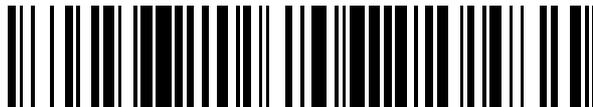


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 855**

51 Int. Cl.:

G06K 9/00 (2006.01)
G06T 7/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
G01N 15/06 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11791124 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2638507**

54 Título: **Método y sistema óptico de alto rendimiento para determinar el efecto de una sustancia de ensayo sobre las células vivas**

30 Prioridad:

12.11.2010 US 413201 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**TRUMBULL, JONATHAN D.;
GINTANT, GARY A.;
KANTOR, STANISLAW;
PAN, JEFFREY YEN;
DIAZ, GILBERT J.;
GREEN, JONATHON;
SU, ZHI y
OLSON, JEFFREY A.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 564 855 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 y sistema óptico de alto rendimiento para determinar el efecto de una sustancia de ensayo sobre las células vivas

5

Campo de la invención

La invención se refiere en general a un aparato para detectar y medir rápidamente efectos electrofisiológicos, proarrítmicos, inotrópicos y otros de sustancias *in vitro* sobre células vivas, basados en protocolos de detección tales como respuestas contráctiles, esquemas de detección óptica y estimulación eléctrica programada adaptada.

10

Antecedentes de la invención

Los métodos actuales para evaluar los diversos efectos de fármacos sobre tejidos cardíacos u otros biológicos *in vivo* usan de forma rutinaria técnicas de registro intracelular que requieren tiempo y que son técnicamente complejas. Adicionalmente, en la mayoría de los casos, estas evaluaciones generalmente se aplican a preparaciones sincitiales o a células aisladas de una en una.

15

Normalmente, los registros intercelulares obtenidos en ausencia y/o presencia de diversas sustancias se comparan para las pruebas de los efectos de dichas diversas sustancias sobre el potencial de acción cardíaco de la fibra muscular. Entre otros aspectos, una sustancia puede afectar al potencial de acción cardíaco de la fibra muscular retrasando la repolarización cardíaca (manifestada como la prolongación de la duración del potencial de acción o DPA) o acelerando la repolarización (manifestado como el acortamiento de la DPA).

20

Por desgracia, existen varias deficiencias: Los métodos actuales para obtener estos registros intracelulares son difíciles de mantener; los experimentos usados para obtener los registros intracelulares son lentos, principalmente como resultado de largos tiempos de equilibrado de fármacos, especialmente para músculos cardíacos; y los registros intracelulares requieren recolección de tejidos de múltiples muestras para garantizar tamaños adecuados de las muestras. Además, este enfoque no se evalúa sobre el efecto potencial de una sustancia para afectar a la contractilidad (una propiedad inherente de muchos tejidos excitables) o cambios en la excitabilidad (otra propiedad inherente de muchos tejidos excitables).

25

30

El retraso en la repolarización cardíaca se considera un marcador sustituto de la proarritmia cardíaca (y, en particular, *Torsades de Pointes*). Se ha demostrado repetidamente que los efectos de las sustancias que retrasan la repolarización cardíaca son exagerados durante la estimulación más lenta, un efecto denominado "dependencia de uso inverso". Desafortunadamente, normalmente no se consideran los efectos de las sustancias durante la electroestimulación acelerada (o irregular). Esto puede ser crucial en la evaluación del riesgo de proarritmia asociado con la rara taquicardia ventricular polimórfica inducida por fármacos conocida como *Torsades de Pointes*, dado que el ritmo de inicio normalmente implica un patrón de estimulación irregular o latidos prematuros.

35

40

Se prefieren respuestas celulares integradas, tales como las proporcionadas a partir de miocitos aislados, para evaluar los efectos electrofisiológicos de las sustancias sobre un cuerpo, ya que esencialmente se desconoce qué canales iónicos cardíacos o proteínas contráctiles pueden verse afectados por los productos químicos y/o compuestos en fase de evaluación de la seguridad o la eficacia.

45

La capacidad de una célula viva para responder mecánicamente (es decir, para expandirse o contraerse) a un estímulo, particularmente estimulación eléctrica, depende, entre otras cosas, de la recuperación de la célula de la estimulación eléctrica anterior. En otras palabras, la expansión o contracción de una célula debido a la estimulación eléctrica depende parcialmente de la rapidez de "retorno a la normalidad" de una célula, o la repolarización, a partir de una estimulación eléctrica anterior. En el caso de las células cardíacas, esta capacidad de respuesta se denomina refractariedad, que está estrechamente relacionada con el "potencial de acción cardíaco".

50

El potencial de acción cardíaco de una célula puede verse afectado por muchos factores. Por ejemplo, se ha demostrado que la introducción/exposición de las sustancias a una célula tiene un efecto sobre el potencial de acción cardíaco. Se dice que algunas sustancias, como los fármacos y/o otros productos químicos, que retrasan la repolarización y prolongan la duración del potencial de acción cardíaco, prolongan la refractariedad. Como ejemplo, las sustancias para potenciar la corriente de entrada de iones (por ejemplo, sodio o calcio) pueden provocar aumentos en el potencial de acción cardíaco. Al hacerlo, estas sustancias limitan la capacidad de una célula para responder a una estimulación muy rápida o prematura. Mediante el uso de dichas sustancias se puede prolongar la refractariedad debido a (1) la reducción de las corrientes repolarizantes de salida o (2) la reducción transitoria y/o el retraso de la recuperación de canales que conducen corrientes de entrada excitatorias.

55

60

De un modo similar, se dice que las sustancias que aceleran la repolarización y acortan la duración del potencial de acción cardíaco acortan la refractariedad. Los cambios en la refractariedad se han relacionado con proarritmia. Por ejemplo, la repolarización retrasada se ha relacionado con proarritmia ventricular (incluyendo *Torsades de Pointes*), mientras que la repolarización auricular acortada (y refractariedad) se ha relacionado con proarritmia auricular (tal

65

como aleteo auricular y fibrilación) y fibrilación ventricular.

Aunque los cambios en la refractariedad pueden ser el resultado de los efectos sobre las corrientes iónicas, conocer los efectos de una sustancia sobre cualquier corriente iónica individual no predice adecuadamente los efectos sobre la refractariedad, ya que múltiples corrientes iónicas pueden actuar de un modo integrado para definir la refractariedad, y las sustancias pueden afectar a múltiples corrientes iónicas de un modo indeterminado a concentraciones diferentes. Por tanto, los cambios en la refractariedad normalmente se evalúan en un sistema celular integrado intacto (por ejemplo, una fibra muscular). Sin embargo, las medidas electrofisiológicas directas de los cambios (utilizando microelectrodos o técnicas de registro basadas en electrodos en parches) y la medición de los cambios en la refractariedad de los sistemas celulares integrados son tediosas, técnicamente complejas, y no se prestan a un mayor rendimiento.

Por lo tanto, es deseable proporcionar un aparato adecuado para llevar a cabo un método mejorado para detectar el efecto de una sustancia sobre un cuerpo, que supere las desventajas de las metodologías utilizadas actualmente.

El método que se puede llevar a cabo mediante el aparato de la invención proporciona la evaluación de los efectos, en particular los efectos electrofisiológicos, de los fármacos sobre las células, en particular de los miocitos cardiacos, sin utilizar las técnicas de registro intracelular técnicamente exigentes de los métodos conocidos, al tiempo que se requiere menos uso de muestras de una manera más sencilla y que se requiere una experiencia técnica mínima. El método mencionado anteriormente también proporciona la evaluación simultánea de cambios en los efectos mecánicos (en particular, la contractilidad cardiaca) de sustancias de ensayo sobre las células mientras se estudian los parámetros electrofisiológicos (cambios en la repolarización y la excitabilidad).

Además, el método que se puede llevar a cabo mediante el aparato de la invención utiliza métodos ópticos no invasivos para determinar las respuestas y las células se evalúan en condiciones fisiológicas. Los esquemas de detección del método mencionado anteriormente son menos exigentes técnicamente. Además, los esquemas de detección de la presente invención son más rápidos y más eficientes que los abordajes conocidos. Los métodos de detección de bordes existentes no pueden escalarse fácilmente para soportar muchas mediciones de varias celdas en paralelo. La detección de bordes también es un problema cuando los bordes no están bien definidos debido al bajo contraste de la imagen, los residuos o cuando una cámara de celda de flujo experimental contiene células muy empaquetadas que pueden solaparse parcialmente. Por último, este abordaje es aplicable a diversos tipos de células (por ejemplo, miocitos cardiacos auriculares y ventriculares) y se puede utilizar para células derivadas de cualquier tejido contráctil donde se desencadena una respuesta mecánica o dependiente de la recuperación de la excitabilidad eléctrica.

Sumario de la invención

La invención proporciona un aparato rápido, de alto rendimiento, no invasivo y eficiente para la medición de los efectos de sustancias tales como compuestos y fármacos sobre las células excitables. El aparato de la invención puede llevar a cabo un método para medir una respuesta de una pluralidad de células a una sustancia de ensayo mediante:

- (1) proporcionar una grabación de vídeo digital de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia ensayo y una grabación de vídeo digital de la pluralidad de las células después de la exposición a una sustancia de ensayo, comprendiendo cada una de las grabaciones de vídeo una pluralidad de fotogramas de vídeo, comprendiendo cada uno de los fotogramas de vídeo una pluralidad de píxeles,
- (2) seleccionar una o más regiones celulares de cada fotograma de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,
- (3) seleccionar un marco de referencia de entre los fotogramas de vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo y de entre los fotogramas de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a una sustancia de ensayo,
- (4) cuantificar los cambios de píxeles dentro de cada región celular en cada fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones celulares del fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones celulares del marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,
- (5) calcular una curva de tiempo - respuesta para cada región celular basada en el cambio de los píxeles cuantificado frente al tiempo,
- (6) definir una o más regiones de interés dentro de cada región celular,
- (7) aplicar las una o más regiones de interés a la grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo y al marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo,
- (8) cuantificar los cambios de píxeles dentro de cada región de interés en cada fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones de interés de los fotogramas del vídeo de la grabación de vídeo de una

pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones de interés del marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo, y

5 (9) calcular una curva de tiempo - respuesta para cada región de interés basada en el cambio de los píxeles cuantificado frente al tiempo.

El aparato de la invención también puede llevar a cabo un método para un protocolo experimental para la obtención de una grabación de vídeo de la pluralidad de las células antes de la exposición a la sustancia de ensayo y una grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a la sustancia de ensayo mediante

- 10 (1) exponer una pluralidad de células a un estímulo,
 (2) simultáneamente grabar en vídeo la pluralidad de células para obtener una grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,
 (3) exponer la pluralidad de células a una sustancia de ensayo,
 15 (4) exponer la pluralidad de células al estímulo, y
 (5) simultáneamente grabar en vídeo la pluralidad de células para obtener una grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo.

20 El método mencionado anteriormente incluye además un método para un protocolo experimental para la obtención de una grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a la sustancia de ensayo y una grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a la sustancia de ensayo mediante (1) grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo, (2) exposición de la pluralidad de células a una sustancia de ensayo, y (3) grabación de vídeo de las células después de la exposición a la sustancia de ensayo. En una realización preferida, esta metodología se aplica cuando las células son espontáneamente contráctiles.

30 En determinados ejemplos, el método proporciona (1) detectar, medir y/o verificar con rapidez y eficacia los efectos de los productos químicos, compuestos, y/o fármacos sobre la despolarización cardíaca, la contractilidad y la excitabilidad utilizando tanto técnicas basadas en óptica como protocolos de simulación adaptados y (2) cribar y seleccionar con rapidez y eficacia e compuestos para determinar los efectos electrofisiológicos y/o proarrítmicos (así como efectos sobre la contractilidad y la excitabilidad) en las células vivas, especialmente en los miocitos cardíacos. Las células pueden derivar de preparaciones cardíacas nativas, representando las preparaciones una respuesta farmacológica basada en células integrada.

35 De acuerdo con la invención, se proporciona un aparato para presentar las células vivas para la obtención de imágenes digitales durante la medición de la respuesta de las células a una sustancia de ensayo. Un aparato de acuerdo con la invención sirve para almacenar y alimentar las células vivas hasta el momento en que se realiza el ensayo, para el transporte de las células vivas de una sección del aparato a otra, y para presentar las células vivas al aparato de grabación digital al tiempo que se exponen las células a una sustancia de ensayo, por ejemplo un fármaco, y, opcionalmente a un protocolo de estimulación eléctrica. Un aparato de acuerdo con la invención incluye:

- 40 un canal de fluidos que tiene un Puerto de entrada para fluidos y una salida para fluidos en un extremo de salida; un dispositivo de bombeo de fluido conectado al puerto de entrada del canal de fluidos;
 45 una tira de película ópticamente transparente o semitransparente que corre a través del canal de fluido; la película capaz de adherirse a las células vivas;
 al menos una celda de flujo colocada sobre la película, comprendiendo la celda de flujo una cavidad que tiene una superficie superior ópticamente transparente y paredes laterales capaces de formar un sello con la película para formar un ambiente cerrado; y
 50 un accionador vertical conectado a la al menos una celda de flujo capaz de elevar la al menos una celda de flujo por encima de la película o descender la al menos una celda de flujo sobre la película.

Breve descripción de las figuras

55 Las figuras adjuntas, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y se incorporan y constituyen una parte de esta divulgación, ilustran realizaciones preferidas de la invención y, junto con la descripción detallada, sirven para explicar los principios de la invención. En las figuras:

60 La figura 1 ilustra un ejemplo de una curva de respuesta-tiempo calculada de acuerdo con un método que puede llevar a cabo el aparato de la presente invención y de acuerdo con un protocolo de pulsos preprogramados mostrado debajo de la curva de respuesta-tiempo, de acuerdo con la invención. El protocolo de pulsos preprogramados representado en la figura 1 exhibe estímulos separados regularmente interrumpidos de una forma regular con estímulos prematuros colocados progresivamente más cerca de los estímulos separados regularmente durante el curso del protocolo de pulsos.

65 La figura 2 ilustra el aparato de la presente invención.

La figura 3 ilustra los recuentos de píxeles de respuesta-tiempo superpuestos (normalizados con el promedio de la respuesta de estimulación eléctrica) para un protocolo de estimulación eléctrica con estímulos prematuros en

un grupo de miocitos.

La figura 4 ilustra el funcionamiento de la aplicación opcional de criterios de eliminación predeterminados a las curvas de respuesta-tiempo de las regiones celulares y la eliminación de esas regiones celulares correspondientes con las curvas de respuesta-tiempo que no cumplen los criterios de eliminación predeterminados. Se representa un fotograma de vídeo que se ha segmentado en regiones celulares (líneas discontinuas); las cajas sólidas indican las regiones celulares que cumplen los criterios de exclusión predeterminados para convertirse en regiones de interés.

La figura 5 es un diagrama esquemático que ilustra un aparato para una forma de realización preferida de la invención.

La figura 6 es una ilustración de una tira de película polimérica flexible ópticamente transparente o semitransparente que puede usarse para transportar las células vivas de una sección a otra dentro del aparato de la invención.

La figura 7 es una vista en planta de un conjunto de una o más celdas de flujo que se pueden usar para presentar las células vivas al dispositivo de grabación digital, al tiempo que se exponen las células vivas a una sustancia de ensayo y, opcionalmente, administrar un protocolo de estimulación eléctrica a las células vivas.

La figura 8 es una vista en sección frontal que representa el conjunto de una o más celdas de flujo, el mecanismo de sujeción, y un dispositivo de grabación digital.

Descripción detallada de las realizaciones

La presente invención proporciona un aparato rápido, no invasivo y eficiente para la determinación del efecto de una sustancia de ensayo (por ejemplo, compuestos o fármacos) sobre células vivas excitables. El aparato de la invención puede llevar a cabo un método para medir una respuesta de una pluralidad de células a una sustancia de ensayo mediante:

(1) proporcionar una grabación de vídeo digital de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo y una grabación de vídeo digital de la pluralidad de las células después de la exposición a una sustancia de ensayo, comprendiendo cada una de las grabaciones de vídeo una pluralidad de fotogramas de vídeo, comprendiendo cada uno de los fotogramas de vídeo una pluralidad de píxeles,

(2) seleccionar una o más regiones celulares de cada fotograma de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,

(3) seleccionar un marco de referencia de entre los fotogramas de vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo y de entre los fotogramas de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a una sustancia de ensayo,

(4) cuantificar los cambios de píxeles dentro de cada región celular en cada fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones celulares del fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones celulares del marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,

(5) calcular una curva de tiempo - respuesta para cada región celular basada en el cambio de los píxeles cuantificado frente al tiempo,

(6) definir una o más regiones de interés dentro de cada región celular,

(7) aplicar las una o más regiones de interés a la grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo y al marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo,

(8) cuantificar los cambios de píxeles dentro de cada región de interés en cada fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones de interés de los fotogramas del vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones de interés del marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo, y

(9) calcular una curva de tiempo - respuesta para cada región de interés basada en el cambio de los píxeles cuantificado frente al tiempo.

En realizaciones donde se aplica un estímulo a la pluralidad de células, el estímulo puede comprender un protocolo de estimulación eléctrica pre-programado. Por ejemplo, la pluralidad de células puede estimularse eléctricamente mediante un protocolo preprogramado de estimulación eléctrica de trenes de impulsos consecutivos de ritmo regular (cada uno separado por una pausa) donde cada tren aumenta o disminuye opcionalmente la frecuencia o la amplitud con respecto al tren de impulsos anterior. El protocolo de estimulación eléctrica preprogramada también puede incluir uno o más pulsos prematuros. Por ejemplo, un protocolo de pulsos preprogramados puede exhibir estímulos separados regularmente interrumpidos de una forma regular con estímulos prematuros colocados progresivamente más cerca de los estímulos separados regularmente durante el curso del protocolo de pulsos para definir refractariedad. El protocolo de estimulación eléctrica preprogramada también puede incluir aumentar o disminuir de forma incremental las amplitudes del pulso. Por ejemplo, un protocolo de pulsos de preprogramado puede presentar estímulos con una amplitud o intensidad que disminuyen progresivamente durante el curso del protocolo de pulsos

para definir la excitabilidad.

En otras realizaciones de la invención, la pluralidad de células es eléctricamente excitable y responde con un cambio en la forma, la morfología o la reorganización interna (incluyendo, pero sin limitaciones, la contracción). También se pueden usar células aisladas, grupos o islotes de células individuales o múltiples, láminas o capas de células, o tejidos. Como alternativa, también se puede usar una pluralidad de células que responden a estímulos químicos o mecánicos con un cambio en la forma, la morfología, o la reorganización interna. Como alternativa, la pluralidad de células puede ser espontáneamente activa (por ejemplo, algunos tipos de células madre) y puede no ser necesario ningún estímulo.

El método mencionado anteriormente incluye un análisis de las grabaciones de vídeo digital de una pluralidad de células tomadas al menos dos períodos de tiempo: una grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a la sustancia de ensayo y una grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición de la sustancia de ensayo. En ejemplos donde se aplica un estímulo a la pluralidad de células, las grabaciones de vídeo se obtienen mediante

- (1) exponer una pluralidad de células a un estímulo,
- (2) simultáneamente grabar en vídeo la pluralidad de células para obtener una grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo,
- (3) exponer la pluralidad de células a una sustancia de ensayo,
- (4) exponer la pluralidad de células al estímulo, y
- (5) simultáneamente grabar en vídeo la pluralidad de células para obtener una grabación de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo.

Las grabaciones de vídeo digitales de la pluralidad de células también pueden tomarse mientras la pluralidad de células se expone a diferentes concentraciones de una sustancia de ensayo.

El método mencionado anteriormente incluye además un método para un protocolo experimental para la obtención de una grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a la sustancia de ensayo y una grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a la sustancia de ensayo mediante (1) grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo, (2) exposición de la pluralidad de células a una sustancia de ensayo, y (3) grabación de vídeo de las células después de la exposición a la sustancia de ensayo. En una realización preferida, esta metodología se aplica cuando las células son espontáneamente contráctiles.

En determinados ejemplos de la invención, los cambios en la refractariedad de una célula (por ejemplo, un miocito) se determinan basándose en las respuestas contráctiles derivadas del estímulo o un calcio intracelular transitorio responsable de iniciar la contracción. En particular, los efectos del fármaco sobre la repolarización se pueden evaluar sobre la base de la capacidad de una pluralidad de células, en particular miocitos, para contraerse durante un protocolo de estimulación eléctrica programable donde la velocidad de estimulación aumenta progresivamente o la estimulación regular se interrumpió con un estímulo prematuro. En particular, los efectos del fármaco sobre la excitabilidad se pueden evaluar sobre la base de la capacidad de una pluralidad de células, en particular miocitos, para contraerse durante un protocolo de estimulación eléctrica programable donde la fuerza del estímulo se incrementa o disminuye de forma progresiva. Estos efectos contráctiles se caracterizan en base a la amplitud y el patrón de las respuestas, que incluye la velocidad de estimulación a la que las células no responden a un único estímulo, y después a varios estímulos. En otros ejemplos, se pueden usar colorantes sensibles al voltaje o sensibles a los iones (por ejemplo, calcio o sodio sensible) para medir directamente los efectos electrofisiológicos de una sustancia de ensayo en una célula. En tales ejemplos, la capacidad de las células para responder puede detectarse a partir de los cambios en, por ejemplo, tránsitos de calcio intracelulares como fluctuaciones en la intensidad de emisión de los colorantes fluorescentes dependientes de calcio intracelular, las fluctuaciones en la señal de los colorantes sensibles al voltaje, o variaciones en parámetros de la imagen microscópica tales como el enfoque o la dispersión de la luz.

De acuerdo con la invención, se seleccionan una o más regiones celulares de cada grabación de vídeo. Las una o más regiones celulares se seleccionan mediante la aplicación de criterios de selección de región celular predeterminados. Por ejemplo, cada región celular puede corresponder con cada célula reflejada en el fotograma del vídeo para excluir las partes de cada fotograma del vídeo que no han realizado una imagen de una célula. Alternativamente, cada fotograma de vídeo de la grabación de vídeo puede segmentarse independientemente de la presencia, presencia parcial, o ausencia de una célula en cada segmento para seleccionar las regiones celulares (por ejemplo, una red). Las regiones celulares se designan de una forma automática, donde las regiones celulares derivan de protocolos de segmentación preprogramados, que pueden designar regiones celulares de acuerdo con los criterios predeterminados diseñados para seleccionar las partes del fotograma del vídeo correspondientes con cada célula cuya imagen se ha obtenido o mediante selección de las regiones del fotograma del vídeo tal como se ilustran en la figura 4. De acuerdo con un ejemplo que no es parte de la invención reivindicada en el presente documento, las regiones celulares se pueden designar mediante inspección manual de la grabación del vídeo y segmentación o selección de las partes correspondientes con cada célula cuya imagen se ha obtenido en la

grabación del vídeo. Las partes localizadas fuera de las regiones celulares pueden excluirse opcionalmente de análisis posteriores. En un ejemplo de la invención, la región celular puede comprender la totalidad del fotograma del vídeo.

5 De acuerdo con un método que puede llevar a cabo el aparato de la presente invención, se selecciona un fotograma de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a la sustancia de ensayo se selecciona como marco de referencia. Preferentemente, el marco de referencia se selecciona para que coincida con un periodo de tiempo donde la pluralidad de celdas está en un estado de reposo. Cuando la pluralidad de células antes de la exposición a la sustancia de ensayo se ha sometido a un estímulo, se puede elegir un marco de referencia para que coincida con un punto de tiempo donde las células no responden a un estímulo de pulso. Por ejemplo, se puede elegir un marco referencia mediante la determinación de la ubicación temporal más probable del estado de reposo de la región celular, por ejemplo, mediante la selección del fotograma de vídeo que es similar al número más alto de fotogramas basados en sumar los cambios de recuento de píxeles para cada fotograma de vídeo o un subconjunto de fotogramas para todas las ubicaciones de referencia posibles o un subconjunto de ubicaciones de referencia. Como alternativa se puede elegir un marco de referencia mediante la determinación de la ubicación temporal más probable de estado de reposo de la región celular calculando una intensidad de píxel para cada fotograma de vídeo, y seleccionando como marco de referencia el fotograma de vídeo que tiene la intensidad de píxel más baja o más alta calculada en función de si el material celular es más oscuro o más claro que el espacio circundante; este procedimiento de selección del marco de referencia es particularmente preferible cuando la pluralidad de células es activa de forma espontánea. En otra alternativa, el marco de referencia se selecciona mediante el cálculo de una media recortada de todos los fotogramas de vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo para formar un marco promedio, que se selecciona como el marco de referencia de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo.

25 Los cambios en el píxel se pueden cuantificar dentro de cada región celular en cada fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de la pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones celulares del fotograma del vídeo de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones celulares del marco de referencia de la grabación de vídeo de una pluralidad de células antes de la exposición a una sustancia de ensayo. Por ejemplo, los cambios de píxeles se pueden cuantificar comparando cada píxel de las una o más regiones celulares con un correspondiente píxel del marco de referencia de la grabación de vídeo de la pluralidad de las células con un píxel correspondiente del marco de referencia de la grabación de vídeo de la pluralidad de células y contando los píxeles que cambian mediante un valor preseleccionado. Como alternativa, los cambios de píxeles se pueden cuantificar mediante el cálculo de una intensidad de píxel agregada de las una o más regiones celulares derivadas de la media, la mediana, la moda, la media recortada o una metodología similar del promediado de las intensidades de los píxeles y comparando la intensidad de píxel agregada de la una o más regiones celulares con la intensidad de píxel agregada de las una o más regiones celulares derivadas mediante la realización de la misma metodología de promediado en las una o más regiones celulares del marco de referencia.

40 Se calcula una curva de respuesta - tiempo que comprende uno o más picos para cada región celular basada en la cantidad de cambio del píxel en función del tiempo. En la figura 1 se muestra un ejemplo de una curva de respuesta - tiempo calculada de acuerdo con el método mencionado anteriormente. Los valores tales como la duración de la contracción (representada como, por ejemplo, el 10–90 % del TWITCH total); la contracción máxima (una medida del estado inotrópico); la velocidad máxima de acortamiento ($+dL/dT_{max}$), la velocidad máxima de relajación ($-dL/dT$), el tiempo desde el acortamiento inicial al máximo ($T_{máximo}$) y el tiempo desde el acortamiento máximo hasta la relajación ($T_{máximo-90}$, una medida del estado lusitrópico) se pueden calcular mediante el análisis de la curva respuesta - tiempo. Los valores agregados, tales como el periodo refractario, la pérdida de respuesta a la estimulación prematura, el ruido (por ejemplo, el ruido basal del pico a la altura), la altura máxima promedio y la anchura máxima promedio también se pueden calcular mediante el análisis de la curva de respuesta - tiempo.

55 Dentro de cada región celular se definen una o más regiones de interés. Cada región celular puede definirse simplemente como una región de interés, es decir las regiones celulares y las regiones de interés pueden coincidir unas con otras. Los criterios de exclusión predeterminados se pueden aplicar a la curva de respuesta - tiempo; las regiones celulares que no cumplen los criterios de exclusión predeterminados se eliminan del análisis posterior. Las categorías de criterios de exclusión predeterminados incluyen, por ejemplo, los valores calculados a partir de análisis de la curva de respuesta - tiempo. Por ejemplo, se puede excluir una región celular por tener una curva de respuesta - tiempo que presenta una duración de la contracción fuera de un intervalo predeterminado de valores. Como resultado de la aplicación de los criterios de exclusión predeterminados, por consiguiente se pueden excluir del análisis posterior las regiones celulares que contienen células no respondedoras y subrespondedoras y la una o más regiones de interés se definen como las regiones celulares que tienen curvas de respuesta - tiempo que cumplan los criterios de exclusión predeterminados. Se pueden definir ejemplos de regiones de interés que correspondan con las regiones celulares que tienen células que exhiben comportamiento contráctil deseable.

65 De acuerdo con el método mencionado anteriormente, las regiones de interés se someten a un análisis adicional aplicándose a la grabación de vídeo de la pluralidad de las células después de la exposición a una sustancia de

ensayo.

Un fotograma de video de la grabación de video de la pluralidad de células tras la exposición a la sustancia de ensayo se selecciona como marco de referencia. Preferentemente, el marco de referencia se selecciona para que coincida con un periodo de tiempo donde la pluralidad de celdas está en un estado de reposo. Cuando la pluralidad de células después de la exposición a la sustancia de ensayo se ha sometido a un estímulo, se puede elegir un marco de referencia para que coincida con un punto de tiempo donde las células no responden a un estímulo de pulso. Por ejemplo, se puede elegir un marco de referencia mediante la determinación de la ubicación temporal más probable del estado de reposo de la región de interés, por ejemplo, mediante la selección del fotograma de video que es similar al número más alto de fotogramas basados en sumar los cambios de recuento de píxeles para cada fotograma de video o un subconjunto de fotogramas para todas las ubicaciones de referencia posibles o un subconjunto de ubicaciones de referencia. Como alternativa se puede elegir un marco de referencia mediante la determinación de la ubicación temporal más probable de estado de reposo de la región de interés calculando una intensidad de píxel para cada fotograma de video, y seleccionando como marco de referencia el fotograma de video que tiene la intensidad de píxel más baja o más alta calculada en función de si el material celular es más oscuro o más claro que el espacio circundante; este procedimiento de selección del marco de referencia es particularmente preferible cuando la pluralidad de células es activa de forma espontánea. En otra alternativa, el marco de referencia se selecciona mediante el cálculo de una media recortada de todos los fotogramas de video de la grabación de video de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo para formar un marco promedio, que se selecciona como el marco de referencia de la grabación de video de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo.

De acuerdo con el método mencionado anteriormente, los cambios de píxeles se cuantifican dentro de cada región de interés en cada fotograma del video de la grabación de video de la pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo mediante la comparación de las una o más regiones de interés de los fotogramas del video de la grabación de video de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo en las una o más regiones de interés del marco de referencia de la grabación de video de una pluralidad de células después de la exposición a una sustancia de ensayo. Por ejemplo, los cambios de píxeles se pueden cuantificar comparando cada píxel de las una o más regiones de interés con un correspondiente píxel del marco de referencia de la grabación de video de la pluralidad de células con un píxel correspondiente del marco de referencia de la grabación de video de la pluralidad de células y contando los píxeles que cambian mediante un valor preseleccionado. Como alternativa, los cambios de píxeles se pueden cuantificar mediante el cálculo de una intensidad de píxel agregada de las una o más regiones de interés derivadas de la media, la mediana, la moda, la media recortada o una metodología similar del promediado de las intensidades de los píxeles y comparando la intensidad de píxel agregada de la una o más regiones de interés con la intensidad de píxel agregada de las una o más regiones de interés derivadas mediante la realización de la misma metodología de promediado en las una o más regiones de interés del marco de referencia.

Opcionalmente, en un ejemplo de la invención se eliminan de la consideración posterior las subregiones dentro de las regiones de interés que no cumplen los criterios de eliminación de subregiones predeterminados. Por ejemplo, los criterios de eliminación de subregiones se pueden basar en un cambio no deseable de la intensidad promedio.

Opcionalmente, para restar las diferencias de variación lenta en la cuantificación de píxeles, se puede aplicar un algoritmo de corrección basal a las unas o más regiones de interés.

Se calcula una curva de respuesta - tiempo que comprende uno o más picos para cada región de interés basada en la cantidad de cambio del píxel en función del tiempo. En la figura 1 se muestra un ejemplo de una curva de respuesta - tiempo calculada de acuerdo con el método mencionado anteriormente. Los valores tales como la duración de la contracción (representada como, por ejemplo, el 10-90 % del TWITCH total); la contracción máxima (una medida del estado inotrópico); la velocidad máxima de acortamiento ($+dL/dT_{max}$), la velocidad máxima de relajación ($-dL/dT$), el tiempo desde el acortamiento inicial al máximo ($T_{máximo}$) y el tiempo desde el acortamiento máximo hasta la relajación ($T_{máximo-90}$, una medida del estado lusitrópico) se pueden calcular mediante el análisis de la curva respuesta - tiempo. Los valores agregados, tales como el periodo refractario, la pérdida de respuesta a la estimulación prematura, el ruido (por ejemplo, el ruido basal del pico a la altura), la altura máxima promedio y la anchura máxima promedio también se pueden calcular mediante el análisis de la curva de respuesta - tiempo.

De acuerdo con el método mencionado anteriormente, las curvas de respuesta - tiempo se pueden comparar para las regiones de interés antes de la exposición a la sustancia de ensayo y después de la exposición a la sustancia de ensayo. Es evidente que, en la práctica, las curvas de respuesta generadas representan representaciones de alta calidad del comportamiento celular individualizado y/o agregado. Por tanto, la comparación de las curvas de respuesta de las regiones de interés antes y después de la exposición a la sustancia de ensayo representan el efecto directo de una sustancia de ensayo en la pluralidad de células y permite realizar predicciones exactas del efecto de una sustancia en un sistema celular integrado del que derivó la pluralidad de células. Los cambios en la excitabilidad eléctrica pueden, por ejemplo, evaluarse basándose en la presencia o ausencia de una curva de respuesta - tiempo (provocada por un protocolo de estimulación de los estímulos aplicados regularmente con una amplitud que aumenta o disminuye progresivamente) utilizada para definir un umbral para la respuesta contráctil. Las aplicaciones específicas de la presente invención incluyen, por ejemplo, la predicción de los efectos adversos de

las sustancias farmacológicas sobre el tejido del corazón.

En un ejemplo de la invención, las células son miocitos cardíacos (ya sea de origen auricular o ventricular), que se colocan y se obtiene la imagen en una cámara experimental, preferentemente un celda de flujo, y se mantienen a una temperatura predeterminada. Preferiblemente, para los estudios óptimos de comportamiento de la pluralidad de células, la temperatura es o está cerca de la temperatura fisiológica, aunque se pueden usar otras temperaturas. Los miocitos cardíacos no contiguos pueden obtenerse mediante metodologías conocidas, tal como la desagregación del músculo cardíaco. Preferiblemente, la pluralidad de células sometidas a un protocolo de estimulación se estimula usando una estimulación de campo de 1,0 Hertz durante superfusión con solución de Tyrode tamponada con HEPES. Las sustancias de ensayo se superfusionan, preferentemente, con la sustancia de ensayo contenida en una solución tampón salina fisiológica. Cada pluralidad de células se visualiza preferentemente a aumentos de 1–3X. El vídeo se graba a un muestreo preferida de 30 Hz o mayor.

En algunos ejemplos, la invención incluye el análisis de grabaciones de vídeo de múltiples cámaras experimentales, conteniendo cada una pluralidad de células para analizar. En tales ejemplos, se pueden ver una o más cámaras experimentales con un único dispositivo de formación de imágenes de vídeo, donde el dispositivo de formación de imágenes y la o las cámaras se pueden mover uno respecto al otro. Como alternativa, múltiples dispositivos de formación de imágenes de vídeo se pueden dedicar a una o más cámaras experimentales y fijar sus posiciones físicas de uno respecto al otro. La captura y análisis de vídeo para cada cámara pueden avanzar en paralelo, de acuerdo con las técnicas descritas anteriormente. Dichos ejemplos proporcionan ensayos paralelos en cualquier momento dado y permiten el examen simultáneo de los efectos de múltiples sustancias de ensayo, diferentes concentraciones de sustancias de ensayo, o ambos. Para cada cámara, también es posible evaluar las relaciones de concentración-respuesta a las sustancias de ensayo mediante el control de la concentración de la sustancia de ensayo en cada cámara y la repetición de los protocolos experimentales.

En otros ejemplos, se pueden realizar varias grabaciones de vídeo de la pluralidad de células después de la exposición a la sustancia de ensayo para que coincidan con la exposición de la pluralidad de células con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo, o una sustancia de ensayo diferente. Tales grabaciones se analizarían de acuerdo con el método de la invención como se ha descrito anteriormente.

En otros ejemplos, la invención utiliza el software de análisis fuera de línea o en línea, ya sea en línea o dentro de una red interna, lo que permite la selección automática de las regiones celulares y/o regiones de interés, en base a los parámetros contráctiles predefinidos, la adición automática de la sustancia de ensayo, la recolección y compilación de datos y la generación de informes. Además, las curvas de respuesta – tiempo y cualquier valor calculados a partir de la misma se pueden almacenar para su referencia posterior, por lo que la invención no tiene por qué implementarse a tiempos posteriores en la misma pluralidad de células. Por tanto, la invención proporciona un sistema para evaluar simultáneamente los efectos de las sustancias de ensayo sobre varias pluralidades de células.

En ejemplos concretos, el método que se puede llevar a cabo con el aparato de la presente invención describe un ensayo de detección selectiva QT automatizado in vitro para evaluar la repolarización tanto acelerada como retardada sobre la base de los cambios en las contracciones de la contracción y la refractariedad de los miocitos cardíacos ventriculares o las células madre cardíacas aislados. En la práctica del ensayo, que incluye las metodologías de grabación de vídeo y de análisis de datos descritas anteriormente, el efecto de los fármacos que afectan a la repolarización cardíaca, al estado inotrópico, y a la excitabilidad y están relacionados con proarritmia se evalúa fácil y rápidamente. Los efectos dependientes de la concentración se pueden evaluar como parte de la caracterización del fármaco y se representan como curvas de concentración – respuesta. Los efectos inotrópicos positivos y negativos sobre la contractilidad cardíaca se evalúan en base a la amplitud de las respuestas contráctiles. El ensayo permite una rápida y fácil evaluación de las expansiones y/o contracciones celulares, en particular de los miocitos, usando técnicas de cambio de píxel basadas ópticamente, estimulación eléctrica programable y análisis por ordenador, anulando la necesidad de registros con microelectrodos y análisis limitantes del tiempo (y laboriosos). Adicionalmente, el ensayo puede cumplir de forma rápida y eficiente la urgente necesidad de un ensayo de repolarización funcional e integrado con un rendimiento mayor para detectar compuestos para responsabilidades de repolarización QT cardíaca. El ensayo proporciona varias ventajas sobre los métodos actuales que no están adaptados para la detección selectiva de alto rendimiento debido a limitaciones en el rendimiento por las condiciones experimentales requeridas (incluyendo periodos largos de recuperación y de equilibrio, y un número pequeño de fibras por tejido muscular), los costes de mano de obra y el uso de animales. Adicionalmente, como resultado del uso de métodos ópticos para medir las respuestas celulares y evaluar las células que no son miembros de un sistema celular integrado (es decir, células no contiguas) en condiciones fisiológicas controlados, los métodos descritos en el presente documento son más fáciles de realizar y requieren menos tiempo que los métodos anteriores, y obvian la necesidad de técnicas de registro con microelectrodos para evaluar las respuestas electrofisiológicas a productos químicos y fármacos.

Por tanto, el ensayo de acuerdo con el método descrito anteriormente puede evaluar los cambios en la refractariedad en miocitos aislados basándose en las respuestas contráctiles a estímulos eléctricos. Los resultados ilustrados en las figuras 1–4 demuestran la técnica básica y los registros obtenidos al evaluar el periodo refractario

eficaz de un grupo de miocitos cardíacos aislados de acuerdo con el método que se puede llevar a cabo con el aparato de la presente invención. La figura 2 ilustra un ejemplo de un aparato físico usado para estimular y registrar. La figura 1 ilustra un protocolo de estimulación típico y las respuestas estilizadas. En la figura 1, los miocitos ventriculares se estimularon eléctricamente usando un protocolo de pulsos pareados donde los miocitos se estimularon eléctricamente (usando estimulación de campo) con un tren de estímulos de 3 grupos de pulsos comprendido cada uno por 3 estímulos eléctricos a intervalos de 1 segundo y un estímulo prematuro cuyo intervalo era variable. El periodo refractario eficaz (PRE) se definió como el intervalo del estímulo prematuro más largo que no desencadena contracciones mensurables de los miocitos de una magnitud igual al 25 % de la respuesta estimulada regula promedio. La figura 3 ilustra las respuestas de recuento de píxeles superpuestos (normalizadas a la respuesta de estimulación eléctrica promedio) para estímulos prematuros a intervalos de 500, 300 y 200 milisegundos. El PRE medido para este grupo de miocitos estaba entre 200–300 milisegundos y se pueden interpolar de forma lineal para que sea de 240 ms. Se puede conseguir una resolución mayor disminuyendo el tamaño de la etapa de los pulsos prematuros crecientes.

En este ejemplo, la estimulación de campo se consiguió mediante dos electrodos de platino conectados a un estimulador de ondas cuadradas bifásicas. LA duración de un único pulso de estímulo fue de 5 milisegundos, mientras que la intensidad se fijó en ciento veinte por ciento (120 %) por encima del umbral, que es de aproximadamente 7 voltios/cm. La temperatura del baño se mantuvo a una temperatura controlada a la temperatura fisiológica o cerca de ella. Las señales de estimulación eléctrica y las contracciones de los miocitos se registraron de forma simultánea.

En la invención se proporciona un aparato para presentar las células vivas para la obtención de imágenes digitales durante la medición de la respuesta de las células a una sustancia de ensayo. El aparato sirve para almacenar y alimentar las células vivas hasta el momento en que se realiza el ensayo, para el transporte de las células vivas de una sección del aparato a otra, y para presentar las células vivas al aparato de grabación digital al tiempo que se exponen las células a una sustancia de ensayo, por ejemplo un fármaco, y, opcionalmente a un protocolo de estimulación eléctrica. Un aparato de acuerdo con la invención incluye un canal de fluidos que tiene un puerto de entrada para fluidos en un extremo de entrada y una salida de fluidos en un extremo de salida; un dispositivo de bombeo de fluidos conectado al puerto de entrada del canal de fluidos; una tira de película ópticamente transparente o semitransparente que atraviesa el canal de fluidos; la película capaz de adherirse a las células vivas; al menos una celda de flujo colocada sobre la película, comprendiendo la celda de flujo una cavidad que tiene una superficie superior ópticamente transparente y paredes laterales capaces de formar un sello con la película para formar un entorno cerrado; y un accionador vertical conectado a la al menos una celda de flujo capaz de elevar la al menos una celda de flujo por encima de la película o bajar la al menos una celda de flujo sobre la película.

El aparato para almacenar y alimentar las células vivas comprende un canal de fluidos alargado 501 que tiene un puerto de entrada para fluidos 502 en un extremo de entrada 503 y una salida para fluidos o puerto de drenaje 504 en un extremo de salida 505. En una realización preferida, las dimensiones del canal de fluidos 501 son 25,4 mm de ancho x 22,225 mm de profundidad x 914,4 mm de longitud (1" anchura x 7/8" profundidad x 36" longitud). En esta realización, un dispositivo de bombeo de fluidos adecuado, por ejemplo una bomba peristáltica, está conectado al puerto de entrada 502 del canal de fluidos 501 de forma que determinados fluidos, por ejemplo soluciones tampón 506, puede mantenerse a un nivel deseado 507 y fluye desde el extremo de entrada 503 del canal de fluidos 501 al extremo de salida 505 con el fin de alimentar las células vivas 601. Asimismo, en una realización preferida se proporciona un dispositivo 508 para calentar una sección del canal de fluidos 501 a una temperatura igual o cercana a las temperaturas ambientales, de modo que las células vivas 601 en esta región del canal de fluidos 501 se pueden mantener a temperaturas fisiológicas o cercanas a ellas.

En una realización preferida de la invención, el aparato para transportar las células vivas 601 se consigue sembrando las células vivas 601 en una tira de película polimérica flexible ópticamente transparente o semitransparente 602. En una realización preferida, la película polimérica 602 mide aproximadamente 0,127 mm de espesor x 22,225 de anchura x 1168,4 de longitud (.005" espesor x 7/8" anchura x 46" longitud). En otra realización preferida, la película polimérica 602 comprende una tira continua de película de FEP (etilenpropileno fluorado) que se ha tratado especialmente, por ejemplo, mediante polimerización en plasma de una subcapa de amina funcionalizada 603 para estimular la fijación de las células vivas 601 a la película polimérica 602. De acuerdo con esta realización, la tira continua de película polimérica con células sembradas 601 602 se traslada según sea necesario mediante un mecanismo de dirección motorizado con rodillo de tracción.

En una realización preferida, las células vivas 601 se presentan al aparato de grabación digital 801 y se exponen a una sustancia de ensayo colocando una sección de la película polimérica con células sembradas 601.602 bajo un grupo de una o más celdas de flujo 701, donde cada celda de flujo 702 comprende una cavidad 803 que tiene una superficie superior ópticamente transparente 804 y paredes laterales elastoméricas 805 para facilitar el sellado de la película polimérica 602. En una realización preferida, las dimensiones de cada celda de flujo son aproximadamente 1,5 mm de anchura x 1,5 mm de altura x 8 mm de longitud. En esta realización se proporciona aberturas 703 en cada extremo de las celdas de flujo de modo que se puede inyectar una sustancia de ensayo en un extremo y salir por el otro extremo. Opcionalmente, en esta realización las aberturas 703 en cada extreme de la celda de flujo incluyen contactos eléctricos que se usan para administrar un protocolo de estimulación eléctrica a las células vivas.

5 Asimismo, en esta realización el grupo de una o más celdas de flujo 701 está conectado a un mecanismo de pinzamiento 806 comprendido por un accionador vertical motorizado 807 y un soporte de conexión 808 de forma que las celdas de flujo pueden elevarse por encima o pinzarse de forma forzada contra la superficie superior de la película polimérica 602. Cuando se pinzan, cada celda de flujo forma un ambiente independiente reversible y completamente encerrado 809 alrededor de una selección de células vivas, lo que permite la introducción de una sustancia de ensayo, la administración de un protocolo de estimulación eléctrica opcional y las grabaciones de vídeo digital de las células vivas encerradas 601.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para obtención de imágenes digitales de células vivas bajo el efecto de una sustancia de ensayo, que comprende:

5 un aparato de grabación digital (801) para designar de un modo automático una o más regiones celulares a partir de un fotograma de vídeo de una grabación de vídeo de las células vivas antes de la exposición a la sustancia de ensayo; y

10 una tira de película ópticamente transparente o semitransparente (602) capaz de adherirse a las células vivas y de presentar las células vivas al aparato de grabación digital (801);

caracterizado por

15 un canal de fluidos (501) que tiene un puerto de entrada para fluidos (502) en un extremo de la entrada (503) y un puerto de salida para fluidos (504) en un extremo de salida (505); un dispositivo de bombeo de fluidos conectado al puerto de entrada (502) del canal de fluidos (501), donde la tira de película ópticamente transparente o semitransparente (602) es capaz de atravesar el canal de fluidos (501);

al menos una celda de flujo (702) colocada sobre la película (602), comprendiendo la celda de flujo (702) una cavidad (803) que tiene una superficie superior ópticamente transparente (804) y paredes laterales (805) capaces de formar un sello con la película (602) para formar un ambiente cerrado (809); y

20 un accionador vertical (807) conectado a la al menos una celda de flujo (702) capaz de elevar la al menos una celda de flujo (702) por encima de la película (602) o descender la al menos una celda de flujo (702) sobre la película (602).

2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un dispositivo de calentamiento (508) para calentar una parte del canal de fluidos (501).

25 3. El aparato de la reivindicación 1, donde la tira de película ópticamente transparente o semitransparente (602) es continua.

30 4. El aparato de la reivindicación 1, donde la al menos una celda de flujo (702) comprende además contactos eléctricos en cada extremo capaces de administrar un protocolo de estimulación eléctrica a las células vivas.

Fig. 1

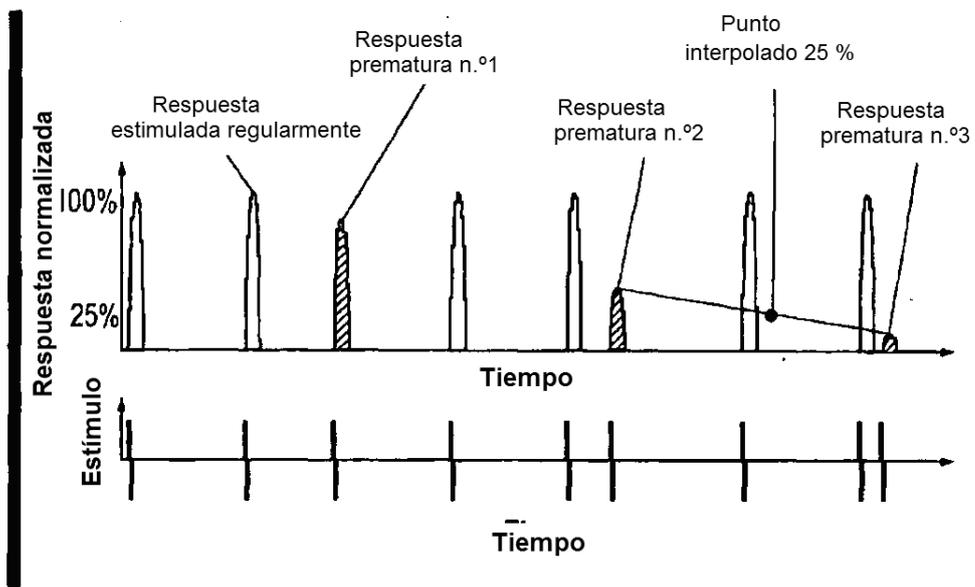


Fig. 2

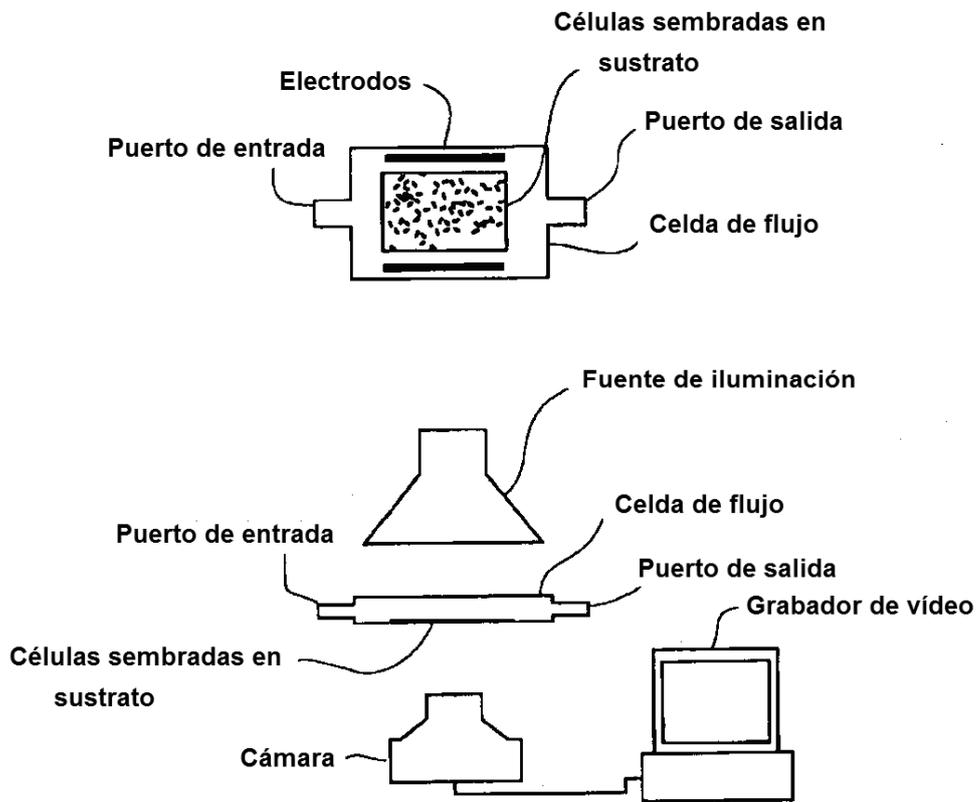


Fig. 3

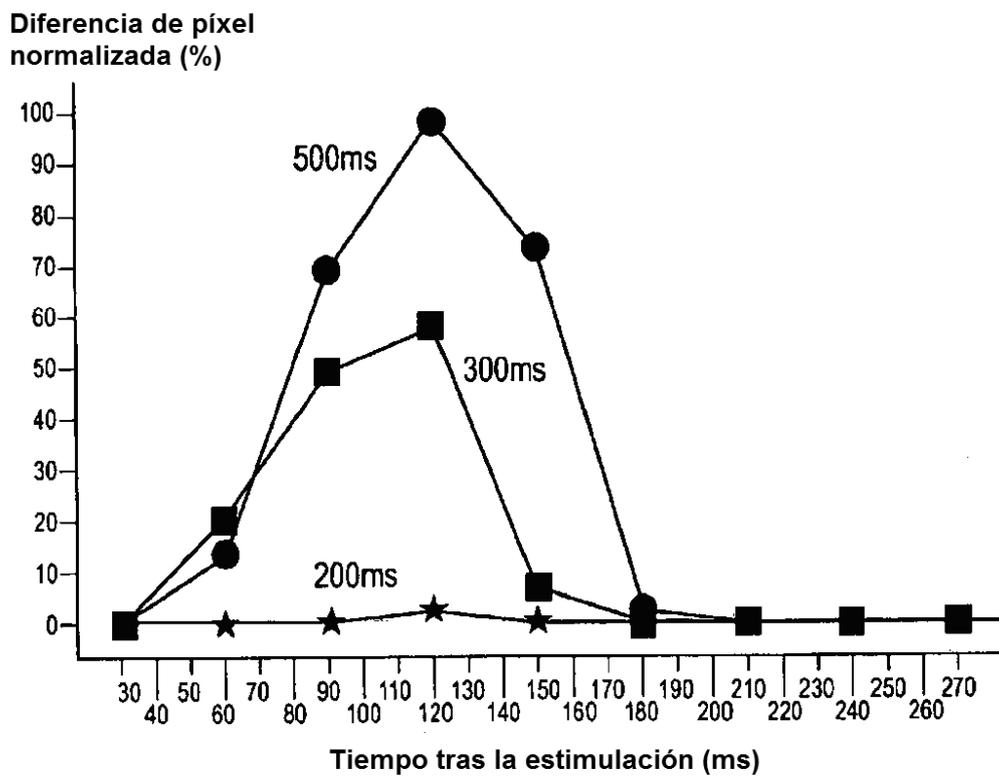


Fig. 4

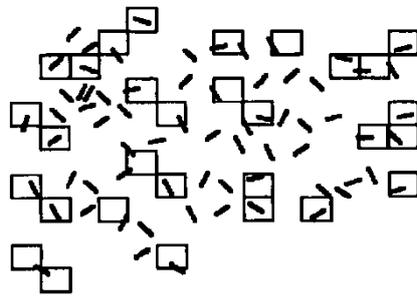


Fig. 5

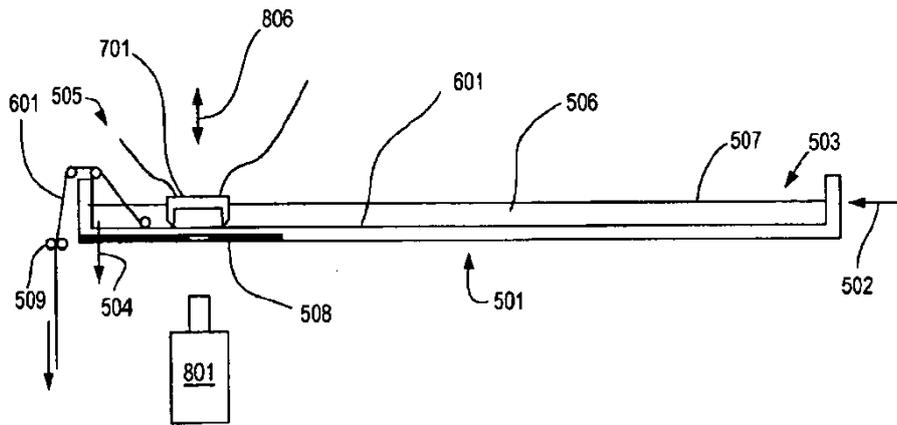
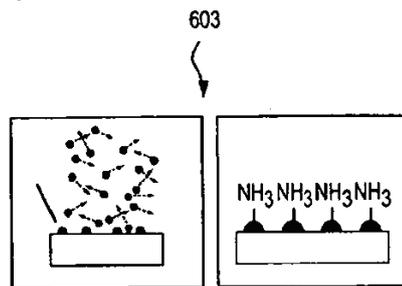


Fig. 6



La polimerización en plasma de alilalanina puede funcionalizar una superficie con aminas primarias

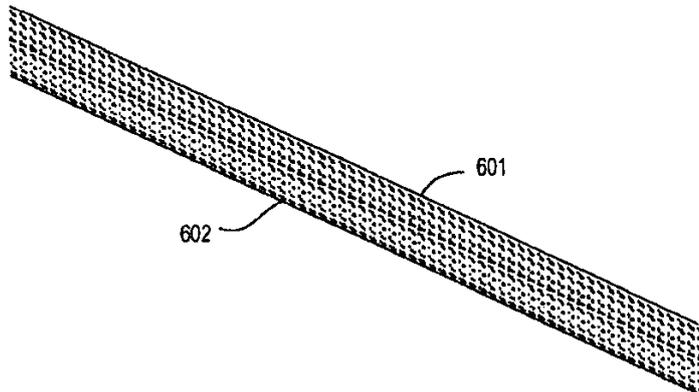


Fig. 7

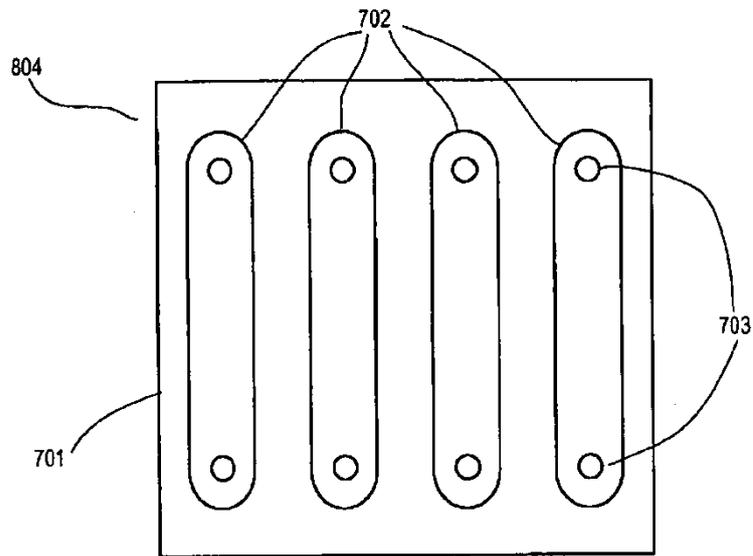


Fig. 8

