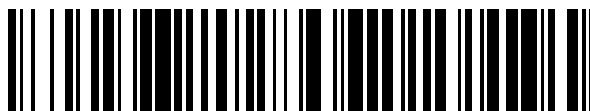


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 969**

51 Int. Cl.:

G01N 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012 PCT/US2012/037532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12155051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12723563 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2707693**

54 Título: **Procedimientos periféricos de diagnóstico para el cribado de la enfermedad de Alzheimer utilizando amiloide beta y comunicación intercelular**

30 Prioridad:

12.05.2011 US 201161485256 P

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**CHIRILA, FLORIN V. (33.3%)
895 Vandalia Road
Morgantown, WV 26505, US;
KHAN, TAPAN KUMAR (33.3%) y
ALKON, DANIEL L. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHIRILA, FLORIN V.;
KHAN, TAPAN KUMAR y
ALKON, DANIEL L.**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 609 969 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

Procedimientos periféricos de diagnóstico para el cribado de la enfermedad de Alzheimer utilizando amiloide beta y comunicación intercelular

5 La presente divulgación se refiere a procedimientos periféricos de diagnóstico para el cribado de la enfermedad de Alzheimer en pacientes, basados en la medición cuantitativa de la complejidad de las redes de fibroblastos tomadas de la piel.

10 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por el empeoramiento progresivo de la memoria y las funciones cognitivas. Se estima que actualmente hay más de cinco millones de estadounidenses que viven con esta enfermedad progresiva y mortal. La enfermedad de Alzheimer destruye las células del cerebro, lo que provoca pérdida de memoria y problemas de razonamiento y comportamiento que disminuyen la calidad de vida. Aunque no se conoce cura para la AD, los tratamientos de los síntomas pueden mejorar la calidad de vida de los millones de personas afectadas por la enfermedad y la de sus familias. Un diagnóstico precoz de la AD proporciona tiempo al paciente para tomar decisiones que maximicen su calidad de vida y para planificar el futuro, reduce la ansiedad provocada por los problemas desconocidos y eleva las probabilidades de que el paciente se vea beneficiado por el tratamiento.

20 La complejidad de la AD hace que su detección precoz presente grandes dificultades. Un marcador biológico que pudiera predecir la AD antes del diagnóstico sintomático o diagnosticara de forma definitiva la AD precoz podría tener un impacto importante en las pruebas y tratamientos de la AD. Las fases prodrómicas prolongadas, la comorbilidad con otras demencias no asociadas a la enfermedad de Alzheimer (no-ADD) y la naturaleza multifactorial de la AD plantean dificultades adicionales para un diagnóstico acertado.

25 Por ello, existe una necesidad en la técnica de procedimientos de diagnóstico mejorados de la enfermedad de Alzheimer.

30 Los documentos WO 2011/041761 y Chirila, F.V. y otros, Poster 205.12/LLL20 of the 40th Annual Meeting Neuroscience 2010, dan a conocer procedimientos de diagnóstico de la AD basados en los patrones de crecimiento de los fibroblastos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La figura 1 muestra dinámicas de los fibroblastos de AD sobre una capa gruesa de Matrigel e ilustra una dinámica rápida (fila superior) y una dinámica lenta (fila inferior). Cabe observar que los agregados aparecen 24 horas y 48 horas después de su siembra.

40 La figura 2 muestra imágenes de células AD y AC de tipo fibroblasto de piel humana cultivadas, así como los valores de puntuación integrada para las células AC, AD y no-ADD. Se muestran células AD tras su siembra en Matrigel en la figura 2A (1 hora) y la figura 2C (48 horas); se muestran células AD tras su siembra en la figura 2B (1 hora) y la figura 2D (48 horas); barra de escala = 100 μm . La figura 2E muestra los datos poblacionales para la puntuación integrada para fibroblastos de la piel a las 48 horas. La figura 2F representa la puntuación integrada para células AD en función de la duración de la enfermedad en años. Los números debajo de cada punto representan el número de líneas celulares y las barras de error representan el error estándar de la media.

45 La figura 3 ilustra el análisis de la superficie de los agregados por número de agregados (superficie/n.^o) para células AD, AC y no-ADD. Las figuras 3A y 3B muestran células de tipo fibroblasto AD y AC, respectivamente, 48 horas después de su siembra en Matrigel. La figura 3C muestra los datos poblacionales de superficie/n.^o para AC (n = 11), AD (n = 13) y no-ADD (n = 9). La figura 3D muestra el valor de superficie/n.^o en función de la duración de la enfermedad en años. Los números debajo de cada punto representan el número de líneas celulares y las barras de error representan el error estándar de la media. Las figuras 3E y 3F muestran dos vistas de la misma distribución de probabilidad de los agregados celulares en función de la superficie y el número, 48 horas después de la siembra.

50 La figura 4 muestra la exactitud en la determinación de la superficie media de los agregados por número de agregados. La figura 4A muestra la repetibilidad de los resultados para AC (n = 1), AD (n = 1) y no-ADD (n = 2); se llevaron a cabo experimentos, como mínimo, con un mes de separación para las mismas líneas celulares y el número inicial de células estaba dentro del 10%. La figura 4B representa la superficie por número de agregados en función de la densidad celular inicial, lo que pone de manifiesto una relación exponencial (líneas continuas) con una pendiente más pronunciada para AD que para AC. Las barras de error representan la desviación estándar. La función de ajuste es $f(x) = a \cdot \exp(x/b)$, donde $a = 112,8$ y $b = 22,8$ para AD, y $a = 64,1$ y $b = 30,5$ para AC. Esto sugiere que, para una densidad celular de 50 células/mm², la separación es razonablemente buena para el cribado de la AD.

60 La figura 5 ilustra el análisis fractal y de lagunaridad. La figura 5A muestra células AC 1 hora después de su siembra en Matrigel (dimensión fractal = 1,72, lagunaridad = 0,37) y la figura 5B muestra las mismas células 48 horas después de la siembra (dimensión fractal = 1,05, lagunaridad = 0,75). La figura 5C muestra curvas fractales para células AD, AC y no-ADD, en las que la pendiente y la intersección de recuperación se controlaron ajustando una

línea (rosa) en el intervalo 20-80% de la diferencia entre el máximo y el mínimo. La figura 5D muestra los datos poblacionales para la pendiente frente a la intersección de la recuperación para las curvas fractales AD (n = 13), AC (n = 10) y no-ADD (n = 9) mostradas en la figura 5C. La figura 5E muestra curvas de lagunaridad para células AD, AC y no-ADD, y la figura 5F muestra la lagunaridad media como medio para separar los tres grupos (AD (n = 7), AC (n = 6), no-ADD (n = 8)).

La figura 6 ilustra el análisis de la migración celular. Los ejemplos de fibroblastos que migran libremente están marcados con puntos verdes en la figura 6A (AD) y la figura 6B (AC), 48 horas después de la siembra en Matrigel. La figura 6C muestra la velocidad de migración en función del número de células migrantes; los cuadrados verdes representan AD (n = 10), los triángulos azules representan no-ADD (n = 7) y los círculos rojos representan AC (n = 9). Las líneas azules son umbrales de separación. La figura 6D representa el número de células migrantes en función de la duración de la enfermedad en años.

La figura 7 muestra el efecto de los oligómeros A β en la formación de la red y la agregación celular. La figura 7A muestra una línea celular de control 2,5 horas después de su siembra en Matrigel. La figura 7B muestra la misma línea celular de control tratada durante una noche con A β oligomerizado 1 μ M al cabo de 2,5 horas de la siembra en Matrigel, e indica un deterioro en la formación de la red. La figura 7C muestra la dimensión fractal para la línea celular de control tratada con A β (verde), que tiene un fenotipo de tipo AD. La figura 7D muestra una mayor lagunaridad para la línea celular de control tratada con A β (verde), lo que es indicativo del fenotipo AD. La figura 7E muestra un ejemplo del aumento de la superficie por número de agregados 48 horas después de la siembra debido al tratamiento con A β 1 μ M.

DESCRIPCIÓN

A continuación se describen con mayor detalle aspectos particulares de la presente divulgación. Los términos y definiciones, tal como se utilizan en la presente solicitud y tal como se detallan en el presente documento, pretenden representar el significado dentro de la presente divulgación.

Las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “aproximadamente” significa prácticamente igual que el número o valor referenciados. En términos generales, tal como se utiliza en el presente documento, debe entenderse que el término “aproximadamente” comprende una desviación estándar de la media de una cantidad, frecuencia o valor especificados.

La presente invención se refiere a procedimientos periféricos *in vitro* para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en pacientes basados en la medición cuantitativa de la complejidad de las redes de fibroblastos tomadas de la piel. Las medidas de la dinámica de la complejidad de la red de fibroblastos, tal como se dan a conocer en el presente documento, pueden ofrecer una nueva oportunidad para diagnosticar la AD en un paciente con un procedimiento mínimamente invasivo. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden proporcionar un medio más preciso, sencillo y/o económico para el cribado de la AD que los que se conocen actualmente en la técnica. El procedimiento se define en la reivindicación 1.

Las células de tipo fibroblasto de la piel son útiles para la identificación de las características de la enfermedad de Alzheimer (AD). Cada vez más indicios apoyan el llamado eje cerebro-piel. Los fibroblastos de ratón y humanos, por ejemplo, se pueden reprogramar para convertirse en neuronas funcionales con una combinación de cuatro factores de transcripción que median en un estado pluripotente. La interacción entre el sistema nervioso cutáneo y las células de la piel participa en la inflamación de la piel y la cicatrización de heridas. Los relojes circadianos en los fibroblastos periféricos de la piel están sincronizados con el marcapasos circadiano del núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Además, hay indicios que apoyan la hipótesis de un vínculo entre las manifestaciones cutáneas (es decir, sistémicas) de anomalías en el metabolismo de amiloide y los depósitos de amiloide en el cerebro de los pacientes con AD. Por ejemplo, la presenilina 1 es uno de los componentes principales del complejo γ -secretasa. La mutación de la presenilina 1 aumenta la actividad del complejo γ -secretasa sobre la proteína precursora de amiloide (APP) y aumenta la producción de amiloide beta tóxico, que se considera una de las principales causas de la AD. La presenilina 1 también participa en el recambio del receptor del factor de crecimiento epidérmico. La pérdida parcial de la expresión de presenilina 1 puede provocar queratosis seborreica y enfermedades inflamatorias de la piel.

Una serie de medidas moleculares en los fibroblastos de la piel indican déficits de la proteína cinasa C (PKC) y señalización extracelular de la cinasa 1/2 (ERK) regulada, que son específicos de la AD. Esta señalización también se ha relacionado con la desregulación específica de la AD de los canales de potasio y las conexiones eléctricas en los fibroblastos cultivados. La matriz extracelular, una red compleja compuesta por una serie de macromoléculas que tiene importancia en la regulación de las funciones celulares y la arquitectura tisular, está desregulada en los fibroblastos de la piel en casos de AD. Además, los estudios de expresión génica con fibroblastos de la piel en casos de AD familiar han puesto de manifiesto que el proceso de la enfermedad puede comenzar incluso antes de la aparición del deterioro cognitivo. También se ha descubierto que los fibroblastos de AD familiar producen un exceso de amiloide beta en los fibroblastos cultivados.

Las redes de fibroblastos de la piel humana, como las redes neuronales en el cerebro con AD, muestran una reducción de la complejidad en comparación con las células de control de la misma edad (AC) y de demencias no asociadas a la enfermedad de Alzheimer (no-ADD). Se pueden utilizar medidas de la comunicación intercelular en las redes de fibroblastos y el efecto del amiloide beta en su complejidad espaciotemporal para detectar la AD. Por consiguiente, las redes de fibroblastos de la piel humana proporcionan un modelo de las redes cerebrales útil para el diagnóstico preciso de la AD y el cribado de fármacos terapéuticos. Las muestras de fibroblastos de la piel se pueden obtener en un sujeto mediante biopsia por punción o utilizando un bisturí quirúrgico, por ejemplo.

10 **Amiloide beta**

En algunas realizaciones, se añade amiloide beta a las células de tipo fibroblasto para estimular un fenotipo de tipo AD para su comparación con un control positivo para AD.

15 Las expresiones “péptido amiloide beta”, “proteína amiloide beta”, “péptido amiloide beta”, “amiloide beta”, “A. beta” y “péptido A. beta” se utilizan indistintamente en el presente documento. En algunas formas, un péptido amiloide beta (por ejemplo, A. beta 39, A. beta 40, A. beta 41, A. beta 42 y A. beta 43) es un fragmento interno de aproximadamente 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glucoproteína transmembranaria mayor denominada proteína precursora de amiloide (APP). Existen múltiples isoformas de la APP, por ejemplo APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. Los ejemplos de isotipos específicos de la APP cuya existencia en humanos es conocida actualmente son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y otros (Nature, 325: 733-736, 1987), designado APP “normal”; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y otros (Nature, 331: 525-527, 1988) y Tanzi y otros (Nature, 331: 528-530, 1988); el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y otros (Nature, 331: 530-532, 1988). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por parte de diferentes enzimas secretasas, *in vivo* o *in situ*, el A. beta se encuentra en una “forma corta”, con una longitud de 40 aminoácidos, y una “forma larga”, con una longitud de 42-43 aminoácidos. Parte del dominio hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxílico del A. beta y puede explicar la capacidad del mismo para agregarse, particularmente en el caso de la forma larga. El péptido A. beta puede encontrarse en los líquidos corporales de los humanos y otros mamíferos, o purificarse a partir de los mismos, por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo, incluidas las personas sanas y las que sufren trastornos amiloidogénicos.

30 Las expresiones “péptido amiloide beta”, “proteína amiloide beta”, “péptido amiloide beta”, “amiloide beta”, “A. beta” y “péptido A. beta” incluyen péptidos resultantes de la escisión de la APP por secretasa y péptidos sintéticos que tienen exactamente o esencialmente la misma secuencia que los productos de escisión. Los péptidos A. beta adecuados para la presente divulgación se pueden derivar de diversas fuentes, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, tejidos, líneas celulares y líquidos corporales (por ejemplo, el suero y el líquido cefalorraquídeo). Por ejemplo, el A. beta se puede derivar de células que expresan APP, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), como se describe, por ejemplo, en Walsh y otros (Nature, 416: 535-539, 2002). Una preparación de A. beta se puede derivar, por ejemplo, de fuentes tisulares (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 94: 1550, 1997) o sintetizarse por procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fields y otros, Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1992, P77). Por consiguiente, los péptidos se pueden sintetizar utilizando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el grupo α -amino protegido mediante técnicas químicas de t-Boc o F-moc, utilizando aminoácidos protegidos de cadena lateral, por ejemplo, en un sintetizador Applied Biosystems Peptid Synthesizer modelo 430A o 431. Pueden sintetizarse antígenos peptídicos más largos por técnicas conocidas de ADN recombinante. Por ejemplo, se puede sintetizar o clonar molecularmente un polinucleótido que codifique el péptido o péptido de fusión e insertarse en un vector de expresión adecuado para la transfección y la expresión heteróloga por parte de una célula huésped adecuada. “Péptido A. beta” también se refiere a secuencias de A. beta relacionadas que resultan de mutaciones en la región A. beta del gen normal.

50 Una anomalía inducida por el amiloide beta en la morfología celular se puede utilizar como prueba confirmatoria de la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, una respuesta negativa de índice de amiloide beta puede indicar la presencia de la enfermedad, mientras que una respuesta positiva puede indicar su ausencia. Es decir, la inducción de un fenotipo de morfología AD en las células tras la incubación o el contacto con un péptido amiloide beta es indicativa de la ausencia de AD en las células sometidas a ensayo o el sujeto sometido a ensayo. En cambio, la inducción de un cambio menor o nulo en el fenotipo de las células tras la incubación o el contacto con un péptido amiloide beta (es decir, no se da ningún cambio estadísticamente significativo en la medición de la complejidad de la red) es indicativa de la presencia de AD en las células sometidas a ensayo o el sujeto sometido a ensayo.

60 En este contexto pueden utilizarse amiloide beta (1-42) (es decir, A β (1-42)) y/o cualquier otro fragmento de amiloide beta, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, (1-39), (1-40), (1-41), (1-43), (25-35), (16-22), (16-35), (10-35), (8-25), (28-38), (15-39), (15-40), (15-41), (15-42) y (15-43).

Cultivo celular

5 La célula o células AD, AC y no-ADD, o la muestra o muestras de células, pueden cultivarse o incubarse en un medio que comprende una mezcla de proteínas, tal como una mezcla de proteínas gelatinosas. En, como mínimo, algunas realizaciones, las células se cultivan tras la adición de amiloide beta.

10 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende una preparación. En algunas realizaciones, la preparación se solubiliza. En, como mínimo, una realización, la preparación se extrae de un tumor, tal como el sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm Swarm (EHS), y es rica en proteínas de la matriz extracelular (ECM). Dichas preparaciones pueden comprender, por ejemplo, como mínimo, una proteína de entre laminina, colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y entactina/nidógeno. Un ejemplo no limitativo adecuado para la presente divulgación es el Matrigel™, que es el nombre comercial (BD Biosciences) de una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por las células del sarcoma de ratón EHS. Esta mezcla es parecida al medio extracelular complejo que se encuentra en muchos tejidos y puede utilizarse como sustrato para el cultivo celular. Matrigel comprende laminina, colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y entactina 1. A 37°C, el Matrigel se polimeriza y produce material de matriz biológicamente activo que se parece a la membrana basal celular de mamífero.

20 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la preparación comprende además TGF-beta, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulinoide, factor de crecimiento de fibroblastos, activador del plasminógeno tisular y/u otros factores de crecimiento, que pueden o no aparecer de forma natural en un tumor. En algunas realizaciones, el TGF-beta, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento insulinoide, el factor de crecimiento de fibroblastos, el activador del plasminógeno tisular y/u otros factores de crecimiento aparecen de forma natural en un tumor, tal como el sarcoma de ratón EHS. La matriz BD Matrigel™ reducida en factores de crecimiento (GFR), por ejemplo, puede ser adecuada para aplicaciones que requieren una preparación de membrana basal más definida del gel de sustrato.

30 La preparación puede comprender una preparación de proteínas ECM eficaz para la unión y la diferenciación de las células epitelioideas dependientes del acoplamiento normales y transformadas, así como otros tipos de células. Entre los ejemplos de tipos de células se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, neuronas, hepatocitos, células de Sertoli, células de cristalino de polluelo y células endoteliales vasculares. La preparación de proteínas ECM puede afectar a la expresión génica en hepatocitos de rata adulta, así como el cultivo tridimensional en células epiteliales mamarias de ratón y humanas. La preparación puede servir, por ejemplo, como base para realizar ensayos de invasión de células tumorales, potenciar la regeneración nerviosa periférica *in vivo* y/o proporcionar un sustrato para el estudio de la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. La proteína ECM también puede ayudar a la propagación *in vivo* de tumores humanos en ratones inmunodeprimidos.

40 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se dispone un volumen de proteína ECM refrigerada sobre el material de laboratorio de cultivo de tejidos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "refrigerada" se refiere a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, por ejemplo, de menos de aproximadamente 15°C, menos de aproximadamente 10°C, menos de aproximadamente 5°C, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 4°C. Cuando se incuban a una temperatura elevada, las proteínas ECM se pueden autoensamblar y producir una película fina que cubre la superficie del material de laboratorio. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elevada" se refiere a una temperatura superior a la temperatura ambiente, tal como mayor de aproximadamente 20°C, mayor de aproximadamente 25°C, mayor de aproximadamente 30°C, mayor de aproximadamente 35°C, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 37°C, que es aproximadamente la temperatura media del cuerpo humano.

50 Las células cultivadas en proteínas ECM pueden mostrar un comportamiento celular complejo, difícil de observar de otro modo en condiciones de laboratorio. Por ejemplo, las células endoteliales pueden crear intrincadas redes de tipo telaraña sobre las superficies revestidas con proteína ECM, pero no sobre las superficies de plástico. Dichas redes son indicativas de los sistemas capilares microvasculares que irrigan de sangre los tejidos vivos, de tal manera que las proteínas ECM ayudan en la observación de ese proceso.

55 En algunas realizaciones, se utilizan mayores volúmenes de proteínas ECM para producir gruesos geles tridimensionales para el cultivo de las células. Por ejemplo, los geles gruesos pueden ser útiles para inducir a las células a migrar de la superficie al interior del gel. En algunas realizaciones, este comportamiento migratorio puede servir como modelo para la metástasis de células tumorales. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende una capa con un espesor comprendido entre aproximadamente 1,0 mm y aproximadamente 2,0 mm, tal como de aproximadamente 1,5 mm o aproximadamente 1,8 mm. La cantidad de medio de cultivo también se puede expresar como el volumen (V) en una placa de acuerdo con la relación $V = (\pi r^2)h$, en la que h es el espesor de la capa y r es el radio. En algunas realizaciones, por ejemplo, el volumen de medio de cultivo puede estar comprendido entre aproximadamente 400 µl y aproximadamente 800 µl, tal como aproximadamente 700 µl, con $r = 11,05$ mm.

65 Sin limitarse a esta teoría particular, se cree que la capacidad de las proteínas ECM para estimular un comportamiento celular complejo puede resultar de una composición heterogénea. En algunas realizaciones, los componentes principales de las proteínas ECM son proteínas estructurales, tales como laminina y colágeno, que

presentan a las células cultivadas las secuencias peptídicas adhesivas que encontrarían en su entorno natural. Algunas realizaciones de la presente divulgación utilizan factores de crecimiento que pueden promover la diferenciación y la proliferación de muchos tipos de células. Las proteínas ECM también pueden contener numerosas otras proteínas en pequeñas cantidades.

Al cabo de entre 1 y 2 horas de cultivo, las células de tipo fibroblasto de la piel pueden conectarse y formar redes medibles. Este hecho proporciona un entorno fisiológicamente relevante para estudiar la morfología celular, las funciones bioquímicas celulares, la motilidad celular o las invasiones, y/o la expresión génica. Estas redes degeneran con el tiempo (por ejemplo, entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 48 horas), y los bordes (conexiones) entre los nodos se retraen y dejan agregados medibles. A medida que la célula o células y/o la red celular de fibroblastos cambian, se pueden tomar imágenes para obtener información cuantitativa, cualitativa y semicuantitativa. En algunas realizaciones de la presente divulgación, se toman imágenes aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas o incluso aproximadamente 72 horas o más después del cultivo. La figura 1 muestra un ejemplo de la dinámica de las células de tipo fibroblasto para células de AD sembradas sobre una gruesa capa de Matrigel (1,8 mm). Las líneas celulares de AC presentan una dinámica similar, pero las líneas celulares de AC tienden a mostrar un mayor número de agregados menores (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 y las figuras 2D, 3B, 5B y 6B).

En algunas realizaciones, a determinadas características de la imagen o imágenes se les pueden asignar valores, según uno o más de los siguientes procedimientos, para evaluar cuantitativamente los patrones en la dinámica de las redes de fibroblastos.

1. Puntuación integrada

Para separar las células AD de las células AC, no-ADD después del cultivo (por ejemplo, 48 horas después de la siembra en Matrigel), se utilizan ocho parámetros que se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros para la puntuación integrada

	Parámetro	Valor
1.	Existencia de agregados grandes	-1 o 0
2.	Unión de las células a los agregados	-1 o 0
3.	Indicios de crecimiento de los agregados	-1 o 0
4.	Número reducido de agregados (< 10 en una imagen de 10x)	-1 o 0
5.	Gran número de agregados (> 10 en una imagen de 10x)	+1 o 0
6.	Bordes medibles dentro de las redes	+1 o 0
7.	Indicios de migración celular	+1 o 0
8.	Cercanía al límite de percolación (las células forman corrientes continuas)	+1 o 0

A partir de estos ocho parámetros, se calcula una puntuación semicuantitativa (“puntuación integrada”) del siguiente modo. Los primeros cuatro parámetros (1-4) son específicos de la enfermedad de Alzheimer, con una puntuación de “-1” para cada uno si está presente y de “0” si está ausente. Los últimos cuatro parámetros (5-8) son específicos de no-ADD y AC, con una puntuación de “+1” si están presentes y de “0” si están ausentes. La puntuación integrada se calcula como la suma de los ocho valores. Si la puntuación integrada es positiva o cero, las células son AC o no-ADD. Si la puntuación integrada es negativa, las células son AD. En algunas realizaciones, el procedimiento se puede automatizar completamente utilizando técnicas conocidas de procesamiento de imágenes.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la puntuación integrada se utiliza para separar los fibroblastos de AD de controles de la misma edad (AC) y/o demencias no de tipo Alzheimer (no-ADD). En algunas realizaciones, la puntuación integrada se calcula para imágenes de células tomadas 48 horas después del cultivo (por ejemplo, siembra sobre Matrigel).

En algunas realizaciones de la presente divulgación, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la puntuación integrada para las células de ensayo tratadas con Aβ es menor que la puntuación integrada para las células de ensayo no tratadas. En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la diferencia en la puntuación integrada entre las células de ensayo tratadas con Aβ y las células de control de AD no es estadísticamente significativa, es decir, de más de una desviación estándar.

2. Superficie por número de agregados

Los parámetros 4 y 5, utilizados para la puntuación integrada, también se pueden expresar como superficie de los agregados por número de agregados (<superficie>/número de agregados) para proporcionar una medida de la morfología más cuantitativa. Las células de AD tienden a formar agregados más grandes y aislados, mientras que

los controles normales y los fibroblastos de no-ADD tienden a formar numerosos agregados más pequeños. Por consiguiente, generalmente, el valor <superficie>/número de agregados es considerablemente mayor para las células de AD que para las células de AC y/o no-ADD.

5 El valor <superficie>/número de agregados se puede calcular a partir de la superficie media de los agregados $\langle A \rangle_i$ y el número de agregados N_i , determinados a partir de cada imagen promediando la relación $\langle A \rangle_i/N_i$. Véase, por ejemplo, el ejemplo 1.3 y la figura 3C. Esto se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento adecuado, tal como el ajuste de una elipse a lo largo del agregado. A continuación, los agregados pueden contarse en las imágenes. El recuento y/o el cálculo de la superficie se puede llevar a cabo manualmente o se puede automatizar, por ejemplo, mediante técnicas de procesamiento de imágenes.

10 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si el valor de <superficie>/número de agregados para las células de ensayo tratadas con A β es mayor que el valor de <superficie>/número de agregados para las células de ensayo no tratadas. En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la diferencia entre el valor de <superficie>/número de agregados para las células de ensayo tratadas con A β y para las células de control de AD no es estadísticamente significativa.

3. Dimensión fractal

20 La complejidad de las redes de fibroblastos de piel humana se puede cuantificar mediante el cálculo de sus dimensiones fractales. El análisis fractal utiliza la complejidad de las redes para distinguir células AD, AC y no-ADD. Estadísticamente, las células de tipo fibroblasto obtenidas de pacientes que padecen AD tienen una dimensión fractal significativamente más baja que las células AC cuando se cultivan en cultivo tisular. La complejidad de las redes medida por dimensión fractal también es marcadamente diferente para los fibroblastos tomados de AD en comparación con los fibroblastos de AC y no-ADD. Por consiguiente, una complejidad reducida de los casos de AD de las redes de fibroblastos de la piel humana proporciona distinciones de los casos de AC y no-ADD.

25 Tras la degeneración de la red (por ejemplo, aproximadamente 48 horas), las células migran y alcanzan la confluencia en unos días. Esta recuperación se detecta por un aumento lineal de la dimensión fractal. Por consiguiente, la recuperación, medida mediante la pendiente y la intersección de las curvas fractales, muestra diferencias cuantificables entre las células AD, no-ADD y AC.

30 La dimensión fractal se puede generalizar a $N(s) = (1/s)^D$, donde D es la dimensión y puede ser un número entero o no entero. Tomando los logaritmos a ambos lados, tenemos $\log(N(s)) = D \cdot \log(1/s)$, de modo que la dimensión fractal se puede determinar representando $\log(N(s))$ contra $\log(1/s)$. Si la pendiente es un número no entero, la dimensión es una dimensión fraccional (fractal).

35 La dimensión fractal se puede calcular utilizando un procedimiento de recuento por cajas estándar después de filtrar las imágenes en bruto (por ejemplo, imágenes digitales) a través de un procedimiento de detección de bordes que utiliza, por ejemplo, la diferencia de dos gaussianas. La detección de bordes es una expresión utilizada en el campo del procesamiento de imágenes, particularmente en las áreas de detección de características y extracción de características, para referirse a algoritmos que tienen como objetivo la identificación de puntos en una imagen digital en los que, por ejemplo, el brillo de la imagen cambia drásticamente o presenta otras discontinuidades.

40 Se puede demostrar que, bajo supuestos bastante generales para un modelo de formación de imagen, es probable que las discontinuidades en el brillo de la imagen correspondan a una o más discontinuidades en la profundidad, discontinuidades en la orientación de la superficie, cambios en las propiedades del material y variaciones de iluminación de la escena.

45 La aplicación de un detector de bordes a una imagen puede conducir a un conjunto de curvas conectadas que indican los límites de los objetos, los límites de las marcas de la superficie y a unas curvas que corresponden a discontinuidades en la orientación de la superficie. Por consiguiente, la aplicación de un detector de bordes a una imagen puede reducir significativamente la cantidad de datos a procesar, por lo que puede filtrar información que puede considerarse menos relevante a la vez que conserva las propiedades estructurales importantes de una imagen. Así pues, si la etapa de detección de bordes se completa con éxito, la posterior tarea de interpretar el contenido de la información de la imagen original puede simplificarse sustancialmente.

50 En términos generales, los procedimientos para la detección de bordes se pueden agrupar en dos categorías: basados en búsqueda y basados en los puntos de cruce por cero. Los procedimientos basados en búsqueda detectan bordes calculando en primer lugar una medida de la intensidad de borde, habitualmente una expresión derivada de primer orden, tal como la magnitud del gradiente, y buscando a continuación máximos direccionales locales de la magnitud del gradiente utilizando una estimación calculada de la orientación local del borde, habitualmente la dirección del gradiente. Los procedimientos basados en los puntos de cruce por cero buscan cruces por cero en una expresión derivada de segundo orden calculada a partir de la imagen con el fin de encontrar bordes, habitualmente los cruces por cero de la laplaciana o los cruces por cero de una expresión diferencial no

lineal. Como paso de procesamiento previo a la detección de bordes, se puede aplicar una etapa de suavizado, por ejemplo de suavizado gaussiano. En otras realizaciones, se pueden aplicar algoritmos de filtración de ruido.

5 Los procedimientos de detección de bordes publicados difieren principalmente en los tipos de filtros de suavizado que se aplican y en la forma en la que se procesan las medidas de intensidad de los bordes. Como muchos procedimientos de detección de bordes se basan en el cálculo de los gradientes de la imagen, también difieren en los tipos de filtros utilizados para el cálculo de las estimaciones de gradiente en las direcciones x e y.

10 En una realización de la presente divulgación, la dimensión fractal se determina aplicando un procedimiento de recuento por cajas, en el que la imagen se cubre con cajas, por ejemplo, mediante un ordenador. El objetivo es determinar cómo cambia el número de cajas necesario para cubrir la imagen según el tamaño de las cajas. Si el objeto es unidimensional, tal como una línea, la relación es $N(s) = (1/s)^1$, tal como se ha descrito anteriormente, y así sucesivamente para dimensiones más altas. En algunas realizaciones, el procedimiento de recuento por cajas se implementa en un ordenador utilizando imágenes digitales de muestras de células.

15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la dimensión fractal para las células de ensayo tratadas con Aβ es menor que la dimensión fractal para las células de ensayo no tratadas. En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la diferencia de dimensión fractal entre las células de ensayo tratadas con Aβ y las células de control de AD no es estadísticamente significativa.

20 **4. Lagunaridad**

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “lagunaridad” se refiere a una medida de cómo un fractal llena el espacio. Se utiliza para clasificar adicionalmente los fractales y texturas que, si bien pueden compartir la misma dimensión fractal, tienen un aspecto visual muy diferente. Los fractales densos tienen una lagunaridad baja. A medida que la rugosidad de los fractales aumenta, también lo hace la lagunaridad; intuitivamente, dado que laguna significa “hueco” (más huecos = más lagunaridad). Habitualmente, la lagunaridad se representa como L:

$$L(r) = \frac{\sum_{m=1}^{r^2} m^2 P(m,r) - \left(\sum_{m=1}^{r^2} m P(m,r)\right)^2}{\left(\sum_{m=1}^{r^2} m P(m,r)\right)^2}$$

30 La lagunaridad es una medida complementaria para la discriminación de la complejidad que cuantifica los huecos en las redes celulares. Las líneas celulares de AD presentan una lagunaridad media mayor que las líneas celulares de AC y no-ADD.

35 El procedimiento de análisis de la lagunaridad que se da a conocer en la presente divulgación cuantifica los huecos de los patrones de fibroblastos como medida complementaria de la complejidad y se utiliza como un segundo nivel de discriminación. La lagunaridad media es mayor para los fibroblastos de AD que para los fibroblastos de AC y no-ADD. Habitualmente, la lagunaridad aumenta y alcanza un pico cuando se maximiza la degeneración de la red, es decir, cuando sólo se ven agregados aislados. La lagunaridad cae cuando comienza la regeneración de la red.

40 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la lagunaridad en las células de ensayo tratadas con Aβ es mayor que la lagunaridad en las células de ensayo no tratadas. En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la diferencia de lagunaridad entre las células de ensayo tratadas con Aβ y las células de control de AD no es estadísticamente significativa.

45 **5. Migración celular**

50 La migración celular permite distinguir entre células AD, AC y no-ADD. Una célula de migración libre se define como una célula que no está unida a agregados. Las células de migración libre se pueden contar en diferentes momentos durante el cultivo. Por ejemplo, para los tiempos N_1 y N_2 , la velocidad de migración se calcula como $R = (N_2 - N_1) / \Delta T$, donde ΔT es el intervalo de tiempo entre los recuentos de migración celular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el número de células de migración libre se puede contar aproximadamente 24 horas después de la siembra, tal como aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 50 horas, aproximadamente 52 horas, aproximadamente 55 horas, aproximadamente 57 horas o aproximadamente 60 horas después de la siembra. En, como mínimo, una realización, la velocidad de migración se cuenta para los tiempos $N_1 = 48$ horas después de la siembra y $N_2 = 55$ horas después de la siembra. En algunas realizaciones, se controla la densidad celular inicial. En, como mínimo, una realización, la densidad celular inicial se controla para que sea aproximadamente de 50 células/mm³.

60 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si el número de células migrantes para las células de ensayo tratadas con Aβ es menor que el número de células migrantes para las células de ensayo no tratadas. En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD si la diferencia en el número de células migrantes entre las células de ensayo tratadas con Aβ y las células de control de

AD es menor que una desviación estándar de la media. En, como mínimo, una realización, una velocidad de migración menor de aproximadamente $0,3 \text{ h}^{-1}$ es indicativa de AD.

5 Los cinco procedimientos de análisis descritos anteriormente (es decir, puntuación integrada, superficie por número de agregados, dimensión fractal, lagunaridad y migración celular) se pueden utilizar solos o combinados. En algunas realizaciones, por ejemplo, se calculan la puntuación integrada y la superficie por número de agregados. En otra realización, por ejemplo, se utiliza una combinación de análisis fractal, análisis de la lagunaridad y análisis de la migración celular. En otra realización, se calculan la puntuación integrada y la superficie media de los agregados por número de agregados, además de aplicar análisis fractal, análisis de la lagunaridad y/o análisis de la migración celular. En algunas realizaciones, los procedimientos dados a conocer en la presente divulgación no sólo sirven para la discriminación de células AD con respecto a células AC, sino también para la discriminación de células AC con respecto a células no-ADD, tales como en la enfermedad de Huntington (EH) y/o la enfermedad de Parkinson (EP).

15 En algunas realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD cuando dos o más de los procedimientos de análisis arrojan independientemente un diagnóstico positivo para la AD. En otras realizaciones, se adopta un diagnóstico positivo para la AD cuando todos los procedimientos de análisis (por ejemplo, dos técnicas diferentes, tres técnicas diferentes, cuatro técnicas diferentes o cinco técnicas diferentes) arrojan independientemente un diagnóstico positivo para la AD.

20 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se pueden evitar y/o minimizar los falsos positivos y/o los falsos negativos estableciendo un umbral de diagnóstico en un determinado múltiplo de la desviación o desviaciones estándar de la población para cualquiera de las variables mencionadas anteriormente.

Análisis morfológico como medida de la comunicación intercelular

25 El análisis de la complejidad de las redes de fibroblastos proporciona información sobre la comunicación intercelular. Las redes tienen una naturaleza ubicua y ofrecen un marco para entender la conectividad que surge de las interacciones tales como las interacciones entre ordenadores en Internet, entre neuronas en un organismo, entre elementos de una red de energía eléctrica y entre las personas. En la AD, las redes neuronales se alteran progresivamente debido a la pérdida sináptica. Las redes de fibroblastos de piel humana, como las redes neuronales en los cerebros afectados por la AD, también se ven alteradas y se pueden caracterizar mediante mediciones cuantitativas físicas, tales como el número de bordes por nodo o el número de nodos por agrupación. Un nodo es un punto de conexión (por ejemplo, un punto de redistribución o un punto final de comunicación), y un borde es una conexión entre dos nodos. Un agrupación o subred es un grupo de nodos conectados continuamente entre sí.

35 El número de bordes por nodo en muestras de células cultivadas se puede considerar una medida de la comunicación intercelular. En algunas realizaciones, el número de bordes por nodo de células cultivadas se cuenta en un período predeterminado, tal como un período comprendido entre aproximadamente 1 hora y 5 horas después de la siembra. En, como mínimo, una realización, el número de bordes por nodo se cuenta aproximadamente 1 hora después de la siembra.

Aunque los procedimientos del presente documento describen células de tipo fibroblasto, también se contempla el análisis morfológico de otras células, tales como glóbulos sanguíneos o células neuronales.

45 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente divulgación. Se entiende que el experto en la materia puede imaginar otras realizaciones que estén de acuerdo con la divulgación dada a conocer en el presente documento.

EJEMPLOS

50 Ejemplo 1. Comparación de células AD, AC y no-ADD

1.1: Preparación de las células y obtención de imágenes

55 Se llevaron a cabo experimentos utilizando 33 fibroblastos de piel humana procedentes del Coriell Institute for Medical Research (Camden, Nueva Jersey) (tablas 2 y 3).

Tabla 2: Células de tipo fibroblasto de piel humana analizadas (AC = controles de la misma edad; AD = enfermedad de Alzheimer; HD = enfermedad de Huntington; PD = enfermedad de Parkinson).

Criterios de diagnóstico	Regla AD IN		Regla AD OUT		Total
	Pacientes con AD	No-ADD	Controles sin demencia		
Confirmado por autopsia	7	1 PD	-		
Antecedentes genéticos y familiares	3	7 HD + 1 PD	-		
Sólo diagnóstico clínico	3	-	-		
Total	13	9	11 AC		
Bien caracterizado	10	9	11		30

Tabla 3: Células de tipo fibroblasto de piel humana analizadas.

AC (n=11)	AD (n=13)	No-ADD (n=9)
AG12438	AG05770	GM02173
AG12927	AG08245	GM00305
AG07714	AG06263	GM05030
AG04146	AG08170	GM05031
AG04461	AG06840	GM06274
AG11734	AG04159	GM02165
AG05840	AG06844	GM02167
AG07123	AG06869	ND27760
AG09977	AG07374	AG08395
AG12998	AG08527	
AG11358	AG10788	
	AG11368	
	AG05810	
Confirmado por autopsia Confirmado por autopsia Antecedentes genéticos y familiares Antecedentes genéticos y familiares Sólo diagnóstico clínico		

- 5 Las células se sembraron en una capa gruesa (~1,8 mm) de Matrigel en placas de 12 pocillos. Las líneas celulares analizadas (30/33) estaban en su mayoría bien caracterizadas a partir de la autopsia o los antecedentes genéticos y familiares (tabla 2). Se obtuvieron resultados similares con fibroblastos recién tomados en el centro médico.
- 10 La densidad celular inicial se controló para que fuera de 50 células/mm³ y se homogeneizó con 1,5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de penicilina/estreptomina (PS) para cada pocillo. Las células se mantuvieron en una incubadora de CO₂ con camisa de agua (Forma Scientific) hasta 7 días después de la siembra.
- 15 Se obtuvieron imágenes de las redes celulares con un microscopio invertido controlado por ordenador utilizando un objetivo de 10x. Véase la figura 1. Se tomaron cinco imágenes por pocillo, habitualmente con tres pocillos por cada línea celular. Se tomaron imágenes cada hora durante el primer día, cada dos horas durante el segundo día y tres veces al día durante los tres días restantes. Las imágenes fueron procesadas con ImageJ, un software libre de NIH (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los análisis fractal y de lagunaridad se realizaron con el plug-in FrLac2.5. Se escribieron
- 20 scripts personalizados para los análisis automáticos de las imágenes. Los agregados se ajustaron manualmente a elipses utilizando el software Micron 2.0 y se registraron su área y su número. El script automático desarrollado para ImageJ concuerda bien con el ajuste manual a una elipse; estos dos procedimientos se diferenciaban en menos de una desviación estándar el uno del otro.
- 25 1.2: Puntuación integrada
- Las figuras 2A-2D presentan imágenes que muestran la formación de la típica red celular de fibroblastos de la piel y la degeneración de dos líneas celulares preparadas, tal como se describe en el ejemplo 1.1. Las líneas celulares de AD (figura 2A) fueron más lentas en la formación de redes que los controles de la misma edad (figura 2B). Los bordes de estas redes comenzaron a degenerarse aproximadamente 5 horas después de la siembra, cuando se volvieron progresivamente más finos y finalmente desaparecieron. A consecuencia de la retracción de los bordes, únicamente los nodos de la red se mantuvieron como agregados celulares. Los agregados ya eran visibles 24 horas después de la siembra. Las figuras 2C y 2D muestran imágenes tomadas a las 48 horas para las células AD y AC, respectivamente.
- 35 Se utilizaron ocho parámetros para distinguir fibroblastos AD, AC y no-ADD a las 48 horas de la siembra en Matrigel mediante el cálculo de la puntuación integrada (la suma de los ocho valores). Una puntuación integrada positiva o una puntuación de cero indican que las células son AC o no-ADD; una puntuación integrada negativa indica que las células proceden de pacientes con AD.

Los datos poblacionales para las puntuaciones integradas de células de tipo fibroblasto de la piel 48 horas después de la siembra muestran una buena separación entre las células AD, AC, y no-ADD (figura 2E). La puntuación integrada parece correlacionarse con la duración de la enfermedad de Alzheimer, volviéndose más negativa a medida que aumenta la duración de la misma (figura 2F).

5 1.3: Superficie media por número de agregados

La exactitud diagnóstica aumentó cuando se expresaron dos de los ocho parámetros de la puntuación integrada en una medida de la superficie media de los agregados por número de agregados (<superficie>/número de agregados). Para calcular este valor, en primer lugar se calcularon para cada imagen una superficie media de los agregados <A>_i y un número de agregados N_i. A continuación se evaluó la relación <A>_i/N_i. Habitualmente, se utilizaron cinco

imágenes por pocillo, y se determinó una superficie media por número para cada pocillo según la relación:
$$\sum_{i=1}^5 \frac{A_i}{N_i}$$

Los tres pocillos se promediaron según la relación
$$\sum_{w=1}^3 \left(\sum_{i=1}^5 \frac{A_i}{N_i} \right)_w$$
, que es el número que se muestra en la figura 3C para cada línea celular. Esta medida fue considerablemente mayor para AD que para AC y no-ADD (exactitud diagnóstica del 96%, N = 33 (n_{AD} = 13, n_{AC} = 11 y n_{no-ADD} = 9) p < 0,000001 para AD frente a AC, y p < 0,00001 para AD frente a no-ADD).

Las células AD muestran grandes agregados aislados (figuras 3A y 5A), mientras que los controles normales (AC) y los fibroblastos de no-ADD muestran numerosos agregados más pequeños (figuras 3B y 5B).

Los datos poblacionales (figura 3C) no muestran solapamiento entre AC, no-ADD y AD. El valor <superficie>/número de agregados aumentó con la duración de la AD (figura 3D). La distribución de probabilidad de los agregados celulares en función de la superficie y el número a las 48 horas muestra que el grupo AD (n = 13) se separa bien del grupo AC (n = 11). Los valores de superficie y número de agregados se agruparon en intervalos inversamente proporcionales a la densidad de los puntos, se ajustaron con funciones gaussianas para cada variable y se integraron en distribuciones normalizadas. El pico de probabilidad para la población de AD se encontraba en N = 5, superficie = 12.370; mientras que la población de AC presentaba un pico a N = 8, superficie = 1.004. Las desviaciones estándar de la población de AC eran σ_N = 2,3, σ_{superficie} = 451, mientras que para la población de AD eran σ_N = 2,6, σ_{superficie} = 5.000. Estas desviaciones estándar indican que las distribuciones de probabilidad para el número de agregados tienen cierto solapamiento, mientras que las distribuciones de probabilidad para las superficies no tienen ninguna superposición a media anchura. Por consiguiente, un procedimiento simple para aumentar la separabilidad entre las poblaciones de AD y de AC consistió en combinar las dos variables en una, dividiéndolas como superficie/número. De este modo, el rango dinámico aumenta de 8/5 = 1,6 para N y 12.370/1.004 = 12,3 para la superficie, a 19,7 para el valor superficie/N. La repetibilidad de los resultados se muestra en la figura 4.

Se obtuvieron resultados similares para el valor <superficie>/número de agregados para 4 muestras frescas procedentes del centro médico. El umbral para los diferentes tipos de células (por ejemplo, AC y AD) para las muestras frescas parece ser mayor (superficie/n.^o ~2.000) que para las muestras procedentes de Coriell (superficie/n.^o ~1.000). Véase la figura 4A.

Las células de AC pueden distinguirse adicionalmente de las células no-ADD por análisis fractal (ejemplo 1.4), análisis de la lagunaridad (ejemplo 1.5) y análisis de la migración celular (ejemplo 1.6).

45 1.4: Análisis de la dimensión fractal

Las dinámicas de la complejidad espaciotemporal, tales como la formación de la red (figura 5A), la degeneración de la red (figura 5B) y la recuperación se pueden medir mediante curvas fractales y de lagunaridad (figuras 5C y 5D). Las redes de fibroblastos de AD medidas con estos parámetros físicos eran marcadamente menos complejas que las redes de AC y no-ADD. Después de la degeneración de la red (~48 h, figura 5B), las células migraron y al cabo de unos días se aproximaron a la confluencia. Esta recuperación se detecta por un aumento lineal de la dimensión fractal, tal como se muestra en la figura 5C. La pendiente frente a la intersección de cada curva que representa la dimensión fractal en función del tiempo es marcadamente diferente en los tres grupos AC, AD y no-ADD (96% de exactitud, n = 33 (n_{AD} = 13, n_{AC} = 10, n_{no-ADD} = 9); p < 0,0001 para AD frente a AC, y p < 0,00001 para AD frente a no-ADD). El análisis fractal no sólo discriminó entre las células AD y las células AC, no-ADD, sino también entre las células AC y las células no-ADD (p < 0,01) (figura 5F).

55 1.5: Análisis de la lagunaridad

La lagunaridad es una medida complementaria de la dimensión fractal. Se utiliza como un segundo nivel de discriminación de la complejidad que cuantifica los huecos de los patrones de fibroblastos. La lagunaridad media de los fibroblastos fue mayor en los fibroblastos tomados de pacientes con AD que en los fibroblastos de AC y no-ADD. Habitualmente, la lagunaridad aumenta y alcanza un pico cuando la degeneración de la red se encuentra en un máximo, es decir, cuando sólo se observan agregados aislados cerca del punto temporal de 48 horas (figuras 5B y

5D). La lagunaridad disminuyó a medida que las células migraban y se volvían más confluentes. Los datos poblacionales de la figura 5F muestran que la lagunaridad media, como el análisis fractal, discriminaba no sólo entre las células AD y las células AC, no-ADD, sino también entre las células AC y las células no-ADD ($p < 0,01$).

5 1.6 Migración celular

Se contaron las células de migración libre a las 48 horas (N_1) y aproximadamente 7 horas más tarde (N_2), calculándose la velocidad de migración como $R = (N_2 - N_1) / \Delta T$, siendo ΔT = intervalo de tiempo entre recuentos. Las células de migración libre (es decir, las células no unidas a agregados) están representadas por los puntos verdes de las figuras 6A (células de AD) y 6B (células de AC). El número de células migrantes se redujo en los fibroblastos de AD en comparación con los controles normales.

Los datos poblacionales de la figura 6C muestra que los fibroblastos de AD (verde) y los fibroblastos de no-ADD (azul) tenían significativamente menos células migrantes y una velocidad de migración menor en comparación con los fibroblastos de AC. Los fibroblastos de AD (verde) mostraron el menor número de células migrantes y la menor velocidad de migración, mientras que los fibroblastos de AD (rojo) mostraron el mayor número de células migrantes y la mayor velocidad de migración. Curiosamente, los fibroblastos de no-ADD se separaron (con una excepción) de las células AD y AC. El número de células migrantes también parecía disminuir con el aumento de la duración de la enfermedad de Alzheimer, tal como se muestra en la figura 6D.

10 1.7: Exactitud, especificidad y sensibilidad

Los cinco procedimientos de análisis (ejemplos 1.2-1.6) dieron lugar a un porcentaje medio de exactitud diagnóstica del 96,8% (tabla 4), que variaba entre el 95% para la lagunaridad media y el 100% para la superficie media por número de agregados. Para la puntuación integrada y el análisis fractal (pendiente frente a intersección), el porcentaje de éxito fue del 97%, mientras que para la migración celular fue del 96%.

La sensibilidad se define como la probabilidad de que el procedimiento sea positivo cuando se aplica a un grupo de pacientes con la enfermedad, $S_n = TP / (TP + FN)$, donde TP y FN son el número de verdaderos positivos y falsos negativos, respectivamente. Para los cinco procedimientos combinados, la sensibilidad media fue del 96,8%, yendo desde el 92% para la puntuación integrada y el análisis fractal hasta el 100% para el valor de <superficie>/número de agregados, el análisis de la lagunaridad y el análisis de la migración celular.

Tabla 4

Procedimiento	Exactitud (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)
Puntuación integrada	97	92	100	100	95
Superficie media por número de agregados	100	100	100	100	100
Análisis fractal	97	92	100	100	95
Análisis de la lagunaridad	95	100	100	90	100
Análisis de la migración celular	96	100	94	90	100

Los cinco procedimientos dieron una especificidad media del 98,8%, con un único valor diferente del 100% para la migración celular, que muestra una especificidad del 94%.

En conjunto, los cinco procedimientos proporcionaron una exactitud media del 96,8%, una sensibilidad media del 96,8% y una especificidad media del 98,8%.

40 **Ejemplo 2: Amiloide beta**

Los experimentos iniciales sugieren que algunas de las diferencias observadas anteriormente en la complejidad de las redes entre los fibroblastos de AD y de AC pueden ser debidas al amiloide beta (A β) oligomerizado.

Los fibroblastos de la piel se obtuvieron del Coriell Institute for Medical Research (Camden, Nueva Jersey). Los fibroblastos depositados en bancos procedentes de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD) y de controles de la misma edad (AC) se mantuvieron y se cultivaron en matraces de cultivo T25 con medio de cultivo DMEM que contenía un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina/estreptomocina, y se colocaron en una incubadora con el 5% de CO $_2$ y a 37°C. Todos los matraces fueron examinados con regularidad y, después de 7-10 días, los cultivos se hicieron confluentes. No se permitió que el número total de pases celulares superara los 16. Las células se tripsinizaron y se contaron (células/mm 3) con una cámara de recuento de células (Hausser Scientific). Las muestras de células de AC y AD se trataron durante una noche con amiloide beta (A β) oligomerizado 1 μ M. Las células de AC y AD tratadas y no tratadas se sembraron en placas de 12 pocillos sobre una capa gruesa (~1,8 mm) de Matrigel. Se utilizó un número medio de 9 cuadrados de recuento para el recuento de células, siendo de 50 células/mm 3 .

Se utilizaron cinco imágenes a 10x por pocillo (centro, arriba, abajo, izquierda, derecha) para el análisis cuantitativo de imágenes. Habitualmente, se utilizaron tres pocillos para cada línea celular. Se utilizó un microscopio de cultivo celular (Westover Digital AMID Modelo 2200) para registrar las imágenes en formato .png con un aumento de 10x. Se utilizó el software GNU Image Manipulation (GIMP2. 6) e ImageJ (1.45a) para el análisis de imágenes. Para el análisis fractal, se utilizó el plug-in para ImageJ FracLac 2.5, con la opción de recuento por cajas estándar. Las imágenes originales .png se sometieron 3 veces a una eliminación automática de motas, se filtraron, se suavizaron y se hicieron binarias utilizando scripts personalizados para ImageJ. Las imágenes binarias se guardaron e importaron en ImageJ para los análisis fractal y de lagunaridad con el plug-in FracLac.

Los fibroblastos de AC tratados durante una noche con A β oligomerizado 1 μ M cambiaron a un fenotipo de tipo AD cuando se sembraron en Matrigel, tal como se muestra en las figuras 7A-7E. La figura 7A muestra una línea de células de control sin tratar (AC) 2,5 horas después de la siembra. La figura 7B muestra la misma línea celular de control tratada durante una noche con A β oligomerizado 1 μ M, también 2,5 horas después de la siembra, que muestra una conectividad baja. El deterioro en la formación de la red también se refleja por una baja dimensión fractal y/o una lagunaridad elevada de las células tratadas con A β , características de la AD. El análisis de la dimensión fractal de la figura 7C indica que la línea celular de control tratada con A β (verde) es de tipo AD. La mayor lagunaridad para la línea celular de control tratada con A β (verde), que se muestra en la figura 7D, también es indicativa de un fenotipo AD. La figura 7E muestra una mayor superficie por número de agregados para las líneas celulares de AC y AD 48 horas después de la siembra debido al tratamiento con A β 1 μ M en comparación con las células no tratadas. Las flechas de la figura 7E señalan desde los valores de superficie/n.^o para las células AC y AD no tratadas hacia el valor superficie/n.^o de las células tratadas con A β . El A β también dificultaba la migración celular en las líneas celulares de AC reduciendo el número de células migrantes después de 48 horas, de forma similar a las células de AD (véase, por ejemplo, la figura 6C).

Experimentos similares en fibroblastos de AD (n = 3) no mostraron ningún efecto apreciable en la agregación celular a las 48 horas, la dimensión fractal o la lagunaridad debido al tratamiento con A β .

Estos resultados sugieren que la gran diferencia en la superficie por número en las líneas de células de AC tratadas con A β en comparación con las líneas celulares de AD tratadas con A β puede ser útil para el cribado de la enfermedad de Alzheimer.

Referencias

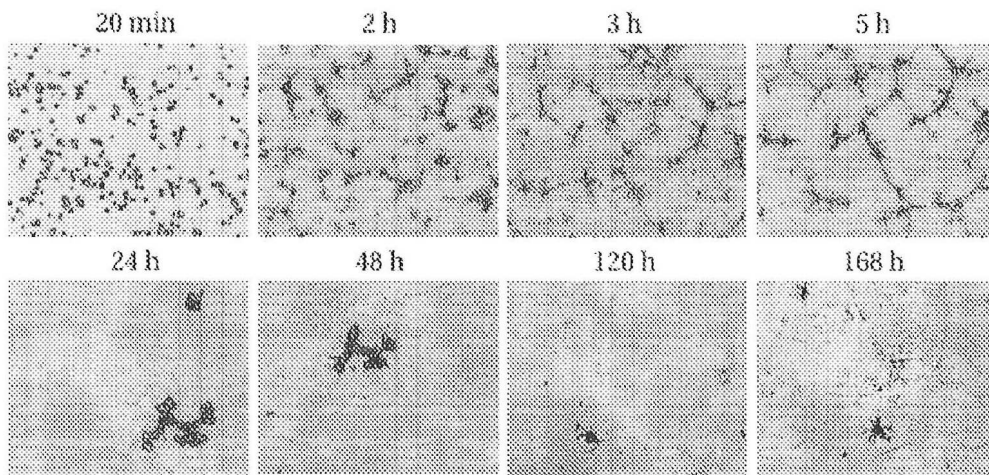
- Schreml, S. y otros, *Exp. Derm.*, D010.1111/j.1600-0625.2010.01166.x (2010).
 Vierbuchen, T. y otros, *Nature*, 463, 1035 (2010).
 Ansel, J. C. y otros, *Progress in Derm.*, 106, 198 (1996).
 Geyfman, M. y B. Andersen, *J. Invest. Derm.*, 129, 1225 (2009).
 Tanioka, M. y otros, *J. Invest. Derm.*, 129, 1225, (2009).
 Selkoe, D. J., *J. Alzheimers Dis.*, 3, 75 (2001).
 Hardy, J. y D. J. Selkoe, *Science*, 297, 353 (2002).
 Repetto, E. y otros, *J. Biol. Chem.*, 282, 31504 (2007).
 Tournoy, J. y otros, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1321 (2004).
 Etcheberrigaray R. y otros, *Science*, 264, 276, (1994).
 Khan, T. K. y D. L. Alkon, *P. Natl. Acad. Sci.*, 103, 13202 (2006).
 Khan T. K. y otros, *Neurobiol Dis.*, 34, 332 (2009).
 Etcheberrigaray, R. y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 101, 11141 (2004).
 Endres, K. y F. Fahrenholz, *FEBS J.*, 277, 1585 (2010).
 Kozikowski, A. P. y otros, *Chem. Med. Chem.*, 4, 1095 (2009).
 Aisen, P. S., *CNS Drugs*, 19, 989 (2005).
 Bellucci C. y otros, *Mol. Med.*, 13, 542 (2007).
 Nagasaka y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 102, 14854 (2005).
 Citron y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 91, 11993-7, (1994).
 Johnston y otros, *FEBS Lett.*, 354, 274 (1994).
 Chirila, F. V. y otros, *J. Physiol.*, 584, 167-190 (2007).
 Watts, J. D. y S. H. Strogatz, *Nature*, 393, 440 (1998).
 Albert, R. y otros, *Nature*, 401, 130 (1999).
 Strogatz, S. H., *Nature*, 410, 268 (2001).
 Barabasi, A. L. y R. Albert, *Rev. Mod. Phys.*, 74, 47 (2002).
 Fowler, J. H. y N. A. Christakis, *Brit. Med. J.*, 337, 2338 (2008).
 Geyfman, M. y B. Andersen, *J. Invest. Derm.*, 129, 1225 (2009).
 Tanioka, M. y otros, *J. Invest. Derm.*, 129, 1225, (2009).
 Selkoe, D. J., *J. Alzheimers Dis.*, 3, 75 (2001).
 Hardy, J. y D. J. Selkoe, *Science*, 297, 353 (2002).
 Repetto, E. y otros, *J. Biol. Chem.*, 282, 31504 (2007).
 Tournoy, J. y otros, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1321 (2004).

- Etcheberrigaray R. y otros, *Science*, 264, 276, (1994).
Khan, T. K. y D. L. Alkon, *P. Natl. Acad. Sci.*, 103, 13202 (2006).
Khan T. K. y otros, *Neurobiol Dis.*, 34, 332 (2009).
Etcheberrigaray, R. y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 101, 11141 (2004).
5 Endres, K. y F. Fahrenholz, *FEBS J.*, 277, 1585 (2010).
Kozikowski, A. P. y otros, *Chem. Med. Chem.*, 4, 1095 (2009).
Aisen, P. S., *CNS Drugs*, 19, 989 (2005).
Bellucci C. y otros, *Mol. Med.*, 13, 542 (2007).
Nagasaka y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 102, 14854 (2005).
10 Citron y otros, *P. Natl. Acad. Sci.*, 91, 11993-7, (1994).
Johnston y otros, *FEBS Lett.*, 354, 274 (1994).
Chirila, F. V. y otros, *J. Physiol.*, 584, 167-190 (2007).
Watts, J. D. y S. H. Strogatz, *Nature*, 393, 440 (1998).
Albert, R. y otros, *Nature*, 401, 130 (1999).
15 Strogatz, S. H., *Nature*, 410, 268 (2001).
Barabasi, A. L. y R. Albert, *Rev. Mod. Phys.*, 74, 47 (2002).
Fowler, J. H. y N. A. Christakis, *Brit. Med. J.*, 337, 2338 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) utilizar dos muestras de células de la piel de tipo fibroblasto procedentes del sujeto;
 (b) tratar una de las muestras de células con un péptido amiloide beta (A β);
 (c) cultivar cada una de las muestras de células, la tratada con A β y la no tratada, en un medio de cultivo;
 (d) obtener imágenes de cada una de las muestras de células, la tratada con A β y la no tratada, para obtener, como
 10 mínimo, una imagen de cada muestra;
 (e) analizar la, como mínimo una, imagen de cada muestra mediante, como mínimo, un procedimiento de análisis
 morfológico con respecto a un control del que se sabe que tiene la enfermedad de Alzheimer (AD); y
 (f) en el que, si tanto la muestra de células tratada con A β como la no tratada tienen un fenotipo de tipo AD, el
 diagnóstico es positivo para AD y, si la muestra de células tratada con A β tiene un fenotipo de tipo AD y la muestra
 15 de células sin tratar no, el diagnóstico es negativo para AD.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende determinar las características de
 agregación celular, seleccionadas entre la existencia de agregados grandes, la unión de células a los agregados,
 indicios del crecimiento de los agregados, la densidad de los agregados (número por unidad de área), la aparición
 20 de bordes dentro de las redes de agregados, señales de migración celular, cercanía al límite de percolación y
 combinaciones de los mismos.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende la determinación de la superficie media
 de los agregados por número de agregados.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende la determinación de la dimensión
 fractal.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende la determinación de la lagunaridad.
- 30 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende la determinación de un número de
 células migrantes.
7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende analizar la, como mínimo una, imagen
 35 de cada muestra para determinar, como mínimo, dos características de morfología celular, seleccionadas entre las
 características de agregación celular, la superficie media de los agregados por número de agregados, la dimensión
 fractal, la lagunaridad y el número de células migrantes.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa (e) comprende analizar la, como mínimo una, imagen
 40 de cada muestra para determinar las características de agregación celular, la superficie media de los agregados por
 número de agregados, la dimensión fractal, la lagunaridad y el número de células migrantes.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el diagnóstico es positivo para AD si, como mínimo, dos de los
 procedimientos de análisis utilizados en la etapa (e) dan independientemente un diagnóstico positivo.
- 45 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprende un gel.
11. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende el cultivo de las muestras de células
 tratada con A β y no tratada entre 1 minuto y 168 horas.
- 50 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la etapa (d) comprende el cultivo de las muestras de células
 tratada con A β y no tratada entre 24 horas y 48 horas.
13. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el procedimiento distingue entre la enfermedad de Alzheimer
 (AD) y las demencias no asociadas a la enfermedad de Alzheimer (no-ADD).
- 55 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que la demencia no-ADD se selecciona entre la enfermedad de
 Huntington y la enfermedad de Parkinson.

FIG. 1



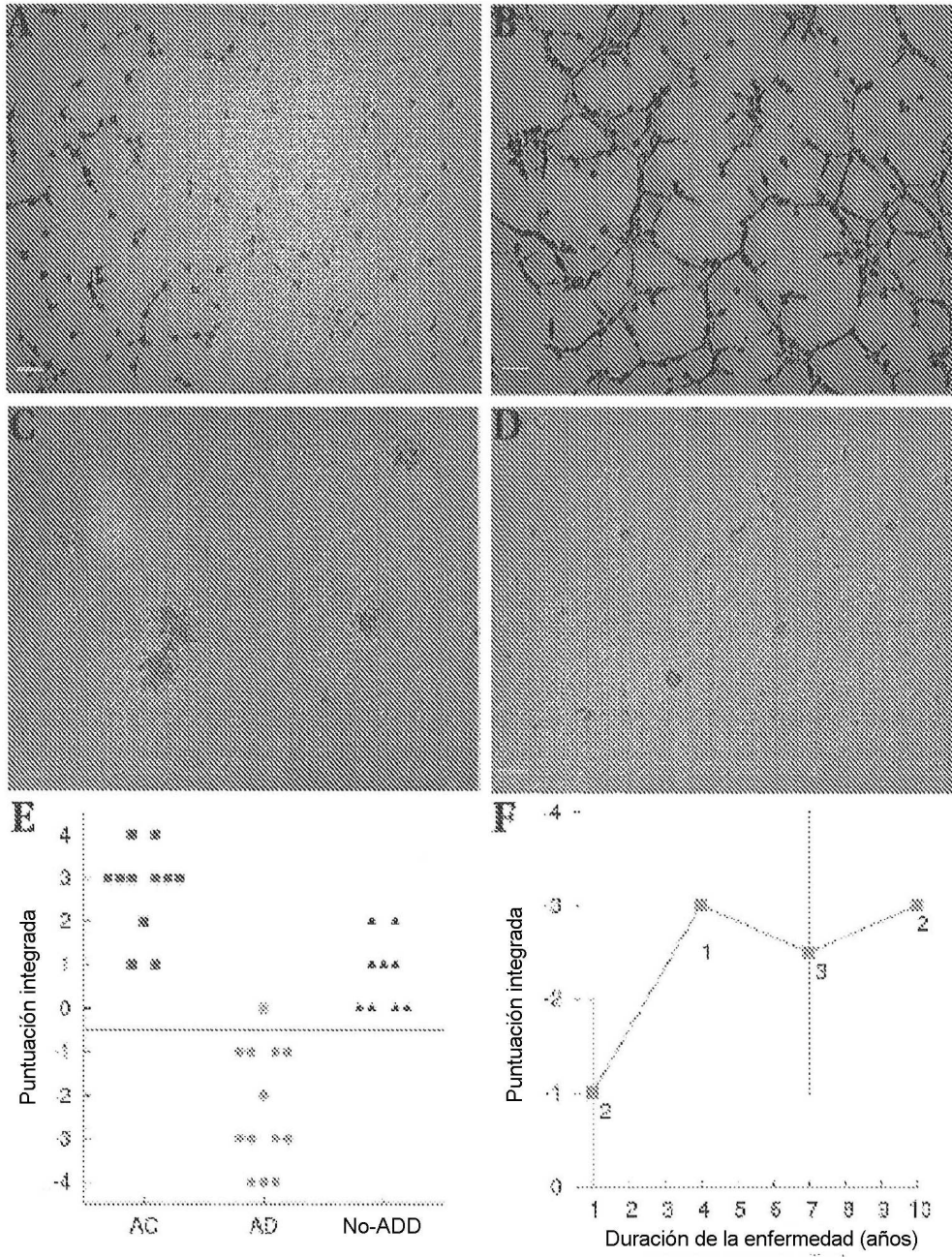


FIG. 2

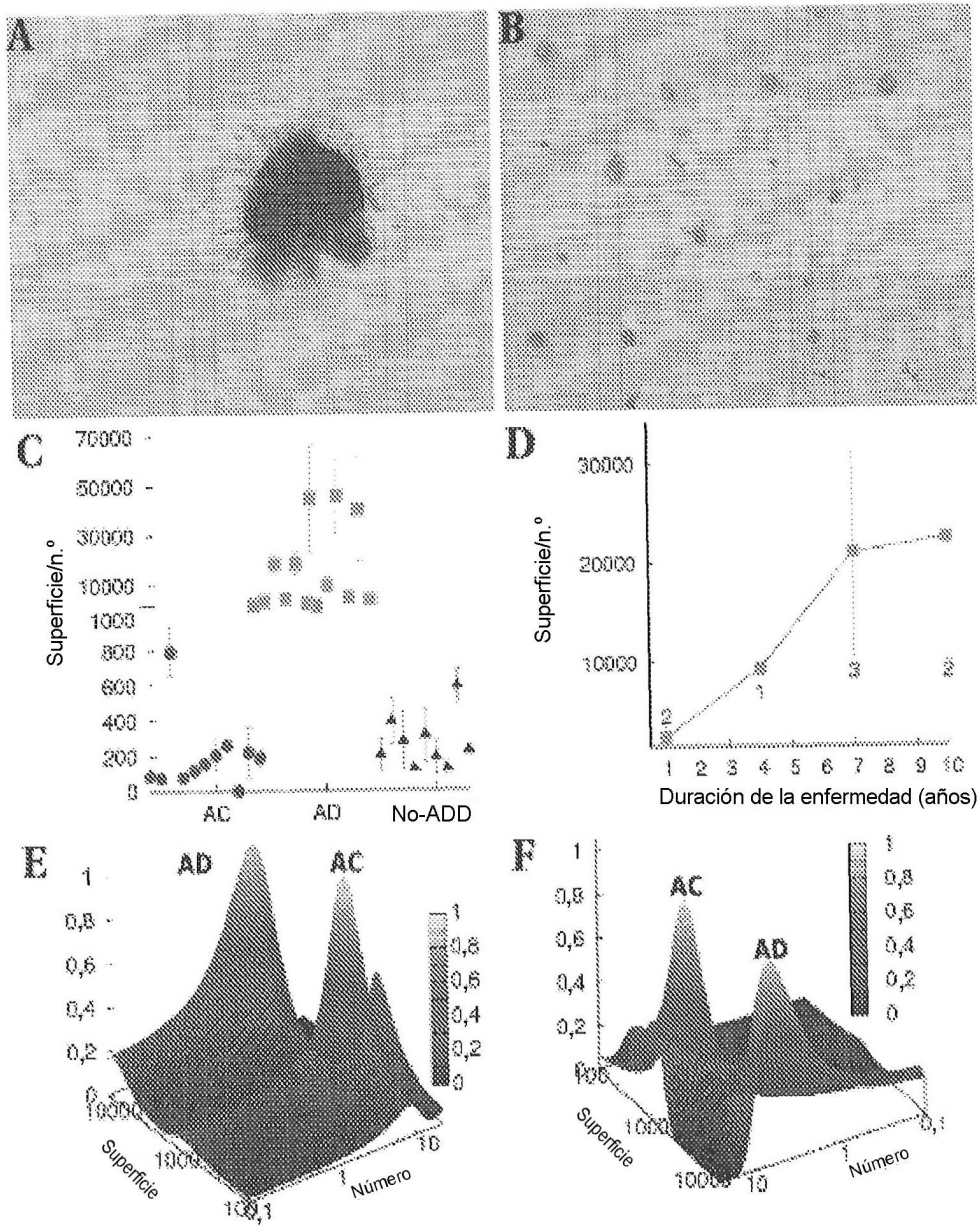


FIG. 3

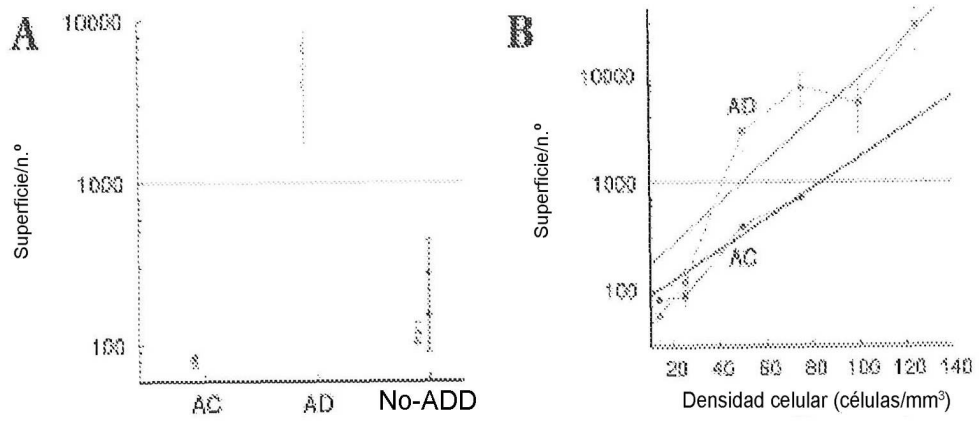


FIG. 4

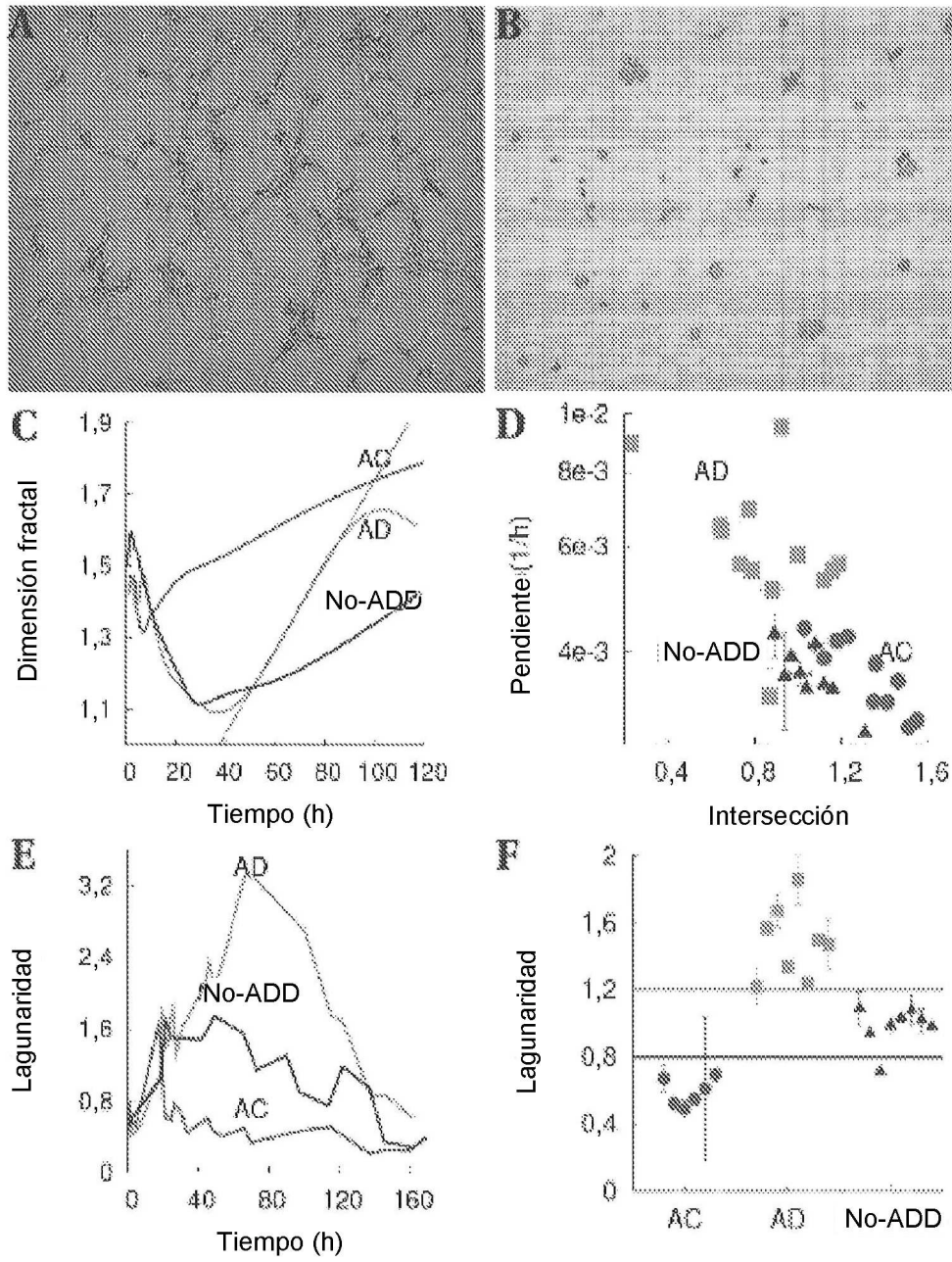


FIG. 5

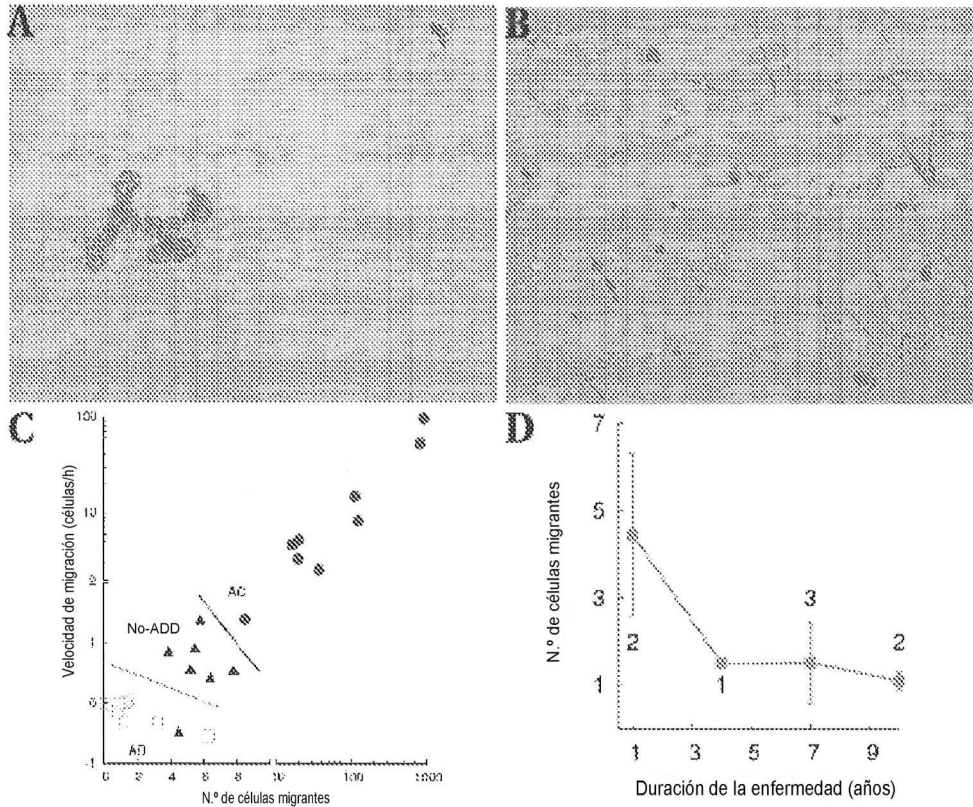


FIG. 6

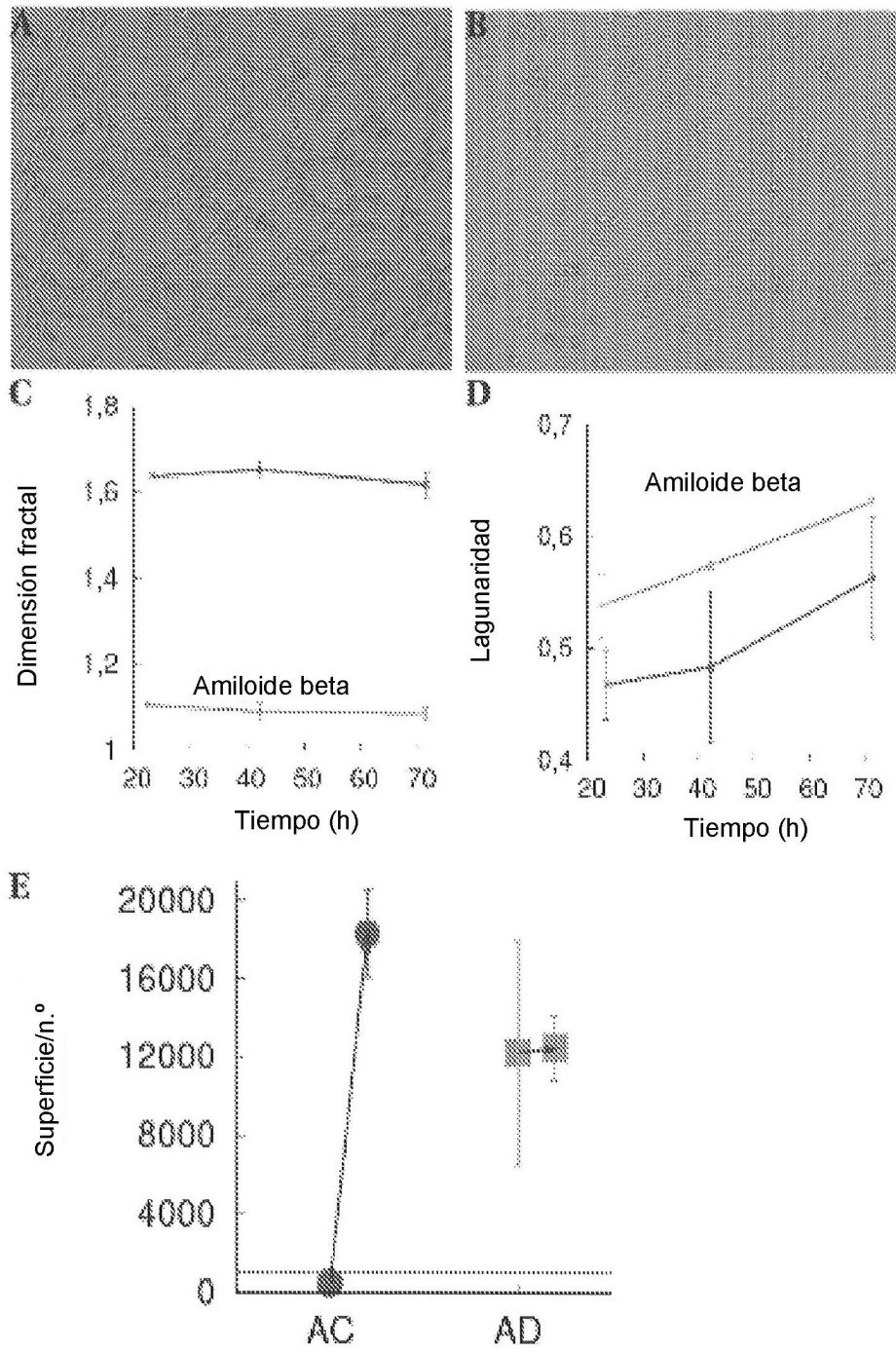


FIG. 7

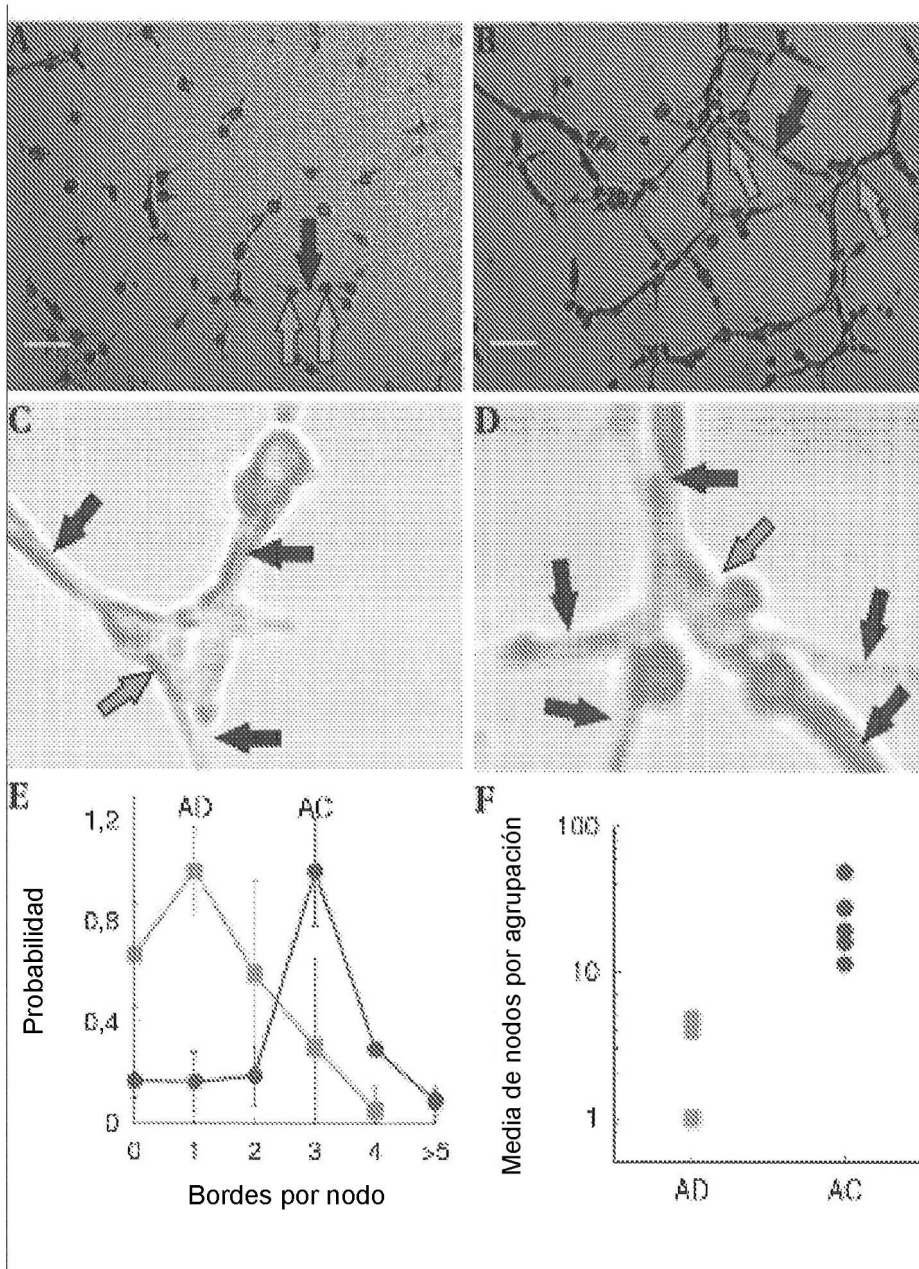


FIG. 8