

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 922**

21 Número de solicitud: 201730992

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.01.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

22.04.2019

Fecha de concesión:

02.04.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.04.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)

Avda. Blasco Ibáñez, 13

46010 València (Valencia) ES

72 Inventor/es:

PONSODA I MARTÍ, Xavier;

BALLESTÍN HINOJOSA, Raúl;

LÓPEZ GARCÍA, Carlos y

MOLOWNY TUDELA, Asunción

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE METALES POR AUTOMETALOGRAFÍA EN MUESTRAS DE TEJIDO BIOLÓGICO**

57 Resumen:

Un método para la detección de metales por autometalografía en muestras de tejido biológico.

La presente invención se refiere a un método para la detección de un metal por autometalografía, preferentemente zinc, en una muestra de tejido biológico, preferentemente un cultivo de célula animal, caracterizado porque comprende llevar a cabo al menos una incubación de la muestra con un fluorocromo específico de dicho metal y al uso de este método en cualquier área relacionada con la autometalografía, y más específicamente en estudios biológicos con fines médicos, para toxicología o relacionados con la contaminación de alimentos.

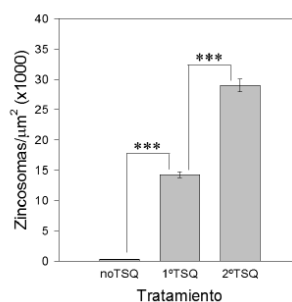


FIG. 3

ES 2 697 922 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

**UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE METALES POR AUTOMETALOGRAFÍA
EN MUESTRAS DE TEJIDO BIOLÓGICO**

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se enmarca en la tecnología de los métodos de detección de metales

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las técnicas de autometalografía son conocidas desde hace décadas, son perfectamente válidas, y sirven para detectar metales en muestras de tejido biológico,
10 principalmente. Sin embargo, estos métodos tienen sus limitaciones y no siempre son fácilmente subsanables. El método de la presente invención ha unificado las técnicas fluorescentes y las autometalográficas mejorando la sensibilidad de las segundas. Al aumentarse los niveles de sensibilidad de una técnica, la información recogida tiene un nivel de calidad superior.

15 La detección mediante fluorescencia está sujeta a la vida media del complejo fluorescente cuando éste es iluminado para ser observado. Los métodos autometalográficos permiten la observación de los elementos que contienen el ion buscado durante períodos más largos de tiempo porque es más estable. En cualquier caso, existe un problema en la técnica autometalográfica de sensibilidad y de umbral
20 de detección. Con el método de la presente invención usando un fluorocromo específico de un metal se consigue una mejora en la sensibilidad de los métodos de autometalografía existentes.

El uso de sustancias que dan color o que emiten fluorescencia cuando entran en contacto con los iones metálicos divalentes se utilizan para detectarlos dentro de las
25 células; son los llamados "métodos directos". La fijación y la precipitación de los iones metálicos en forma de precipitados de sales insolubles, su mantenimiento durante el proceso histológico, y su detección después del revelado autometalográfico son pasos esenciales para otros métodos, los llamados "métodos indirectos" (tales como los métodos de Timm y Danscher Neo-Timm).

30 Los métodos directos pueden ser utilizados *in vivo* y para propósitos cuantitativos/microanalíticos, aunque por lo general no permiten una buena conservación histológica. Los métodos indirectos por contra, aunque no son muy adecuados para la cuantificación, son mucho más sensibles y compatibles con la microscopía óptica y electrónica.

Los métodos indirectos requieren principalmente que los iones metálicos sean precipitados como nanocristales insolubles.

En el estado de la técnica se conocen trabajos que divulgan detección de diversos metales por autometalografía. Por ejemplo, el trabajo de Danscher, 1991, se refiere a la aplicación de la autometalografía (AMG) a material histológico de humanos y animales expuestos a oro, plata y mercurio, y se ha mostrado que pueden ser detectables con el microscopio óptico o electrónico. Danscher, 2002, divulga la detección de oro procedente de implantes mediante autometalografía. Danscher, 2008, se refiere a la detección de mercurio presente en ranas que lo captan del ambiente, mientras que Hacker, 1996, se refiere a autometalografía para oro, plata, mercurio, bismuto, cobre, zinc.

Algunos autores han resaltado la necesidad de detectar los metales pesados de los alimentos (Hosseini, 2015). Existen también trabajos publicados sobre detección por autometalografía de metales como bismuto, que está presente en la pólvora (Soltenberg, 2003).

El trabajo de Meeusen, 2011, muestra también un ejemplo del uso de metoxitoluenosulfonamido-quinolina (TSQ) para detectar zinc.

En el caso del zinc, estos fluorocromos específicos de zinc, y particularmente el TSQ se usa habitualmente para fluorescencia, sin embargo no se había usado nunca antes en autometalografía de zinc, y su uso mejora la detección de zinc por autometalografía.

El zinc que puede ser detectado mediante técnicas histoquímicas, es el denominado zinc histoquímicamente detectable o lábil, y supone una fracción pequeña de la cantidad de zinc total de la célula (10-15%). El resto de formas en las que se encuentra el zinc, unido a proteínas, a enzimas, o a ácidos nucleicos o mediante uniones covalentes, no es histoquímicamente detectable.

El primer método fiable para la detección histoquímica de zinc y metales pesados fue desarrollado por Timm (1958). Una premisa del método autometalográfico es que el zinc presente en las células se encuentre en forma iónica, ya que la mayoría del zinc detectable se acumula en vesículas, como vesículas sinápticas, vesículas secretoras y lisosomas. Los dos métodos ampliamente utilizados para realizar esta tarea han sido: la adición de iones sulfuro en el fijador (métodos Timm y Neo-Timm) o la adición de iones selenio (método Danscher selenito) *in vivo* inmediatamente antes de la fijación. Es muy importante que ambos precipitados de nanocristales de sulfuro o de selenio

permanezcan insolubles durante el proceso histológico. Entonces, estas partículas del nanocrystal de metal en secciones de tejido son reveladas por autometalografía. Las ventajas de esta técnica son: la alta sensibilidad, la localización precisa y la posibilidad de detectar el metal que se está amplificando (Danscher y Stoltenberg, 2006).

5 La autometalografía de plata se basa en el depósito de plata metálica en la superficie del nanocrystal metálico y así formar parte de él, reduciéndose los iones plata de la solución al capturar los electrones liberados por la hidroquinona, de esta manera se forma un cristal metálico que va aumentando de tamaño progresivamente con el tiempo mientras haya disponibilidad de plata iónica e hidroquinona en la solución. Esta
10 envoltura de plata metálica alrededor del centro catalítico crece hasta que pueda ser detectado por microscopía óptica o electrónica. Se ha calculado que un sólo átomo de oro, dos átomos de plata, y dos o tres átomos de zinc son necesarios para actuar como centro catalítico autometalográfico. Por otro lado, los depósitos de sulfuro (Timm, 1958), complejos de selenio (Danscher, 1982), oro, mercurio, plata metálica
15 (Danscher et al., 1994), e incluso los grupos SH de las proteínas pueden actuar como centros catalíticos para la autometalografía.

Aunque el método de Timm no es específico para un ion metálico definido, el uso de diferentes tratamientos de las muestras con ácido (disolviendo nanocristales de un metal en particular) lo hacen adecuado para estudios microscópicos de zinc, hierro y
20 cobre (Kozma et al., 1981).

Modificaciones de la técnica original de Timm han permitido el estudio del zinc en biopsias de cerebros humanos mediante detección autometalográfica (Jaarsma y Korf, 1990).

El uso de diferentes soluciones, como el glutaraldehído saturado con sulfuro (Grzybek et al, 1990) o una perfusión inicial con una solución de sulfuro sódico antes del
25 glutaraldehído (Ugarte y Osborne, 1998), así como mejoras en la mezcla reveladora (Danscher y Zimmer, 1978) han permitido que el revelado de Timm sea adecuado para los estudios de microscopía electrónica. Así, se localizaron gránulos autometalográficos de plata electrodensos dentro de las vesículas sinápticas de las
30 neuronas del hipocampo de rata (Haug, 1967). Y más tarde este hallazgo fue confirmado con el método sulfhídrico-osmio (López-García et al., 1984) y el método Neo-Timm (Pérez-Clausell y Danscher, 1985).

La preparación que se puede llamar clásica de las muestras para la autometalografía del zinc (Danscher, 1981), incluye la precipitación de zinc iónico con sulfuro sódico y consta de los siguientes pasos:

- fijación de las células con paraformaldehído (PFA) 4%, glutaraldehído (GA) 4% o con PFA- GA 1%; 20 minutos a 4°C
- 5 - incubación, durante 30 minutos a 4°C, con la solución NTS:
 - 0,1 g de Na₂S
 - 6 ml de GA 50%
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4
 - 44 ml de agua destilada
- 10 - lavado con abundante agua destilada, quedando preparadas para su posterior revelado por autometalografía, tanto con microscopía óptica como microscopía electrónica.

15 A diferencia de lo anteriormente expuesto, la preparación de las muestras para la autometalografía del metal, tal como el zinc, según la presente invención, comprende realizar al menos dos incubaciones de las muestras con un fluorocromo específico para dicho metal, por ejemplo para el zinc, un fluorocromo específico de zinc.

Un artículo que se refiere tanto a fluorescencia como autometalografía y describe el uso de TSQ es Nitzan Y. B. 2004. Sin embargo estas técnicas de fluorescencia y autometalografía hasta la fecha se usan de manera separada y se combinan por primera vez en el método de la invención, que contribuye a una mejora del método de Timm y variantes, elevando la sensibilidad de los límites de detección.

20 Los métodos autometalográficos sirven, en teoría, para cualquier muestra, independientemente del origen. Con el método de la invención se mejora la detección, independientemente de si la muestra procede de un experimento con un metal, por ejemplo el zinc, o de otra clase.

25 En el caso específico del zinc, su detección en los tejidos puede ayudar a realizar diagnósticos del estado de las células como consecuencia de enfermedades, lesiones o intoxicaciones.

30 Con la presente invención se ha encontrado una manera ventajosa de procesar las muestras para estabilizar y observar los zincosomas - tipo de endosomas que se forman en células como los astrocitos en respuesta a la presencia de zinc en el medio extracelular – al final de todo el proceso, cuya última parte es la autometalografía de manera parecida a lo que se ve con la fluorescencia, minimizando la pérdida de marcaje. El método de la presente invención es de utilidad en diversas áreas tecnológicas, tales como investigación básica en ciencia. En el caso concreto del zinc, tiene una utilidad

específica en cualquier estudio biológico que tenga este metal entre sus intereses. Y en general es de utilidad en medicina, toxicología y contaminación de alimentos para su aplicación a cualquier metal que pueda ser detectado mediante autometalografía, entre los que se encuentra por ejemplo, el zinc.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la detección de un metal por autometalografía caracterizado por que comprende llevar a cabo antes del tratamiento autometalográfico, al menos dos incubaciones de una muestra que contiene el metal,
10 con un fluorocromo específico del metal.

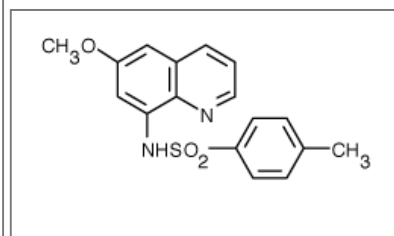
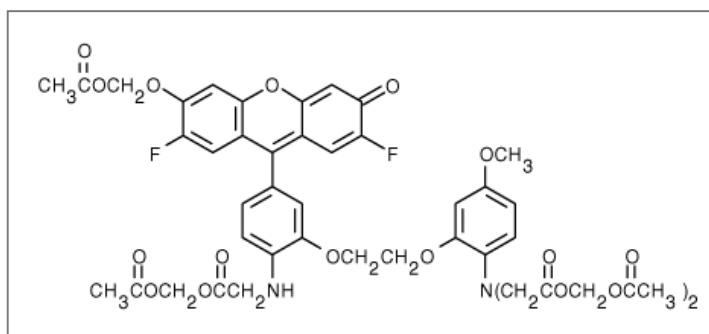
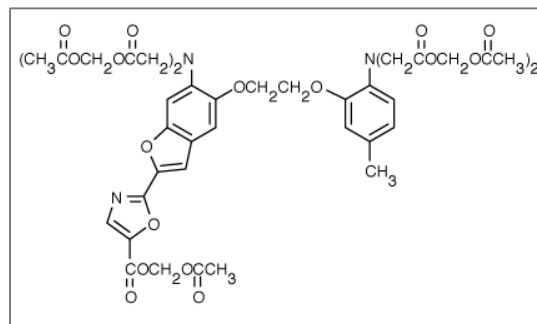
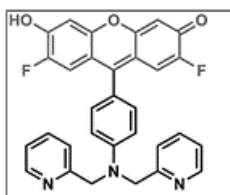
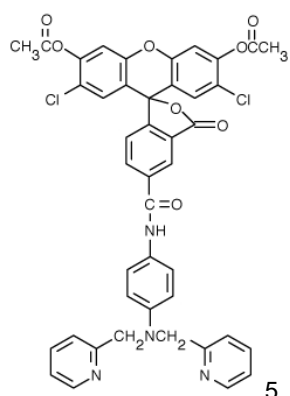
La muestra puede ser de cualquier tipo, en el caso de la medicina puede ser por ejemplo, células, órganos o tejidos. En el caso del zinc la muestra es, por ejemplo, de un cultivo de una célula animal.

El metal puede ser cualquiera que pueda ser detectado por autometalografía y para el cual se conozcan fluorocromos específicos. Por ejemplo puede ser zinc, cobre, mercurio. Otros metales a los que se podrá aplicar el método de la presente invención serán el hierro, níquel, cromo, manganeso, cobalto, plomo, cadmio, molibdeno, tungsteno, uranio, arsénico, selenio, bismuto, aluminio y lantánidos.

Los fluorocromos pueden ser moléculas pequeñas, sensores codificados genéticamente, o híbridos. En el caso del zinc se utilizará un fluorocromo específico de zinc, que puede ser, por ejemplo, un sensor basado en quinolina, fluoresceína, 4-aminonaphthalimida, BODIPY, rodamina, resorufina o cianina. Ejemplos de fluorocromos específicos de zinc son New Port green (Newport Green DCF127 y Newport Green PDX123), Fura-2, FluoZin-3, y preferentemente el TSQ.

25

30

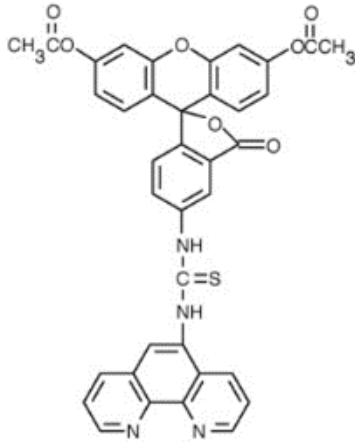


10

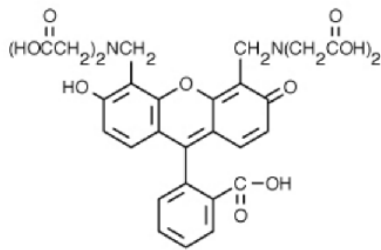
Arriba se muestran por orden: Newport Green DCF127 ($C_{43}H_{30}Cl_2N_4O_8$), Newport Green PDX ($C_{31}H_{21}F_2N_3O_3$), Fura-2 AM ($C_{44}H_{47}N_3O_{24}$), Fluozin-3 AM ($C_{46}H_{44}F_2N_2O_{20}$) y TSQ ($C_{17}H_{16}N_2O_3S$).

- 15 Ejemplos de fluorocromos que pueden ser utilizados para algunos metales susceptibles de ser detectados por el método de la presente invención se encuentran en "Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems", (Carter K. P., 2014).

20 Fluorocromos apropiados para el cobre son por ejemplo, un fluorocromo basado en fenantrolina, de fórmula

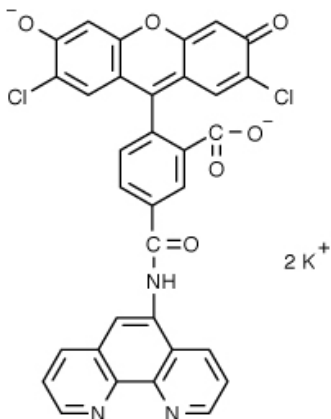


que también sirve para detectar hierro, cadmio, plomo, mercurio o níquel.
 Otro fluorocromo para cobre es uno basado en calceína de fórmula



5

Un fluorocromo conocido de mercurio es el representado por la fórmula $C_{33}H_{15}Cl_2K_2N_3O_6$ y que se muestra a continuación, llamado comercialmente "Phen Green dipotassium salt"



10

La incubación de la muestra con un fluorocromo específico de un metal, como por ejemplo, el zinc, puede tener una duración variable, y no existe una limitación. Además la duración de la incubación depende del metal concreto de que se trate. En el caso del zinc y a modo de ejemplo, la duración de una incubación puede ser entre 0,5
5 segundos y 30 minutos.

Las concentraciones de fluorocromos pueden ser igualmente variables, y dependerán del metal concreto de que se trate. En el caso del zinc y a modo de ejemplo se pueden utilizar concentraciones de fluorocromo de entre 1 y 100 µg/ml.

El número de incubaciones de la muestra con el fluorocromo específico de un metal
10 puede ser variable, y no existe una limitación. En el caso del zinc se pueden llevar a cabo una o más incubaciones, por ejemplo para el caso de una muestra de cultivo de célula animal se pueden realizar dos incubaciones de la muestra con un fluorocromo específico de zinc.

En el caso de llevar a cabo más de una incubación, por ejemplo dos, entre las dos
15 incubaciones con un fluorocromo de un metal, el método puede comprender una etapa de fijación de las muestras. Esta etapa de fijación se puede realizar a valores de pH variables, dependiendo de la muestra, del metal etc.

Realizaciones más concretas del método de la invención se refieren a la detección de zinc por autometalografía, y de modo específico, en muestras de cultivo de célula
20 animal. Pero debe entenderse que el método puede aplicarse a otro metal y a otro tipo de muestras biológicas. Ejemplos de muestras biológicas son muestras de órganos, tejidos etc.

En realizaciones concretas, para el caso del zinc, la etapa de fijación de las muestras se realiza con PFA a pH entre 5,8 y 8,2, preferentemente entre 6 y 8.

25 En realizaciones concretas para el caso del zinc, dicha etapa de fijación para el caso de las muestras de cultivos de célula animal, se puede realizar con PFA a una concentración – expresada como gramos por cada 100 mL de volumen final de tampón fosfato – por ejemplo entre el 2% y el 6 %.

Además dicha etapa de fijación de las muestras se puede realizar con PFA a una
30 concentración – expresada como gramos por cada 100 mL de volumen final de tampón fosfato y a pH entre 5,8 y 8,2, preferentemente a pH entre 6 y 8.

En realizaciones concretas para el caso del zinc el método comprende:

- incubación de la muestra con TSQ,
- fijación con PFA a pH entre 5,8 y 8,2, preferentemente a pH entre 6 y 8,

- incubación de la muestra con TSQ.

Según realizaciones particulares adicionales para el caso de autometalografía de zinc en cultivo de célula animal, la etapa de fijación de las muestras se realiza con PFA al 4% y pH 7,4.

5 Según realizaciones particulares adicionales para autometalografía de zinc, la muestra son astrocitos cultivados, y el método comprende:

- incubación de la muestra con TSQ a 50 µg/ml durante 10 minutos,
- fijación con PFA 4% a pH 7,4,
- segunda incubación de la muestra con TSQ a 50 µg/ml durante 10 minutos.

10

Según realizaciones particulares adicionales para autometalografía de zinc el método comprende después de la segunda incubación con TSQ:

- incubación, durante 30 minutos a 4°C, con una solución NTS,
- lavado con abundante agua destilada, quedando preparadas las muestras para su posterior revelado por autometalografía.

15

Según realizaciones particulares adicionales para autometalografía de zinc, el método comprende:

- incubación de la muestra con TSQ a 50 µg/ml durante 10 minutos,
- fijación con PFA 4% a pH 7,4,

20

- incubación de la muestra con TSQ a 50 µg/ml durante 10 minutos,
- incubación, durante 30 minutos a 4°C, con una solución NTS,
- lavado con abundante agua destilada, quedando preparadas las muestras para su posterior revelado por autometalografía,

que representan las condiciones óptimas para la correcta estabilización y detección del zinc mediante métodos autometalográficos en tejidos y, en general, en cualquier muestra.

25

La presente invención se refiere también al uso del método descrito para detección de zinc en zincosomas.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra la formación (conocida) de zincosomas (endosomas que contienen zinc) en astrocitos con, y sin, pulso de zinc exógeno.

La figura 2 muestra el efecto del TSQ tras la fijación sobre el marcaje de zincosomas con Neo-Timm. Concretamente las figuras 2 (A-E) muestran astrocitos incubados con

distintos protocolos: con y sin zinc exógeno, y con, y sin, el marcador TSQ. En la serie de fotos solo se ven marcas positivas en las muestras que han tenido alguna incubación con TSQ: la foto C una incubación y la E dos incubaciones.

La figura 3 muestra el efecto del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección
5 de zinc mediante autometalografía en células cultivadas.

La figura 4: muestra por una parte el efecto del pH del fijador sobre el resultado final. Con una incubación de TSQ solo se ve marca a pH 7,4 con Neo-Timm. Con dos incubaciones, encontramos marca con cualquier pH.

La figura 5: muestra la cuantificación de zincosomas marcados tras el revelado con
10 Neo-Timm utilizando soluciones fijadoras con distintos valores de pH y con una o dos incubaciones con TSQ.

Los ejemplos que se muestran a continuación se refieren a autometalografía de zinc en muestras biológicas, pero como se ha indicado, el método puede ser aplicado a otros metales y a otro tipo de muestras.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Reactivos utilizados detallados con sus concentraciones y métodos de preparación:

20 **Soluciones fijadoras (100 ml):**

• **Paraformaldehído (PFA), solución stock (8%):**

- 8 g de PFA (818715, Merck).

- 100 ml agua destilada.

- Agitar en placa calefactora hasta su disolución.

25 - Sumergir una lenteja de NaOH (141687, Panreac) durante unos segundos hasta que la solución se vuelva transparente.

- Dejar enfriar, alicuotar y congelar hasta su uso.

• **Paraformaldehído 4% (PFA 4%):**

- 50 ml de PFA 8% solución stock.

30 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.

• **Glutaraldehído 4% (GA 4%):**

- 8 ml de GA 50% (15A807, Panreac).

- 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.

- 42 ml de agua destilada.

• **Paraformaldehído 1% y glutaraldehído 1% (PFA 1%-GA 1%):**

- 2 ml de GA 50%.
- 12,5 ml de PFA 8% solución stock.
- 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
- 35,5 ml de agua destilada.

5

Soluciones de postfijación:

- NTS (Neo-Timm solution, Danscher, 1981)
- 0,1 g de Na_2S (208043, Sigma-Aldrich).
- 6 ml de GA 50%.
- 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
- 44 ml de agua destilada.

10

Tampones utilizados:

- Tampón fosfato (PB), solución stock (0,2 M) pH 7,4:
 - 22,72 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol) (106586, Merck).
 - 4,8 g de NaH_2PO_4 (PM 120 g/mol) (106370, Merck).
 - Disolver en agua destilada y enrasar hasta 1 litro.
- Tampón fosfato (PB), solución de trabajo (0,1 M) pH 7,4:
 - Mezclar en proporción 1:1, tampón PB 0,2 M y agua destilada.
- Tampón fosfato salino (PBS), solución de trabajo (0,01 M) pH 7,4:
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
 - 9 g NaCl (27800, Rectapur).
 - Añadir agua destilada y enrasar hasta 1 litro.

15

20

Solución reveladora de Danscher Neo-Timm (100 ml):

- 60 ml de Goma arábiga al 50% en agua destilada (142061, Panreac).
- 10 ml de Tampón citrato 2 M pH 3,7, preparado con 25,5 g de ácido cítrico 1-hidrato (141018, Panreac) y 23,5 g de citrato tri-sódico 2-hidrato (131655, Panreac) y enrasando con agua destilada hasta 100 ml.
- 15 ml de Hidroquinona 5,7% en agua destilada (822333, Merck).
- 15 ml de Lactato de plata 0,73% pH 3,8 en agua destilada (L7771, Sigma-Aldrich).

30

Ejemplo 2

Ensayos con distintas soluciones fijadoras con distinto valor de pH.

Se prepararon distintas soluciones tamponadoras con los distintos valores de pH ensayados (6,0, 7,4 y 8,0), de forma que al añadir el fijador PFA 4% teníamos
5 soluciones fijadoras con distintos pHs.

Se observó – cómo se puede ver en la figura 4 y en la 5- como la solución fijadora con pH 7,4 era la única que mostraba zincosomas marcados con una incubación de TSQ y la que más zincosomas marcaba con dos incubaciones de TSQ respecto a los otros valores de pH (6,0 y 8,0) tras el revelado autometalográfico.

10

Ensayos con distintas soluciones fijadoras.

Para ello se prepararon distintas soluciones fijadoras, PFA 4%, GA 4% y PFA1%-GA1%.

Se observó como la solución fijadora PFA 4% era la que más zincosomas marcaba
15 tras el revelado autometalográfico.

Ejemplo 3

Ensayos con distintos tiempos de incubación con NTS.

Para comprobar cuál era el tiempo de incubación con NTS que mejores resultados
20 daba se incubaron células con NTS durante 3 tiempos: 30 minutos, 3 horas y 24 horas. Se observó como la solución de NTS aplicada durante 30 minutos era la que más zincosomas marcaba tras el revelado autometalográfico.

Ejemplo 4

25 Revelado autometalográfico o Neo-Timm

El revelado autometalográfico o Neo-Timm se realizó en todos los casos tras los procedimientos de incubación con TSQ, fijación e incubación con NTS, es el último paso del método. Y se realizó de la siguiente manera en la que la secuencia numérica sigue el orden cronológico:

30 Tratamiento previo para detectar el zinc capturado. En este ejemplo concreto se añade zinc para evaluar la su captación por los astrocitos. Por tanto, para este caso concreto éstos son pasos previos para poder estudiar la captación de zinc en astrocitos. Se pone TPEN para quitar el zinc preexistente y luego se añade zinc. En otro tipo de muestras, estos pasos no serían necesarios:

1- Incubación con 25 μ M TPEN (N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina) (T1210, Life Technologies) en DMEM base (DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium) durante 20 minutos a 37°C.

2- Lavar las células con DMEM base.

5 3- Incubación con 50 μ M ZnSO₄ en DMEM base durante 10 minutos a 37°C.

4- Lavar las células con DMEM base.

Pasos para la mejora de la sensibilidad de la autometalografía según la invención:

5- Incubación con 152 μ M (50 μ g/ml) TSQ en DMEM base durante 10 minutos a 37°C.

6- Fijación con PFA 4% a pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.

10 7- Incubación con TSQ (50 μ g/ml) 10 minutos (conveniente y necesario en muestras con pH distinto de 7,4).

8- Incubación con NTS 0,1% y GA 3% en tampón PB 0,1 M pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.

9- Lavar con agua destilada.

15 Pasos del revelado, o la autometalografía propiamente dicha:

10- Sumergir las células en la solución autometalográfica a 37°C en oscuridad durante 30 minutos aproximadamente.

11- Lavar con abundante agua destilada para detener la reacción de revelado y eliminar completamente la solución de revelado.

20 12- Estabilizar la plata metálica sumergiendo las células en una solución de tiosulfato sódico 10% (p/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

13- Lavar las células con abundante agua destilada.

14- Montar las preparaciones con algún medio que no disuelva el precipitado formado (por ejemplo, Mowiol 4-88 (17951, Polysciences)).

25

Ejemplo 5

Ensayo sobre detección de zincosomas

La figura 1 muestra la formación de zincosomas (endosomas que contienen zinc) con pulso de zinc exógeno. Se muestran las diferencias entre los cultivos de astrocitos incubados con, o sin, un pulso de zinc exógeno, que han sido previamente incubados con TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina) para eliminar el zinc libre, y habiendo sido marcado este zinc exógeno posteriormente con TSQ.

30 En la imagen (A) los astrocitos se incubaron con 50 μ M ZnSO₄ durante 10 minutos y en (B) solo con medio nuevo. El término "medio nuevo" se refiere a un medio nutritivo

comercial. Las células en cultivo se mantienen siempre sumergidas en un medio de cultivo que contiene agua, sales minerales, glucosa etc; necesarios para su mantenimiento. Si añadimos zinc a las células con el medio de cultivo, posteriormente podemos ver puntos fluorescentes; si añadimos medio de cultivo sin zinc (=medio
 5 nuevo), no veremos fluorescencia. Por tanto se deduce que la fluorescencia que se observa es debida al zinc añadido, no a la naturaleza de las células o de las condiciones de cultivo.

Al incubar las células con el marcador TSQ, observamos cómo solo las células que habían recibido el pulso de zinc exógeno mostraban zincosomas brillantes (A),
 10 mientras que las células sin el pulso de zinc, no mostraron ningún tipo de marca (B). Escala: 20 μm .

Ensayo para mostrar la importancia del fluorocromo TSQ

Se analizó también la importancia del uso de TSQ para aumentar la capacidad de
 15 detección de zinc mediante autometalografía en células cultivadas, lo que se muestra en la figura 2. Se analizó el efecto del TSQ tras la fijación sobre el marcaje de zincosomas con Neo-Timm. Así, en la figura 2 (A-E) se muestra una imagen representativa de las diferencias mostrando astrocitos incubados con distintos protocolos: con (concentración en el medio de incubación de ZnSO_4 : 50 μM) y sin zinc
 20 exógeno, y con (concentración en el medio de incubación de TSQ: 50 $\mu\text{g/ml}$), y sin, el marcador TSQ. En el ejemplo se añade zinc exógeno para asegurar que existe zinc en las células del ensayo y demostrar lo que se pretende conseguir con la presente invención, es decir, el efecto técnico de la misma, que es la mejora del método con la(s) incubación(es) con el fluorocromo específico de zinc, y especialmente TSQ.

25 En las figuras 2A-2E, el símbolo del conjunto vacío significa que no se añade ninguna sustancia durante el tratamiento.

Es decir, las muestras reciben 4 tratamientos. A algunas muestras se les añade zinc, TSQ, mientras que a otras, en un momento concreto, no se les pone esa sustancia. Así se ha comparado el efecto de diversas adiciones con respecto a no realizar esas
 30 adiciones.

Posteriormente se fijaron y se precipitó el zinc con NTS antes de revelar las monocapas con Neo-Timm. Podemos ver cómo sin pulso de zinc, no se forman zincosomas ni con TSQ (A), ni sin TSQ (B). Las células que fueron incubadas con zinc, mostraron zincosomas marcados por autometalografía tras incubarlas con TSQ

(C), pero sin la incubación con el fluorocromo no se obtuvo ninguna marca (D). Las monocapas que fueron incubadas con zinc, TSQ y fijadas, se incubaron nuevamente con TSQ antes del revelado de Neo-Timm, estas mostraban una densidad de zincosomas marcados mayor (E) que las monocapas sin la segunda incubación de
 5 TSQ tras la fijación (C). Escala: 20 μ m.

Efecto del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección de zinc mediante autometalografía en células cultivadas

Se estudió también el efecto del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección
 10 de zinc mediante autometalografía en células cultivadas (análisis y cuantificación de imágenes mostradas en las mismas condiciones que en las figuras 2A a 2E). Así, se observa en la figura 3 cómo, las células sin la incubación con el marcador TSQ, tras el revelado autometalográfico no mostraban ningún tipo de marca. Al incubar los astrocitos vivos con TSQ, tras el revelado marcamos los zincosomas con plata
 15 metálica siendo así cuantificables. Finalmente, las monocapas que fueron incubadas una segunda vez con el fluorocromo TSQ tras la fijación, marcaron el doble de zincosomas tras el revelado autometalográfico que con una única incubación con TSQ. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, *** $p < 0,001$, $n = 174$ células).

20

Efecto del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección de zinc mediante autometalografía incluso en condiciones no fisiológicas

Se estudió también el efecto del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección
 25 de zinc mediante autometalografía en condiciones no fisiológicas. En la figura 4 se muestra el efecto del TSQ tras la fijación sobre el marcaje de zincosomas con Neo-Timm y también se muestra el efecto del pH sobre el marcaje de zincosomas con Neo-Timm.

Se incubaron astrocitos con TPEN, zinc y TSQ. A continuación, las monocapas se fijaron con PFA 4% con distintos valores de pH para ver si éste afectaba en la
 30 conservación y detección del zinc iónico. Unas células se incubaron nuevamente con TSQ. Finalmente, las monocapas se fijaron con NTS y se revelaron con el método de Neo-Timm. Observamos como con una única incubación con TSQ (A, C y E), solo las monocapas fijadas con PFA 4% a pH 7,4 muestran zincosomas marcados. Sin embargo, todas las monocapas con dos incubaciones de TSQ (B, D y F), muestran

zincosomas marcados por el citoplasma, siendo el PFA a pH 7,4 el que más zincosomas marcados presenta. Escala: 20 μ m.

Además en la figura 5, que representa el análisis y cuantificación de los experimentos correspondientes a un conjunto de imágenes como las mostradas en la figura 4, se ilustra la importancia del uso de TSQ para aumentar la capacidad de detección de zinc mediante autometalografía, incluso en condiciones no fisiológicas. Así se puede observar el efecto del pH sobre el marcaje de zincosomas con Neo-Timm.

La gráfica de la figura 5 muestra la densidad de zincosomas marcados tras el revelado con Neo-Timm utilizando soluciones fijadoras con distintos valores de pH y con una o dos incubaciones con TSQ. Vemos como el fijador PFA a pH 7,4 presenta la mayor densidad de zincosomas, tanto con una incubación de TSQ como con dos, en comparación con las otras dos soluciones fijadoras pH 6,0 y pH 8,0. Las monocapas con una única incubación con TSQ solo muestran zincosomas marcados con el pH 7,4 y presentan una densidad de zincosomas significativamente menor con respecto a las monocapas con doble incubación con TSQ con todos los valores de pH del fijador. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, $n = 120$ células).

Para poder estudiar los zincosomas con métodos indirectos y así evitar los inconvenientes de la fluorescencia, como la extinción de la marca con la iluminación de las células vivas, se determinaron cuáles eran las mejores condiciones para la fijación de las monocapas de astrocitos. El objetivo era conservar el zinc lo mejor posible para su posterior detección con autometalografía e incluso la microscopía electrónica.

En los análisis de fluorescencia, vimos como todas las soluciones fijadoras (proceso necesario para el proceso de autometalografía) reducían los niveles de fluorescencia. También reducían la densidad de los endosomas que se forman en los astrocitos al incubarlos en presencia de zinc, llamados zincosomas. Pero fue el PFA 4% el que mejor conservó la fluorescencia del TSQ respecto a los niveles de fluorescencia observados en las células vivas.

Los primeros resultados (correspondientes a los experimentos de la figura 1 y 2) nos muestran que la incubación con TSQ previa a la fijación es un factor determinante para obtener unos resultados semejantes a lo que se observa con las células vivas.

Comprobamos también que el pH del fijador es un factor determinante a tener en cuenta a la hora de fijar las células, ya que el zinc es un ion muy lábil y se puede

perder de las muestras con facilidad tanto con la fijación como con los lavados. Previamente vimos que el fijador preparado con tampón a pH 7,4 (condiciones fisiológicas) es el que mejor conserva el zinc con la fluorescencia de TSQ, con una menor reducción en la densidad, brillo y tamaño de los zincosomas que los fijadores
 5 preparados con tampón a pH 6 y 8 (datos no mostrados porque no afectan al propósito de la patente).

La segunda fijación con TSQ da como resultado un mayor marcaje autometalográfico en todos los casos. Esto puede ser debido a que los zincosomas hayan perdido parte de su contenido en zinc con la fijación y los lavados, y es en los acúmulos de zinc de menor tamaño, donde esta pérdida es más notable, hasta niveles por debajo del límite
 10 de detección. Por lo que, esta segunda incubación con TSQ sirve para verificar que los zincosomas de las células mantienen zinc en su interior, y al mismo tiempo para poder determinar la presencia de zinc de manera más apropiada, con mayor sensibilidad. Se entiende que el TSQ de la segunda incubación tras la fijación, se una a zinc que ha
 15 aguantado el proceso de fijación y post-fijación, y actúe como mordiente en el proceso de revelado de Neo-Timm, mejorando así los resultados de la autometalografía, respecto al estado de la técnica.

Bibliografía

- 20 Carter K. P., 2014: Carter K. P., Young A. M., & Palmer A. M.; Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems, Chem. Rev. (2014), 114: 4564–4601.
- Danscher, 1991: Danscher G.; Applications of Autometallography to Heavy Metal Toxicology; Pharmacology & Toxicology (1991), 69: 414-423.
- Danscher, 2002: Danscher G.; In vivo liberation of gold ions from gold implants.
 25 Autometallographic tracing of gold in cells adjacent to metallic gold. Histochem. Cell Biol. (2002), 117: 447–452.
- Danscher, 2008: Nikolaos S. Loubourdis Æ, G. Danscher; Autometallographic tracing of Hg–S quantum dots in frogs exposed to inorganic mercury; Biometals (2008), 21: 311–319.
- 30 Danscher, 1981: Danscher, G.; Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. Histochemistry (1981), 71(1): 1–16.

- Danscher, 1982: Danscher, G.; Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry* (1982), 76(3): 281–293.
- Danscher y Stoltenberg, 2006: Danscher, G., & Stoltenberg, M.; Silver enhancement of
 5 quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* (2006), 41(2): 57–139.
- Danscher et al., 1994: Danscher, G., Stoltenberg, M., & Juhl, S.; How to detect gold,
 10 silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (1994), 20(5): 454–467.
- Danscher, G., y Zimmer, J. 1978: Danscher, G. & Zimmer, J.; An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* (1978), 55(1): 27–40.
- 15 Grzybek et al., 1990: Grzybek, H., Sliwa-Tomczok, W., & Tomczok, J.; Application on Timm sulphide silver method for electron microscope localization of lead ions in blood cells. *Folia Haematologica (Leipzig, Germany : 1928)* (1990), 117(2): 277–282.
- Hacker, 1996: Hacker G. W., Muss W. H., Hauser-Kronberger C., Danscher G., Rufner R., Gu J., Su H., Andreasen A, Stoltenberg M., & Dietze O.; Electron Microscopical
 20 Autometallography: Immunogold–Silver Staining (IGSS) and Heavy-Metal Histochemistry; *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* (1996), 10: 257–269.
- Haug, 1967: Haug, F. M.; Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie. Histochemistry. Histochimie* (1967), 8(4): 355–368.
 25
- Hosseini, 2015: Hosseini S. V., Sobhanardakani S., Miandare H. K., Harsij M. & Regenstein J. M.; Determination of toxic (Pb, Cd) and essential (Zn, Mn) metals in canned tuna fish produced in Iran. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* (2015), 13:59.
- 30 Jaarsma y Korf, 1990: Jaarsma, D., & Korf, J.; A novel non-perfusion Timm method for human brain tissue. *Journal of Neuroscience Methods* (1990), 35(2): 125–131.
- Kozma et al., 1981: Kozma, M., Szerdahelyi, P., & Kasa, P.; Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta Histochemica* (1981), 69(1): 12–17.

- López-García et al., 1984: Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Perez-Clausel, J., & Martinez-Guijarro, F. J.; A sulphide-osmium procedure for detection of metal-containing synaptic boutons in the lizard cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* (1994), 11(4): 211–220.
- 5 Meeusen, 2011: Meeusen J. W., Tomaszewicz H., Nowakowski A., & Petering D. H.; TSQ, a Common Fluorescent Sensor for Cellular Zinc, *Images Zinc Proteins; Inorg Chem.* (2011), August 15; 50(16): 7563–7573.
- Nitzan Y. B., 2004: Nitzan Y. B., Sekler I., & Silverman W. F.; Histochemical and Histofluorescence Tracing of Chelatable Zinc in the Developing Mouse; *Journal of*
10 *Histochemistry & Cytochemistry* (2004), Volume 52(4): 529–539.
- Pérez-Clausell y Danscher, 1985: Perez-Clausell, J., & Danscher, G.. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Research* (1982), 337(1): 91–98.
- Ugarte y Osborne, 1998: Ugarte, M & Osborne, N. N.; The localization of endogenous
15 zinc and the in vitro effect of exogenous zinc on the GABA immunoreactivity and formation of reactive oxygen species in the retina. *General Pharmacology* (1998), 30: 297-303.
- Soltzenberg, 2003: M. Stoltenberg, L. Loch, A. Larsen, D. Jensen & G. Danscher; In vivo cellular uptake of bismuth ions from shotgun pellets; *Histol Histopathol.* (2003), 18:
20 781-785.
- Timm, F. 1958: Timm, F.; [Histochemistry of zinc]. *Deutsche Zeitschrift fur die gesamte gerichtliche Medizin* (1958), 47(3): 428–431.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un metal por autometalografía en una muestra de tejido biológico, caracterizado por que comprende llevar a cabo al menos dos incubaciones de la muestra con un fluorocromo específico de dicho metal.
5
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende realizar dos incubaciones con el fluorocromo, y entre las dos incubaciones comprende una etapa de fijación de las muestras.
3. El método según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la muestra
10 es un cultivo celular.
4. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que la muestra es un cultivo de célula animal.
5. El método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el metal es zinc, cobre o mercurio.
- 15 6. El método según la reivindicación 5, caracterizado por que el metal es zinc y comprende llevar a cabo al menos dos incubaciones de una muestra con un fluorocromo específico de zinc
7. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que el metal es zinc y por que la etapa de fijación de las muestras se realiza con paraformaldehído (PFA).
- 20 8. El método según la reivindicación 7, caracterizado por que el PFA está en una concentración entre el 2 % y el 6 %.
9. El método según una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que la etapa de fijación de las muestras se realiza con PFA a pH entre 5,8 y 8,2.
10. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que el fluorocromo específico
25 de zinc es metoxi-toluenosulfonamido-quinolina (TSQ).
11. El método según una de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que comprende:
 - incubación de la muestra con TSQ,
 - fijación con PFA a pH entre 5,8 y 8,2.
 - 30 - incubación de la muestra con TSQ.
12. Uso del método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la técnica autometalográfica.

13. Uso del método según la reivindicación 12 en estudios biológicos con fines médicos, para toxicología o relacionados con la contaminación de alimentos.

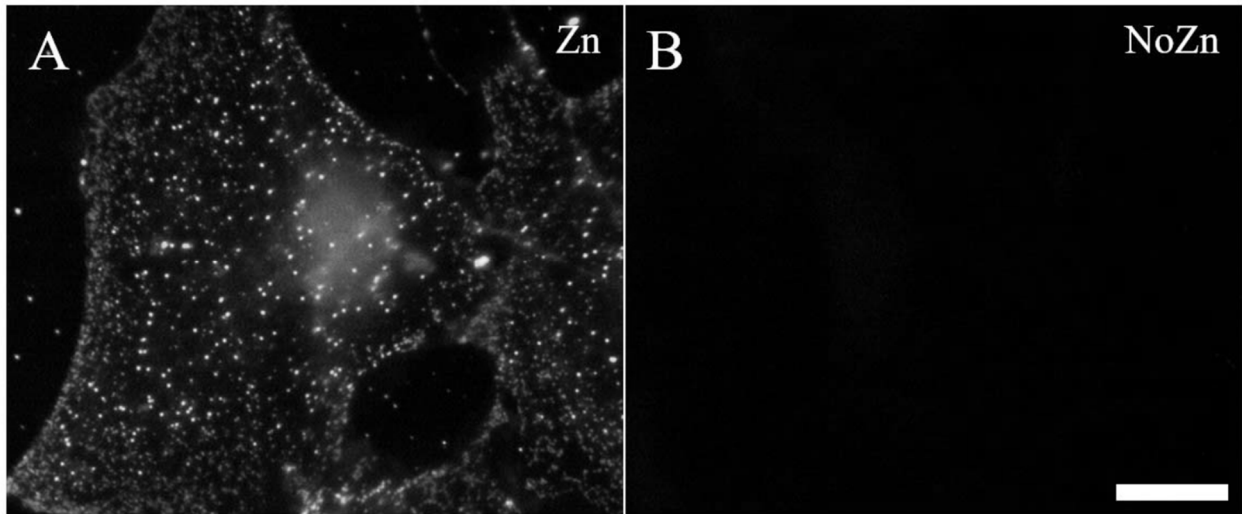


FIG. 1

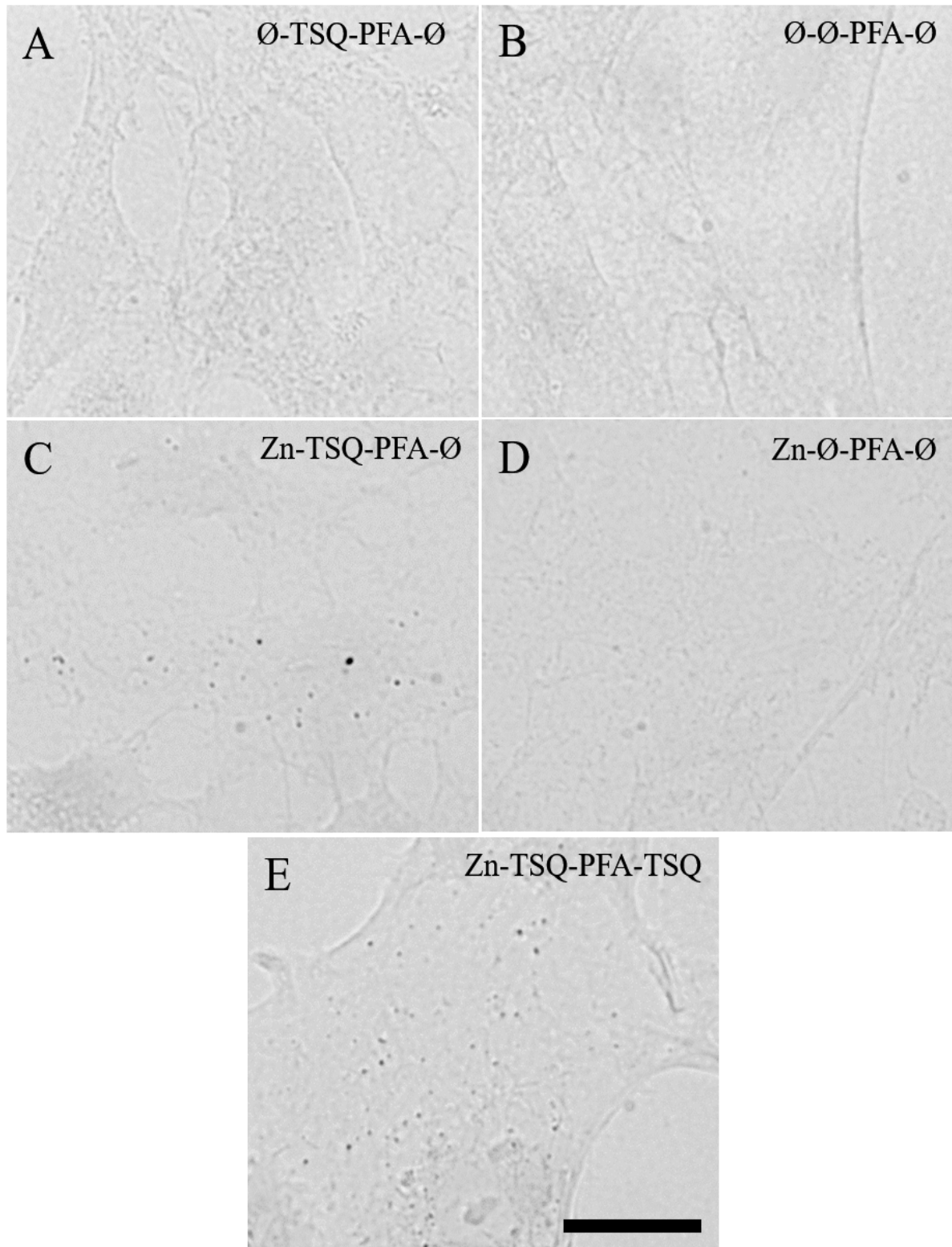


FIG. 2

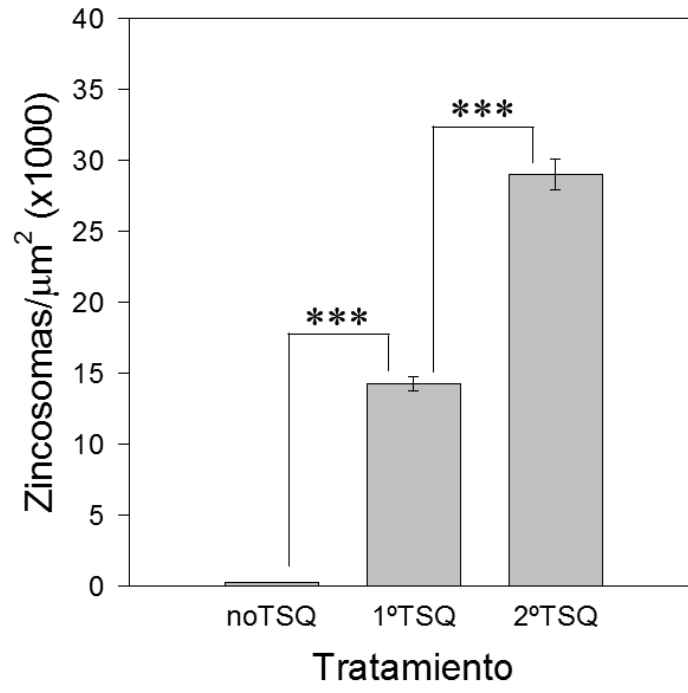


FIG. 3

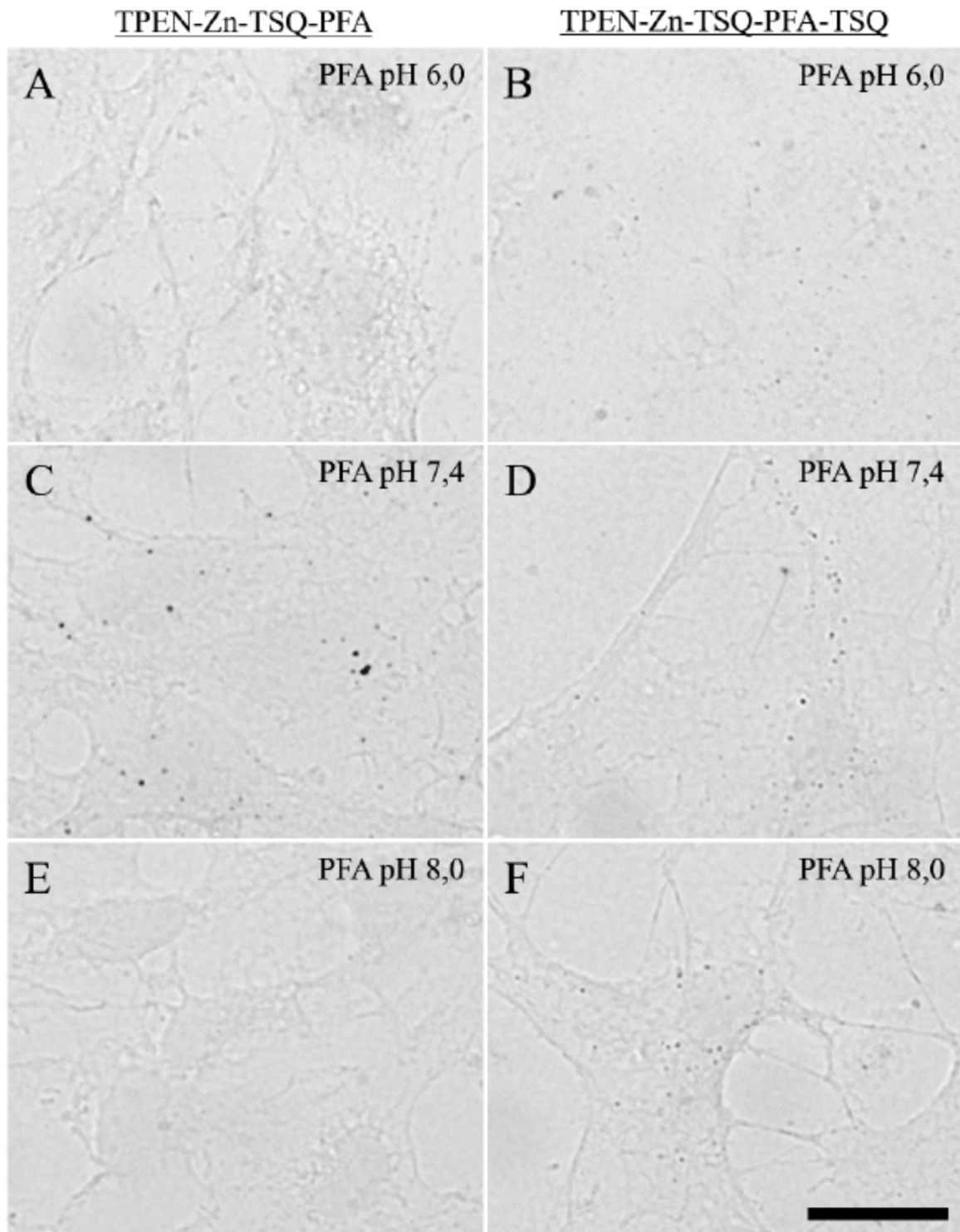


FIG. 4

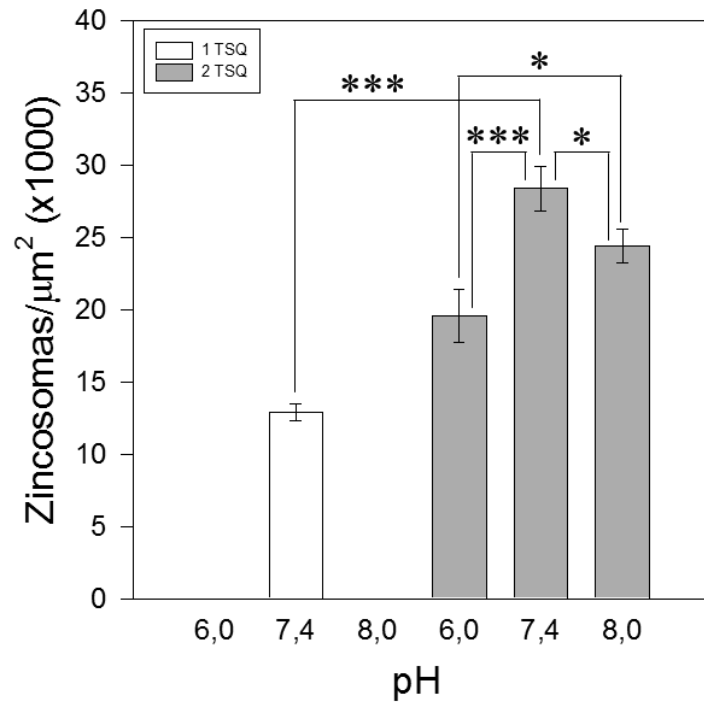


FIG. 5