

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 243**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

G06F 17/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012 PCT/US2012/021233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 12742044 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2670857**

54 Título: **Ensayo de viabilidad celular en 3D**

30 Prioridad:

01.02.2011 US 201161438310 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2017

73 Titular/es:

**NANO3D BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
7000 Fannin Street Suite 2140
Houston, TX 77030, US**

72 Inventor/es:

SOUZA, GLAUCO, R.

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 644 243 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

Ensayo de viabilidad celular en 3D

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad del documento 61/438.310, presentado el 1 de febrero de 2011.

SECTOR DE LA INVENCION

- 10 La invención se refiere a los campos de ensayos celulares para diagnóstico, toxicología, descubrimiento de fármacos, así como análisis de imágenes, nanotecnología, materiales, medicina, biología celular e ingeniería de tejidos. Más particularmente, las composiciones y métodos de la presente divulgación se refieren a métodos de magnetización de células, cultivo de células en 3D, levitación de células, manipulación de células y modelado de células utilizando campos magnéticos, así como a métodos de análisis de imágenes y detección en tiempo real sin marcadores con aplicaciones en pruebas de toxicidad, pruebas de drogas, cribado de alto rendimiento, cribado de alto contenido, viabilidad celular, interacción célula-célula, cicatrización de heridas y ensayos de optimización de cultivos celulares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 20 La mayoría de las retiradas de fármacos y de los retrasos en las aprobaciones reguladoras son el resultado de acontecimientos adversos inducidos por fármacos y las razones más frecuentes para la retirada de un fármaco son la nefrotoxicidad y la hepatotoxicidad. Por ejemplo, se conocen dos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ampliamente prescritos, el ibuprofeno y el paracetamol, de los que se sabe que son compuestos nefrotóxicos¹ y hepatotóxicos, respectivamente. Sin embargo, los mecanismos de la toxicidad de los AINE y los acontecimientos
25 que producen la muerte celular son poco conocidos y los métodos de evaluación de estos efectos secundarios antes de la utilización en pacientes son de utilidad limitada.

- Los ensayos celulares en 2D *in vitro* actuales son fáciles y económicos de realizar, además de ser susceptibles de automatizar y ampliar. Por desgracia, los sistemas en 2D son a menudo malos predictores de hepatotoxicidad inducida por fármacos y pueden producir falsos positivos porque las células cultivadas en 2D tienden a ser más
30 sensibles a los agentes citotóxicos.

- Además, el entorno en 2D no refleja un ambiente celular natural y no es capaz de simular el estrés extracelular, tal como el estrés oxidativo y el estrés osmótico. Como ejemplo, es probable que las células renales cultivadas en 2D *in vivo*, en comparación con las de los modelos de cultivo celular, sean más susceptibles a las nefrotoxinas debido a la hiperosmolaridad, pero esto es difícil (si no imposible) de simular en cultivos de células en 2D. Por lo tanto, los
35 modelos de tejido en 3D, que pueden captar las interacciones célula-célula y célula-matriz y proporcionar un entorno más similar al *in vivo*, ofrecen una mejor plataforma para las pruebas de toxicidad.

- 40 Se están desarrollando materiales que pueden soportar condiciones de cultivos celulares tridimensionales (3D). La mayor parte del trabajo en las técnicas de cultivo celular en 3D hasta la fecha implica la rotación de los frascos, la utilización de un armazón exterior al cual las células puedan adherirse, la utilización de campos magnéticos para suspender las células o alguna combinación de estos enfoques.

- 45 Por ejemplo, Felder, en los documentos US2005054101, WO2005010162, describe un sustrato de hidrogel que forma un armazón exterior en el que las células pueden crecer y ser soportadas en un entorno 3D. Esto introduce un sustrato artificial con el cual las células interaccionan, en lugar de promover rápidamente interacciones célula-célula, y aunque supone una mejora sobre el cultivo en 2D, es probable que el armazón perturbe las células y permanezca en el producto final. Además, las células pueden crecer sobre microportadores o dentro de los mismos, pero las
50 células no pueden levitar de una manera en la que todo el contacto e interacción célula-célula sea posible.

- También hay un nivel de complejidad significativo implicado en la fabricación de los microportadores de Felder, que incluye una química laboriosa y la necesidad de un equipo complejo. Además, algimatrix, uno de los principales reactivos en la fabricación de los microportadores, puede ser una fuente de endotoxinas. El control de la flotabilidad
55 también parece ser relevante para facilitar la levitación y se controla mediante la infusión de burbujas de vidrio en los microportadores, lo que contribuye de nuevo a la complejidad y dificultad. Por último, se requieren unos equipos especializados para la agitación, lo que es necesario para lograr el intercambio de gases e impedir el aglutinamiento de los microportadores, y a menudo se utilizan agitadores de hélice para agitar las células. Sin embargo, se sabe que el esfuerzo cortante resultante de la agitación causa daño celular. Además, la agitación afecta a cualquier
60 control de forma magnética de los cultivos 3D.

- Becker, en los documentos US2009137018, WO2005003332, utiliza un revestimiento de partículas de núcleo magnetizado bioatrativas, iniciando de este modo la adherencia de las células biológicas a las partículas de núcleo magnetizadas y permitiendo su suspensión en un campo magnético. El revestimiento permanece con las células durante el cultivo, de modo que se introduce un elemento no natural en el cultivo y, probablemente, perturba a las
65 células. Los presentes inventores contemplan la utilización de un revestimiento biodegradable que podría eliminarse

en último término, pero no dan a conocer ninguno, por lo que no se sabe si este enfoque tendría éxito. Además, debido a que las células se cultivan en el núcleo de los microportadores, es improbable que la levitación de células individuales para que puedan reunirse por levitación magnética con el fin de promover la interacción célula-célula. Por lo tanto, no es obvio que el montaje rápido (horas) de estructuras multicelulares en 3D debido al contacto célula-célula pueda demostrarse cuando se utilizan microportadores. Asimismo, al cultivar células en los microportadores, no se demuestra el cultivo conjunto de diferentes tipos de células, especialmente levitando células individuales y, a continuación, poniéndolas en contacto magnéticamente. Por último, este sistema es engorroso y no es adecuado para aplicaciones de ampliación de escala y alto rendimiento.

Un mejor enfoque podría ser magnetizar temporalmente las células, lo que permite su cultivo en 3D. Por ejemplo, Akira, en los documentos US2006063252, WO2004083412, WO2004083416, utiliza liposomas catiónicos magnéticos (LCM) para magnetizar células mediante captación de los liposomas. A continuación, se cultivan las células magnetizadas en una lámina en el fondo de una placa utilizando atracción magnética y después se liberan para su utilización. Sin embargo, aunque puede producir láminas de células, las células todavía crecen en el fondo de una placa y, por lo tanto, este no es el verdadero cultivo en 3D mediante levitación magnética. Además, no se demostró ningún ensayo funcional.

Shimizu y Akira y otros han utilizado recientemente un guiado magnético para sembrar células sobre un vaso sanguíneo descelularizado. Su estudio muestra resultados alentadores, pero no utilizan las células magnetizadas como la fuente de tejido para descelularizar. Las células magnetizadas solo se utilizan para recelularizar los vasos sanguíneos descelularizados.

En la solicitud de patente WO2010036957, de Souza, las células se levitan en un campo magnético poniendo en contacto las células con un "hidrogel" que comprende un bacteriófago con nanopartículas que responden a un campo magnético. En particular, se utilizan fagos filamentosos, tales como los bacteriófagos fd, fl o M13. La forma en que funciona el método no está completamente clara, pero se ha enunciado la teoría de que los fagos proporcionan una estructura o conjunto de tipo gel que recubre las células y de alguna manera ayuda a las células a captar o adsorber las nanopartículas que responden magnéticamente. De este modo, incluso cuando el hidrogel se elimina por lavado, las células permanecen sensibles magnéticamente y pueden ser levitadas en un campo magnético apropiado. Sin embargo, aunque el hidrogel se elimina en su mayor parte por lavado, permanece el potencial de infectividad del fago o transferencia de material genético, y, por lo tanto, se desea dar a conocer un material que permita la captación o adsorción celular sin la utilización de fagos.

El documento WO2011038370, también de Souza, describe un hidrogel de segunda generación, que evita completamente la utilización de bacteriófagos para permitir la magnetización de las células. Además, actualmente se dispone en el mercado de una variación de los geles reivindicados a través de N3D BIOSCIENCES™, con el nombre comercial NANOSHUTTLE™. Este nuevo hidrogel proporciona un método superior de magnetización de células sin la utilización de agentes tóxicos o infecciosos y las células permanecen magnetizadas cuando el gel se elimina por lavado.

Hirschhaeuser y otros, y Lin y Chang describen mediciones de esferoides. Sin embargo, estos documentos utilizan puntos finales analíticos de imagen clásica/estándar, tales como crecimiento esferoide, recrecimiento o retardo del crecimiento. Ninguno de estos documentos describe o sugiere utilizar la contracción del cultivo como lectura de la viabilidad o la interacción de fármacos.

Aunque algunos de estos enfoques son prometedores todavía hay espacio para mejorar los métodos 3D de evaluación de la toxicidad de los fármacos que simulen con mayor precisión un entorno natural y que sean robustos, reproducibles y susceptibles de ampliación de escala.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Abreviatura	Definición:
D_f	Dimensión fractal, una cantidad estadística que da una indicación de en qué grado de complejidad parece que un fractal llena un espacio y en el presente documento se utiliza para obtener una aproximación del número de células en las estructuras 3D multicelulares generadas por MLM, determinado por la ecuación 3 siguiente.
MEC	Matriz extracelular
SFB	Suero fetal bovino
kg	Una constante llamada prefactor de estructura, que a menudo se determina de forma empírica y puede variar dependiendo del sistema que se esté midiendo y del tipo de medición. En el presente documento se eligió de forma arbitraria como 0,8, ya que el sistema simulado refleja los datos experimentales.
MLM	Método de levitación magnética
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio], utilizado en los ensayos de viabilidad o proliferación celular de la técnica anterior basados en la conversión enzimática del sustrato MTT en un color púrpura.

Abreviatura	Definición:
HPF	Fibroblasto primario humano
SMC	Células de músculo liso
HEK	Riñón embrionario humano
EpiBr	Epitelial bronquial
NIR	Espectroscopia en el infrarrojo cercano

La presente invención da a conocer un ensayo de viabilidad celular mejorado sin marcaje, en tiempo real. El método utiliza el cultivo de células en 3D mediante levitación magnética y combina la técnica de cultivo en 3D con el análisis de imágenes para evaluar la viabilidad celular y la interacción célula-célula.

En el presente documento, mediante "cultivo" se incluyen el cultivo de tipos individuales de células o el cultivo conjunto de más de un tipo de células.

En general, el método de detección de la viabilidad celular se basa en el principio de que las células muertas se lisan, por lo que o bien pierden todas las partículas magnéticamente sensibles y, por lo tanto, no vuelven a levitar, o bien la muerte de las células hará que los cúmulos de células en 3D se desintegren. Por lo tanto, en el método solo se obtendrán imágenes de las células vivas. El aumento de la muerte celular dará lugar a más grupos de células, pero más pequeños y más difusos o porosos. Además, debido a que la dimensión fractal es una función tanto de la estructura como del número de células N, la replicación de las células viables aumentará N, por lo que aumentará la dimensión fractal de las estructuras multicelulares.

La presente invención también permite monitorizar y medir la viabilidad celular (salud de las células) o las interacciones célula-célula en respuesta a cualquier agente de ensayo (incluyendo células y proteínas de la matriz extracelular como agentes) introducidos en el cultivo o un cambio ambiental. La técnica es novedosa en cuanto a que se combina la formación rápida del cultivo de células en 3D mediante levitación magnética con el análisis de imágenes de parámetros topológicos para cuantificar la viabilidad celular o las interacciones célula-célula. El método se puede describir simplemente del siguiente modo:

1. En primer lugar, se levitan las células para permitir el crecimiento del cultivo en 3D.
2. Se toman microfotografías de bajo aumento (4X) de las células en 3D.
3. Dichas fotomicrografías se analizan utilizando, por ejemplo, el software imageJ (software libre) para medir, por ejemplo, la dimensión fractal, el número de grupos de células, el tamaño del grupo de células, la apertura de tejido y/o el área total de los grupos de células y otros parámetros celulares como se ha descrito. Esta etapa se puede llevar a cabo en cualquier momento durante o después del experimento.
4. A continuación, a las células se añade un fármaco o agente candidato (incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, fármacos, toxinas ambientales, factores de crecimiento, inhibidores, nanopartículas, mezcla homogénea o heterogénea de células y/o mezcla homogénea o heterogénea de proteínas y/o péptidos de la matriz extracelular), habitualmente una configuración dependiente de la dosis y/o el tiempo (por ejemplo, diferentes muestras tienen diferentes dosis de fármaco).
5. Se repiten las etapas 2 y 3.
6. Por último, la salida del análisis de imágenes (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, la dimensión fractal, el número de grupos de células, el tamaño del área de los grupos, el área total de los grupos) se representa frente al tiempo y/o la concentración de fármaco y dichos datos se utilizan para determinar el efecto del agente de ensayo sobre las células.

Los agentes de ensayo pueden ser cualquier cosa cuya toxicidad se desee analizar, incluyendo fármacos, otros tipos de células, componentes celulares, supuestas toxinas o cualquier agente o sustancia química medioambiental o industrial.

Aunque anteriormente se ha descrito de forma lineal y escalonada, esto es solo para facilitar la comprensión, y habitualmente, todas las muestras (control cero de fármaco, más múltiples muestras con dosis crecientes de fármaco) pueden procesarse en paralelo. En la alternativa, las muestras se pueden cultivar durante 1-7, preferentemente 2-3 días, para alcanzar un tamaño suficiente, y se añade el fármaco en un momento posterior.

Además, aunque los presentes inventores han utilizado en el presente documento un imán de anillo simple, se sabe cómo influir en la forma y estructura del cultivo en 3D variando el campo magnético. Por último, aunque es preferente utilizar levitación magnética, como se describe en el presente documento, en el método se puede utilizar cualquier método de cultivo en 3D.

Preferentemente, las fotos se toman mientras las células están todavía levitando, porque se espera que esto minimice la interrupción del cultivo. Sin embargo, esto no es esencial, y se puede fotografiar un cultivo en 3D cuando no está levitando. Esto puede ser particularmente apropiado para algunos ensayos, tales como ensayos de cicatrización de heridas en los que se mide la velocidad de cierre de un hueco u orificio en una estructura multicelular.

Preferentemente, se asigna a la imagen de la muestra de control (sin fármaco o agente) un valor de referencia de la viabilidad del 100% y la dosis más baja que produce muerte celular total se asigna como el valor de referencia de viabilidad del 0%. Por lo tanto, cualquier valor intermedio debe reflejar la toxicidad del fármaco o agente. Estos cálculos son similares a los utilizados para diversos agentes colorimétricos, tales como MTT, siendo la diferencia que otros métodos utilizan color y el método de la presente invención utiliza variables topológicas, tales como la dimensión fractal y, por lo tanto, evita la adición de cualquier agente químico o marcador señalizador.

Como prueba del sistema, los presentes inventores compararon los datos de MTT a partir de los cultivos en 2D con el método en 3D de la invención (figura 3) y descubrieron que los resultados eran comparables, aunque la estructura en 3D proporciona un efecto protector a las células en el interior del cultivo, lo que se refleja en un aumento significativo de la viabilidad celular.

Con más detalle, la presente invención es un ensayo de viabilidad celular que comprende cultivar células levitadas para formar estructuras celulares en 3D, tomar microfotografías de dichas células en uno o más puntos temporales (no se requiere que las células estén levitadas durante la fotografía, pero es preferente minimizar las interrupciones en el cultivo), analizar dichas microfotografías para medir uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área de los grupos de células; en el que el número de grupos de células y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula. El método puede comprender además el análisis de dichas microfotografías para medir una o más de entre i) la dimensión fractal (una indicación estadística de en qué grado de compleción llena un fractal el espacio, utilizada para obtener una aproximación del número de células en el cultivo en 3D), ii) el tamaño del grupo de células o iii) la velocidad de cierre de la herida, y uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células; en la que la dimensión fractal, la velocidad de cierre de la herida y el tamaño del grupo de células son directamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula, y el número de todos los grupos y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula.

También puede haber una pluralidad de muestras de células levitadas, estando dichas muestras con y sin una o más concentraciones de diversos agentes de ensayo o añadiendo agentes de ensayo en uno o más puntos temporales. Generalmente, una disminución de la viabilidad celular con dicho agente de ensayo indica que el agente de ensayo es inhibidor, y un aumento de la viabilidad celular indica que dicho agente de ensayo es estimulador. El mismo método puede evaluar un gran número de variables, incluyendo la toxicidad del agente, la estimulación del crecimiento, la estimulación mitótica, la cicatrización de heridas, las interacciones célula-célula, el tamaño celular, el crecimiento celular, los cambios estructurales celulares y similares.

Además, aunque nos hemos centrado en la viabilidad y en las interacciones célula-célula en la presente memoria, el método también puede proporcionar información importante sobre la forma y la estructura celular, que se correlacionan con cambios importantes en el estado celular. Por ejemplo, algunas células se vuelven más redondas en la transformación en una célula cancerosa, el crecimiento/elongación de las células endoteliales durante el proceso de angiogénesis, y similares.

Además, el método puede combinarse con otros métodos, por ejemplo, tinción celular y nuclear, y los efectos sobre el tamaño de las células, la relación núcleo/citoplasma, la redondez celular y similares pueden proporcionar también información importante sobre el estado de la célula. Estos ensayos pueden realizarse después de que los efectos del agente de ensayo sobre la viabilidad celular y/o la diferenciación celular (en el caso de las células madre) se hayan determinado mediante microfotografía, o bien se pueden preparar muestras separadas para los mismos.

En algunas realizaciones, la presente invención es un ensayo de viabilidad celular o un ensayo de interacción célula-célula, que comprende: cultivar un cultivo celular en 3D con uno o más tipos de células; tomar microfotografías de dicho cultivo celular en 3D en uno o más puntos temporales; analizar dichas microfotografías para medir uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células, en el que el número de grupos de células y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular, las interacciones célula-célula o los tipos celulares presentes en el cultivo. El método puede comprender además el análisis de dichas microfotografías para medir una o más de entre i) dimensión fractal (una indicación estadística de en qué grado de compleción llena un fractal el espacio, utilizada para obtener una aproximación del número de células en el cultivo en 3D), ii) el tamaño del grupo de células o iii) la velocidad de cierre de la herida y uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células; en la que la dimensión fractal, la velocidad de cierre de la herida y el tamaño del grupo de células son directamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula, y el número de todos los grupos y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula.

El método puede incluir cultivar una pluralidad de cultivos en 3D para su utilización como cultivos de control y cultivar una pluralidad de cultivos en 3D para su utilización como cultivos de ensayo, en el que se añade un agente de ensayo a dichos cultivos de ensayo, y evaluar el efecto de dicho agente de ensayo sobre dicha viabilidad celular, las interacciones célula-célula, la interacción célula-matriz extracelular o los tipos celulares presentes en el cultivo (cuando se cocultivan células).

El método también puede incluir la adición de cantidades variables de dicho agente de ensayo a dicha pluralidad de cultivos de ensayo, tomar una pluralidad de microfotografías de dicho cultivo celular en 3D en una pluralidad de puntos temporales y/o lavar dicho agente de ensayo y tomar una pluralidad adicional de microfotografías de dicho cultivo celular en 3D en una pluralidad adicional de puntos temporales.

En realizaciones preferentes, las células se levitan con una composición que comprende: a) una nanopartícula cargada negativamente; b) una nanopartícula cargada positivamente; y c) una molécula de soporte, en la que una de entre dicha nanopartícula cargada negativamente o nanopartícula cargada positivamente contiene un material magnéticamente sensible, tal como hierro u óxido de hierro, y en el que dicha molécula de soporte retiene dicha nanopartícula cargada negativamente y dicha nanopartícula cargada positivamente en una mezcla íntima.

Preferentemente, la molécula de soporte comprende péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros, polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, gelatina, ácido nucleico, mezclas de proteínas de la matriz extracelular, anticuerpo o mezclas o derivados de los mismos, b) en la que dicha nanopartícula cargada negativamente es una nanopartícula de oro, y c) en la que dicha nanopartícula cargada positivamente es una nanopartícula de óxido de hierro. Más preferentemente, la composición es NANOSHUTTLE™.

En algunas realizaciones $D_f = [\log(N) - \log(kg)] / \log(L/a)$ y D_f es la dimensión fractal, kg es el prefactor de la estructura y es una constante, N es el número de células, a es el diámetro de una célula y L es la longitud de la caja. Además,

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{D_{f \text{ muestra}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}}{D_{f \text{ control}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}}$$

y $D_{f \text{ muestra}}$ es la dimensión fractal del cultivo de ensayo y $D_{f \text{ control}}$ es la dimensión fractal del control. Sin embargo, pueden utilizarse otros métodos para calcular los mismos.

En ensayos de cierre de heridas, hay dos aproximaciones para generar una herida: en una, el cultivo en 3D se perfora para formar una herida, y en la otra el cultivo en 3D se ralla mecánicamente y, a continuación, se modela magnéticamente en una estructura de anillo. En ambos casos, se puede añadir un agente de ensayo a dicho cultivo en 3D herido, y

$$\text{Cierre de la herida (\%)} = 100\% - \left(\frac{\text{área de la herida}_t}{\text{área de la herida}_{t_0}} \times 100 \right)$$

en el que el área de la herida_t es el área de la herida en un momento dado después de la adición de un agente de ensayo, y el área de la herida_{t0} es el área de la herida antes de añadir dicho agente de ensayo.

El ensayo celular puede utilizarse en diversas aplicaciones, incluyendo, como mínimo, evaluar los efectos de un agente de ensayo sobre la toxicidad, la cicatrización de heridas, la actividad mitótica, la estimulación del crecimiento, las interacciones célula-célula, la viabilidad o la estructura celular y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Esquema de (1) células dispersadas en una placa de Petri, y células en levitación (3) concentradas magnéticamente y que se recogieron utilizando un imán en forma de anillo (5).

Figura 2. Micrografías de contraste de fase de la morfología en 3D de HEK293 a un aumento 4X en condiciones no tratadas (control) y después del tratamiento con 0, 0,25, 1, 2, 4, 10 mM de ibuprofeno durante 0, 4, 24, 48, 72, 96 y 168 horas (la barra de escala es de 500 μm).

Figura 3. Porcentaje de viabilidad frente al logaritmo de la concentración de ibuprofeno para células HEK293 durante un periodo de tiempo de dosificación de 24 horas. Para el ensayo en 3D sin marcadores se promediaron los datos y se indican las barras de error. La DL50 puede determinarse extrapolando la concentración de fármaco al 50% de viabilidad.

Figura 4. Cálculos simulados de la teoría fractal utilizando la ecuación:

$$D_f = [\log(N) - \log(kg)] / \log(L/a)$$

en la que 1 unidad (a) es el diámetro de una célula y la longitud (L) de la caja era 9,8 unidades. Kg es una constante llamada prefactor de la estructura, que se elige de forma arbitraria como 0,8 en el presente documento. El número de células (N) varía. Los valores de la dimensión fractal calculada (D_f) son (a) 1,47, (b) 1,59, (c) 1,86 y (d) 1,94 para las cuatro estructuras. Por tanto, el D_f es proporcional a la viabilidad celular.

Figura 5. Crecimiento simulado de cultivo celular en 3D con un tipo de células (a-g) o dos (j-m) a lo largo del tiempo. Las partes a–g representan un cultivo sano que crece a lo largo del tiempo, en el que se va añadiendo cada vez más fármaco a los cultivos d–g. Las partes h-i representan gráficos de los cultivos d-g expuestos a concentraciones crecientes de dosis de fármaco a tiempos crecientes. Los valores de D_f calculados son (a) 1,7265, (b) 1,7678, (c) 1,8144, (d) 1,8935, (e) 1,7195, (f) 1,6734, y (g) 1,5405. La D_f y la viabilidad frente al crecimiento del cultivo sano a lo largo del tiempo (h) y la concentración de fármaco/toxina (i). Las partes j-m representan un cocultivo sano de dos tipos de células, en las que hay un número creciente de un tipo de célula (óvalos pequeños). La parte n representa el gráfico de los cultivos j-m con un número creciente de células de un tipo de célula (óvalos pequeños) donde el otro tipo de células (óvalos grandes) se mantiene constante. Los valores de D_f calculados son (j) 1,418, (k) 1,812, (l) 1,844 y (m) 1,912. D_f frente al número de células de un tipo de célula de un sistema simulado cocultivado (n).

Figura 6. Varios gráficos basados en datos simulados. (a) D_f frente a la concentración, (b) número de células frente a la concentración, (c) tamaño promedio frente a la concentración, (d) área total frente a la concentración, (e) D_f frente al tiempo, (f) número de células frente al tiempo, (g) tamaño promedio frente al tiempo, y (h) área total frente al tiempo.

Figura 7. Varios gráficos basados en los datos físicos mostrados en la figura 2. (a) Dimensión fractal (D_f), (b) tamaño promedio del grupo (px^2), y (c) área total (px^2) para células HEK293 expuestas a concentraciones variables de ibuprofeno durante 1, 24 y 168 horas. Viabilidad celular basada en (d) la dimensión fractal (D_f), (e) tamaño promedio del tamaño del grupo y (f) área total (en la que px^2 es una unidad arbitraria de área y representa píxel al cuadrado). La concentración 0 mM contiene DMSO, pero sin fármaco.

Figura 8. Las micrografías de contraste de fases muestran la morfología de los hepatocitos en 3D a un aumento de 4X en condiciones no tratadas (control) y después del tratamiento con paracetamol 4 y 8 mM ("APAP") durante 0, 24, 48, 72, 144 horas, seguido de recuperación sin APAP a 168, 192 y 216 horas después de la dosis inicial del fármaco (la barra de escala es de 500 μm).

Figura 9. Viabilidad celular del epitelio bronquial ("EpiBr") frente al tiempo de exposición a xileno. Las células en 3D mueren (panel superior derecho, la flecha derecha apunta a la viabilidad del 0% trazada) o pierden completamente su estructura escamosa o de tipo azulejo característica de epitelios sanos (panel superior izquierdo, la primera flecha apunta a la viabilidad del 100% trazada) después de la exposición final a xileno (3D) (la flecha de en medio apunta al último punto de tiempo de exposición). Esto es importante para la prueba de toxicidad de los factores aéreos, en la que se puede levantar el tejido a la interfaz aire-líquido y exponer las células a un gas. Para mostrar que solo las células en la interfaz aire-líquido se vieron afectadas, los presentes inventores también muestran las células que se cocultivaron en 2D en el fondo de la placa de Petri expuesta a xileno (panel inferior derecho e izquierdo).

Figura 10. Fotografías de hojas de tejido de HEK293 cultivadas en placas de cultivo celular no adherentes y adherentes.

Figura 11. (A) Fotomicrografías de células HEK293 cultivadas en 2D que muestran el cierre de rasguño frente al tiempo (0, 2, 4, 24 y 216 horas) con medio suplementado con 0 o 10% de SFB (aumento de 4x, barra de escala de 500 μm). (B) Porcentaje de cierre de rasguño frente al tiempo para medios suplementados con 0, 1, 5 y 10% de SFB. La velocidad de cierre se obtiene ajustando los datos entre las líneas discontinuas. (C) Velocidad de cierre frente al % de suero utilizando los datos mostrados en (C).

Figura 12. (A) Fotomicrografías de células HEK293 cultivadas en 3D que muestran el cierre de orificios frente al tiempo (0, 2, 4 y 24 horas) con medio suplementado con 0 o 10% de SFB (aumento de 4x, barra de escala de 500 μm). (B) Porcentaje de cierre de orificios frente al tiempo para medios suplementados con 0, 1, 5 y 10% de SFB. La velocidad de cierre se obtiene ajustando los datos entre las líneas discontinuas. (C) Velocidad de cierre frente al % de suero utilizando los datos mostrados en (B).

Figura 13. Fotomicrografías de fibroblastos primarios humanos (a y d, HPF, 500.000 células) y células de músculo liso (c y f, SMC, 500.000 células) y cocultivo (1:1, HPF-SMC) de fibroblastos primarios humanos (250.000 células) con células de músculo liso (250.000 células)(b y e) cultivadas en 3D, mostrando el cierre de orificios frente al tiempo (3, 12, 20 y 34 horas) cuando se cultivaron en medio de músculo liso (a-c, izquierda) o medio de fibroblastos (d-f, derecha) (SCIENCECELL RESEARCH LABORATORIES™, Carlsbad, CA; medio de fibroblastos, número de catálogo: #2301; y medio de células de músculo liso, número de catálogo: medio #1101; aumento 2,5X, la barra de escala es 300 μm).

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

La presente invención es un método de detección sin marcador que evalúa y cuantifica la viabilidad celular o las interacciones célula-célula combinando el cultivo de células en 3D mediante levitación magnética y/u orientación magnética y análisis de imágenes de características topológicas, incluyendo el análisis de la dimensión fractal. La cohesividad de la estructura de los cultivos celulares en 3D es sensible a la presencia de agentes tóxicos u otros agentes, independientemente de si su modo de acción perjudica a la viabilidad celular, al crecimiento o las interacciones célula-célula. Por lo tanto, los presentes inventores aplicaron herramientas topológicas para cuantificar la viabilidad celular resultante de los cambios en la estructura multicelular en 3D en términos, por ejemplo, de dimensión fractal, tamaño del cultivo en 3D, tamaño de la herida y número de grupos celulares, etc., en función de la concentración del agente tóxico y/o del tiempo.

Entre las ventajas claras de la presente invención se incluyen: 1. evaluación de la viabilidad sin marcador, 2. capacidad para monitorizar la viabilidad frente al tiempo sin alterar ni destruir la muestra, 3. solo se necesita un microscopio invertido estándar (luz transmitida, equipado con cámara) y el equipo de cultivo celular, 4. la utilización del cultivo en 3D es una gran mejora con respecto a la utilización de monocapas en 2D, 5. la técnica es adaptable al alto rendimiento y 6. la cantidad de información recopilada puede aumentarse mediante la recopilación de imágenes en planos diferentes (proporcionando de este modo más datos en 3D) utilizando microscopia confocal o desconvolución, imágenes en tiempo real, imágenes resueltas en espectros (tales como imágenes hiperespectrales) y/o microscopia de fluorescencia.

Otra ventaja de esta técnica es que no es sensible al tamaño de las estructuras multicelulares, siempre que se llene el campo elegido para el análisis de la dimensión fractal. La dimensión fractal es sensible tanto a las interacciones célula-célula, que acerca a las células, como a la viabilidad y el crecimiento celular, como se muestra a continuación.

En la geometría fractal, la dimensión fractal, D , es una cantidad estadística que da una indicación del grado de complejidad con que un fractal parece llenar el espacio, a medida que se baja a escalas cada vez más pequeñas. Hay muchas definiciones específicas de la dimensión fractal. Las dimensiones fractales teóricas más importantes son la dimensión de Rényi, la dimensión de Hausdorff y la dimensión de empaquetado. La dimensión de recuento de cajas y la dimensión de la correlación son ampliamente utilizadas, en parte debido a su facilidad de implementación. En el presente documento, los presentes inventores han utilizado la metodología de recuento de cajas, pero es posible utilizar otros métodos siempre que el método se emplee de forma coherente.

Esta técnica de análisis permite obtener datos frente al tiempo de dosificación del fármaco sin necesidad de muestras adicionales para cada punto de tiempo, que se requieren para los ensayos fluorescentes y colorimétricos actuales. El método de la levitación magnética o "MLM", junto con el análisis de la dimensión fractal, parece ser una valiosa herramienta para los estudios toxicológicos *in vitro* sobre células renales, hepatocitos y células pulmonares, y muchos otros tipos celulares, e incluso mezclas de tipos celulares que forman estructuras similares a tejidos.

Además, se pueden eliminar los fármacos por lavado y evaluar la recuperación. Por lo tanto, cada cultivo celular en 3D puede funcionar como su propio control y esto mejora aún más la fiabilidad de los resultados.

Se pueden conseguir mejoras adicionales acoplando esta técnica a la medición de la intensidad de la luz transmitida, la detección de autofluorescencia de las células, la detección de fluorescencia, la desconvolución en 3D o la microscopia confocal, la microscopia de campo oscuro (o luz dispersa) y/o la microscopia multifotónica.

También podría acoplarse la quimioluminiscencia a este sistema, pero la adición de un sustrato quimioluminiscente podría poner en peligro la viabilidad y el valor de una técnica sin marcador. Lo mismo ocurre con la fluorescencia, ya que se necesitaría introducir células modificadas (tales como células que expresan GFP) o moléculas fluorescentes en el cultivo, por lo tanto, posiblemente poniendo en peligro la viabilidad del sistema y haciendo que ya no fuera sin marcador. Sin embargo, también podría utilizarse detección/obtención de imágenes NIR y puede haber casos en los que las ventajas superen a las desventajas de la adición de un marcador artificial al sistema.

Además, cabe esperar que los valores de D_f y los cambios de la D_f frente al tiempo sean característicos de cada tipo de célula, linaje celular y composición celular dentro del mismo cultivo. Por lo tanto, la presente invención podría utilizarse para tabular la D_f de diversos tipos de células y el cocultivo de células, con el fin de utilizar este método para identificar y diferenciar diferentes tipos de células o mezcla de células.

La presente invención también podría utilizarse para evaluar las interacciones de proteínas resultantes de las interacciones célula-célula. Debido a que la formación de cultivos celulares en 3D a menudo está mediada por la interacción entre las proteínas de membrana celular durante el contacto célula-célula, el número y la distribución de estas proteínas en la membrana celular y la constante de disociación de estas proteínas también deben influir sobre la D_f . Por ejemplo, los cultivos en 3D de células con un mayor número de estas proteínas de superficie distribuidas de forma uniforme alrededor de la célula, deben mostrar una D_f mayor (grupos más apretados) que los sistemas con menor cobertura de células proteicas y/o con proteínas localizadas (o centradas) en posiciones celulares específicas. Esto también sugiere que la polarización celular podría también influir en la D_f . Este análisis también

podría utilizarse cuando se estudia la inhibición de las proteínas de la superficie celular o cuando se silencian genes responsables de la producción de tal proteína (tal como cuando se utiliza “ARN pequeño”, pero no se limita a este). El bloqueo de las proteínas en la superficie celular, mediante la utilización de anticuerpos o péptidos, por ejemplo, también podría influir en los cambios en la D_f . Por lo tanto, los cambios en los niveles de expresión proteica y la accesibilidad a las proteínas deberían influir sobre los cambios en la D_r . Por tanto, el método permite la medición de diversas interacciones célula-célula y el análisis de agentes que rompen las mismas.

Finalmente, este tipo de análisis de imágenes también podría utilizarse con cultivos en 3D que no se leviten magnéticamente, en los que estos cultivos crecen sobre una superficie, en una matriz y/o agrupados en 3D en el fondo de un pocillo o en otra superficie. Sin embargo, hay inconvenientes para otros métodos de cultivo en relación con la utilización del método de levitación magnética de los inventores. La clara ventaja del método de levitación magnética es su capacidad para juntar rápidamente las células y mantenerlas juntas mientras se monitorizan la D_f y otras variables topológicas. Cuando se utilizan otros sistemas de cultivo celular, las células pueden dispersarse en grandes áreas, lo que dificulta la toma de muestras y el análisis de las imágenes. Además, todas las desventajas asociadas con otros sistemas de cultivo también se aplican a la evaluación de la viabilidad y los cultivos en 3D se aproximan más estrechamente a los tejidos naturales.

EJEMPLO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y cultivo celulares: Se adquirieron células de riñón embrionario humano (HEK293) de la Colección Americana de Cultivos tipo (ATCC™, n.º de cat. CRL-1573). Se propagaron células HEK293 utilizando un medio base de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (MEDIATECH™ INC., 10-017-CV) suplementado con suero bovino fetal (ZEN-BIO™, SER-500), Pen-Strep (SIGMA-ALDRICH™, P4333), HEPES (99%, para bioquímica, ACROS ORGANICS, 1725-71000), y bicarbonato sódico (SIGMA-ALDRICH™, S-8875). Se utilizaron solución salina tamponada con fosfato (PBS) (SIGMA-ALDRICH™, P4417-100TAB) y tripsina/EDTA 1x (MEDIATECH™ INC., 25-053-CI) para subcultivar las células. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera con el 5% de CO₂. Las células se centrifugaron durante 1,5 minutos a ~1.380 RCF.

Compuestos: Se disolvió (+/-)-ibuprofeno (SIGMA ALDRICH™, I110) en dimetilsulfóxido (DMSO) (FISHER SCIENTIFIC™, BP2311). Los controles positivos consistieron en tratar células con la misma solución madre utilizada para administrar compuestos sin ninguna toxina añadida a una concentración del 1% en el medio. Los controles negativos consistían en células sin tratamiento de la solución madre.

La imagen del área de la herida se realizó utilizando un microscopio invertido LEITZ™ Labovet FS. El análisis de imágenes en las imágenes de microscopía de campo brillante se realizó con el software IMAGEJ 1.43u. En el programa ImageJ, el archivo de imagen se abrió y la escala se ajustó a una longitud de unidad en mm. Con la imagen maximizada, se trazó el área del rasguño u orificio utilizando la herramienta pincel y se dibujó una línea negra alrededor del borde del rasguño u orificio lineal. El área del rasguño u orificio se determinó primero seleccionando la herramienta de la varita, después seleccionando la línea negra pintada y, finalmente, seleccionando la medida. A continuación se registró el área resultante.

Ensayo de rasguño en 2D: Se cultivaron células HEK293 a una confluencia > 90% en placas de cultivo adherentes y se crearon rasguños raspando manualmente una punta de pipeta de 200 µl (con un diámetro aproximado de 0,90 mm) a lo largo de la monocapa celular. Las placas de cultivo celular de 6 pocillos utilizadas para el cultivo en 2D fueron multiplacas estériles no tratadas para cultivos de células en suspensión (NUNC™, 150239). Las marcas se hicieron en el exterior de la placa de cultivo como puntos de referencia para la adquisición de imágenes, de modo que la misma área pudiera monitorizarse con el tiempo.

Ensayo de heridas en 3D: Se generaron cultivos celulares en 3D levitadas utilizando el kit Bio-Assembler™ de 6 pocillos (NANO3D BIOSCIENCES™, INC.) que consistía en una solución NANOSHUTTLE™, una unidad magnética de placas de 6 pocillos y una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos. La solución NANOSHUTTLE™ es una solución de conjunto de nanopartículas de nanopartículas óxido de hierro (Fe₂O₃) y nanopartículas de Au montadas en una solución acuosa de poli-L-lisina que promueve la captación celular de las nanopartículas.

La unidad magnética es un montaje de acrílico que lleva 6 imanes de tipo copa de APPLIED MAGNETS™ (Plano, TX, número de modelo: Cup-32) o 24 imanes de cilindro de K&J MAGNETS™ (Jamison, PA, número de modelo: D48-N52). El valor del campo en el centro del menisco, donde residen las células cuando levitan, aproximadamente a 18 mm (sistema de 6 pocillos) y 4 mm (sistema de 24 pocillos) por debajo del fondo del imán, es 300 G. Los campos se calcularon utilizando el programa Finite Element Method Magnetics¹², y se confirmó con una sonda Gauss meter. Las placas de 6 pocillos y de 24 pocillos utilizadas para el cultivo en 3D eran placas de pocillos múltiples de inserción ultra baja (COSTAR®, 3471 o 3473).

Las células se cultivaron primero en 2D a una confluencia de ~80%, después se trataron con NANOSHUTTLE™ (NANO3D BIOSCIENCES™, Houston TX) y se colocaron en un incubador estándar de cultivo celular en CO₂ durante un período de incubación de 12 horas. A continuación, las células se digirieron con tripsina para separarlas del recipiente y entre sí. La tripsina se inactivó y las células se contaron y se centrifugaron y, a continuación, se

sembraron en pocillos individuales de una placa de 6 pocillos utilizando medios recomendados para su tipo celular específico. El volumen de medio en cada pocillo era de 1,0 ml. Una unidad magnética se colocó inmediatamente por encima del cultivo y las fuerzas magnéticas levitan suavemente y guían a las células a juntarse para inducir rápidamente las interacciones célula-célula y formar conjuntos en 3D. A continuación se incubaron los cultivos levitados.

Para los experimentos presentados en el presente documento, las células HEK293 se levitaron durante 12 horas y, después, se perforó un orificio en el conjunto de acuerdo con el procedimiento siguiente. Se retiró la unidad magnética de encima de la placa de cultivo y se colocó debajo de ella para tirar suavemente del conjunto hasta el fondo y mantener las células en su sitio. Se utilizó un tubo capilar estéril para perforar un orificio en el esferoide celular. Los tubos capilares (DRUMMOND SCIENTIFIC™, Broomall Pa., Cat # 1-000-800) tenían una longitud de 75 mm, un diámetro interno de 0,4 mm y un diámetro externo de 0,8 mm. Después de retirar el tubo capilar, quedó un defecto circular. Se encontró que un tubo capilar creaba un orificio circular consistente, aunque para imitar heridas más complejas se pueden desarrollar y utilizar otros dispositivos de punción con otras formas.

Después de crear la herida, se llevó el volumen de los medios a 1,5 ml y el imán se colocó de nuevo por encima del cultivo para volver a levitar las células. La placa de cultivo celular se colocó en una platina de microscopio para obtener microfotografías por formación de imágenes a través de la abertura central en el imán. A continuación se colocó la placa de cultivo celular en el incubador de cultivo de células, pero se retiró para monitorizar las células mediante microscopia a intervalos regulares durante el cierre de la herida. Las células se mantuvieron reponiendo los medios cada dos días.

Para otro experimento, los fibroblastos primarios humanos (HPF), las células de músculo liso primarias (SMC) y un cocultivo de estas dos células (50% de HPF y 50% de SMC o HPF-SMC) se levitaron durante 4 a 24 horas con el sistema de levitación magnética de 24 pocillos para generar cultivos en 3D cohesivos y, a continuación, se generó un orificio de acuerdo con el siguiente procedimiento.

La unidad magnética se retiró de encima de la placa de cultivo y los cultivos se trituraron después por medio de 4 acciones de pipeteado repetidas con una pipeta P1000 (1.000 microlitros). Pueden utilizarse otros métodos mecánicos de cizalla o corte para fragmentar el cultivo en 3D, tal como agitación en vórtex y/o corte.

Una matriz de 24 imanes de anillo (1/4 pulgadas de diámetro externo x 1/16 pulgadas de diámetro interno x 1/16 pulgadas de espesor de K&J Magnets, Jamison, PA, Número de modelo: R411) pegado en una placa acrílica y distribuido para encajar debajo del centro de los pocillos de las placas de 24 pocillos se colocaron por debajo de la placa de 24 pocillos (Ultra Low Attachment Multiple Well Plates, Corning, Inc.) que portaba los cultivos. El campo magnético de estos imanes reestructura (o modela) los cultivos triturados en estructuras de forma de anillo. El diámetro interno de estos anillos es de aproximadamente 1/16 pulgadas, aunque este tamaño puede reducirse o incrementarse aumentando o disminuyendo el número de células del pocillo, respectivamente. Normalmente se utilizan placas de fijación ultrabaja, pero se pueden utilizar otras placas con otras modificaciones de superficie como superficie para modelar magnéticamente los cultivos triturados, tales como superficies de adhesivo celular (a menudo modificadas con poli-L-lisina), placas de cultivo tisular revestidas/modificadas con matriz extracelular (incluyendo Matrigel™, BD, Inc.), revestidas con colágeno, modificadas con hidrogel y gelatina, y similares.

Una vez que los imanes se colocan bajo la placa de cultivo de 24 pocillos y se conforma la forma de anillo, la matriz de imán se mantiene estática bajo el cultivo durante un período de 1 a 24 horas dentro del incubador de cultivo de tejidos. Después de este período de incubación, la placa de 24 pocillos se levanta del conjunto de imanes con un movimiento vertical directo. En este caso, no es deseable un movimiento horizontal (de lado a lado) para no deformar las estructuras en forma de anillo.

En una realización, después de modelar el cultivo en forma de anillo y antes de retirar la matriz de imanes, pueden manipularse las condiciones de cultivo y/o composición, tales como: i) añadiendo células al sistema (estas células pueden ser del mismo o diferente tipo celular y llevar o no llevar imanes NANOSHUTTLE™), ii) añadiendo o sobreponiendo o recubriendo las células modeladas con materiales de tipo matriz extracelular, gel o hidrogel, y/o iii) añadiendo moléculas o nanopartículas que puedan afectar (estimular o inhibir) al proceso de cierre de orificios de estos cultivos.

Después de crear la herida o la abertura del anillo, el volumen del medio se mantuvo constante y se dejó que estas estructuras permanecieran en el fondo de la placa de cultivo de tejidos no adherente. Por lo tanto, los cultivos no se volvieron a levitar. La placa de cultivo celular se colocó en una platina de microscopio para obtener microfotografías por formación de imágenes a través de la abertura central en el imán. A continuación se colocó la placa de cultivo celular en el incubador de cultivo de células, pero se retiró para monitorizar las células mediante microscopia a intervalos regulares durante el cierre de la herida. Las células se mantuvieron reponiendo los medios cada dos días o según lo necesario.

En estos ensayos se pueden incorporar células individuales y/o una combinación de tipos de células (cocultivo) que no llevan el NANOSHUTTLE™ (punzonado y modelado magnético) poniendo en capas/vertiéndolas sobre las

células magnetizadas. Las células que no llevan el NANOSHUTTLE™ una vez en contacto con las células magnetizadas (células portadoras de NANOSHUTTLE™), si son compatibles con el tipo de célula magnetizada, interaccionarán y se incorporarán como parte del tejido modelado. Por lo tanto, solo se necesita tratar o modificar un tipo de célula con NANOSHUTTLE™, aunque se puede tratar más de un tipo de célula si se desea.

EJEMPLO 2: ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La figura 1 muestra un esquema de células dispersadas (1) y células en levitación concentradas magnéticamente (3) cultivadas utilizando un dispositivo de pocillo único de MLM. Ahora, los presentes inventores han extendido esta técnica a un dispositivo de alto rendimiento comercialmente disponible que incluye una placa de cultivo estándar de seis pocillos con tapa (no mostrada) junto con una sobrecubierta diseñada especialmente o una cubierta secundaria (6-WELL BIO-ASSEMBLER™ MAGNETIC DRIVE, N3D BIOSCIENCES™) que sujeta seis imanes en su lugar sobre los seis pocillos. Por supuesto, son posibles otros tamaños de matriz. La utilización del dispositivo es tan simple como las técnicas estándar en 2D y se ha demostrado que es más rápido que cualquier otro producto de cultivo celular en 3D presente en el mercado.

La posición y la forma del conjunto de células en 3D se pueden controlar magnéticamente ajustando la posición y/o la forma del campo magnético. Sin embargo, la morfología de los conjuntos y la cantidad de tiempo necesario para alcanzar una etapa particular es específica de la célula. Algunos tipos de células, tales como las células epiteliales, forman hojas estratificadas y muestran una morfología escamosa, mientras que otras, tales como las células endoteliales de la vena umbilical humana, muestran estructuras ramificadas. Las estructuras levitadas se pueden separar para crear múltiples muestras y las células viables pueden retirarse del cultivo en 3D para experimentación adicional.

No se requiere un equipo adicional especial y el dispositivo de MLM es compatible con el cocultivo y las técnicas estándar de diagnóstico por imagen. Las células pueden mantenerse durante meses y las toxinas pueden introducirse en el cultivo y examinarse para detectar cualquier efecto perjudicial. Los cultivos que se han realizado con la tecnología MLM proporcionan un modelo para el tejido humano natural, que puede exponerse a varios fármacos y controlarse para determinar la viabilidad y/o las interacciones célula-célula.

La figura 2 muestra microfotografías de ejemplo de células HEK293 cultivadas en 3D en placas de 6 pocillos. Se utilizaron placas Nunc de cultivo celular de 6 pocillos no tratadas (6-WELL BIO-ASSEMBLER™ MAGNETIC DRIVE, N3D BIOSCIENCES™) y las muestras se dosificaron con concentraciones variables de ibuprofeno (0 a 10 mM). Se levitaron previamente las células durante 1 hora antes de administrar el fármaco y las imágenes se obtuvieron en varios períodos de incubación (de 0 a 168 horas). Las imágenes se tomaron a un aumento de 4X en el centro de la estructura en 3D.

A medida que aumentaba la concentración de la dosis de ibuprofeno o el tiempo de incubación (figura 2), las construcciones en 3D comenzaron a aparecer menos cohesivas. A altas concentraciones y tiempos de incubación (2 mM, 24 horas), las estructuras en 3D se desmontaron completamente en múltiples colonias. Esto indica que el ibuprofeno está rompiendo las interacciones célula-célula y célula-matriz y/o la viabilidad celular que estimulan la formación de esferoides en 3D.

Cuando las microfotografías de la figura 2 se examinaron mediante el análisis de la dimensión fractal (véase más adelante una descripción de cómo calcular la dimensión fractal), se pudieron observar tendencias generales. La dimensión fractal (D_f) puede definirse como estructuras autosimilares a través de escalas² y su análisis se ha utilizado en el estudio de los agregados y la formación de grupos²⁻³. Un aumento en el número de colonias de células individuales y la porosidad de una estructura en 3D con concentración de fármaco y tiempo de incubación de fármaco crecientes producen disminuciones de la dimensión fractal. Este cambio en la dimensión fractal se puede traducir en viabilidad celular o interacciones célula-célula. A medida que disminuye la dimensión fractal de la muestra, disminuye también el porcentaje de viabilidad o las interacciones célula-célula de las células.

La figura 3 muestra el porcentaje de viabilidad para células HEK293 a las que se ha administrado ibuprofeno cultivadas en 2D y evaluadas con un ensayo de MTT sin la presencia de NANOSHUTTLE™ (rombos), con la presencia de NANOSHUTTLE™ (cuadrados) y células cultivadas en 3D con NANOSHUTTLE™ y evaluadas con el ensayo de análisis fractal sin marcador (triángulos). Los valores de DL50 de 24 horas (concentración a la que la mitad de las células murieron después de 24 horas) pueden extrapolarse a aproximadamente 1 mM para células cultivadas en 2D y evaluadas con el ensayo de MTT y 2,2 mM para células cultivadas con el MLM y evaluadas utilizando el ensayo sin marcador descrito anteriormente.

Los resultados de la citotoxicidad en 2D presentados en el presente documento coinciden con la bibliografía, en la que se indicó que un valor de DL50 de 24 horas utilizando un ensayo de MTT era de 1.000 μ M para el ibuprofeno en células HEK293. Los inventores plantearon la hipótesis de que el aumento de la DL50 para los montajes en 3D se debe a varios factores, que incluyen las limitaciones en la difusión de fármacos en el centro de la construcción en 3D y la presencia de la MEC y las interacciones célula-célula que protegen las células dentro de la estructura frente a la misma exposición al fármaco que las del exterior, de modo que no todas las células están expuestas al fármaco.

Todos ellos son aspectos que existen en el contexto de un tejido *in vivo*, pero no se pueden replicar fácilmente en cultivos de monocapa en 2D.

EJEMPLO 3: ANÁLISIS DE IMAGEN

El análisis de la dimensión fractal de las imágenes en 2D se puede utilizar para evaluar la estructura de los aglomerados de objetos de tipo fractal^{2,4-8}. La teoría de la dimensión fractal postula que la relación entre el número de objetos primarios (N) en un agregado fractal y su radio de giro (R_g) obedece a la siguiente ecuación³⁻¹⁰:

$$N = kg(R_g/a)^{D_f} \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que a es el diámetro medio del objeto primario, D_f es la dimensión fractal y kg es una constante llamada el prefactor de la estructura. En esta demostración, los presentes inventores representaron las células como esferas conectadas entre sí. Dado que las estructuras de tipo fractal son complejas, a menudo la determinación de R_g no es trivial¹¹. Por lo tanto, los presentes inventores modificaron la ecuación anterior reemplazando R_g por la longitud máxima del espacio ocupado por el aglomerado multicelular (L)^{9,12}:

$$N = kg(L/a)^{D_f} \quad \text{Ecuación 2}$$

que se puede reescribir como

$$D_f = [\log(N) - \log(kg)] / \log(L/a) \quad \text{Ecuación 3}$$

Estas ecuaciones se pueden utilizar para evaluar la D_f de los sistemas modelados, como se muestra en la figura 4. En este procedimiento simplificado, L, a, y kg se mantuvieron constantes, lo que hace de D_f una función de N, proporcional al $\log(N)$. El resultado de este análisis mostró que el aumento del número de células eleva los valores de D_f (figura 4, $a < b < c < d$). Estos resultados coinciden cualitativamente con el análisis de la D_f de los presentes inventores y la interpretación de conjuntos multicelulares en 3D⁴, en la que se postula que la viabilidad de las células (replicación celular que da lugar a un aumento de N) y la interacción célula-célula resultante de células viables impulsa el aumento de la D_f a medida que disminuye la concentración de fármaco.

Asimismo, los presentes inventores calcularon la D_f de las estructuras de la figura 5 para un cambio simulado de la estructura frente al tiempo utilizando el método de recuento de cajas^{3,11} (software ImageJ). Generalmente, el recuento de cajas consiste en un procedimiento que cuenta el número de cajas de un tamaño dado necesario para cubrir un borde binario (negro sobre blanco) de un píxel de anchura, donde este procedimiento se repite para cajas de tamaños variables. Se traza una curva en la que se traza el logaritmo del recuento de cajas como una función del logaritmo del tamaño de la caja. La linealidad de esta relación suele ser una indicación de autosimilitud, la característica principal de los objetos fractales. La D_f se evalúa midiendo la pendiente de la curva generada a partir de la representación del logaritmo del tamaño de la caja frente al logaritmo del número de células dentro de cada caja. Este método dio lugar a valores de D_f de 1,89, 1,72, 1,67 y 1,54, representativos de estructuras multicelulares (figura 5 (d-g)).

Aunque estos valores siguen una tendencia similar a los resultados experimentales de los presentes inventores (un aumento de la D_f como una función de la densidad celular, por ejemplo, la figura 2 y la figura 8), la sensibilidad de este método a los cambios en N es inferior al cálculo anterior. Se podría aumentar el intervalo dinámico y la sensibilidad de la metodología si se pudieran obtener microfotografías de las distintas capas de células, teniendo así en cuenta las tres dimensiones (3D) del tejido. Las imágenes en 2D utilizadas en el presente documento no pueden resolver capas de células, por lo tanto, solo la proyección de las estructuras multicelulares se tiene en cuenta en el cálculo de la D_f (figuras 4, 5). En conjunto, los análisis presentados muestran que la medida relativa de la D_f permite inferir el número relativo de células de las estructuras multicelulares en función de la dimensión fractal.

De forma similar a la dimensión fractal, la viabilidad celular también puede evaluarse en base a los cambios morfológicos de la estructura esferoide. La viabilidad celular se calcula utilizando la ecuación siguiente:

i. Viabilidad celular = $(D_{f\text{muestra}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}) / (D_{f\text{control}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}})$

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{D_{f\text{muestra}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}}{D_{f\text{control}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

en la que la $D_{f\text{muestra}}$ es la dimensión fractal de la muestra a una longitud de tiempo t de la dosificación de fármaco en particular, $D_{f\text{control}}$ es la dimensión fractal del control negativo a la misma longitud de tiempo t de la dosificación y $D_{f100\% \text{ muerte celular}}$ es la dimensión fractal de la muestra al 100% de muerte celular. Este valor se obtuvo de la muestra a la concentración más alta de fármaco y el punto de tiempo de dosificación de fármaco más largo. La

dimensión fractal calculada y el porcentaje de viabilidad (figura 5 (h, i)) aumentan frente al tiempo de cultivo sin deterioro y disminuyen en función de la concentración de toxina.

A continuación, este método puede utilizarse para ensayos en los que un agente extraño es reemplazado por células de tipo conocido o desconocido (las células podrían incluir una mezcla heterogénea de tipos de células, tal como en la fracción de sangre y/o de células estromales). En este caso, las células magnetizadas se utilizarían para capturar células de una muestra desconocida. Las células de esta muestra desconocida podrían llevar o no el NANOSHUTTLE™.

En la figura 5, partes j-m, se representa un cocultivo sano de dos tipos de células, en el que hay un número creciente de un tipo de célula (óvalos pequeños). En el presente documento, la composición heterogénea y la estructura de este cultivo se detectaría mediante análisis D_f . La parte n representa el gráfico de los cultivos j-m con un número creciente de células de un tipo de célula (óvalos pequeños) donde el otro tipo de células (óvalos grandes) se mantiene constante. Los valores de D_f calculados son (j) 1,418, (k) 1,812, (l) 1,844 y (m) 1,912. D_f frente al número de células de un tipo de célula de un sistema simulado cocultivado (n).

Además, si las células de ensayo no llevan NANOSHUTTLE™ necesario para la levitación, tendrían que incubarse con células conocidas que portan NANOSHUTTLE™ (estas células permitirían la levitación y el cultivo en 3D) en el fondo de la placa no adherente durante, como mínimo, 30 minutos. Como alternativa, la mezcla de células podría centrifugarse para juntarlas. Una vez que los múltiples tipos de células están en contacto y que puede tener lugar la interacción célula-célula, las células se levantarían.

En resumen, este ensayo puede utilizarse para capturar, detectar y caracterizar mezclas de células homogéneas o heterogéneas, tales como células madre aisladas, sangre y/o mezcla de células estromales.

Basándose en los datos simulados mostrados anteriormente, se pueden construir varias representaciones. La figura 6 muestra (a) D_f frente a la concentración, (b) el número de células frente a la concentración, (c) el tamaño promedio frente a la concentración, (d) el área total frente a la concentración, (e) D_f frente al tiempo, (f) el número de células frente al tiempo, (g) el tamaño promedio frente al tiempo, y (h) el área total frente al tiempo para los datos simulados en la figura 6.

Según las tres modalidades diferentes introducidas anteriormente (D_f , tamaño y distribución del tamaño) se pueden presentar varios métodos de análisis. La figura 7 muestra varios gráficos basados en los datos físicos presentados en la figura 2. Se determinan (a) la dimensión fractal, (b) el tamaño promedio del grupo (en píxeles cuadrados (px^2)), y (c) el área total (px^2) para células HEK293 expuestas a concentraciones variables de ibuprofeno durante 1, 24 y 168 horas. También se muestra la viabilidad celular basada en (d) la dimensión fractal, (e) el tamaño promedio del grupo y (f) el área total.

Cuando la dosis de fármaco disminuye (por ejemplo, se elimina por lavado), se puede observar que, con el tiempo, las células comienzan a recuperarse y los cultivos en 3D se vuelven a ensamblar. La figura 8 muestra microfotografías de hepatocitos cultivados en 3D con el MAGNETIC DRIVE de 6 pocillos de MLM dosificado con concentraciones variables de paracetamol (APAP) (0 a 16 mM). Después de un cambio a un medio fresco sin fármaco, las estructuras comienzan a montarse de nuevo en un esferoide cohesivo.

EJEMPLO 4: TOXINAS TRANSPORTADAS POR AIRE

Para explorar los efectos de las toxinas transportadas por el aire en cultivos de levitación magnética, se cultivaron en 3D células epiteliales bronquiales (EpiBr) y se expusieron a vapor de xileno puro. Primero se cultivaron EpiBr en 3D durante dos días en placas de cultivo de 35 mm x 10 mm incluidas en el kit SINGLE WELL BIOASSEMBLER KIT™ (NANO3D BIOSCIENCES™). Como fuente de vapor de xileno, en una campana de cultivo celular estéril, se colocaron aproximadamente 15 ml de xileno (calidad histológica, FISHER CHEMICAL™) en una placa de Petri Pyrex® de 100 mm x 20 mm y se dejó reposar a presión atmosférica dentro de una bolsa de plástico sellada. Las células en levitación se expusieron a los vapores de xileno acumulados dentro de la bolsa de plástico en intervalos de 30 minutos. Después de la exposición repetida a xileno (cuatro veces) no se observó muerte celular. A continuación, se retiraron las placas de 35 mm del portaplacas de Petri grandes de 95 mm x 15 mm y se colocaron individualmente en la bolsa para incrementos de 30 minutos, seguido de incrementos de 15 minutos en el incubador de CO₂. Esto se repitió durante 1 hora (dos veces) antes de observar muerte celular. Se planteó la hipótesis de que el soporte de placas de Petri grandes estaba obstruyendo de alguna manera que los vapores de xileno alcanzaran las células.

La figura 9 muestra imágenes levitantes (3D) y no levitantes (fondo, 2D) de células EpiBr y la viabilidad celular de las EpiBr en función del tiempo de exposición al xileno utilizando el ensayo de dimensión fractal sin marcador descrito anteriormente. La flecha indica cuándo se observó por primera vez la muerte celular. Las células levitantes previamente tratadas con xileno parecían sanas, formaban una hoja y mostraron una morfología escamosa característica. La muerte celular no se observó hasta el punto de tiempo de exposición al xileno de 150 minutos. Directamente antes de este punto de tiempo, se retiró el soporte de la placa de Petri grande para que los vapores de

xileno pudieran alcanzar más eficazmente las células levitantes. El aumento de la exposición al xileno perturbó la formación de tipo hoja y permanecieron células muertas sin interaccionar (figura 9, 180 minutos),

El ensayo de análisis fractal sin marcador presentado en el presente documento para estudiar la viabilidad celular proporciona una manera no invasiva de monitorizar tejidos en 3D. Con los avances actuales en el procesamiento de datos, esta técnica puede ser cada vez más importante para los ensayos de toxicidad *in vitro*. La levitación y el crecimiento de las células pueden (si se desea) se producen en la interfaz aire-líquido, lo que permite la introducción fácil de las toxinas ambientales transportadas por el aire y la posterior monitorización. Esta característica particular resulta útil para estudiar el pulmón y la exposición a contaminantes ambientales.

EJEMPLO 4: CIERRE DE HERIDAS

La figura 1 muestra un esquema de formación de hoja de tejido guiada magnéticamente. Las células dispersadas no levitantes (1) se concentran (3) magnéticamente (5) en una placa de cultivo de un solo pocillo no adherente. Las hojas planas pueden analizarse en su posición o se pueden levitar invirtiendo el campo magnético y utilizarse. También se pueden añadir tipos de células adicionales, con lo que se construye una estructura compleja de tejido en 3D.

Un ejemplo físico simple de esto se demuestra en la figura 10, que muestra macro y microfotografías de células HEK293 cultivadas después de dos días tanto en placas de cultivo celular no adherentes como adherentes. La placa no adherente muestra evidencia clara de hojas de tejido en 2D formadas con las células HEK293, mientras que la placa adherente muestra células aisladas que se han unido al plástico. Una hoja plana de células, tal como las formadas en la placa no adherente, podría utilizarse para diversas aplicaciones, como un ensayo de cicatrización de heridas.

Se prepararon cultivos de rasguño en 2D como se describe en el ejemplo 1, se tomaron microfotografías a intervalos cronometrados y se analizaron. Una vez que se analizan las imágenes, se puede evaluar el cierre del rasguño (2D) o el orificio (3D), denominado cierre de herida para ambos sistemas, basándose en cambios morfológicos en la estructura utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Cierre de la herida (\%)} = 100\% - \left(\frac{\text{área de la herida}_t}{\text{área de la herida}_{t_0}} \times 100 \right)$$

Ecuación 5

donde *área de la herida_t* es el área del rasguño u orificio dentro del campo de visión en la imagen de la muestra en un momento *t* particular y *área de la herida_{t0}* es el área del rasguño u orificio dentro del campo de visión en la imagen de la muestra a tiempo cero.

La figura 11A muestra microfotografías de un rasguño lineal creado en cultivos monocapa en 2D de células HEK293 cultivadas en presencia de diferentes cantidades de suero bovino fetal (SFB). La muestra de suero al 0% mostró algunos restos celulares que se desprendieron y aparecieron en los puntos de tiempo de 2, 4 y 24 horas; sin embargo, se eliminaron mediante lavado antes del punto de tiempo de 216 horas. Asimismo, para el suero de 0% a las 216 horas, se observó cierto "redondeo" o "esferificación" de los grupos celulares cerca del borde del rasguño. Esto no es sorprendente, ya que una de las críticas del método clásico de rasguño lineal es la retracción de células cerca del borde de la herida y la pérdida de la morfología y función de la célula original debido a la rotura física. Este "redondeo" 216 horas después del rasguño también puede haber sido el resultado de las condiciones de los medios de inanición debido a la ausencia de suero.

A las 216 horas, las líneas grabadas en los cultivos de SFB al 10% se habían cerrado completamente debido a la migración y el crecimiento de células, pero los cultivos de SFB al 0% no lo habían hecho. Las imágenes de microscopía de campo brillante obtenidas se analizaron a continuación utilizando el software IMAGEJ para cuantificar el cierre del rasguño frente al tiempo y del porcentaje de suero.

Es importante tener en cuenta que IMAGEJ es un programa de procesamiento de imágenes de dominio público y que este software fácil de utilizar está disponible de forma gratuita a través de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). No se requirió ningún costoso software adicional o programación especial para realizar este ensayo de cicatrización de heridas.

La aplicación del ensayo de cicatrización de heridas al sistema de levitación magnética en 3D de la presente invención solo requirió algunas modificaciones sencillas. En lugar de sembrar las células (HEK293, HPF, SMC o HPF-SMC) en pocillos adherentes, las células tratadas con NANOSHUTTLE™ se sembraron en placas de fijación ultrabaja (1,0 ml de suspensión de células/medio por pocillo, ~500.000 células/pocillo en el pocillo de 6 pocillos o 320 µl de suspensión de células/medio por pocillo, ~500.000 células/pocillo en los 24 pocillos) y la unidad magnética BIO-ASSEMBLER™ de 6 pocillos o 24 pocillos se colocó en la tapa de cada placa.

Las células levitadas se mantuvieron primero con medios con SFB al 10% hasta que se unieron para formar una pieza continua de tejido (~ 4 a 24 horas) en cada pocillo. A continuación se formaron orificios utilizando un capilar de vidrio (con un sistema de 6 pocillos y HEK293) o trituración de modelado magnético de la estructura en 3D (con un sistema de 24 pocillos y HPF, SMC y HPF-SMC). En los 6 pocillos, cada muestra y las células se mantuvieron a un volumen de 1,5 ml utilizando medio y en los 24 pocillos, cada muestra y las células se mantuvieron a un volumen de 320 µl utilizando medios SMC o HPF.

Como primera prueba del ensayo de cicatrización de heridas, los presentes inventores estudiaron la respuesta de las células a la variación de concentración de suero. El aumento de la concentración de suero suplementado aumenta la cantidad de factores de crecimiento y citocinas presentes, que son necesarios para la división celular. Por lo tanto, un resultado común de un aumento en el porcentaje de suero suplementado es una proliferación celular aumentada y, por tanto, puede proporcionar una prueba de concepto para el ensayo.

La figura 12 muestra microfotografías de un ensayo de cicatrización de heridas utilizando células HEK293. Se analizaron dos condiciones de suero diferentes para el cierre de la herida generado con la estrategia de tubo capilar y se controlaron los orificios a lo largo del tiempo (figura 12a). Frente al tiempo, la migración celular y el nuevo crecimiento celular hicieron que los orificios se cerraran. Para este intervalo de tamaños de orificios, cuando se representa el porcentaje de área cerrada frente al logaritmo de tiempo para los orificios de diferentes tamaños en una concentración de suero del 0 al 5% (figura 12b), las pendientes para estos tres ajustes de caja del orificio de tamaño diferente aparecen muy similares (~1). Esto indica que las tasas de crecimiento de las células HEK293 tienen poca influencia para los orificios de diferente tamaño y condiciones de suero bajo.

También se realizaron pruebas en 2D y en 3D utilizando ibuprofeno como fármaco citotóxico. Las imágenes se obtuvieron frente al tiempo y la concentración de ibuprofeno y se analizaron como se describe en el presente documento. La muestra de control consistió en células sin ibuprofeno o DMSO, mientras que la muestra 0 mM consistió en tratar las células con DMSO (1% en medio) sin nada de ibuprofeno. A las 96 horas, los orificios en 3D de ibuprofeno 0 y 0,1 mM se habían cerrado (no se muestra), mientras que el rasguño en 2D dosificado a esas mismas concentraciones aún no había cicatrizado después de 216 horas (no mostrado).

Para los dos ensayos en 2D y en 3D realizados, se demostró que el tiempo necesario para la cicatrización se redujo a concentraciones séricas mayores. También se demostró que el tiempo necesario para la cicatrización se redujo para 3D en comparación con las condiciones de crecimiento en 2D. Cuando se introdujo el compuesto de prueba ibuprofeno (datos no mostrados), se demostró que el ensayo de heridas en 3D *in vitro* podía utilizarse como una herramienta predictiva de la toxicidad. Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que podía utilizarse un ensayo de esta naturaleza para distinguir si un compuesto de prueba es un inhibidor o un activador del crecimiento y la migración celulares o el cierre de la herida.

La figura 13 muestra microfotografías de un ensayo de cicatrización de heridas o un ensayo de cicatrización de heridas utilizando células HPF, SMC, y cocultivo de células HPF y SMC (HPF-SMC). Se analizaron dos condiciones de medio diferentes, medios medio HPF y SMC, para el cierre de la herida generado con la estrategia de modelado magnético descrito en el ejemplo 1 y los orificios se monitorizaron a lo largo del tiempo. Frente al tiempo, la migración celular, la contracción del cultivo en 3D y el nuevo crecimiento celular hicieron que los orificios se cerraran.

El tamaño de la herida disminuyó con ambos tipos de medio dentro del período de 34 horas. Las heridas de los cultivos en medio SMC (figura 13a-c) no se cerraron durante el período de 34 horas. A continuación, los cultivos SMC (figura 13c y f) no eran sensibles al tipo de medio, ya que estos cultivos bajo ambos tipos de medios no se cerraron durante el periodo de 34 horas. Al comparar el cierre de heridas de cultivos HPF (figura 13a y d) y cocultivos HPF-SMC (figuras 13b y e), las heridas de los cultivos en medios de fibroblastos (figuras 13d y e) se cerraron en 20 horas, en contraste con los cultivos en medios SMC, que no cerraron en un período de 34 horas. Estos resultados sugieren que las células HPF son sensibles a los dos tipos de medios diferentes y el cierre de la herida se acelera cuando las células se cultivan en medio HPF.

Un desafío actual cuando se cocultivan diferentes tipos de células es la optimización de la condición del medio que es compatible con diferentes tipos de células que se cocultivan. Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que este ensayo podría utilizarse para optimizar y/o determinar condiciones de medios y/o selección de medios para cocultivar células según la migración celular, la contracción del cultivo y/o la proliferación celular.

Referencias:

1. Chen, C. Y., Pang, V. F. & Chen, C. S. Assessment of ibuprofen-associated nephrotoxicity in renal dysfunction. J. Pharm. Exp. Ther. 270, 1307–1312 (1994).
2. Koylu, U. O., Faeth, G. M., Farias, T. L. & Carvalho, M. G. Fractal and projected structure properties of soot aggregates. Combust. Flame 100, 621–633 (1995).

3. Dewey, T. G. *Fractals in Molecular Biophysics*. (Oxford University Press, 1997).
4. Souza, G. R. & Miller, J. H. Oligonucleotide detection using angle-dependent light scattering and fractal dimension analysis of gold-DNA aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6734–6735 (2001).
5. Mandelbrot, B. B. *The Fractal Geometry of Nature*. (Freeman, 1982).
6. Avnir, D., Farin, D. & Pfeifer, P. Molecular fractal surfaces. *Nature* 308, 261–263 (1984).
10. 7. Weitz, D. A., Huang, M., Lin, Y. & Sung, J. Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids. *Phys. Rev. Lett.* 54, 1416–1419 (1985).
8. Brasil, A. M., Farias, T. L. & Carvalho, M. G. Evaluation of the fractal properties of cluster-cluster aggregates. *Aerosol. Sci. Technol.* 33, 440–454 (2000).
15. 9. Souza, G. R. & Miller, J. H. Fractal dimension analysis of gold-biopolymer nanoparticle aggregates using angle dependent light scattering for the detection and characterization of nucleic acids and proteins. Application: US
20. 10. Schroeder, M. *Fractals, Chaos, Power Laws: Minutes from an Infinite Paradise*. (W. H. Freeman and Company, 1992).
11. Smith, T. G. J., D., L. G. & Marks, W. B. Fractal methods and results in cellular morphology. *J. Neurosci. Methods* 69, 1123–1126 (1996).
25. 12. Meeker DC (26Dec2009 Build) Finite Element Method Magnetics, Versión 4.2. Disponible en femm.info.
Documento US2003436621
Documento US2004038264
Documento WO2011038370
Documento WO2010036957
30. Documento 61/438.310
Documentos US2009137018, WO2005003332
Documentos US2005054101, WO2005010162
Documentos US2006063252, WO2004083412, WO2004083416
35. Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfield C., West J., Mueller-Klieser W., y Kung-Schughart. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148, 3–15 (2010).
Lin R.-Z. y Chang H.-Y.. Recent Advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* 3, 1172–1184 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Ensayo de viabilidad celular o de interacción célula-célula, que comprende:

- a) cultivar un cultivo celular en 3D;
- b) tomar microfotografías de dicho cultivo celular en 3D en uno o más puntos temporales;
- c) analizar dichas microfotografías para medir uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células;
- d) en el que el número de grupos de células y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula.

2. Método, según la reivindicación 1, que incluye además cultivar una pluralidad de cultivos en 3D para su utilización como cultivos de control y cultivar una pluralidad de cultivos en 3D para su utilización como cultivos de prueba, en el que se añade un agente de ensayo a dichos cultivos de ensayo y se evalúa el efecto de dicho agente de ensayo sobre dicha viabilidad celular o interacciones célula-célula.

3. Método, según la reivindicación 2, que incluye además la adición de cantidades variables de dicho agente de ensayo a dicha pluralidad de cultivos de ensayo.

4. Método, según la reivindicación 3, que comprende además eliminar por lavado dicho agente de ensayo y tomar una pluralidad adicional de microfotografías de dicho cultivo celular en 3D en una pluralidad adicional de puntos temporales.

5. Método, según la reivindicación 1, en el que las células se levitan con una composición que comprende: a) una nanopartícula cargada negativamente; b) una nanopartícula cargada positivamente; y c) una molécula de soporte, en la que una de entre dicha nanopartícula cargada negativamente o nanopartícula cargada positivamente contiene un elemento magnéticamente sensible, y en el que dicha molécula de soporte retiene dicha nanopartícula cargada negativamente y dicha nanopartícula cargada positivamente en una mezcla íntima.

6. Método, según la reivindicación 5, en el que la molécula de soporte comprende péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros, polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, gelatina, ácido nucleico, mezclas de proteínas de la matriz extracelular, anticuerpo o mezclas o derivados de los mismos, b) en la que dicha nanopartícula cargada negativamente es una nanopartícula de oro, y c) en la que dicha nanopartícula cargada positivamente es una nanopartícula de óxido de hierro.

7. Método, según la reivindicación 5, en el que la composición comprende un conjunto de nanopartículas de una nanopartícula de oro, una nanopartícula de óxido de hierro y una molécula de soporte de poli-l-lisina.

8. Método, según la reivindicación 3, en el que una disminución de la viabilidad celular con dicho agente de ensayo indica que el agente de ensayo es inhibidor y en el que un aumento en la viabilidad celular indica que dicho agente de ensayo es estimulador.

9. Método, según la reivindicación 2, en el que $D_f = [\log(N) - \log(kg)]/\log(L/a)$ y D_f es la dimensión fractal, kg es el prefactor de la estructura y es una constante, N es el número de células, a es el diámetro de una célula y L es la longitud de la caja, y en el que

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{D_{f \text{ muestra}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}}{D_{f \text{ control}} - D_{f100\% \text{ muerte celular}}}$$

y $D_{f \text{ muestra}}$ es la dimensión fractal del cultivo de ensayo y $D_{f \text{ control}}$ es la dimensión fractal del control.

10. Método, según la reivindicación 1, en el que el ensayo mide el cierre de la herida en respuesta a un agente de ensayo, en el que el cultivo en 3D se perfora o se moldea magnéticamente para formar una herida, y se añade un agente de ensayo a dicho cultivo en 3D herido, en el que el cierre de la herida (%) = $100\% - (\text{área de la herida}_t / \text{área de la herida}_{t0} \times 100)$, en el que el área de la herida_t es el área de la herida en un momento dado después de la adición de un agente de ensayo, y el área de la herida_{t0} es el área de la herida antes de añadir dicho agente de ensayo.

11. Un ensayo celular, que comprende:

- a) cultivar una pluralidad de muestras de células levitadas para formar grupos de células, estando una o más de dicha pluralidad de muestras sin un agente de ensayo y una o más de dicha pluralidad de muestras con una o más concentraciones de dicho agente de ensayo;
- b) tomar microfotografías de dicha pluralidad de muestras de las células levitantes en uno o más puntos temporales;

c) analizar dichas microfotografías para medir uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células;

d) en el que el número de grupos de células y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula.

12. Método, según la reivindicación 11, en el que dicho ensayo celular se utiliza para evaluar los efectos de dicho agente de ensayo sobre la toxicidad, la cicatrización de heridas, la actividad mitótica, la estimulación del crecimiento, las interacciones célula - célula, las interacciones célula - matriz, la viabilidad, la estructura celular u optimizar medios de cultivo.

13. Ensayo de interacción célula-célula o de viabilidad, que comprende:

a) cultivar una pluralidad de muestras de cultivos celulares en 3D, estando una o más de dicha pluralidad de muestras sin un agente de ensayo y una o más de dicha pluralidad de muestras con una o más concentraciones de dicho agente de ensayo;

b) tomar microfotografías de dicha pluralidad de muestras de los cultivos celulares en 3D en uno o más puntos temporales;

c) analizar dichas microfotografías para medir uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células;

d) en el que el número de grupos de células y el área total de los grupos de células son inversamente proporcionales a la interacción célula-célula y la viabilidad celular, y en el que una disminución en la interacción célula-célula indica que dicho agente de ensayo es inhibidor y en el que un aumento en la interacción célula-célula indica que dicho agente de ensayo es estimulador;

e) en el que dichos cultivos de células en 3D se preparan levitando células con una composición que comprende:
a) una nanopartícula cargada negativamente; b) una nanopartícula cargada positivamente; y c) una molécula de soporte, en la que una de entre dicha nanopartícula cargada negativamente o nanopartícula cargada positivamente contiene un hierro u óxido de hierro magnéticamente sensible, y en el que dicha molécula de soporte retiene dicha nanopartícula cargada negativamente y dicha nanopartícula cargada positivamente en una mezcla íntima.

14. Método, según la reivindicación 13, en el que la molécula de soporte comprende péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polímeros, polilisina, fibronectina, colágeno, laminina, BSA, hialuronano, glicosaminoglicano, glicosaminoglicano aniónico no sulfatado, gelatina, ácido nucleico, mezclas de proteínas de la matriz extracelular, anticuerpo o mezclas o derivados de los mismos, b) en la que dicha nanopartícula cargada negativamente es una nanopartícula de oro, y c) en la que dicha nanopartícula cargada positivamente es una nanopartícula de óxido de hierro.

15. Método, según la reivindicación 13, en el que la composición comprende un conjunto de nanopartículas de una nanopartícula de oro, una nanopartícula de óxido de hierro y una molécula de soporte de poli-l-lisina.

16. Método, según la reivindicación 1,11 o 13, que comprende:

analizar dichas microfotografías para medir una o más de entre i) la dimensión fractal (una indicación estadística del grado de complejidad con que un fractal llena espacio, utilizado para obtener una aproximación del número de células en el cultivo celular en 3D), ii) el tamaño del grupo celular o iii) la velocidad de cierre de la herida y uno o más de entre i) el número de grupos de células, o ii) el área total de los grupos de células:

en el que la dimensión fractal, la velocidad de cierre de la herida y el tamaño del grupo celular son directamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula, y el número de grupos celulares y el área total de los grupos celulares son inversamente proporcionales a la viabilidad celular o a las interacciones célula-célula.

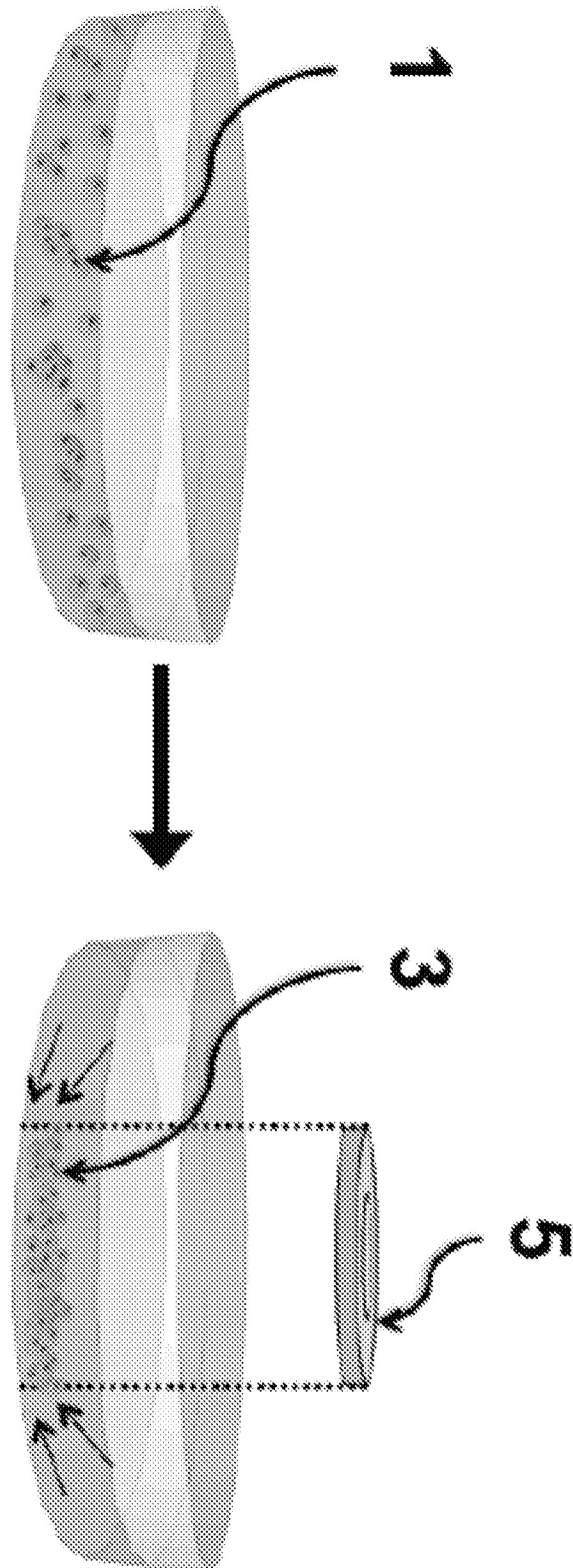


FIGURA 1

FIGURA 2

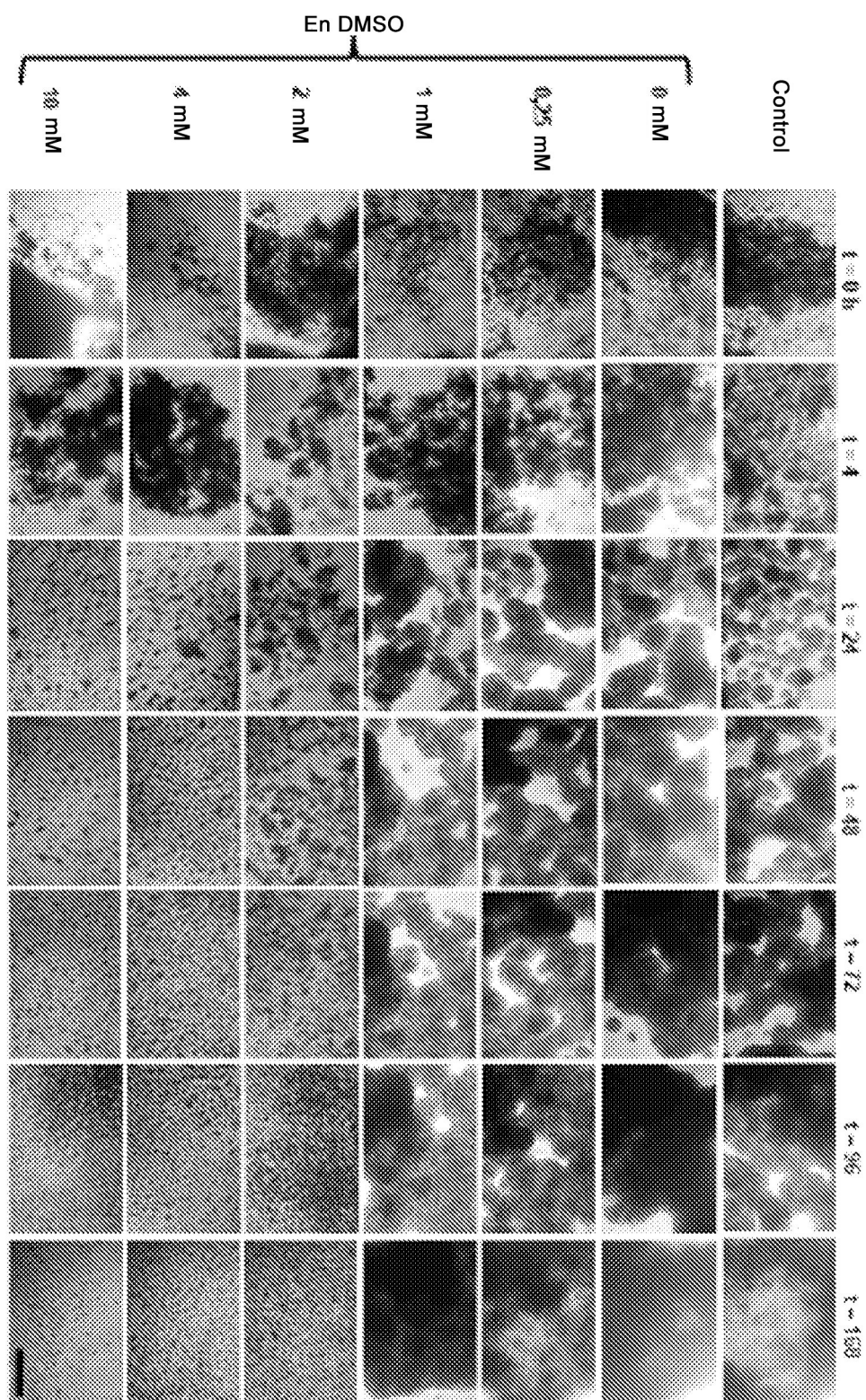


FIGURA 3

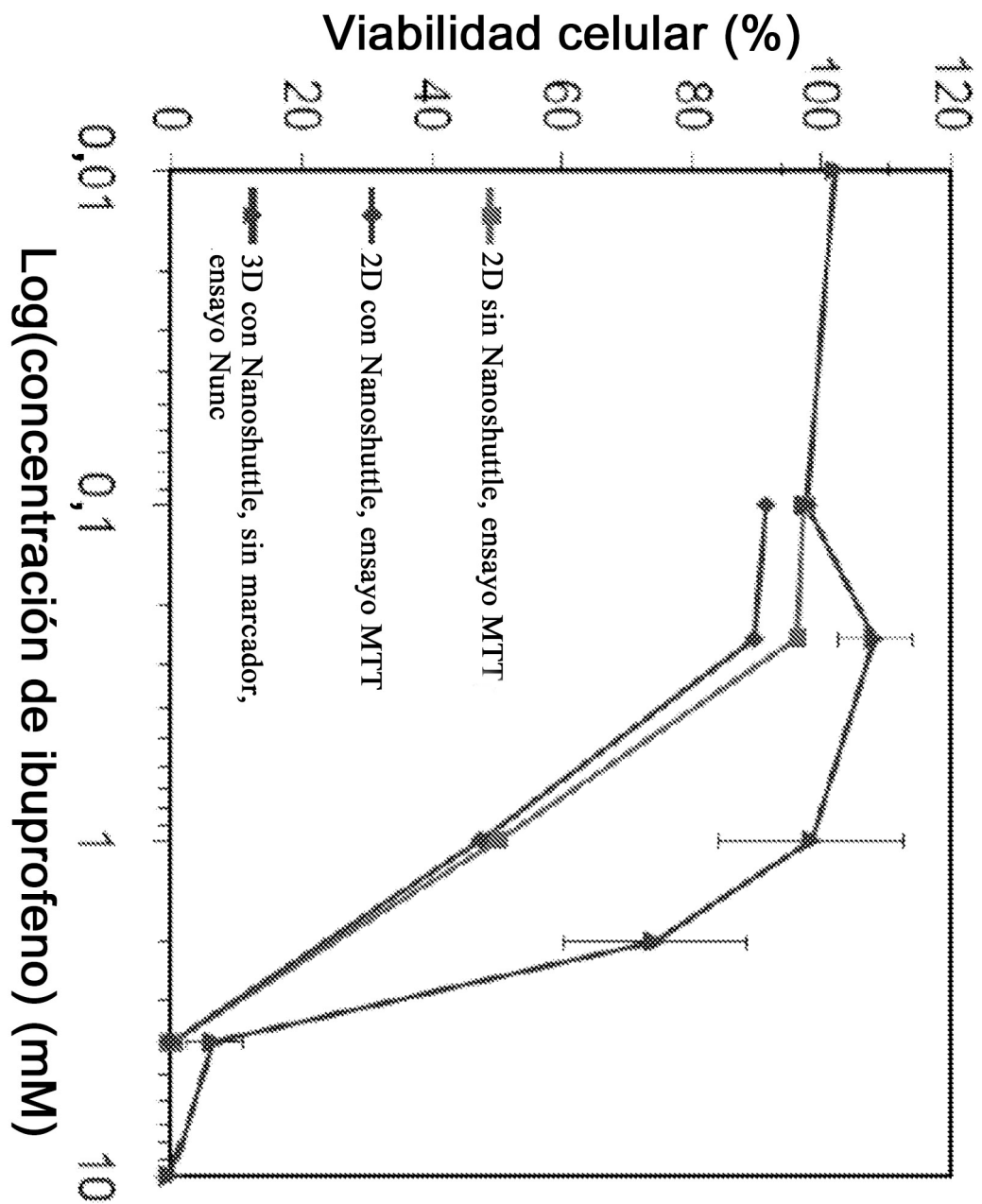


FIGURA 4

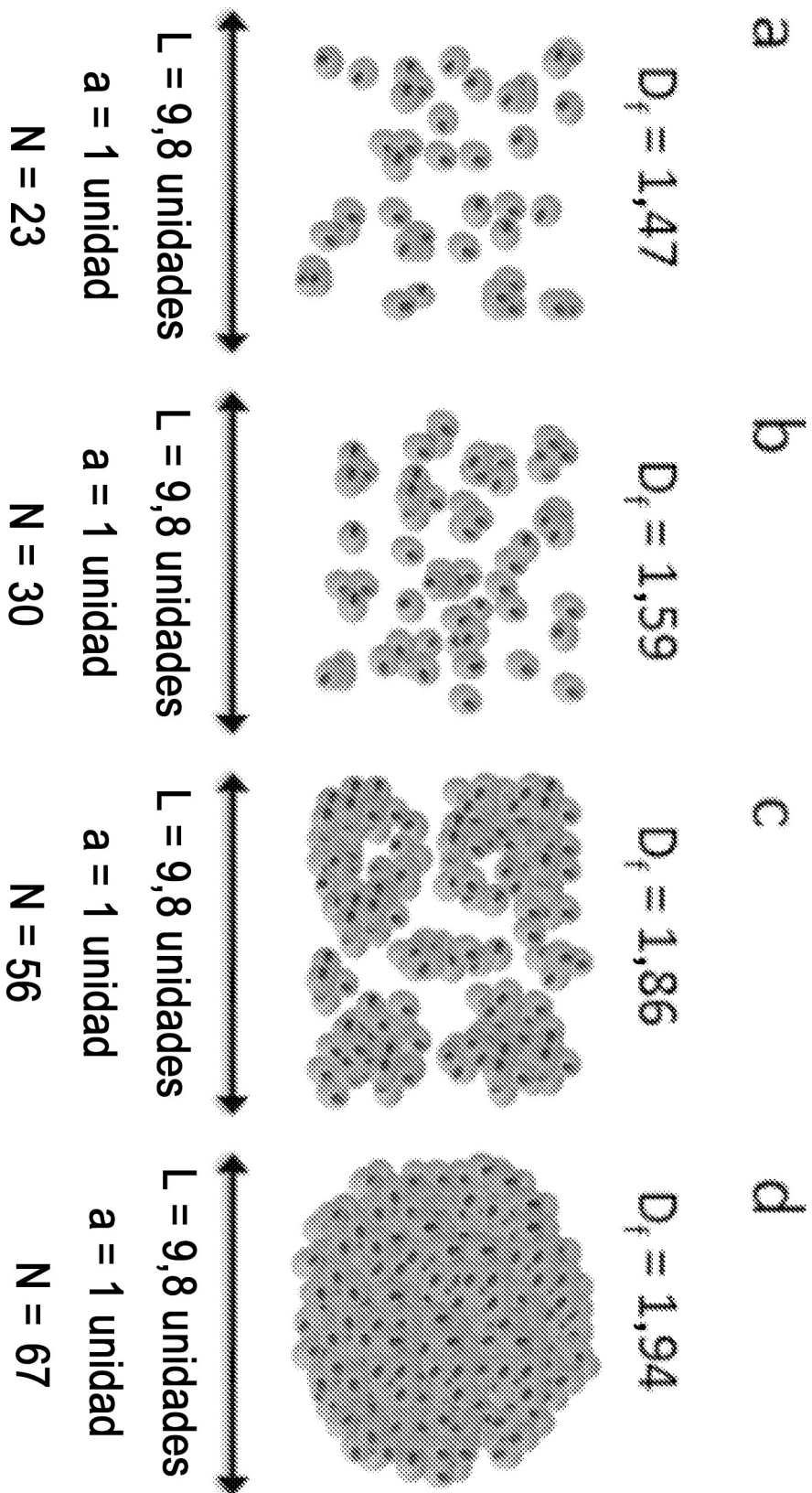


FIGURA 5

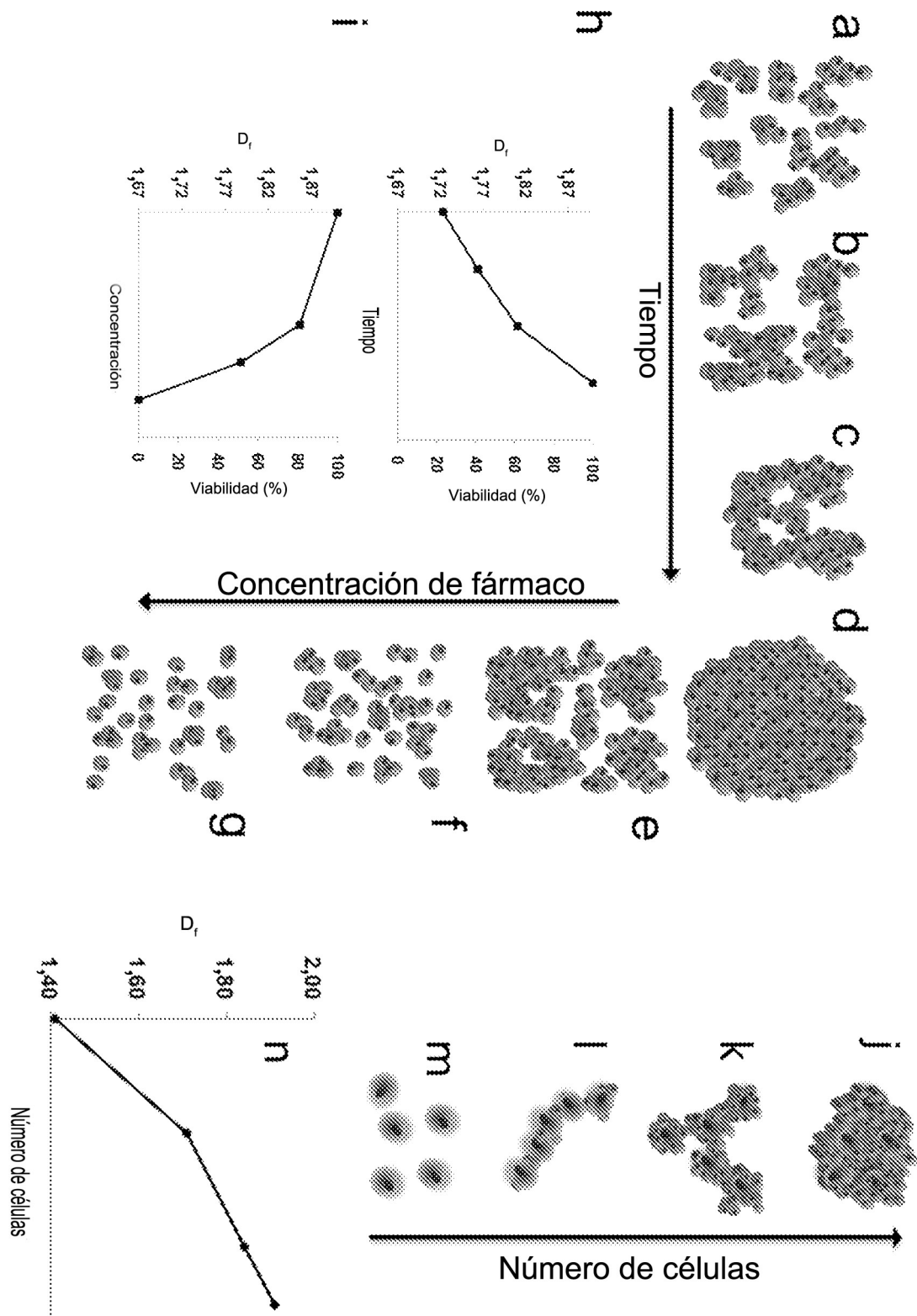


FIGURA 6

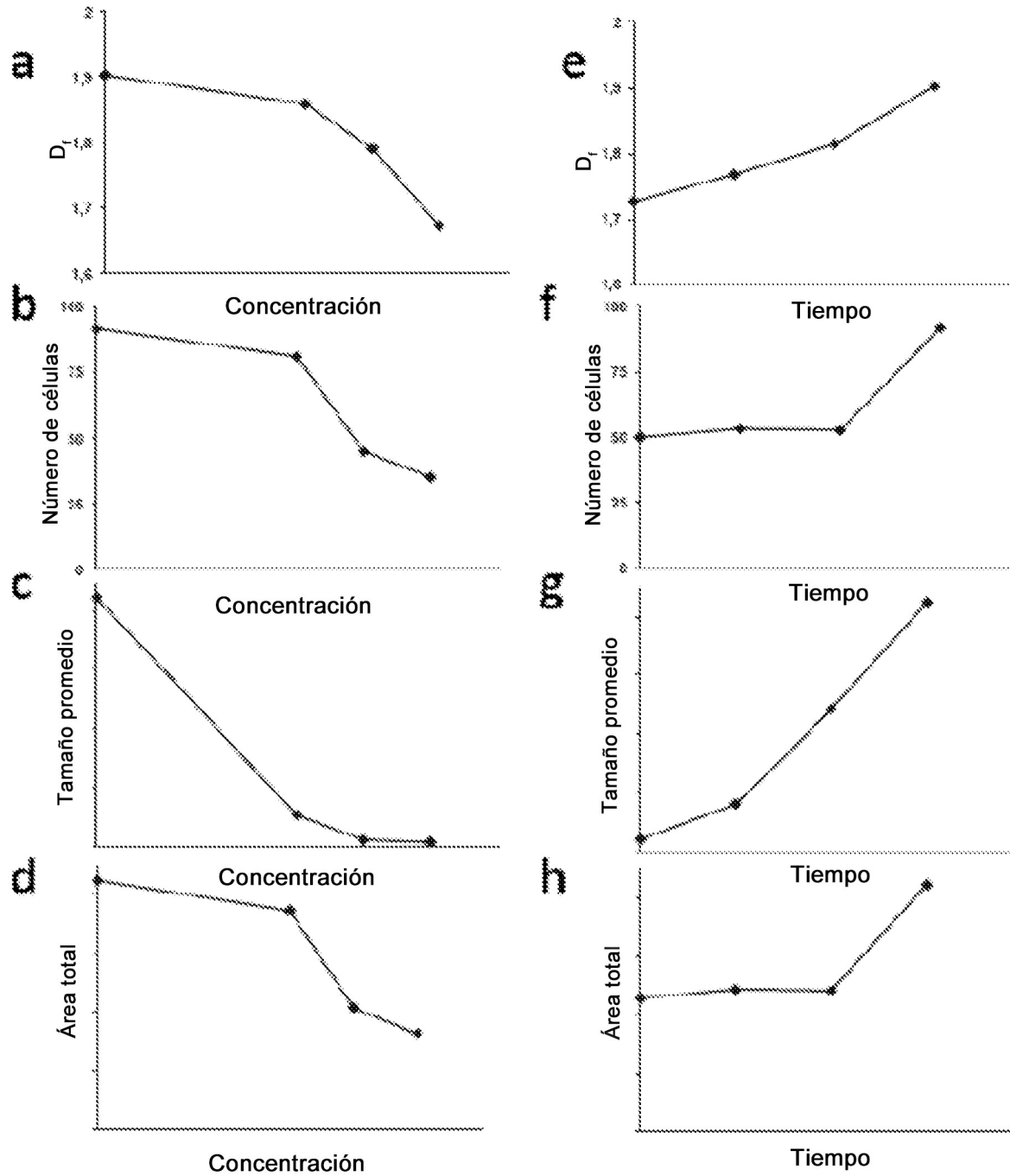
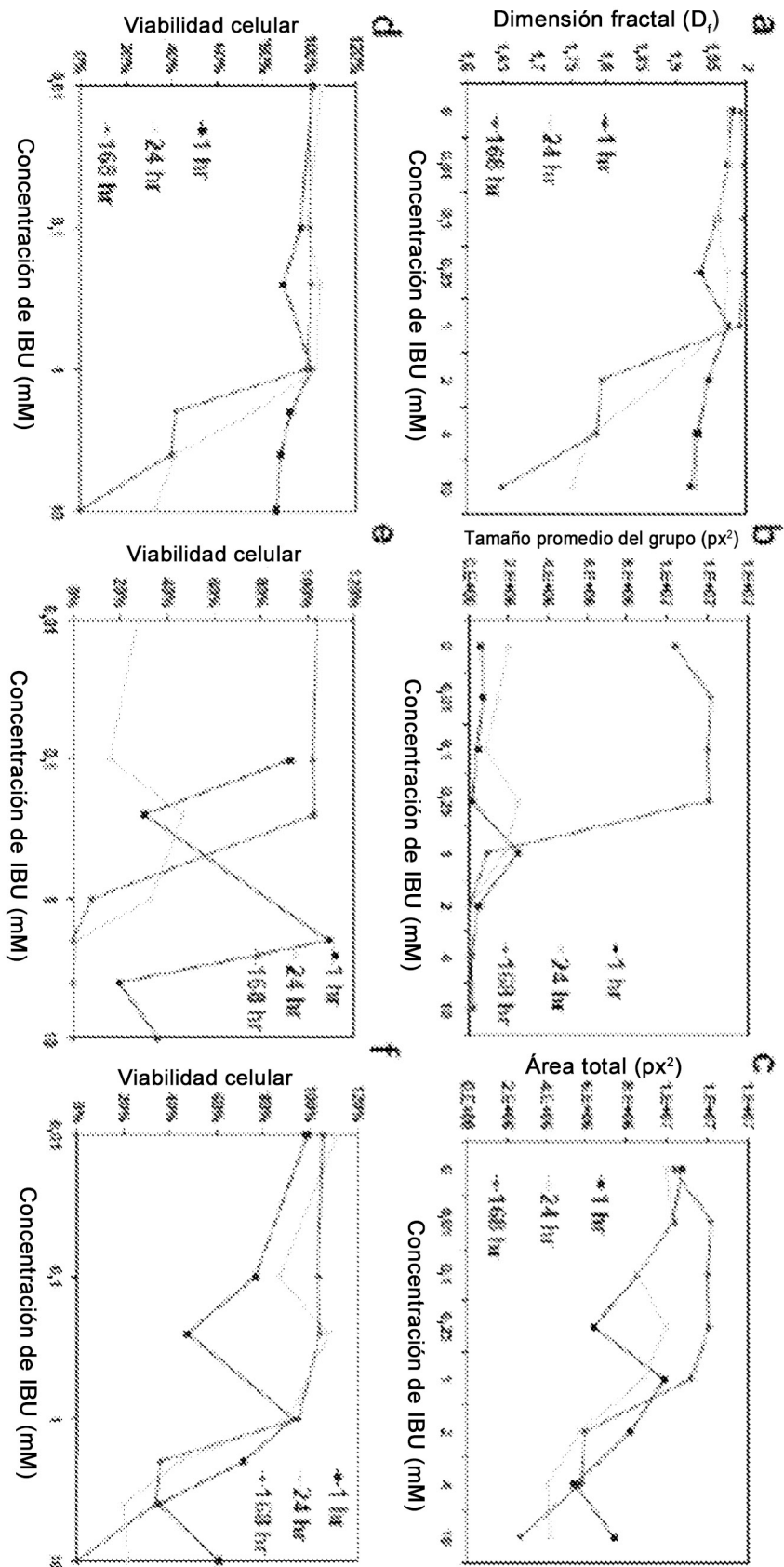


FIGURA 7



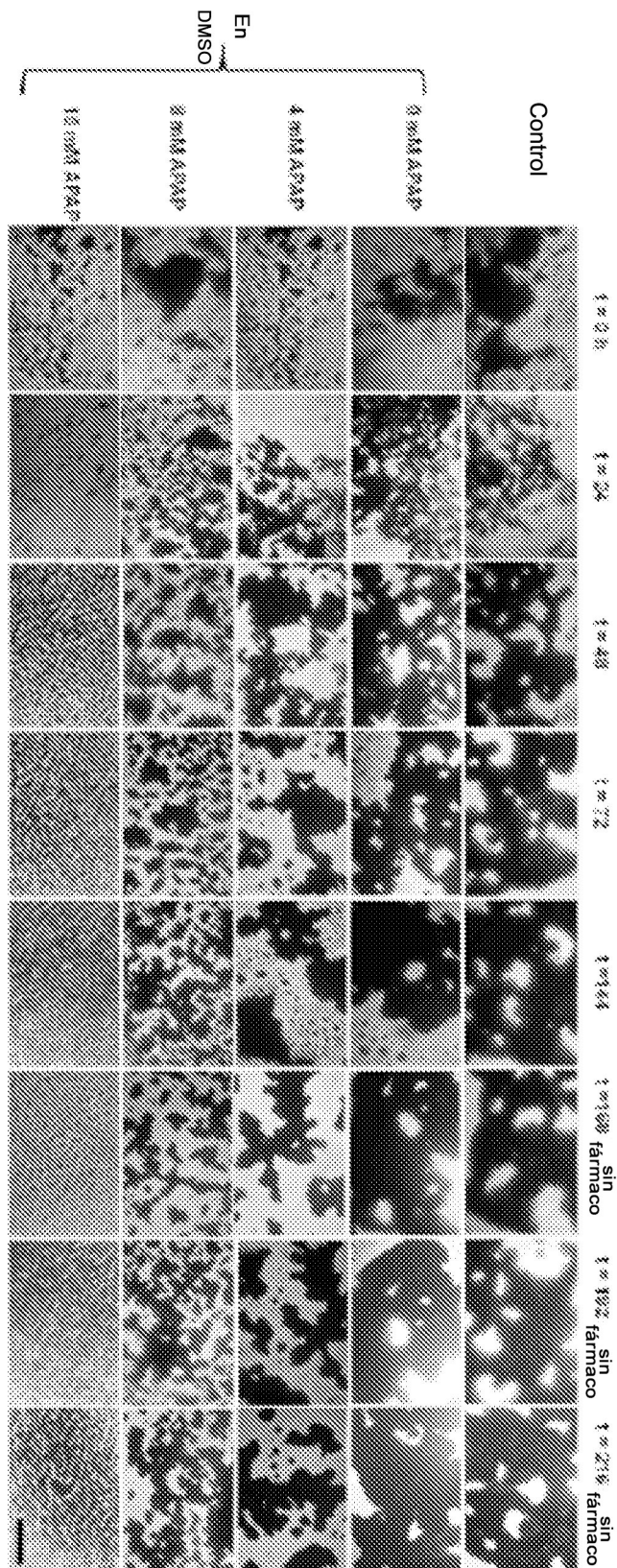


FIGURA 8

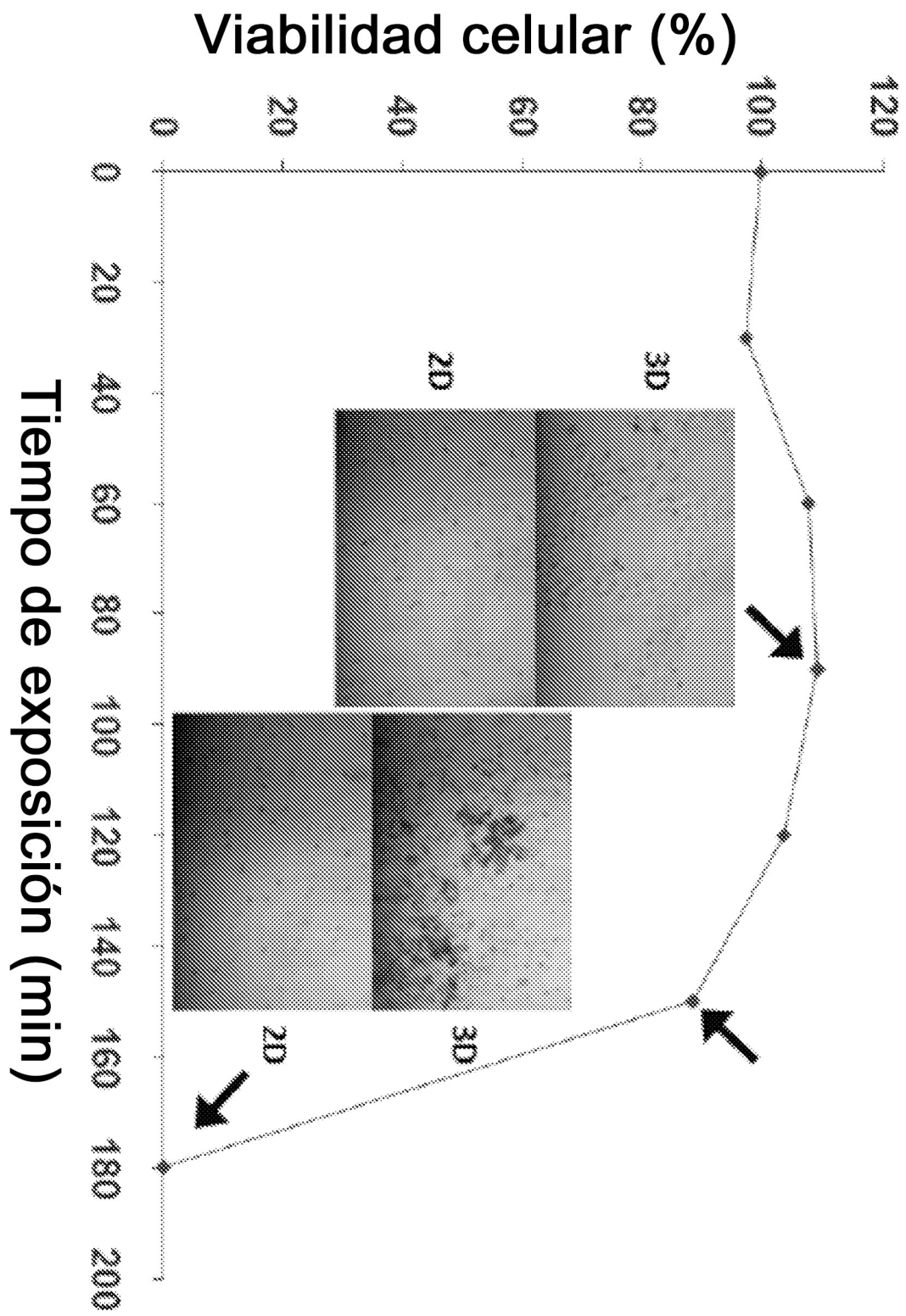
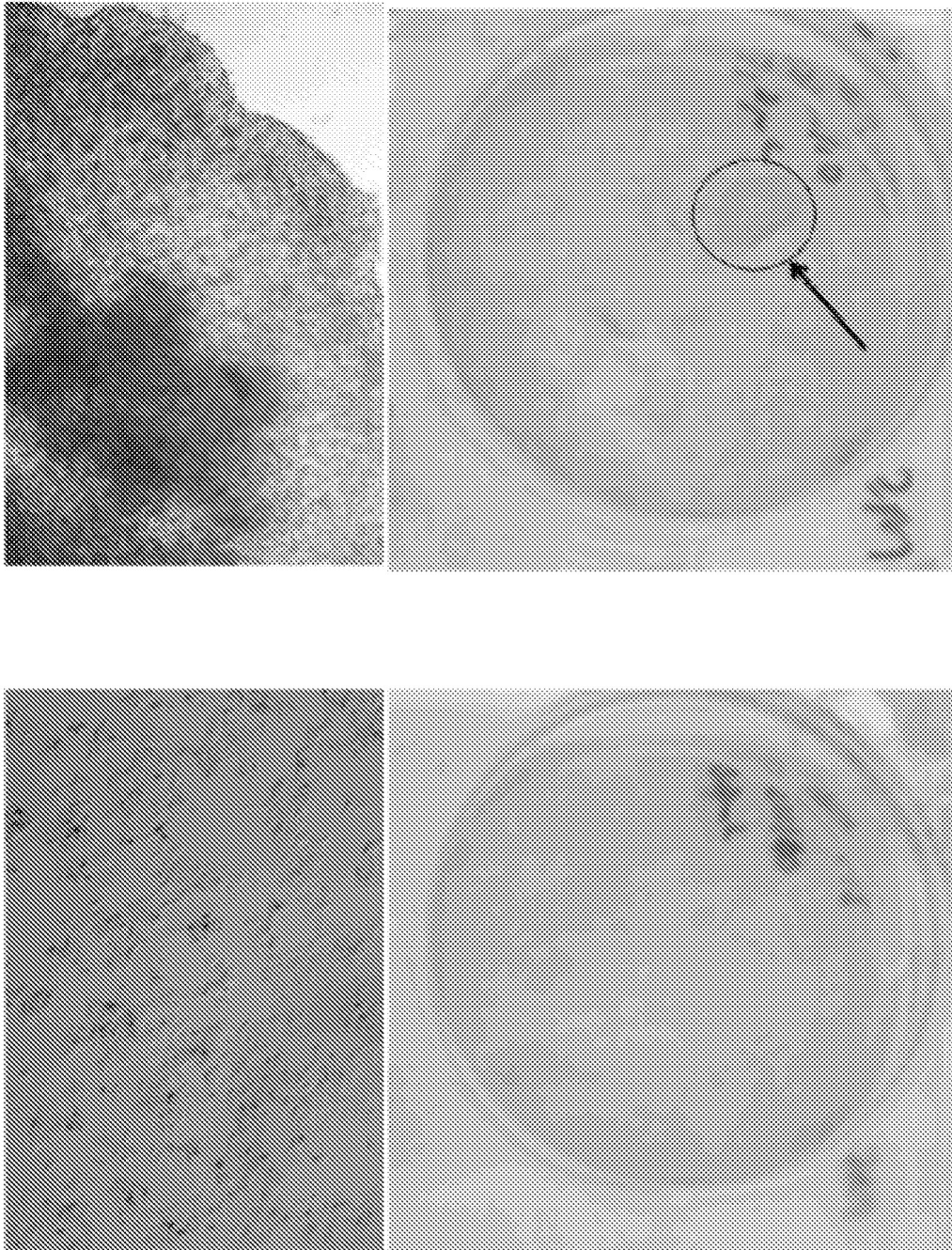


FIGURA 9



No adherente

FIGURA 10

Adherente

FIGURA 11

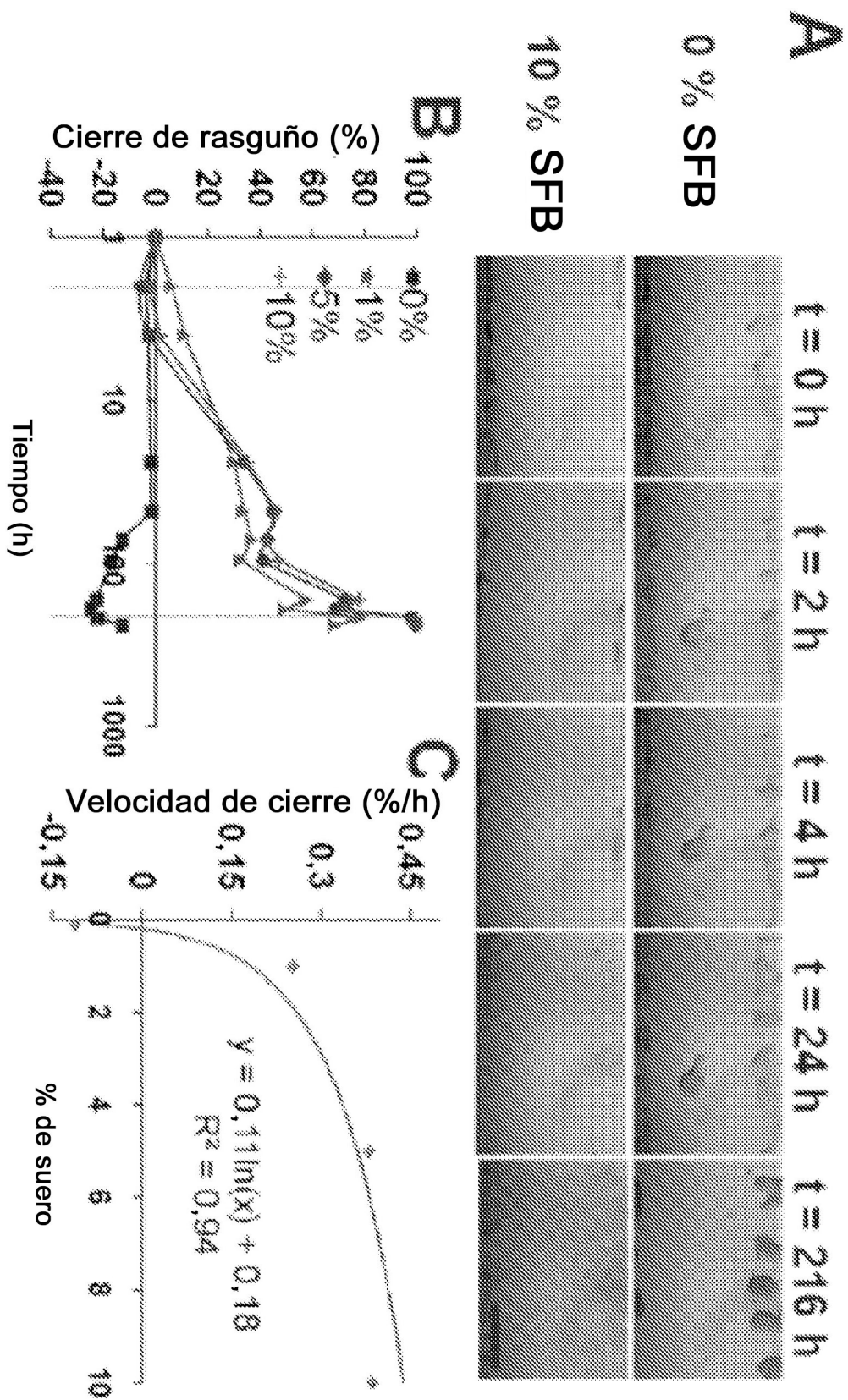


FIGURA 12

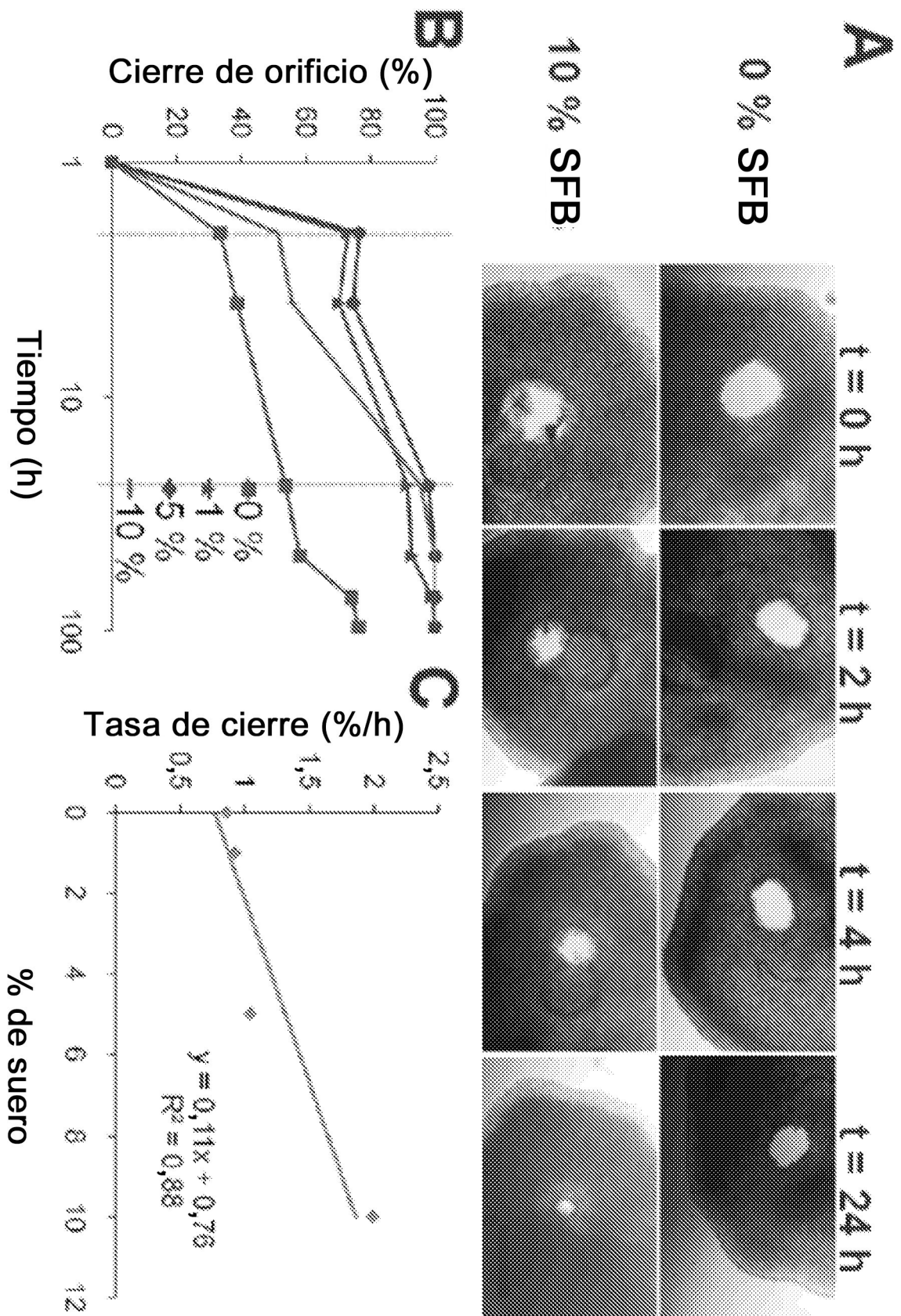


FIGURA 13

