(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 390 961**

(21) Número de solicitud: 201000640

(51) Int. CI.:

G01N 33/483 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

15.07.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2012

Fecha de la concesión:

31.01.2014

(45) Fecha de publicación de la concesión:

07.02.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
OTRI.EDIFICIO CENTRAL, DELGADO BARRETO S/N
38201 LA LAGUNA (Tenerife) ES

(72) Inventor/es:

BORGES JURADO, Ricardo;
RODRIGUEZ VALIDO, Manuel;
MACHADO PONCE, Jose David;
BELTRAN BAUTE, Beatriz;
SUAREZ MONTESINOS, Monica;
DIAZ MARTIN, David y
GONZALEZ MORALEZ, Yezer

(54) Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACION MULTIPLE Y SIMULTANEA DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE SUSTANCIAS FARMACOLOGICAS MEDIANTE METODOS OPTICOS**

(57) Resumen:

Dispositivo para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos caracterizados por el uso de placas multi-pocillo o equivalentes, un módulo de adquisición digital de imágenes para la monitorización y cuantificación de la actividad farmacológica. Las preparaciones están termostatizadas y el sistema incorpora el procesado mediante algoritmos que permiten la cuantificación de la actividad contráctil de forma simultánea.

A diferencia de los métodos al uso, no requiere de transductores de fuerza o de desplazamiento para la cuantificación de la actividad contráctil. Su aplicación reduce de forma drástica el tiempo requerido para la obtención de resultados.

ES 2 390 961 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos

SECTOR DE LA TÉCNICA

Biotecnología, investigación farmacéutica

ESTADO DE LA TÉCNICA

La evaluación de la actividad farmacológica de las sustancias químicas emanadas de los laboratorios de síntesis o de aislamiento requiere de un sustrato biológico sobre el cual hacer las pruebas. Tradicionalmente se han utilizado las técnicas en tejidos y en animales enteros. Para evaluar la actividad contráctil de un tejido (un vaso sanguíneo, una porción de intestino, un anillo traqueal o bronquial, etc...) se requiere de transductores que miden la fuerza contráctil o el desplazamiento de la preparación. Cada porción de tejido se coloca en una copa de baño termostatizada y el tejido, inmerso en una solución tampón fisiológica oxigenada, se somete a una tensión basal. Se estudia la acción del fármaco midiendo las contracciones o relajaciones del tejido.

Con la llegada de los sistemas de producción masiva de sustancias esas técnicas resultaban muy lentas y costosas por lo que se relegaron a las últimas etapas del cribado farmacológico. Paralelamente se han ido desarrollando nuevos abordajes para el cribado masivo de sustancias (high throughput screening) que permitieron la robotización de los análisis de actividad farmacológica. Las dianas ahora ya no son los tejidos sino las células cultivadas o las enzimas, receptores, ADN inmovilizados sobre un sustrato que generalmente cambia de color cuando una sustancia química se liga a ellos. La base ya no es la copa del baño de órganos, ni el tejido perfundido sino la placa multipocillo. Las placas se han desarrollado con las mismas dimensiones independientemente de la casa que las fabrique o del número de pocillos (desde 6 hasta 1536). Existen diversas modificaciones en el mercado que permiten extender sus aplicaciones como los colores (transparentes, blancas, negras), el material del fondo, plástico, vidrio, polímeros, materiales de filtración, etc. Con todo, el desarrollo de los sistemas de manejo de líquidos se ha optimizado para el trabajo con multipipetas, lavadores de placas y todo tipo de robots. Simultáneamente se han desarrollado los sistemas de detección (colorimétricos, fluorescentes, fosforescencia, impedancia, etc.). El resultado ha sido que un macro robot puede evaluar diariamente librerías de cientos de miles sustancias. El principal inconveniente radica en que ya no se trabaja con tejidos -la auténtica diana de

los fármacos- y que la información proporcionada no siempre es útil. Como ejemplo podríamos decir que si un compuesto X actúa sobre células cancerosas de varios tipos podemos estar ante un eficiente antitumoral o simplemente lejía. Los resultados del cribado masivo hasta la fecha han sido cuando menos decepcionantes.

El uso de transductores mecánicos (por ejemplo, galgas extensiométricas) introduce alteraciones reológicas en el tejido y con frecuencia lo daña. Además, el tiempo requerido para el montaje de la preparación es muy largo.

Para el caso de la invención que nos ocupa, el principio de medida prescinde de sistemas mecánicos, evitando muchas manipulaciones sobre el tejido. El transductor es sustituido por un sistema de adquisición digital de imágenes, como puede ser una simple cámara de fotos. Se emula así el registro continuo de imágenes, permitiendo observar los cambios (contracciones, dilataciones o variaciones de relación de aspecto entre ejes bidimensionales) que experimenta el tejido ante un fármaco.

Por ejemplo, en el ejemplo descrito, se utilizan placas de 96 pocillos. A diferencia de los métodos al uso, no requiere de transductores de fuerza o de desplazamiento para la cuantificación de la actividad contráctil. También reduce drásticamente el tiempo requerido para la obtención de resultados. La estructura matricial de las placas permite el manipulado en paralelo con pipetas multicanal o, en su caso, la automatización robótica del manejo de líquidos. Igualmente, se reduce la cantidad de tejido (y animales) necesarios para completar un estudio farmacológico. Al prescindir de transductores, copas de baño, equipos de amplificación, termostatización, etc. se abarata significativamente el coste inicial de implementación de la técnica. Además, el pequeño volumen de los pocillos reduce, al menos, en dos órdenes de magnitud la cantidad de producto necesario para conducir un análisis farmacológico.

Sin embargo, estos documentos, a pesar de hacer uso de procesado de imagen para realizar medidas y análisis, están lejos de la propuesta presentada a continuación, ya que en este caso particular se determina el área encerrada en los tejidos así como su evolución como respuesta a los fármacos. La presente invención permite además solucionar los problemas descritos y proporciona un procedimiento y un dispositivo para el estudio de la actividad farmacológica

de sustancias químicas en tejidos. Este sistema permite el análisis simultáneo de un número elevado de muestras.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama de bloques del sistema está formado por: A) Placa de pocillos con las muestras a analizar. B) Módulo de Adquisición de Imagen, compuesto por una óptica correctora (B.1) y una cámara digital (B.2). C) Módulo de Procesado, integrado por un procesador (C.1), un bloque de memoria (C.2) y una interfaz de usuario (C.3). D) Usuario. En este diagrama se muestra el flujo general de información entre los distintos elementos expresando el orden mediante la secuencia de números.

Figura 2. Descripción montaje del sistema. En el ejemplo que se muestra, el principio consiste en cortar secciones de tejido, en este caso anillos de la arteria aorta de rata de 500-700 µm de grosor y colocarlos en una placa de cultivos de 96 pocillos en los que hemos puesto solución tampón fisiológica (100 µL de Krebs-HEPES). En la parte A se muestra un esquema de la vista lateral donde una cámara digital (a) enfoca la placa de 96 pocillos (b). Esta se encuentra situada sobre una placa calefactora, en nuestras condiciones a 37°C. La placa calefactora puede utilizar agua en recirculación o un sistema peltier. Ambas placas se sitúan dentro de una cámara de metacrilato para mantener un mejor control de la temperatura (c). En el panel B se muestra una vista aérea de una placa de 96 pocillos (b). En C vemos una representación de cuatro anillos de aorta (e).

Figura 3. Algoritmo de cuantificación. **A,** imagen original de un sólo pocillo. **B,** imagen acondicionada (reducción de brillos y reflejos). **C,** imagen intermedia invertida, aquí se localiza y se identifica el tejido (objeto de interés). **D,** área resultante a medir obtenida combinando la imagen A y los parámetros extraídos de la imagen C.

Figura 4. Experimento llevado a cabo en una multiplaca de 96 pocillos (sólo se muestran 25) para la evaluación de la actividad contráctil de la aorta torácica de rata por métodos ópticos. A, anillos aórticos antes de administrar el agonista alfa-adrenérgico fenilefrina. B, los mismos anillos tras cinco minutos de estimulación. C, representación del experimento. Curva concentración respuesta obtenida de la placa (en eje Y reducción de área, en eje X –Log[M]).

La curva superior representa la evolución de las muestras de control, mientras que la curva inferior representa la respuesta de los anillos al fármaco. Cada punto corresponde a la media ± error estándar de 8 anillos. La contracción fue normalizada al valor inicial (entendido como 100%) del área de la luz arterial de cada anillo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención permite evaluar la actividad contráctil de sustancias farmacológicas (Figura 1) determinando cómo responden los tejidos al aplicar dichas sustancias. Se caracteriza por:

1.-Unas placas multipocillo (en esta memoria las hemos usado de 96 pocillos) en sustitución de las copas de baño tradicionales. Con estas placas se permite el análisis simultáneo de muchas sustancias en decenas de preparaciones.

2.- Una cámara fotográfica para adquirir imágenes a distintos intervalos de tiempo y de esa forma conocer cómo responden los tejidos ante el fármaco administrado.

3.- Un procedimiento para el cribado farmacológico que permite cuantificar la actividad contráctil. Este procedimiento se realiza mediante la aplicación de algoritmos que se basan en la ejecución de una serie de fases:

Fase 1. Configuración del experimento

Primeramente, se coloca la placa de pocillos sobre el soporte de fijación, de forma que quede perfectamente alineada con el sensor de la cámara. En el caso de no disponer en la base de datos un registro de los parámetros físicos de la placa (dimensiones, número de pocillos y diámetro de los mismos) tenemos que generarlo como sigue. Capturamos una imagen y calculamos el radio y las coordenadas del centro de cada pocillo y lo guardamos en la base de datos. Para ello, es necesario establecer un punto de referencia, en el centro de un pozo (pozo de referencia). A continuación, se determina la posición del centro de dos pocillos vecinos ortogonales y sus distancias. Con estas medidas, y aprovechando la geometría regular de la placa, se determinan los parámetros físicos.

En caso afirmativo, cargamos de la base de datos la información correspondiente a la placa que vaya a ser utilizada. Seguidamente, se especifican los parámetros que establecen las

condiciones del experimento (por ejemplo, duración, número de imágenes por concentración de fármaco, pocillos de control,...).

Fase 2. Extracción de medidas. Algoritmo de procesado

1. En primer lugar se debe capturar una imagen del conjunto de tejidos al que se ha aplicado el fármaco, convertirla a escala de grises y dividirla en tantas sub-imágenes como pocillos se dispongan en la placa. Estas nuevas sub-imágenes, se construyen de forma concéntrica al pocillo y con unas dimensiones de 2Rx2R pixeles, siendo R el radio de los pocillos, también en pixeles. Con esto, sólo se analiza el área circundante al anillo arterial (suponiendo que sea una arteria el tejido colocado), eliminando del cómputo los píxeles que se hallen fuera de la zona de interés. Por ejemplo, si se dispone de una placa de 96 pocillos, el algoritmo analizará 96 sub-imágenes por cada imagen capturada, si es una placa de 12 pocillos, corresponderán 12 y así sucesivamente.

2. En una segunda etapa se eliminan rasgos y objetos indeseados (tales como reflejos, brillos intensos, burbujas...) que dificultarían la detección del tejido (por ejemplo, empleando técnicas de mejora de contraste, manipulando las componentes del espacio de color HSV, reduciendo el gradiente de grises, etc...).

3. Mediante el método de umbralización óptimo (por ejemplo, mediante el método de Otsu) cada sub-imagen es segmentada en tantos objetos como dispongan. El resultado de salida de esta etapa es una imagen binaria.

4. En esta fase se etiquetan los objetos de cada sub-imagen binaria (áreas blancas encerradas por píxeles negros) entre los cuales se encuentra el área circunscrita por el tejido. Este proceso sigue las mismas directrices que los algoritmos de conexión de componentes por etiquetado, donde a todos los píxeles de un mismo objeto se les asigna un mismo número (etiqueta), dando como resultado una matriz de salida de las mismas dimensiones que la imagen de entrada y donde cada elemento tiene asignado un valor de acuerdo al objeto al que pertenezca. En particular, las bases de nuestro proceso de identificación se ajustan al método "Run-lenght enconding", equiparando como objetos aquellos pixeles de color blanco que, según el criterio de la técnica, hayan sido determinados como conexos. Esto permite identificar objetos como el fondo de la imagen, el interior del tejido y alguna que otra sección en blanco de menor tamaño resultado de los brillos y reflejos que no se consiguieron eliminar con el contraste y la binarización.

5. Luego, se identifica el tejido (en este caso, el anillo arterial) mediante la aplicación de descriptores que recogen los parámetros que lo diferencian del resto de objetos (por ejemplo, tamaño de área, diámetro, perímetro, excentricidad, color, etc.). Se reconocerá como objeto de interés aquel cuyas características tengan mayor afinidad con los parámetros establecidos. Una vez identificado, se determina su posición dentro del plano de la imagen (por ejemplo, calculando las coordenadas de su centro de masas).

6. Dado que ahora las coordenadas que determinan la localización del tejido son conocidas, podemos seleccionar el área inscrita en el anillo arterial de entre todos los objetos que aparecen en escena, entendiendo por objetos, los pocillos, los bordes de la bandeja, etc. De tal forma que aislemos la imagen (por ejemplo, construyendo una imagen binaria en la que solo aparezca el tejido), extraer los datos deseados y almacenar estos últimos para su posterior presentación.

Habiendo acabado con el análisis de los anillos contenidos en todos y cada uno de los pocillos, el algoritmo toma otra imagen y repite, en el tiempo, el mismo proceso tantas veces como el usuario haya considerado oportuno.

Fase 3. Presentación de resultados (figura 4)

Terminado el experimento, los resultados correspondientes a la medición del área de cada tejido son almacenados de forma dinámica y en formato estándar.

Utilizando una iluminación monocromática adecuada, filtros de corte y cámaras sensibles el sistema puede complementarse fácilmente con la monitorización simultánea de otros parámetros como el calcio intracelular mediante el uso de sondas fluorescentes.

Modos de realización de la invención

Un ejemplo de realización del experimento se muestra en la Figura 2, donde se procede a estudiar anillos de arteria aorta de rata (rebanadas de 500 μm). Se utilizó una cámara réflex de 14 Mpixels/pulgada, la cual se conectó, vía USB, a un ordenador desde el que es posible manejar el disparador y los parámetros de control de la misma. El objetivo de la cámara ha de permitir obtener imágenes de toda la placa sin distorsionar la perspectiva y aprovechando

al máximo el número de píxeles del chip-sensor. En el ejemplo descrito se utilizó un objetivo tipo Macro ED 50 mm 1:2.0.

El proceso de detección y medida de la actividad contráctil pasa por una serie de etapas. La placa de pocillos, conteniendo los anillos de arteria aorta de rata, se coloca sobre una placa termostatizada a 37 ºC situado bajo la cámara y se calibra y alinea con el sistema de adquisición. Terminada la etapa de calibrado, se realiza de forma continua un de registro secuencial de imágenes del proceso (medición en situación basal, tras la administración de fármacos) y medida de la respuesta contráctil. Esta tarea puede ser programada fácilmente en virtud de los tiempos de incubación, la respuesta del tejido, etc.

En el ejemplo de la figura 4 hemos construído una curva concentración-respuesta a la fenilefrina en el rango 100 nM a 30 µM. Los anillos de arteria aorta estaban bañados en 90 µL de una solución salina (Krebs-HEPES) a 37 ºC. En multipipetas de 8 canales añadimos 10 µL de fenilefrina diez veces más concentrada que la concentración requerida. Cada tejido recibió una única adición de fármaco. Monitorizamos la respuesta contráctil hasta que el tejido alcanza su estado estacionario. Como puede verse el grado de respuesta es idéntico al observado con un sistema de baño de órganos tradicional. Nótese que la curva concentración-respuesta tiene una morfología típica en sigmoide aunque sea especular de las habituales obtenidas en baño de órganos clásico. De la misma manera, pueden utilizarse dosis acumulativas y cualquier protocolo estándar del laboratorio de farmacología.

El sistema muestrea cada fotografía del sistema y extrae los valores numéricos para su posterior análisis. Debido a que cada pocillo representa un experimento independiente, la fotografía es dividida en tantas sub-imágenes como pocillos se dispongan en la placa. Sobre cada una de estas se ejecutan una serie de etapas de procesado que permiten determinar la actividad contráctil del tejido. En la figura 3 se muestra la estrategia seguida para la cuantificación del proceso, tras el procesado previo que se realiza sobre cada fotografía. Es importante resaltar que el programa localiza la posición de la preparación independientemente de que ésta se desplace o gire dentro del pocillo.

Con todo, el área interior de las arterias ronda, en nuestras condiciones, tiene un valor en torno a los 400 píxeles. Aunque la reducción de los diámetros de los anillos es apreciable a simple vista la cuantificación otorga valores objetivos. Dado que nunca se va a obliterar la

luz de la arteria, la reducción del calibre ante un agente vasoconstrictor (e.i. fenilefrina) nunca rebasará el ≈70%. Los datos normalizados al calibre inicial se muestran en la figura 4C.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento que permite evaluar la actividad contráctil de sustancias farmacológicas analizando el cambio que experimentan los tejidos a los que son aplicadas, caracterizado por ejecutar las siguientes fases:

-Fase 1 de configuración, donde una placa multipocillos o equivalente se sitúa de manera alineada con una cámara fotográfica o un sistema de adquisición de imágenes y se genera una base de datos de los parámetros físicos de la placa: diámetro, número de pocillo y profundidad.

-Fase 2 de extracción de medida, que consiste en aplicar un algoritmo donde se captura una imagen, se convierte a escala de grises y se divide en tantas sub-imágenes como pocillos se dispongan en la placa. En una segunda etapa se eliminan rasgos indeseados que dificultarían la detección del tejido. A continuación, cada sub-imagen se segmenta. Seguidamente, se identifica la región del tejido que interese estudiar mediante la aplicación de descriptores y se determina su posición. Finalmente, se selecciona el área inscrita por esa región del tejido que interese estudiar y se extraen los datos deseados, en particular un cambio de área.

- Fase 3 de presentación de resultados, donde los resultados correspondientes a la medición del área de cada tejido son almacenados de forma dinámica y en formato estándar, y se analiza la variación del área de tal forma que si disminuye se considera que la sustancia analizada presenta actividad contráctil. Un aumento del área implica que la sustancia analizada presenta actividad dilatadora.

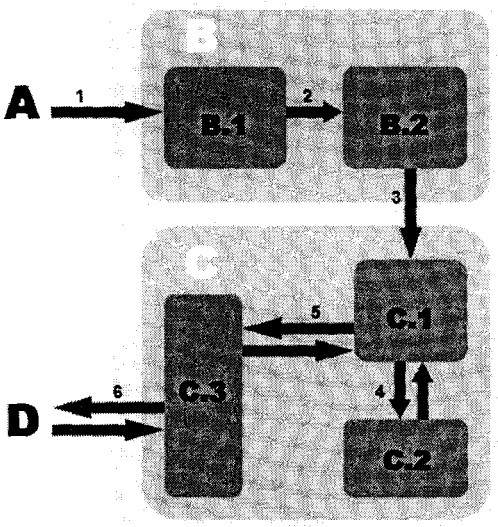


Figura1

Figura 2

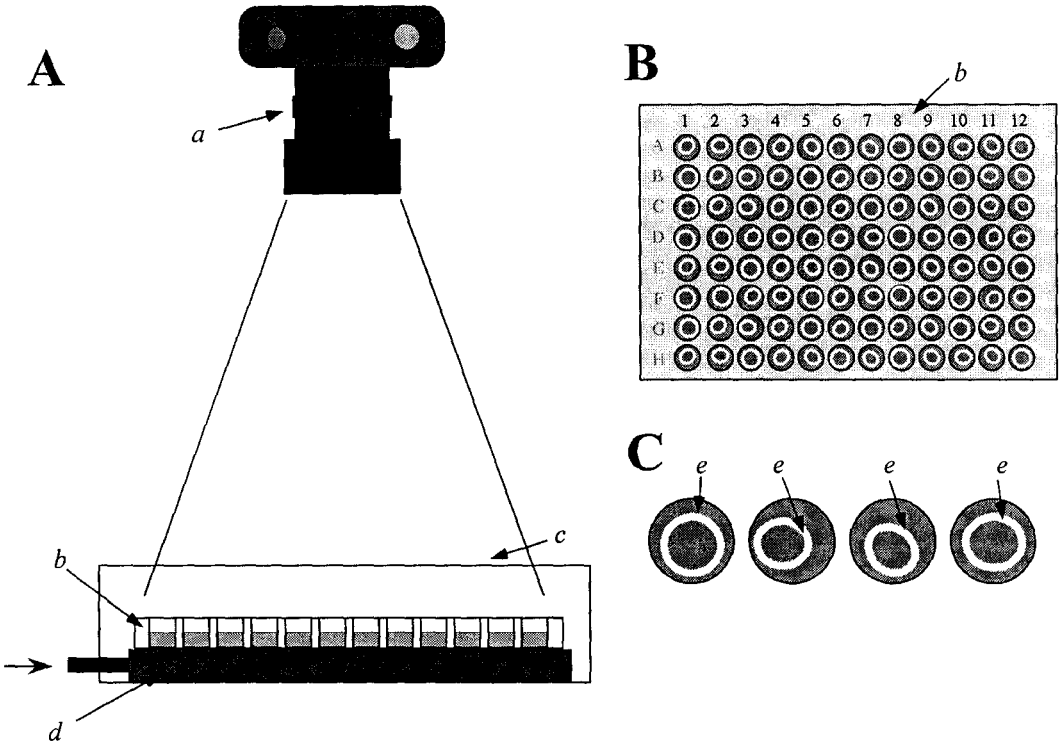


Figura 3

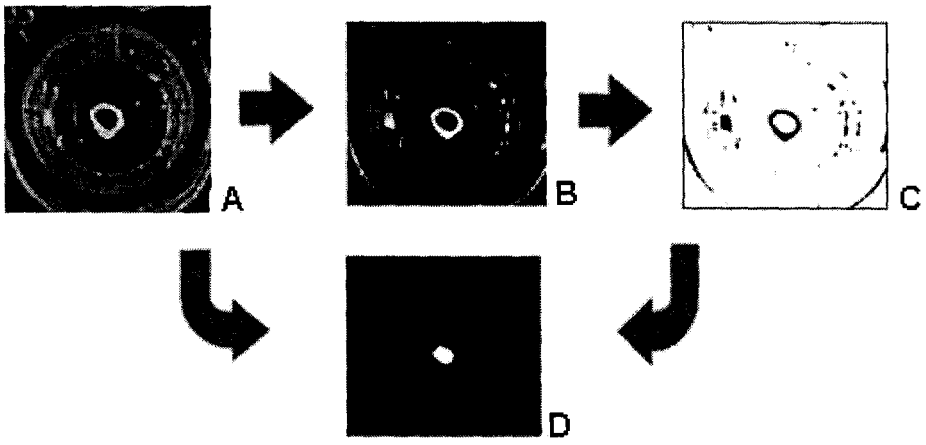
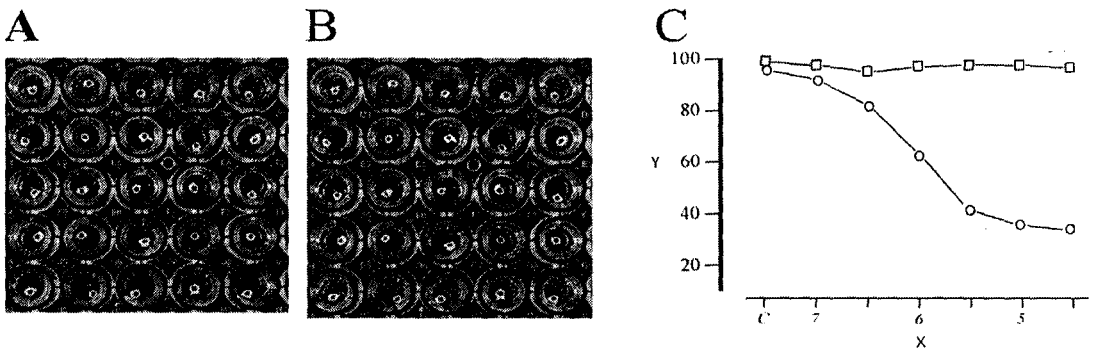


Figura 4


A
B
C
100
80
Y 60
40
20
X

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201000640

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.07.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/483*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CIVELEK M. et al. Smooth muscle cells contract in response to fluid flow via a Ca2+-independent signaling mechanism. J Appl Physiol. 30.08.2002, Vol. 93, páginas 1907-1917 (todo el documento)	1
X	MITCHELL R. W. et al. Conservation of bronchiolar wall area during constriction and dilation of human airways. J Appl Physiol. 1997, Vol. 82, páginas 954-958 (todo el documento)	1
X	IVANOV V. et al. Bioflavonoids effectively inhibit smooth muscle cell-mediated contraction of collagen matrix induced by Angiotensin II. J Cardiovasc Pharmacol. 2005, Vol. 46, páginas 570-576 (todo el documento)	1
A	Investigadores de la ULL patentan un procedimiento óptico para evaluar el efectos de los fármacos en los tejidos 25.05.2010 todo el documento [en línea] [recuperado el 09.08.2012] Recuperado de Internet: http://wayback.archive.org/web/20100525030102*/http:/www.ull.es/viewullnew/institucional/prensa/Noticias_ULL/es/276387	1

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
29.10.2012	**M. Cumbreño Galindo**	1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CIVELEK M. et al. J Appl Physiol. Vol. 93, páginas 1907-1917	30.08.2002
D02	MITCHELL R. W. et al. J Appl Physiol. Vol. 82, páginas 954-958	1997
D03	IVANOV V. et al. J Cardiovasc Pharmacol. Vol. 46, páginas 570-576	2005
D04	Investigadores de la ULL patentan un procedimiento óptico para evaluar el efectos de los fármacos en los tejidos 25.05.2010 todo el documento [en línea] [recuperado el 09.08.2012] Recuperado de Internet: http://wayback.archive.org/web/20100525030102*/http:/www.ull.es/viewullnew/institucional/prensa/Noticias_ULL/es/276387	25.05.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para evaluar la actividad contráctil de sustancias farmacológicas analizando el cambio que experimentan los tejidos a los que son aplicadas.

D01 examina el efecto del flujo de fluido en la contracción de células de la musculatura lisa de la aorta de ratas.

D02 estudia el efecto de la contracción y relajación de la musculatura lisa del tracto respiratorio sobre el área de la pared bronquial.

D03 comprueba el efecto de los flavonoides sobre la actividad contráctil de células de la musculatura lisa de aortas humanas.

D04 habla de un procedimiento óptico para evaluar el efecto de fármacos vasoconstrictores o vasodilatadores sobre los tejidos que permite el análisis múltiple y simultáneo de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas sin dañar los tejidos. A diferencia de los métodos mecánicos, el transductor es sustituido por un sistema de adquisición digital de imágenes que registra los cambios que experimenta el tejido ante la administración de un determinado fármaco pudiendo observan si experimenta contracciones o dilataciones. Este sistema permite, además, el análisis simultáneo de un número elevado de muestras.

NOVEDAD

En la documentación y bases de datos que han sido consultadas no se ha encontrado un procedimiento que comprenda las mismas etapas que el procedimiento objeto de la presente invención y, por tanto, la reivindicación 1 se puede considerar nueva a la vista del estado de la técnica.

ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 examina el efecto del flujo de fluido en la contracción de células de la musculatura lisa de la aorta de ratas. Las células son cultivadas en placas Petri y mediante una cámara, conectada a un vídeo y a una televisión, se graban todos los experimentos. Para ello se mide el área de cada célula y se establece la reducción en el área como contracción.

D02 estudia el efecto de la contracción y relajación de la musculatura lisa del tracto respiratorio sobre el área de la pared bronquial determinando el perímetro interno o área luminal (A_i) y el área transversal total (A_0) de muestras de bronquios humanos. La medida se lleva a cabo utilizando videomicrometría computerizada que captura las imágenes y marca las áreas de anillos bronquiales de 1.0 a 1.5 mm de grosor situados en microplacas antes y después de añadir carbacol o isoproterenol.

D03 comprueba el efecto de los flavonoides sobre la actividad contráctil de células de la musculatura lisa de aortas humanas inmersas en una matriz de colágeno tridimensional y situadas en placas de 24 pocillos. Para ello, se toman fotografías digitales de los geles y se mide el cambio en el área de los mismos.

Así pues, son sobradamente conocidos en el estado de la técnica los procedimientos para evaluar la actividad contráctil de sustancias farmacológicas basados en el análisis del cambio que experimentan los tejidos a los que son aplicadas, en concreto del área, y, por tanto, la reivindicación 1 no presenta actividad inventiva.