivas de tejido adiposo (70-80 %) que se caracteriza por un pico estrecho específico con un valor medio de $0,31 \pm 0,13$ kPa (Fig. 19).

5 Los mapas de FV de tejidos premalignos revelan un patrón de características blandas y moderadamente más rígidas (Fig 2b, parte izquierda) que se correlacionan con un aumento de los componentes del estroma que rodean las masas de células proliferativas en secciones teñidas con H&E (Fig 18b, parte derecha). Por consiguiente, el
10 histograma global muestra una distribución más amplia con un desplazamiento del valor máximo de $1,51 \pm 0,91$ kPa (Fig. 18b, parte media). Sin embargo, el software que analiza picos fue capaz de identificar dos picos a 1,15 y 1,55 kPa, respectivamente, lo que indica el comienzo de una distribución de rigidez bimodal.

Esta tendencia se hizo más pronunciada en cáncer temprano dando como resultado áreas blandas y rígidas distintas (Fig. 21c, parte izquierda). Los picos a $0,51 \pm 0,11$ y $1,63 \pm 0,71$ kPa en el histograma global proporcionan una clara
15 evidencia de la distribución de rigidez bimodal (Fig. 21c, parte media). En la misma medida, distintas zonas de células cancerígenas densamente empaquetadas e invasión inicial del estroma son evidentes en secciones teñidas con H&E (Fig. 21c, parte derecha). Los valores de rigidez se calcularon para todos los tejidos de mama y pulmones de murino examinados y se presenta en la Tabla 2. Además, el tejido adiposo como un contribuyente principal a la
20 composición de la glándula mamaria de murino se puede confundir para grupos de células cancerígenas. Por lo tanto, fueron necesarios experimentos de control en tejidos adiposo para diferenciar entre los dos tipos de células (Fig. 19). Por lo general, los adipocitos se pueden diferenciar de todos los demás tipos de células basándose en su aspecto morfológico uniforme en las secciones teñidas con H&E (Fig. 19a, parte izquierda). Los adipocitos carecen de cualquier estructura distinta y por lo general tienen un tamaño mayor en comparación con las células cancerígenas (Fig. 19b, parte izquierda). Estas características son coherente con lo que se había observado en los
25 mapas de FV (Fig. 19, partes medias respectivamente). El valor de rigidez correspondiente de tejido adiposo que se obtuvo es $0,31 \pm 0,13$ kPa (Fig. 19a, parte media). En comparación, una medida representativa sobre células cancerígenas proporcionó un pico suave primario a $0,75 \pm 0,25$ kPa (Fig. 19b, parte media), que es coherente con el análisis de la Fig. 14c. De forma importante, los datos muestran que el tejido adiposo es (i) aproximadamente un tercio más blando que las células malignas, (ii) ejerció una adhesión más fuerte a la punta (los datos no se muestran), y, (iii) presenta características de disipación más elevadas (como se caracteriza con la histéresis grande entre curvas de fuerza de MFA de enfoque y retracción) (los datos no se muestran).

Los mapas representativos de rigidez de MFA de alta resolución (72 x 72 píxeles) muestran conductos para una glándula normal (D) (Fig. 18a, parte izquierda), que presenta una distribución Gaussiana uniforme (Fig. 18a, parte
35 media). La histología después de MFA de secciones de tejido de ratón muestra glándula mamaria no lactante con un conducto (D) rodeado por tejido del estroma y adiposo (Fig. 18a, parte derecha) señalado con flechas. En la lesión premaligna se visualizan el epitelio proliferativo (E) y el estroma adyacente (S) (Fig. 18b, parte izquierda). La distribución de rigidez para hiperplasia premaligna (Fig. 18b, parte media) es más amplia con una indicación de bimodalidad (Fig. 18b, parte media). Las secciones teñidas con H & E del mismo tejido visualizan una gran
40 proliferación de células epiteliales (E) rodeadas por componentes del estroma (S) (Fig. 18b, parte derecha). El mapa de rigidez de una lesión de cáncer inicial revela células cancerígenas individuales (C) limitadas por tejido del estroma (S) (Fig. 18c, parte izquierda). Por consiguiente, la distribución de rigidez bimodal diferencia entre fenotipo de células cancerígenas blandas y estroma rígido (Fig. 18c, parte media). En la sección teñida con H & E las flechas apuntan a la morfología celular atípica (C) y una invasión temprana en el estroma adyacente (S) Fig. 18c, parte derecha).

45 La tinción con H&E en un tejido adiposo de la región aproximada se muestra en la Fig. 20a (parte izquierda), en la que se registraron los mapas de fuerza correspondientes. Dentro de los mapas de fuerza, los adipocitos aparecen homogéneos (Fig. 20a, parte media). El histograma correspondiente indica distribución de rigidez y valor medio computerizado para el tejido adiposo (Fig. 20a, parte derecha). Por otro lado, el tejido cancerígeno (Fig. 20b, parte
50 izquierda) presenta cierta estructura que revela células cancerígenas individuales embebidas en ECM (Fig. 20b, parte a la izquierda y medias respectivamente). El tejido formado por células cancerígenas y masivas presenta perfil más rígido nanomecánico y más heterogéneo (Fig. 20b, parte derecha).

Entre los cambios estructurales más significativos de la arquitectura de la glándula mamaria que se producen
55 después de la transición de glándula mamaria normal al inicio de cáncer se encuentran, la degradación de la membrana basal, que rodea las glándulas normales y premalignas (Fig. 22, parte superior) y la expresión y organización alteradas del colágeno I (Fig 22, parte inferior). En estadios más tardíos de progresión tumoral, las contribuciones del estroma modifican de forma creciente el comportamiento del cáncer. Por ejemplo, el colágeno I, el componente principal de la ECM, se ha asociado con la rigidez del cáncer. Por lo tanto, se examinó la relación entre
60 perfiles nanomecánicos locales y estructura de la ECM en el cáncer de MMTV-PyMT tardío, que corresponde a invasiones dísticas de carcinoma en ser humano. Algunos mapas de FV secuencia demuestran rigidez gradual desde el núcleo a la periferia Fig. 21a) con valores máximos que se desplazan de $0,74 \pm 0,26$ kPa en el núcleo a $5,51 \pm 1,70$ kPa en la periferia. Al mismo tiempo, la heterogeneidad del tejido aumentado (Fig. 21 b) y es máxima en la periferia (Fig. 21b parte derecha). Estos cambios parece que están asociados con distintos cambios en ECM como se revela mediante análisis de IHC correlativo (Fig. 21c).

Los mapas de rigidez consecutiva a través de la muestra demuestran un aumento significativo de la rigidez y la heterogeneidad estructural desde el núcleo la periferia (Fig. 21a, de izquierda a derecha respectivamente) como se ilustra en las distribuciones de rigidez correspondientes (Fig. 21b). El análisis de IHC (tinción de color gris oscuro) revela cambios estructurales y morfológicos subyacentes en el colágeno I (Fig. 21c, parte superior) y la laminina (Fig. 21c, parte inferior) desde el núcleo a la periferia marcados con cabezas de flecha.

Por ejemplo, el colágeno I no se detecta en el núcleo hablando, pero está presente de forma creciente hacia la periferia (Fig. 21c, parte superior). Además, la expresión de la laminina I está prácticamente ausente desde el núcleo (Fig. 21 c, parte inferior izquierda) como se espera en el cáncer avanzado, en el que la membrana basal se ha desintegrado. Sin embargo, el aumento de la vascularización de las áreas medias y periféricas daba como resultado una tinción de la laminina de las membranas basales de los vasos (Fig. 21c, parte inferior media y derecha). La ausencia de laminina y colágeno I en las regiones del núcleo contribuyen al fenotipo blando de las células cancerígenas. Por otro lado, el aumento de tinción hacia la periferia marca el aumento de la invasión del estroma relacionada con la rigidez en las respectivas regiones. Además, la inmunotinción muestra claramente que hay una heterogeneidad considerable del tejido en estadios tumorales tardíos que se reflejan en el amplio intervalo de valores de rigidez.

Ejemplo 7: El fenotipo celular blando e hipóxico conduce a metástasis pulmonar en el modelo de ratón

A continuación, se examinó la asociación entre los cero tipos de cáncer más blandos con la capacidad para producir metástasis en sitios distantes, en particular en los pulmones. Los pulmones de murino sano contienen cantidades elevadas de colágeno IV y laminina y por lo tanto presentan un fenotipo más rígido en comparación con glándulas mamarias. La MFA revelaba que el valor de rigidez media es de $11,01 \pm 5,19$ kPa para tejido de pulmón sano (Fig. 26a, parte izquierda, mapa representativo de rigidez de MFA en la parte media, Tabla 3) que consiste en estructuras alveolares y bronquiales así como vasos sanguíneos expandidos (Fig. 26a, parte derecha). En un estadio tardío de la progresión del tumor, los ratones MMTV-PyMT desarrollaron metástasis pulmonar. De forma coherente, las medidas de rigidez de los pulmones de ratones en estadio de cáncer tardío demuestran un pico extremadamente suave de $0,61 \pm 0,41$ kPa ($P < 0,0001$) (Fig. 26b, parte izquierda, barras de color gris, mapa de representativo de rigidez de MFA en la parte media, Tabla 3) que está ausente en los pulmones sanos. La tinción histológica después de MFA confirmaba la presencia de lesiones metastásicas múltiples. De forma interesante, en comparación con los pulmones sanos, el tejido pulmonar alrededor de las metástasis mostraba una distribución de rigidez más plana con rigidez media a $8,19 \pm 4,94$ kPa. La hipoxia extensa en estadios tumorales avanzados altera la reticulación del colágeno en pulmones. Posiblemente, algunos cambios en ECM de los pulmones metastásicos son responsables de variaciones locales de rigidez de tejido pulmonar adyacente a la metástasis.

La formación de metástasis de células cancerígenas demandan pulmones presenta un fenotipo blando similar al del tumor primario (Fig. 26a) como se muestra mediante el mapa representativo de rigidez MFA de pulmones sanos y el perfil de rigidez global (Fig. 26a, parte media). La tinción histológica posterior revela morfología del epitelio normal que consiste en estructuras alveolares y bronquios (Fig. 26a, parte derecha). El mapa representativo de rigidez de MFA de pulmones (Fig. 26b, parte izquierda) y el perfil de rigidez global (parte media) presentaban lesiones metastásica. El análisis histopatológico revela la ubicación del grupo metastásico y estructuras alveolares que parecen normales en el pulmón circundante (Fig. 26b, parte derecha).

Un mapa representativo de rigidez de MFA (24 x 24) de una región revela la heterogeneidad nanomecánica entre células cancerígenas (Fig. 23a). La distribución de rigidez a partir de una región celular de la biopsia de cáncer revela dos picos, el primero a $0,45 \pm 0,15$ kPa y el segundo a $1,26 \pm 0,43$ kPa representando dos subpoblaciones blandas distintas de células cancerígenas (Fig. 23b).

Una escasa diferenciación como se indica con la expresión de desmina y/o vimentina en células cancerígenas es otra evidencia de agresividad. En contraste con glándulas normales y premalignas, en las que la tinción de vimentina y desmina eran específicas del tejido (Fig. 25a and 25b), el estadio de cáncer temprano presenta áreas, en las que tanto vimentina como desmina se expresan en células de cáncer epitelial. (Fig. 25c). Por último, en un cáncer tardío, se observó una expresión y distribución distintas de vimentina y desmina para células de cáncer blanco rodeando e intravasando los vasos sanguíneos (Fig. 25d), que se correlaciona bien con la formación de grupos blandos de células metastásicas en pulmones (Fig. 26b, parte izquierda).

Ejemplo 8

La Fig. 27 muestra una realización de la invención, en la que el elemento piezoeléctrico 1 se acopla directamente a la estructura en voladizo 2. En caso de que el elemento 1 se extienda de forma máxima a lo largo de la primera dirección R y el contacto entre la punta de la estructura en voladizo 21 y la superficie 4 de la muestra esté relajará, el controlador 31 activa los motores externos 3 (actuador) para bajar la punta de la estructura en voladizo 21 a lo largo de la primera dirección R en la superficie hasta que se alcance de la extensión deseada del elemento piezoeléctrico 1. En caso de que el rendimiento piezoeléctrico 1 se retraiga de forma máxima y la punta de la estructura en voladizo 21 a hendidura en la superficie de la muestra 4 con una fuerza no deseada con el controlador 31 activa los motores externos 3 para elevar la estructura en voladizo 2 a lo largo de la primera dirección R para restaurar una extensión

deseada del elemento piezoeléctrico 1.

Ejemplo 9

5 La Fig. 28 muestra otra realización de la invención, en la que el elemento piezoeléctrico se acopla directamente al soporte de muestras 41 y la estructura en voladizo 2 se une a un soporte de muestras 25.

Ejemplo 10

10 La Fig. 29 muestra el esquema del movimiento piezoeléctrico vertical a lo largo de la primera dirección R. El elemento piezoeléctrico se caracteriza por una extensión máxima 12 y una retracción máxima 11. Entre estos dos estados se encuentra el intervalo de trabajo del elemento piezoeléctrico que se puede dividir en el intervalo de trabajo óptimo 13 y el intervalo de trabajo no óptimo. Un primer umbral se sitúa en el límite entre el intervalo de trabajo óptimo 13 y el intervalo de trabajo no último 14 en el lado de la retracción máxima 11. Un segundo umbral 15 se sitúa en el límite entre el intervalo de trabajo óptimo 13 y el intervalo de trabajo no óptimo 14 en el lado de la extensión máxima 12.

20 Cuando la muestra ésta alcanzan una posición demasiado elevada y el elemento piezoeléctrico 1 se retrae hacia el umbral 15, por ejemplo menos de un 20 % o 2 µm de su intervalo de extensión total, el controlador activará los motores. Los motores se moverán hacia arriba y restablecerán la distancia de trabajo óptima 13 del elemento piezoeléctrico (por ejemplo, entre un 20 % y un 80 % de la extensión máxima o entre los 2 µm iniciales y los últimos 2 µm de la extensión máxima) (Fig. 3). Si el elemento piezoeléctrico se extiende más de un 80 % o los últimos 2 µm del intervalo de extensión total en el umbral 16, el controlador activará de nuevo los motores, pero en esta ocasión se moverán hacia abajo para restablecer la distancia de trabajo óptima del elemento piezoeléctrico 13 (Fig. 3). Por lo
25 general, la estructura en voladizo se baja o se eleva por ejemplo en 3 µm si una está trabajando con un elemento piezoeléctrico de 15 µm de intervalo de extensión total. Este valor no puede acusar al usuario con la combinación dada de MFA y motores.

Concepto y evidencia

30 La complejidad del cáncer exige mejores biomarcadores para la detección y análisis de la enfermedad. La presente invención tiene implicaciones importantes para el uso de propiedades nanomecánicas como un nuevo biomarcador para detectar y evaluar cambios en tejidos tumorales nativos que se pueden trasladar a entornos clínicos.

35 El método de la invención distingue claramente entre tejido normal, lesiones benignas tales como fibroadenomas tejido cancerígeno. Aunque ambos tipos de tejido por lo general presentan una rigidez uniforme que es coherente con el respectivo aspecto morfológico homogéneo, la rigidez de las lesiones benignas es significativamente más elevada que la del tejido de glándulas mamarias normales. Esta rigidez evidente se debe más probablemente a la hiperplasia fibroquística que da como resultado un contenido elevado de tejido fibrótico que se extiende y altera el mioepitelio ductal. Por el contrario, el ensayo de MFA nanomecánico de muestras de tejido de glándula mamaria
40 obtenidas a partir de ratones MMTV-PyMT y biopsias en seres humanos demuestra que las lesiones malignas no se caracterizan por una rigidez específica, sino más bien por un gradiente de rigidez radial que se relaciona con el fenotipo maligno agresivo.

45 Los informes sobre evaluación de la rigidez tumoral en la bibliografía son discrepantes. Algunas medidas realizadas en biopsias de tejido con radiología clásica condujeron a la noción ampliamente aceptada de que el tejido cancerígeno por lo general es más rígido en sus alrededores. De forma análoga, algunos ensayos de compresión sin limitar han descrito que los tumores son más rígidos que los tejidos normales. Además, un estudio reciente mostró que la fibrosis tisular inducida por reticulación de colágeno, actividad de integrina modulada y aumento de
50 adhesiones focales estimula la rigidez del estroma tumoral. Por el contrario, un número de estudios que usan diferentes ensayos biomecánicos *in vitro* de una sola célula informan de una disminución de la rigidez en células cancerígenas aisladas con aumento de la eficacia metastásica. Por ejemplo, recientemente se mostró que las células metastásicas aisladas de pacientes con cáncer presentan una rigidez inferior a un 70 % que las células normales en la misma muestra. Sin embargo, las células aisladas y/o cultivadas carecen de interacciones complejas
55 de célula-célula y célula-matriz que se producen en tejidos.

60 Con el ensayo de muestras de tejido recién preparadas se mantuvieron tanto la arquitectura tisular como la estructura de la ECM. Además, las medidas realizadas representan una toma de muestras de toda la sección transversal del tumor y por lo tanto representa la heterogeneidad que es habitual para tumores. Por lo tanto, algunos datos de rigidez de MFA reconcilian parcialmente estas discrepancias porque no representan una sola rigidez a
65 single sino más bien una firma nanomecánica distinta. Por ejemplo, al igual que el aumento de rigidez medida con compresión sin limitar, el ensayo de MFA también revelaba que el tejido tumoral del estroma en la periferia era relativamente rígido; sin embargo, el tumor subyacente es considerablemente más blando. Dado que el cáncer es extremadamente diverso con respecto a morfología y bioquímica celular, apenas se puede esperar un módulo de rigidez común para todas las regiones tumorales. Los datos presentados aquí ofrecen un nuevo paradigma para la comprensión de cómo la rigidez del cáncer y el fenotipo agresivo se ven influidos por la heterogeneidad de las

células tumorales.

La hipoxia es una de las condiciones microambientales que influyen en la progresión del tumor mediante la alteración de la expresión de numerosos productos genéticos que conducen a la supervivencia y expansión de células cancerígenas en un entorno con déficit de oxígeno. Estos procesos incluyen angiogénesis, apoptosis, glucólisis, control del ciclo celular y de forma más interesante, migración. Algunas medidas de MFA de tejido de mama de MMTV-PyMT proporcionan evidencias de que la hipoxia también modula las propiedades nanomecánicas del tejido cancerígeno. En particular, el reblandecimiento relacionado con hipoxia parece que estimula un fenotipo metastásico, agresivo. Los hallazgos realizados apoyan el concepto emergente de que el microentorno tumoral regula algunas propiedades biofísicas a nivel celular y/o insular. En el caso de células neoplásicas epiteliales de mama, la respuesta celular resultante corriente abajo da como resultado reblandecimiento celular coherente con un aumento del potencial metastásico. De forma coherente, algunas células con fenotipo hipóxico que se propagaron desde el núcleo a la periferia en tejidos de cáncer invasivo dieron como resultado un desplazamiento correspondiente de la distribución de rigidez. Aunque la hipoxia no se midió directamente en muestras humanas, el reblandecimiento del núcleo sugiere que estas áreas también hipóxicas.

Recientemente, se ha sugerido que la modificación del microentorno tumoral a través de la rigidez de la ECM inducida por la reticulación de colágeno mediada por lisil oxidasa (LOX) estimula la capacidad de invasión y la metástasis tumorales. La hipoxia regula de forma positiva la expresión de LOX y, sobre todo, su actividad catalítica, que da como resultado una degradación del colágeno y dirige escasamente a las células de cáncer de mama y masivas hacia un fenotipo más agresivo. Anteriormente se ha informado que la hipoxia, a través de la remodelación de la ECM y el citoesqueleto, influye en la rigidez celular, y que estos cambios de rigidez estimulan la invasión y metástasis celular. Una degradación importante de colágeno y fibronectina en lugar de un aumento del colágeno fibrilar se observó en regiones con una abundancia elevada de células cancerígenas. De forma análoga, se ha informado que la degradación de la ECM dependiente de MMP acompaña a la progresión del cáncer. Algunos datos indican una fuerte correlación entre hipoxia, degradación del colágeno, y reblandecimiento del tejido en carcinomas invasivos, aunque se midió un aumento de la rigidez de ~15 veces en el estroma tumoral adyacente a células hipóxicas. Se puede concebir que el reblandecimiento del tejido relacionado con la hipoxia en lugar de la rigidez de la ECM estimule la progresión tumoral. La presencia de metástasis de pulmón en ratones MMTV-PyMT que han mantenido su fenotipo hipóxico proporciona un soporte adicional para esta idea.

Se sabe bien que la hipoxia induce la angiogénesis tumoral a través de señales químicas y posiblemente mecánicas. Al mismo tiempo, la hipoxia estimula la capacidad de invasión de células tumorales que implica que las células crucen la membrana basal endotelial durante la entrada y salida de los vasos sanguíneos. En la transición desde carcinoma *in situ* a invasivo, se observa degradación estructural de la membrana basal de forma microscópica, que coincide con la invasión de células tumorales. La rotura de la membrana basal como la "última línea de defensa" antes de que el tumor se extienda provoca de forma más probable un aumento adicional del reblandecimiento del tejido regional y contribuye a una heterogeneidad de la rigidez global. De forma coherente, las células hipóxicas se detectaron no solamente en el núcleo sino también cerca de los vasos sanguíneos en carcinomas invasivos, lo que se añade al patrón característico de rigidez heterogénea.

Al hacer que las células epiteliales originalmente en capas se comporten como fibroblastos con motilidad, los marcadores de transición epitelial-mesenquimal (EMT) y sobreexpresión de mesenquimal son elementos fundamentales en la progresión del tumor. La expresión de vimentina y desmina aumentaron radicalmente con la progresión del tumor en biopsias tanto de ratones MMTV-PyMT como humanas, contribuyendo de este modo al fenotipo de rigidez heterogénea. La coexpresión de vimentina y desmina indica desdiferenciación celular que podría conducir a adaptación a hipoxia. Por otro lado, la expresión y el comportamiento de estos marcadores durante EMT se ven afectados por la hipoxia. Esto podría explicar cómo se mantiene el fenotipo hipóxico agresivo incluso en entornos bien oxigenados tal como vasos sanguíneos y pulmones.

Conclusión

Los datos de la presente invención proporciona la evidencia de que el fenotipo blando desempeña un papel fundamental en la progresión del cáncer. La comparación de la firma nanomecánica de muestras de tejido humano con el correspondiente diagnóstico histopatológico demuestra que una proporción elevada de regiones blandas con respecto a rígidas es una indicación de un fenotipo más agresivo.

Algunos datos inmunohistoquímicos adicionales (no se muestran) indican que la degradación y la reorganización espacial de componentes de la ECM se asocian con la progresión tumoral. Al mismo tiempo, los cambios estructurales de SM-actina, vimentina y desmina dentro del tumor primario localizado indican cambios significativos en la citoarquitectura. A medida que el tumor progresa la heterogeneidad estructural aumenta adicionalmente, es evidente que algunos cambios en la organización de la ECM y en la citoarquitectura influyen en la respuesta nanomecánica de las células y por lo tanto la progresión del tumor se caracteriza por un aumento de la heterogeneidad de la rigidez.

Esto está muy de acuerdo con la distribución de rigidez bimodal medida en carcinomas con MFA. Además, la

laminina está muy desorganizada y revela que la pérdida de polaridad epitelial es coherente con malignidad y capacidad de invasión.

Tabla 1

Caso nº.	Edad / sexo	Valores de rigidez de MFA ± DT [kPa]			Diagnóstico histopatológico correspondiente	Grado (g)
		Pico 1	Pico 2	Pico 3 otro		
1	20 / hembra	1,19 ± 0,82	-	-	Sano	-
2	31 / hembra	1,13 ± 0,78	-	-	Sano	-
3	34 / hembra	1,17 ± 0,67	-	-	Sano	-
4	50 / hembra	1,23 ± 0,24	-	-	Sano	-
5	53 / hembra	1,31 ± 0,76	-	-	Sano	-
6	55 / hembra	1,83 ± 1,13	-	-	Sano	-
7	61 / hembra	1,33 ± 0,32	2,63 ± 2,06	-	Fibroadenoma con hiperplasia ductal	-
8	47 / hembra	-	1,91 ± 0,99	-	Fibroadenoma	-
9	48 / hembra	-	3,94 ± 1,49	-	Fibroadenoma	-
10	49 / hembra	-	3,41 ± 1,97	-	Fibroadenoma	-
11	56 / hembra	-	3,68 ± 1,92	-	Fibroadenoma	-
12	63 / hembra	0,56 ± 0,24	1,82 ± 0,96	7,71 ± 4,55	Carcinoma ductal invasivo	3
13	44 / hembra	0,61 ± 0,21	1,54 ± 0,30	-	Carcinoma invasivo oncocítico	2
14	45 / hembra	0,46 ± 0,21	1,19 ± 0,84	-	Carcinoma ductal-lobular invasivo	2
15	61 / hembra	0,75 ± 0,22	1,64 ± 0,78	declive exponencial definido por la enfermedad	Carcinoma ductal invasivo	2
16	73 / hembra	0,73 ± 0,34	1,47 ± 1,67	-	Carcinoma ductal invasivo con patrón de crecimiento lobular	2
17	83 / hembra	0,63 ± 0,50	-	declive exponencial definido por la enfermedad	Carcinoma apocrino	2

ES 2 562 008 T3

18	61 / hembra	0,57 ± 0,16	1,99 ± 0,73	5,75 ± 1,62	Carcinoma ductal invasivo	1
19	69 / hembra	0,66 ± 0,31	1,71 ± 1,41	-	Carcinoma ductal invasivo	1
20	79 / hembra	0,53 ± 0,23	1,81 ± 0,42	7,41 ± 2,49	Carcinoma lobular invasivo	1
21	95 / hembra	0,31 ± 0,12	-	8,45 ± 1,77	Carcinoma ductal invasivo	1

Tabla 2

Ratón (muestra nº.)	Valores de rigidez de MFA [kPa] ± DT		Diagnóstico histopatológico correspondiente
	Pico 1	Pico 2	
1	1,148 ± 0,482	-	Normal
2	1,075 ± 0,622	-	Normal
3	1,021 ± 0,524	-	Normal
4	0,983 ± 0,860	-	Normal
5	1,149 ± 1,275	-	Normal
6	0,959 ± 0,931	-	Normal
7	0,956 ± 0,260	-	Normal
8	1,124 ± 0,503	-	Normal
1	1,023 ± 0,054	1,449 ± 0,693	Premaligno
2	-	2,437 ± 0,844	Premaligno
3	1,012 ± 0,434	2,046 ± 0,679	Premaligno
4	1,265 ± 0,549	1,963 ± 1,382	Premaligno
5	1,612 ± 0,244	2,166 ± 1,042	Premaligno
6	1,579 ± 0,973	-	Premaligno
7	1,568 ± 0,648	-	Premaligno
1	0,591 ± 0,178	1,404 ± 0,556	Cáncer inicial
2	0,467 ± 0,158	1,496 ± 0,748	Cáncer inicial
3	0,721 ± 0,068	4,195 ± 2,837	Cáncer inicial
4	0,443 ± 0,112	1,069 ± 0,512	Cáncer inicial
5	0,771 ± 0,152	1,446 ± 0,879	Cáncer inicial
6	0,498 ± 0,192	1,554 ± 0,895	Cáncer inicial
7	0,521 ± 0,180	1,414 ± 0,812	Cáncer inicial
1	0,626 ± 0,197	3,171 ± 2,312	Cáncer tardío
2	0,723 ± 0,277	2,422 ± 0,701	Cáncer tardío
3	0,503 ± 0,032	5,081 ± 2,746	Cáncer tardío
4	0,650 ± 0,131	5,279 ± 3,122	Cáncer tardío
5	0,767 ± 0,041	4,493 ± 3,060	Cáncer tardío
6	0,567 ± 0,223	2,636 ± 1,449	Cáncer tardío
7	0,744 ± 0,301	3,451 ± 1,701	Cáncer tardío
8	0,699 ± 0,155	4,404 ± 1,001	Cáncer tardío

Tabla 3

Ratón (pulmón n°.)	Valores de rigidez de MFA [kPa] ± DT		
	Normal	Metástasis	Alrededores
1	9,917 ± 4,753		
2	11,302 ± 5,246		
3	11,334 ± 5,808		
4		0,776 ± 0,689	9,723 ± 5,215
5		0,588 ± 0,377	10,685 ± 6,763
6		0,777 ± 0,880	8,354 ± 4,548
Listado de elementos de referencia			
100	Microscopio de fuerza atómica de la invención		
1	Elemento piezoeléctrico		
11	Retracción máxima		
12	Extensión de forma máxima		
13	Intervalo de trabajo óptimo		
14	Intervalo de trabajo no óptimo		
15	Umbral para elevar la estructura en voladizo		
16	Umbral para bajar la estructura en voladizo		
2	Estructura en voladizo		
21	Punta de la estructura en voladizo		
22	Láser		
23	Espejo		
24	Fotodiodo		
25	Soporte de la estructura en voladizo		
3	Motor		
31	Controlador		
4	Muestra		
41	Soporte de la muestra		
R	Primera dirección		

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar una muestra de biopsia de tejido obtenida a partir de un tumor, que comprende
 - 5 - determinar los valores de rigidez para una pluralidad de puntos en dicha muestra con una resolución espacial de al menos 100 μm , dando como resultado una distribución de rigidez,
 - asignar a dicha muestra una probabilidad de malignidad, en el que
 - 10 - a una muestra que presenta una distribución de rigidez al menos bimodal se le asigna una probabilidad elevada de que sea maligna, en donde dicha distribución de rigidez al menos bimodal se **caracteriza por** un primer pico que presenta un valor de rigidez al menos dos veces más elevado que el de un segundo pico.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha pluralidad de puntos se coloca en forma de una rejilla de n_1 por n_2 puntos, definiendo dicha rejilla un área.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, mediante el que se determinan dichos valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de dicha misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de dichas áreas es un múltiplo de dicha resolución espacial de al menos 10.
4. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que a una muestra que presenta una distribución de rigidez unimodal se le asigna una probabilidad elevada de que no sea maligna.
5. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** que dicha muestra de biopsia de tejido es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 7 μm .
6. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tumor es un carcinoma de mama humana o una metástasis de ganglio linfático, pulmón, hueso, hígado o cerebro.
7. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** que dichos valores de rigidez se determinan en condiciones fisiológicas.
8. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina la rigidez de una muestra de biopsia de tejido de mama y en el que
 - 35 - a una muestra que presenta una distribución de rigidez **caracterizada por** un pico entre 1,1 kPa y 1,5 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea tejido de mama normal,
 - a una muestra que presenta una distribución de rigidez **caracterizada por** un pico entre 1,9 kPa y 3,7 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea una lesión benigna,
 - 40 - a una muestra que presenta una distribución de rigidez **caracterizada por** picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y a un valor superior a 1,2 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea un tumor maligno.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que a una muestra que presenta una distribución de rigidez **caracterizada por** picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y entre 1,2 kPa y 2,0 kPa se le asigna una probabilidad elevada de que sea un tumor maligno.
10. Un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos valores de rigidez se determinan con un microscopio con sonda de barrido que tiene
 - 50 - una sonda (2) con una punta (21) para interactuar con dicha muestra (4), y
 - un nanoescáner (1) para retener dicha muestra (4) o dicha sonda (2), en donde
 - la extensión de dicho nanoescáner (1) a lo largo de una primera dirección (R), a lo largo de la que se mueve dicha punta (21) hacia dicha muestra (4), se controla, y
 - 55 - un nivel de dicha sonda (2) a lo largo de dicha primera dirección (R) se ajusta por medio de un actuador adicional (3) cuando dicho nanoescáner (1) presenta una extensión por debajo o por encima de un valor umbral.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho ajuste se realiza mediante bajada o elevación de dicha sonda (2) o mediante bajada o elevación de dicha muestra (4).
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho nivel se ajusta cuando dicho nanoescáner (1) presenta una extensión inferior a un 20 % o superior a un 80 % de su extensión máxima.
13. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho nivel se ajusta mediante bajada o elevación de dicha sonda (2) o de dicha muestra (4) de un 10 a un 30 % de la extensión máxima de dicho nanoescáner (1).

14. Un sistema para clasificar una muestra de biopsia de tejido tumoral, que comprende

- un dispositivo (100), en particular un microscopio de fuerza atómica, para determinar valores de rigidez con un poder de resolución de al menos 1 μm ,
- un microprocesador programado,

5 en el que dicho microprocesador programado está equipado y diseñado para realizar un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dichos dispositivo (100) o microscopio de fuerza atómica comprenden:

- una sonda (2) que tiene una punta (21) para interactuar con una muestra (4), en donde dicha sonda (2) está configurada para mover dicha punta (21) hacia dicha muestra (4) a lo largo de una primera dirección (R),
- un nanoescáner (1) para retener dicha muestra (4) o dicha sonda (2),

15 **caracterizado por que**

dicho dispositivo (100) comprende un medio para controlar la extensión de dicho elemento piezoeléctrico a lo largo de dicha primera dirección (R), un actuador (3) para ajustar un nivel de dicha sonda (2) a lo largo de dicha primera dirección (R) y un controlador (31) para controlar dicho actuador (3), en donde dicho controlador (31) está configurado para controlar dicho actuador (3) con el fin de ajustar dicho nivel de dicha sonda (2), cuando dicho nanoescáner (1) presenta una extensión inferior o superior a un valor umbral.

20

Fig. 1

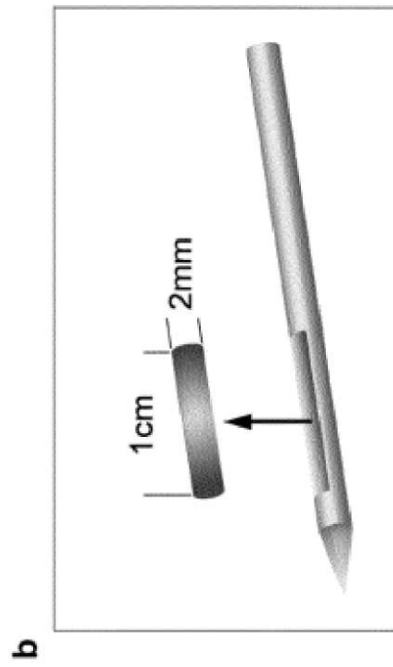
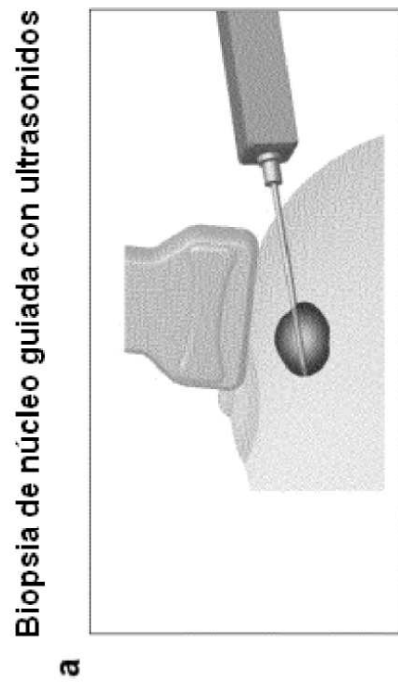
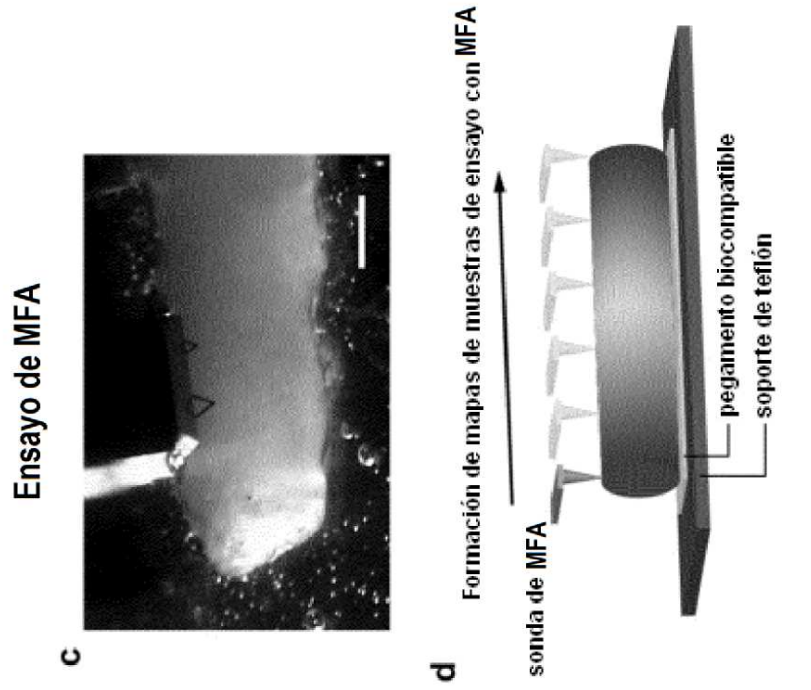
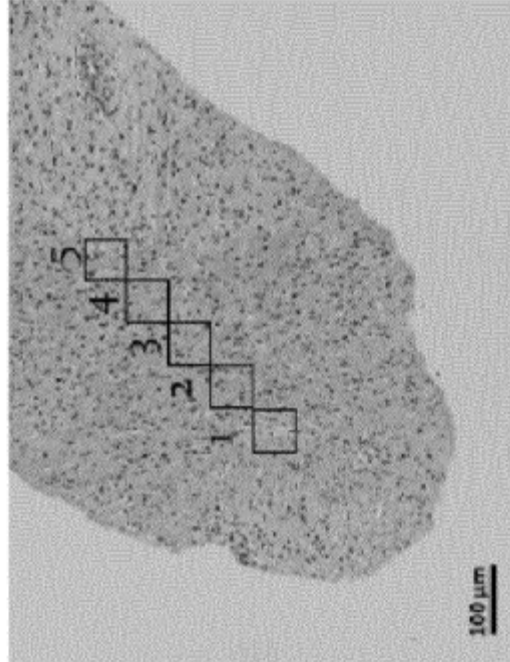
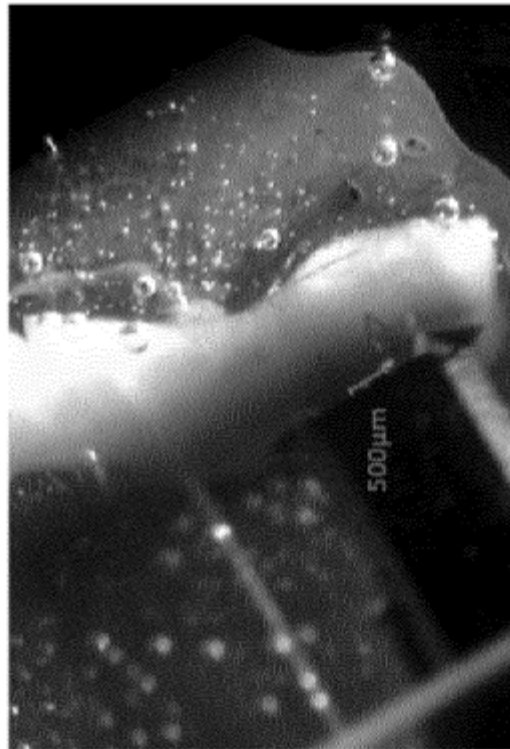


Fig. 2



b



a

Fig. 3

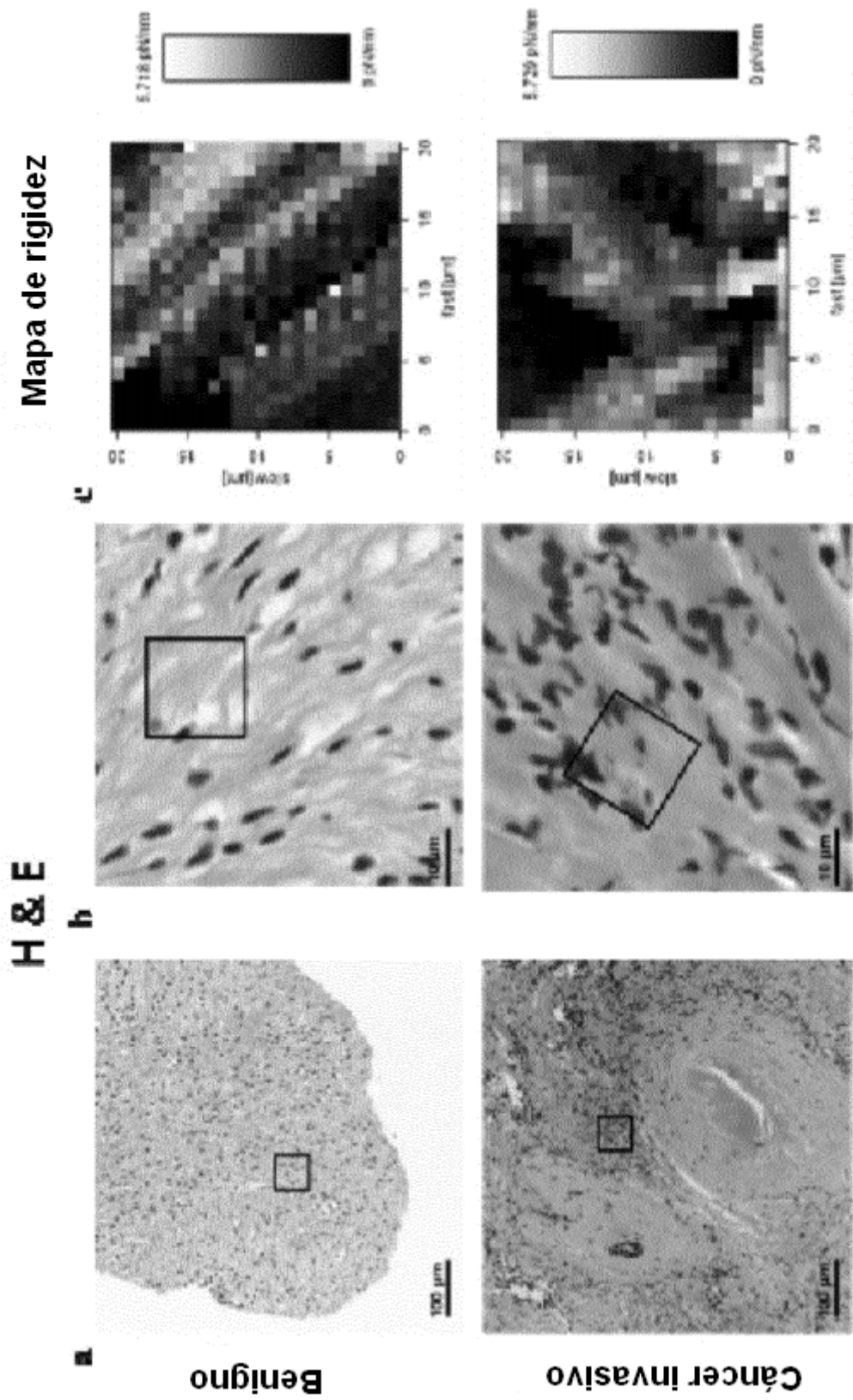


Fig. 4

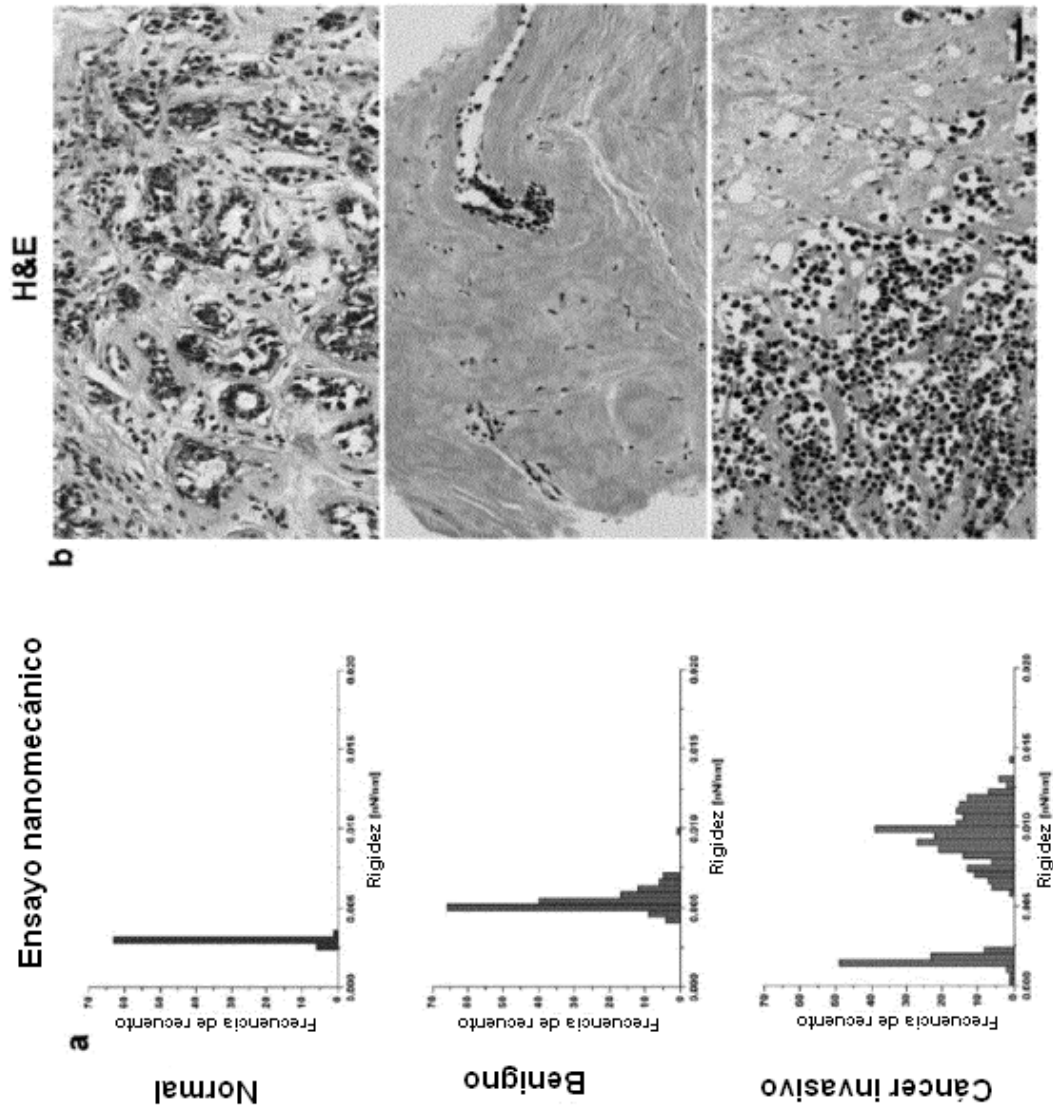


Fig. 5

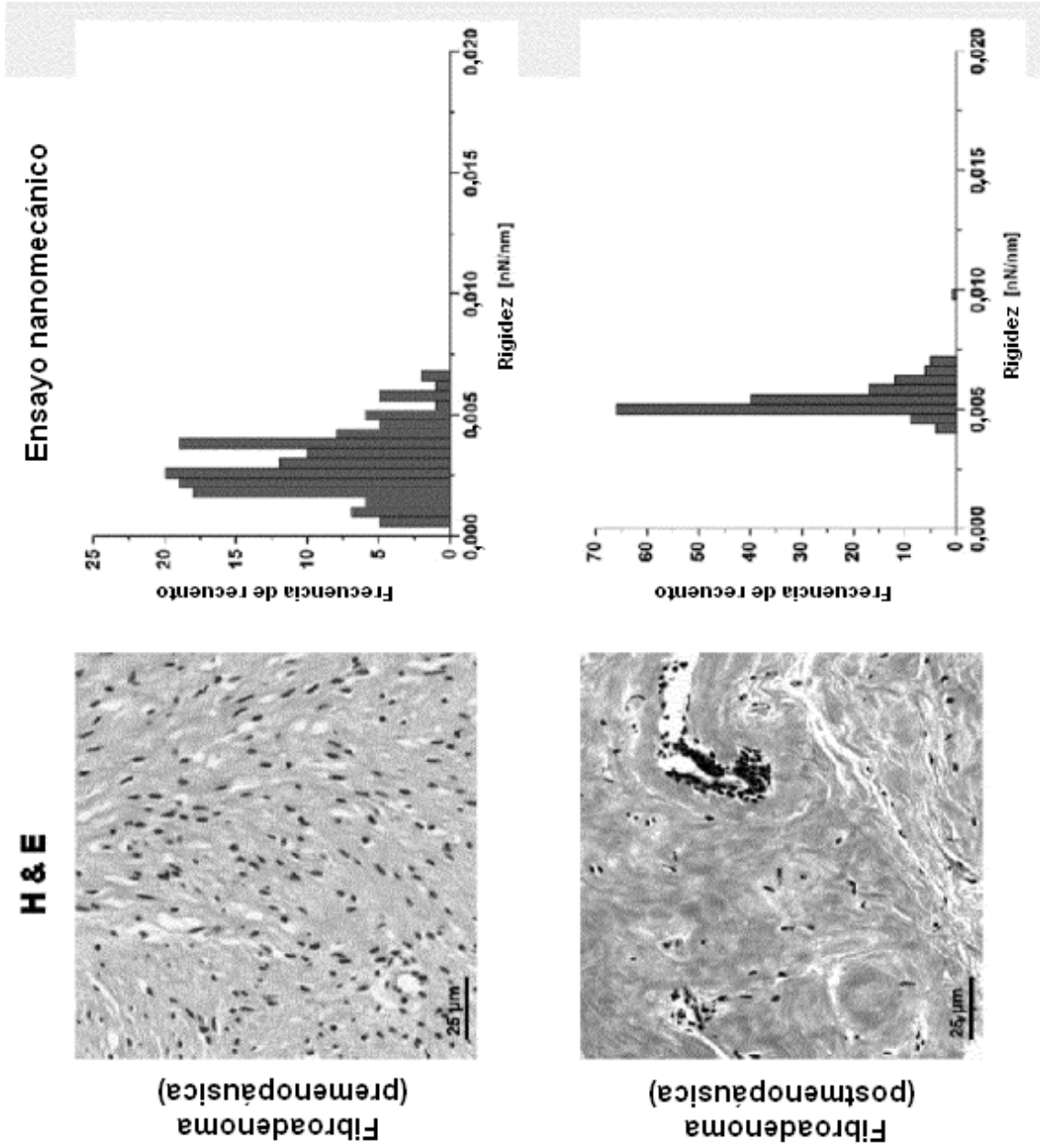


Fig. 6

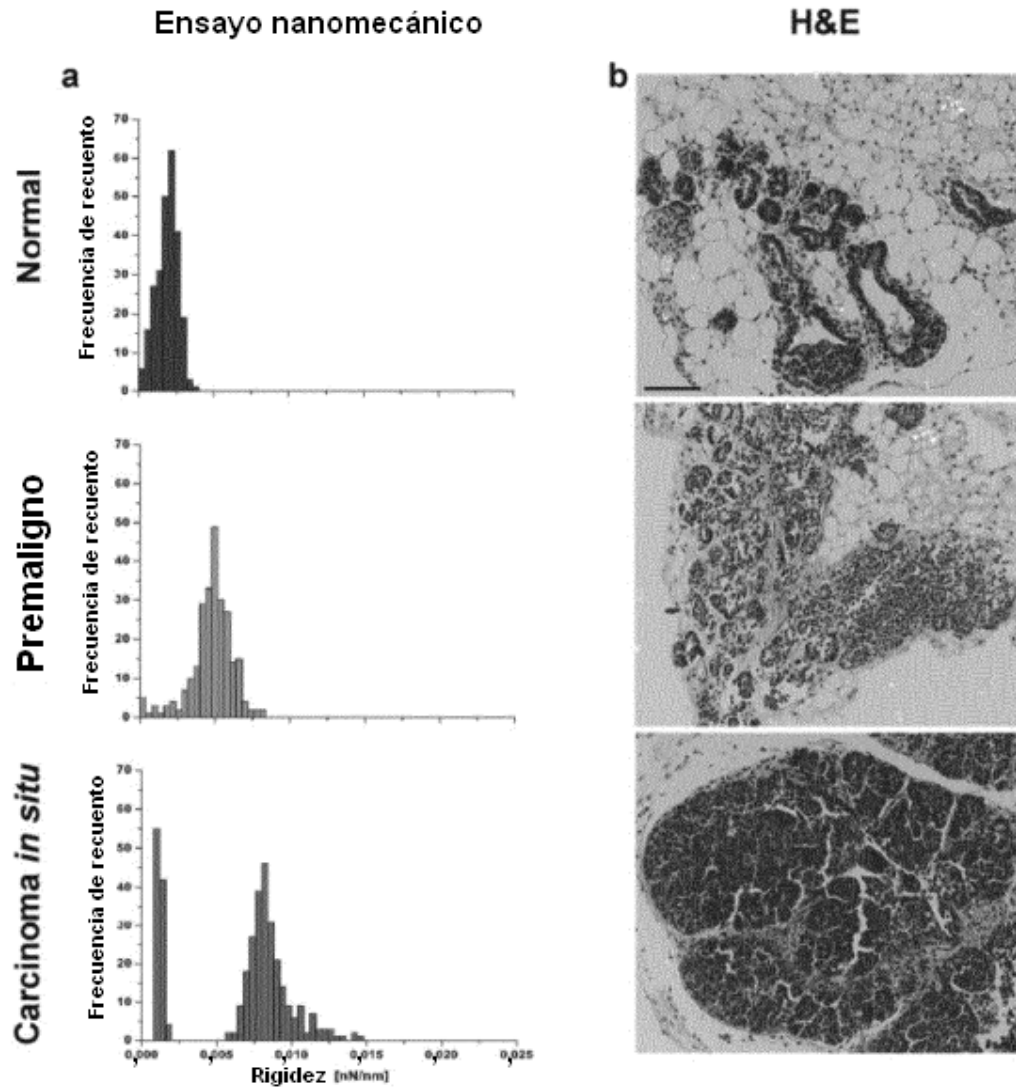


Fig. 8

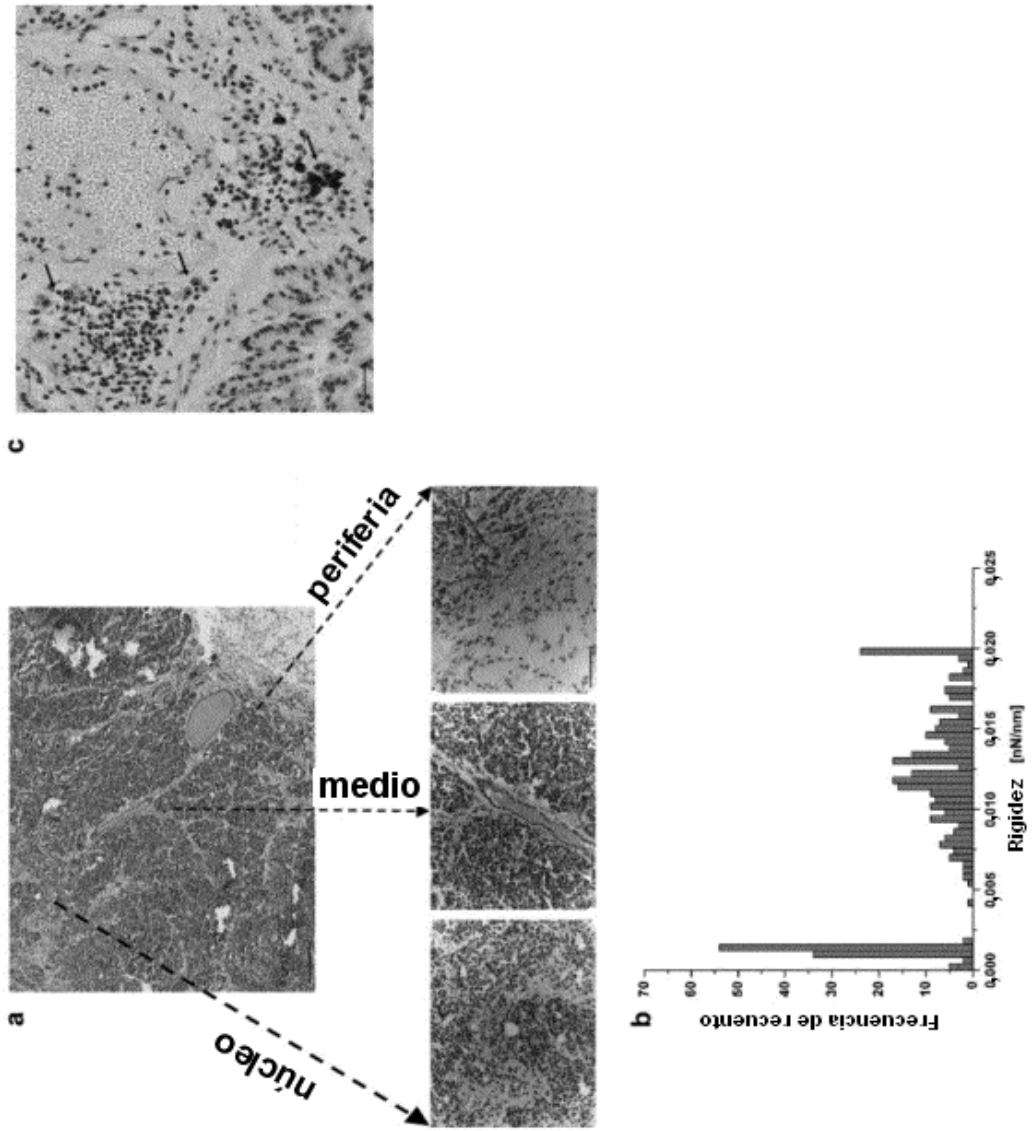


Fig. 14

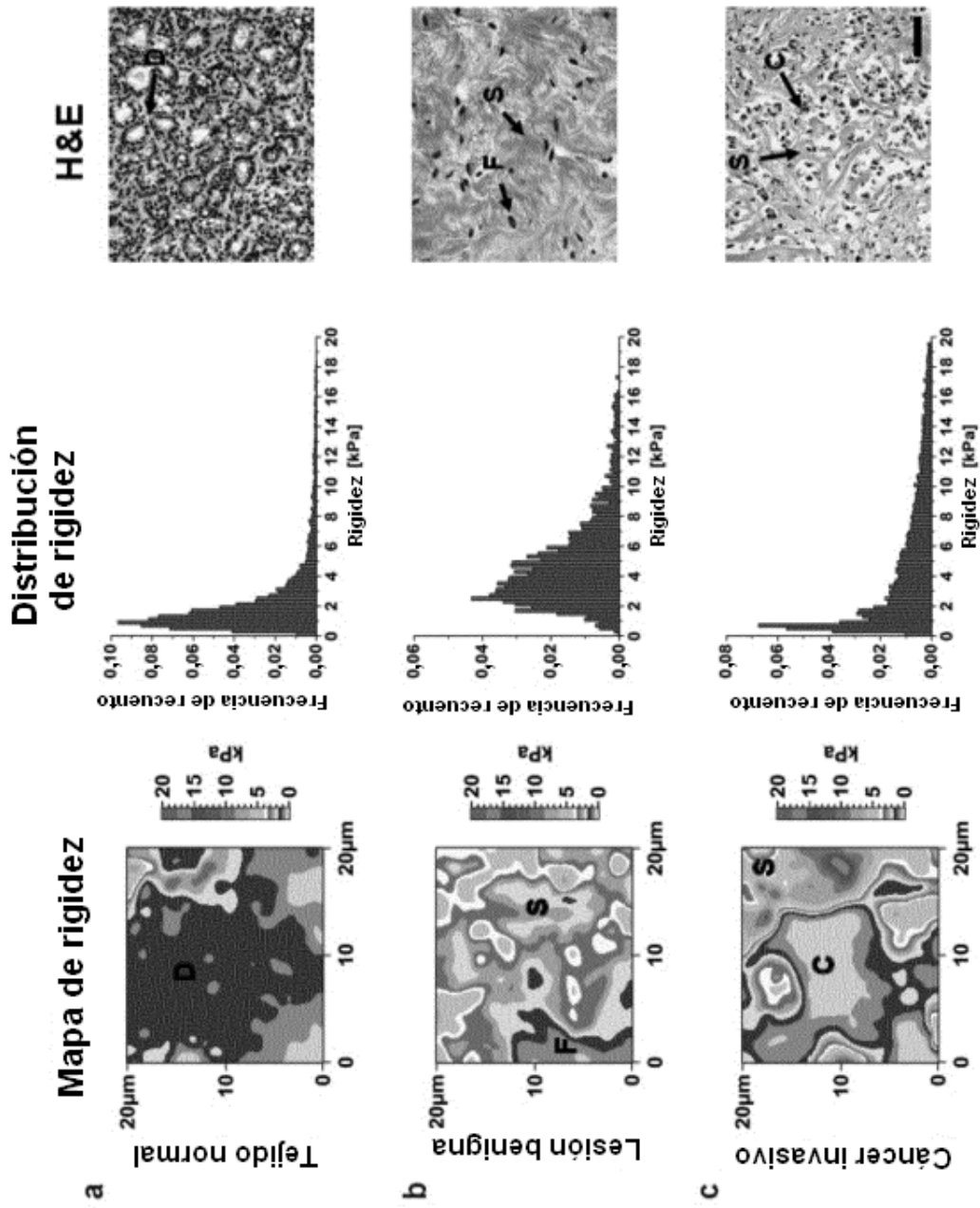


Fig. 15

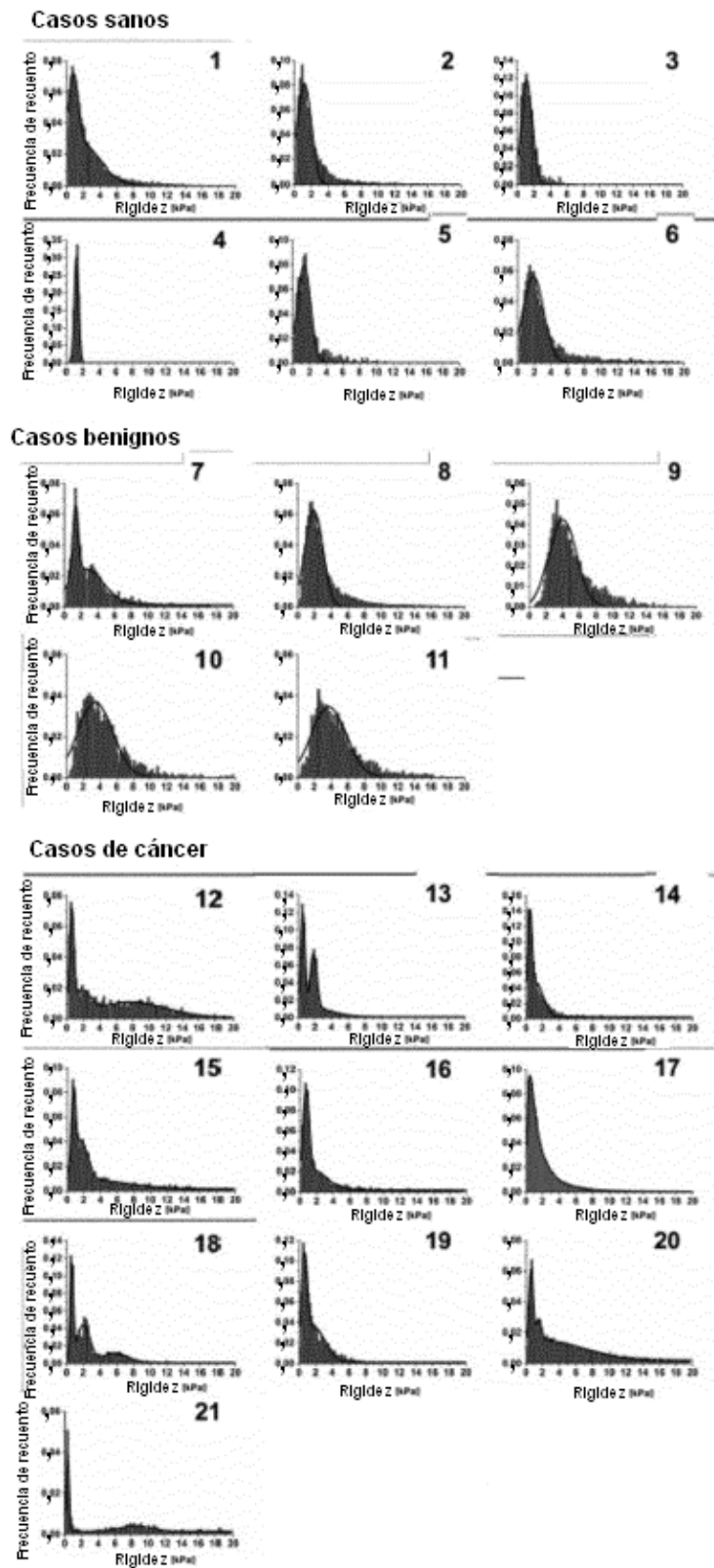


Fig. 16

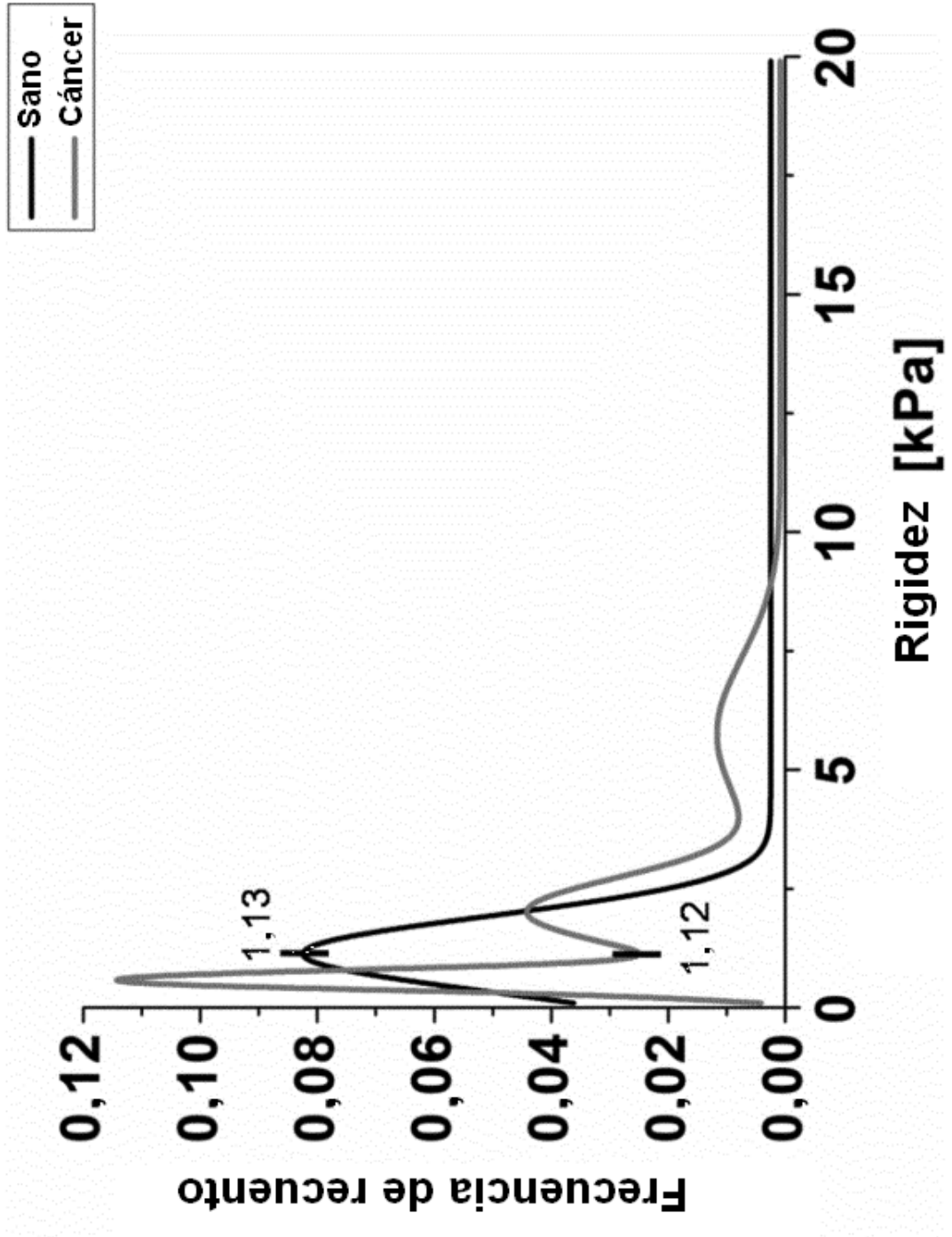


Fig. 18

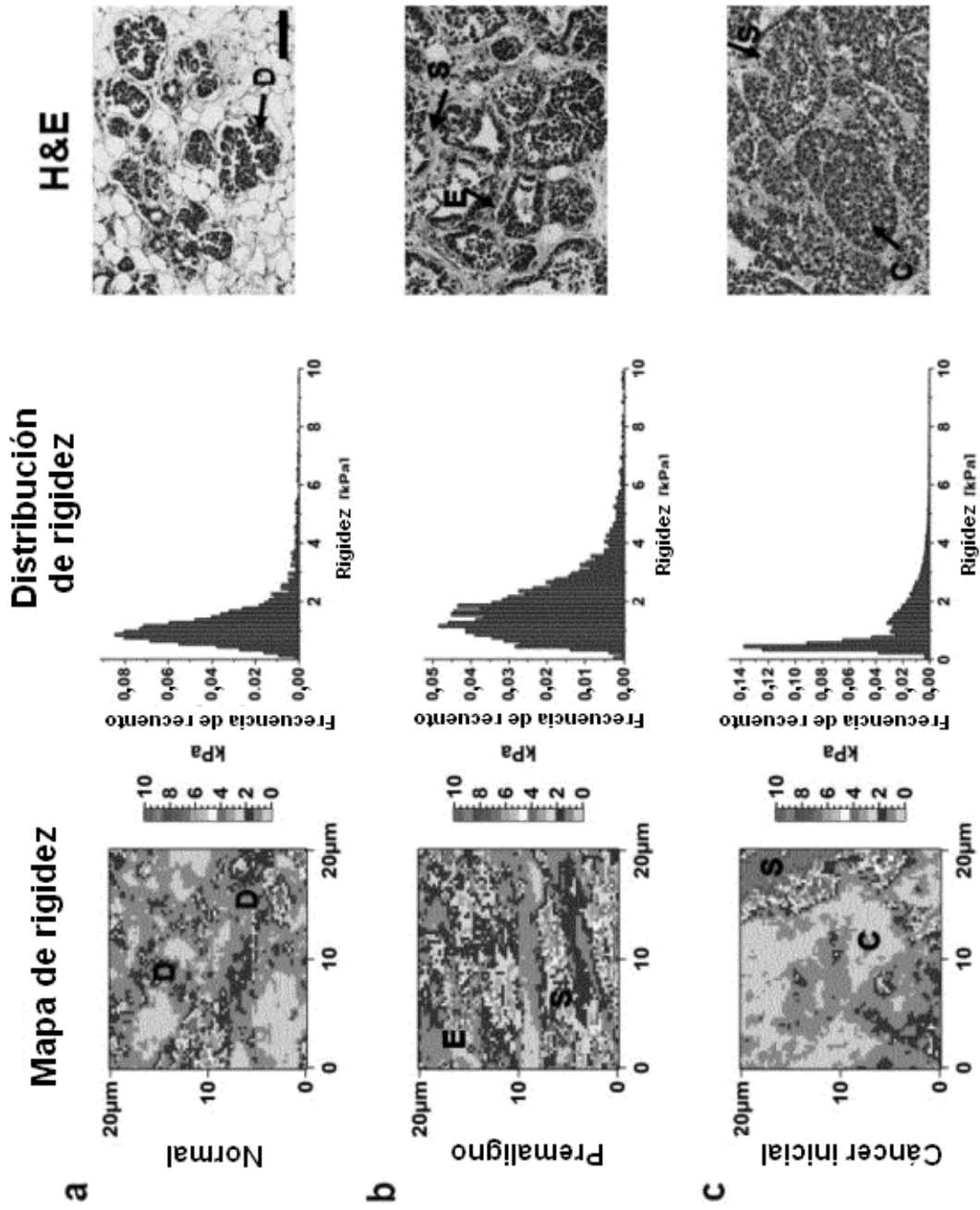


Fig. 20

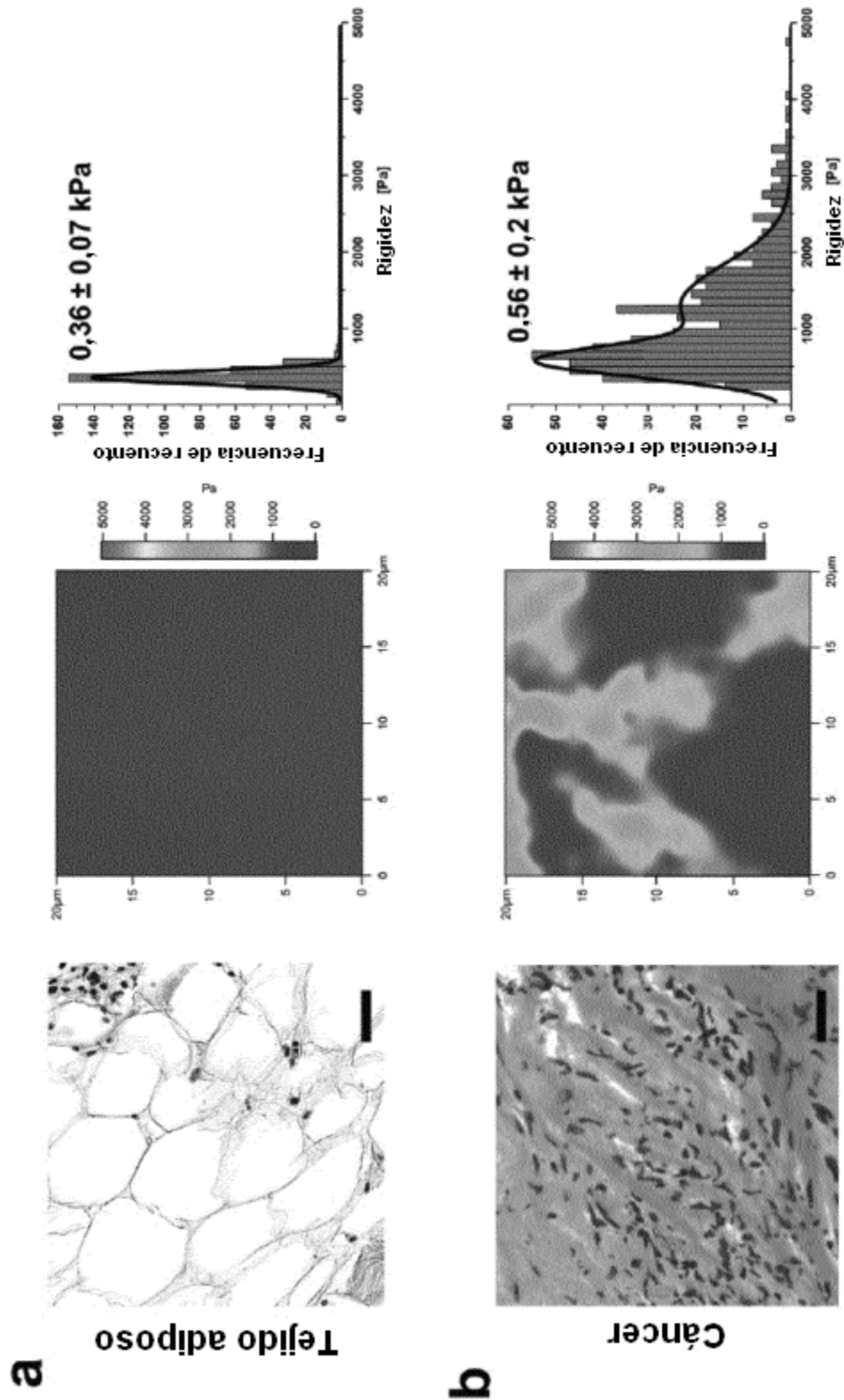


Fig. 21

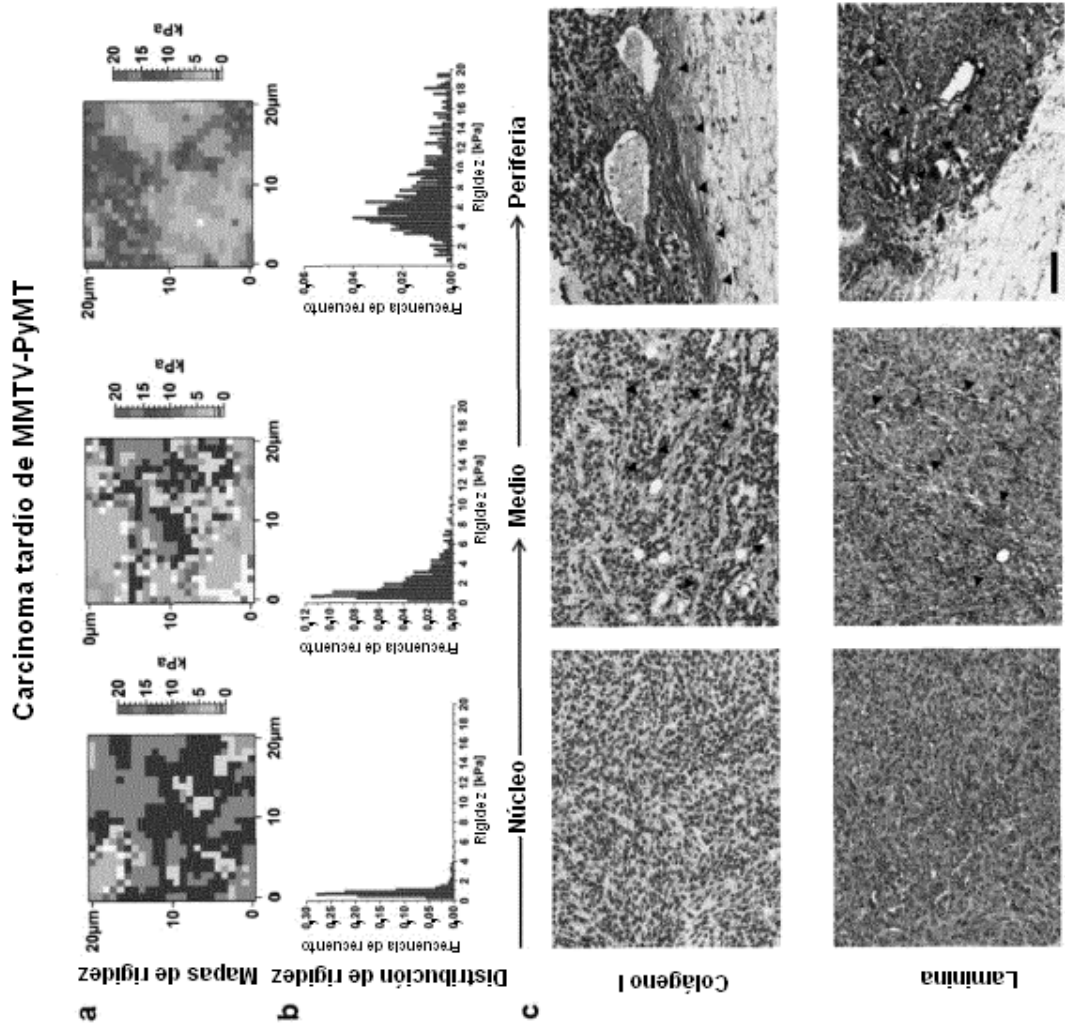


Fig. 23

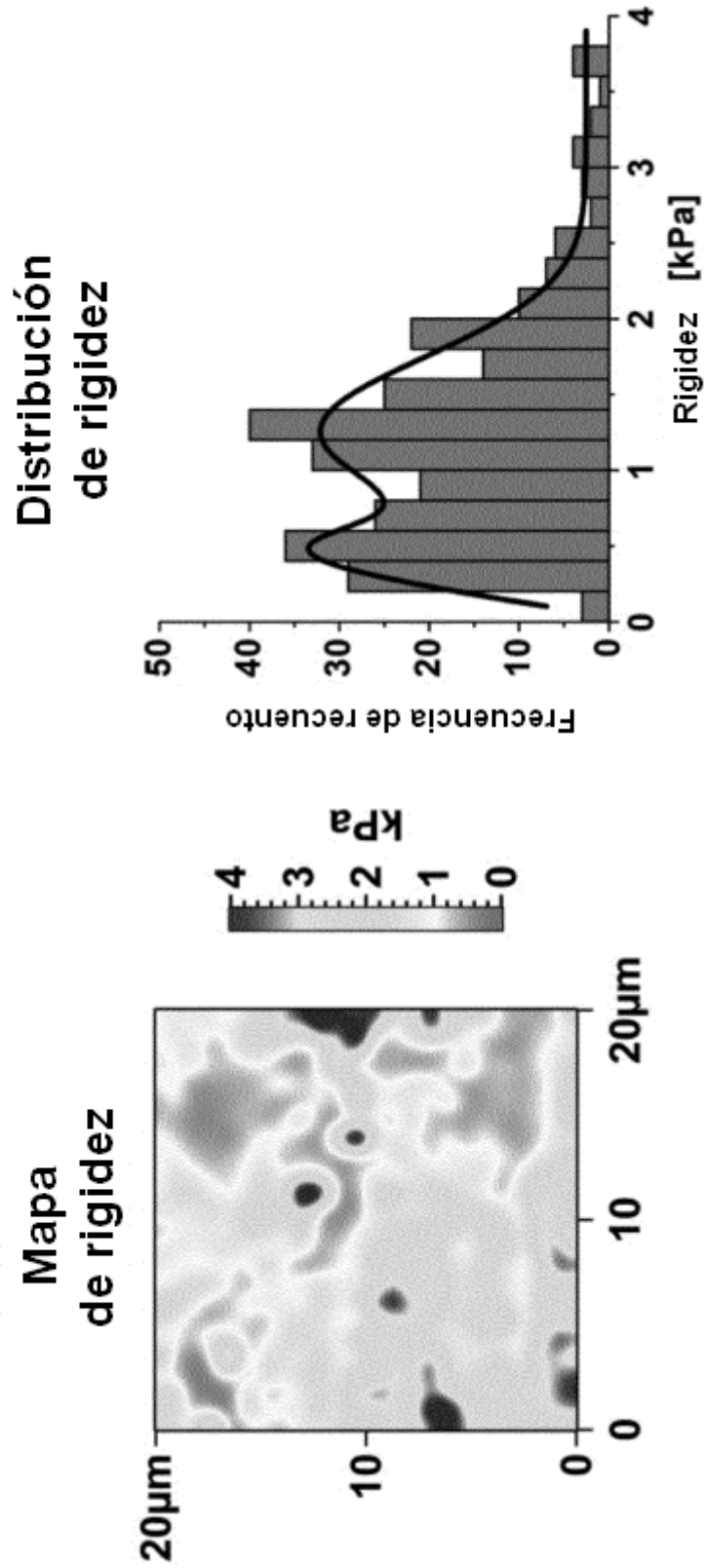


Fig. 26

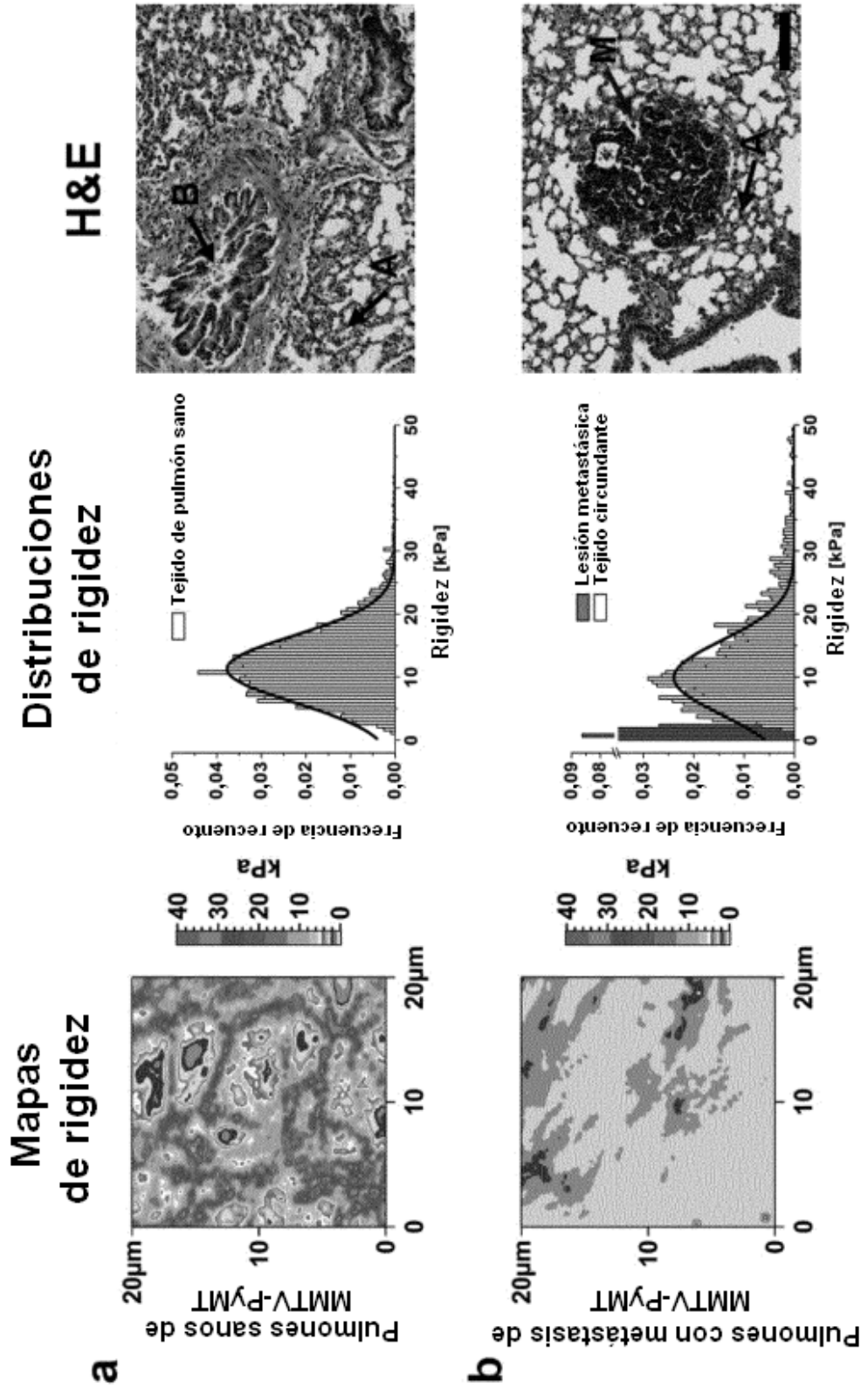


Fig. 27

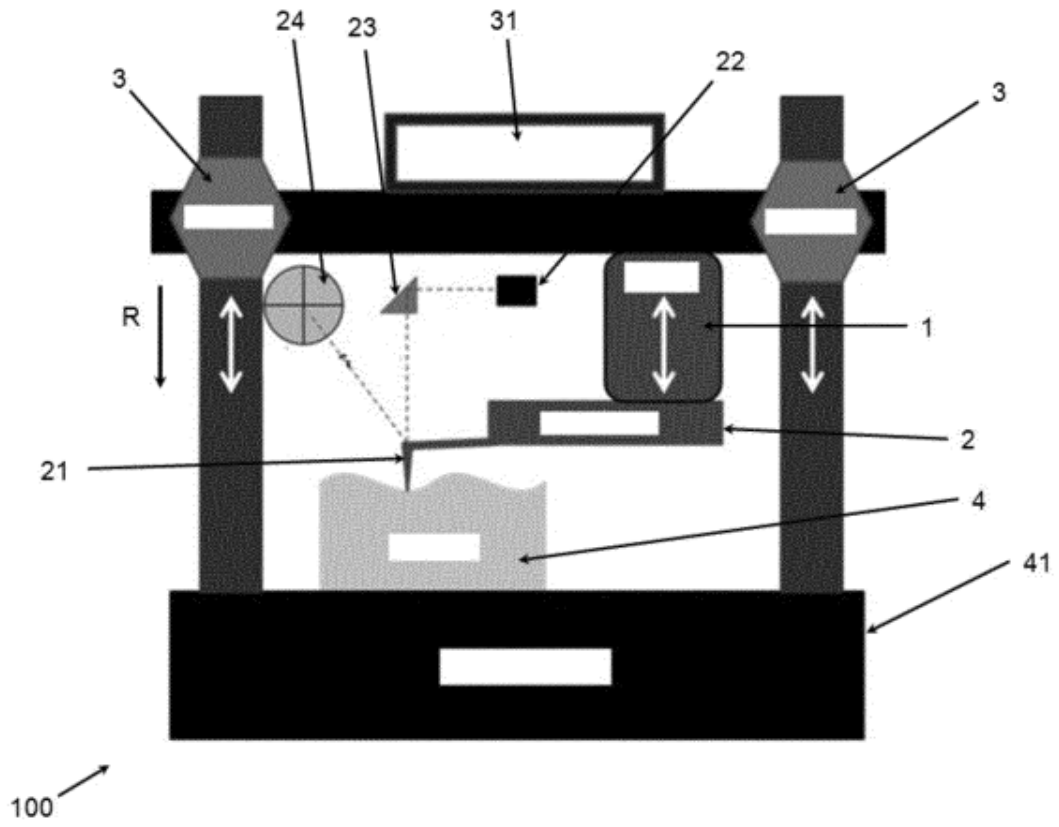


Fig. 28

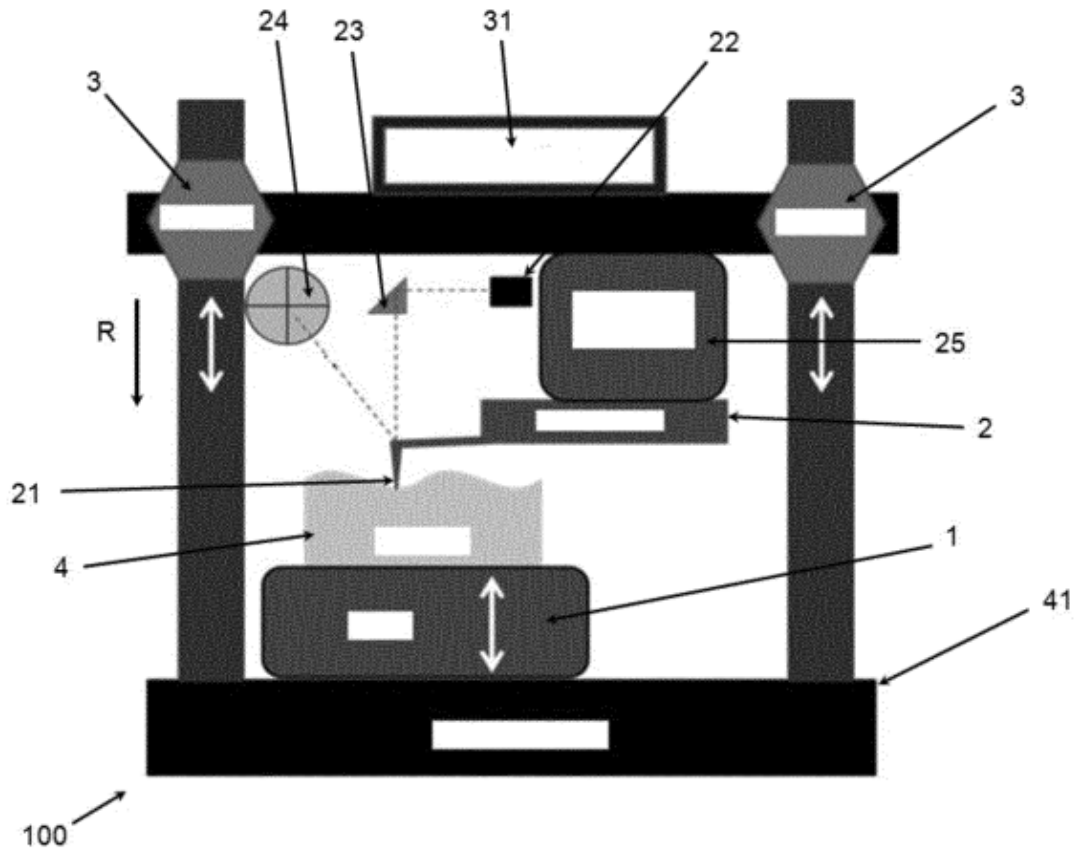


Fig. 29

