

Título

Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico

Objeto de la invención

La patente de invención se refiere a un nuevo sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares. El sistema utiliza un array bidimensional (2D) de electrodos como sensores de bioimpedancia e implementa el circuito de medida con tecnología CMOS, utilizando modelado eléctrico para la reconstrucción de imagen.

La invención se enmarca dentro de la medida de impedancia eléctrica de material biológico. También se refiere a un dispositivo microelectrónico sensor para llevar a cabo dicha medida.

Estado de la técnica

Muchos parámetros biológicos y procesos pueden ser detectados y controlados mediante la medida de su bioimpedancia, con la ventaja de ser una técnica no invasiva y relativamente barata. El crecimiento de la célula, los cambios en la composición celular o los cambios en la ubicación de la célula son sólo algunos ejemplos de procesos que pueden ser detectados por microelectrodos mediante cambios de impedancia [1-4].

Esta técnica fue inventada por Ivar Giaever y Charles Keese en 1993 [5], registrando en una patente un aparato para la monitorización de cultivos celulares, basado en una serie de pocillos donde se realiza el cultivo celular, cada uno de ellos con un array de microelectrodos por los que se introduce una corriente alterna, midiéndose la impedancia eléctrica resultante. Esta patente inicial fue completada con una serie de patentes relacionadas, aplicadas al tema del estudio de la movilidad celular [6] o de la actividad metastásica de células cancerígenas [7].

Otro sistema de medida de bioimpedancia fue registrado en 2005 por B. Rubinsky et al. [8]. Este sistema utiliza dos electrodos entre los que se aplica una diferencia de potencial y una membrana dieléctrica con microagujeros por los que se fuerza el paso de la corriente eléctrica. En España también se han registrado métodos

para la determinación y visualización simultánea de señales de bioimpedancia eléctrica en material biológico a varias frecuencias [9], utilizando un tratamiento de la señal de excitación y de respuesta como dos funciones independientes en el dominio del tiempo, y aplicando técnicas de procesamiento de señal (correlación cruzada y transformación de Fourier) para obtener mejores resultados.

En general, para el problema de medir una impedancia Z_x dada, de magnitud Z_{x0} y fase ϕ , se han descrito varios métodos, los cuales requieren circuitos de excitación y de procesamiento. La excitación se suele implementar con corriente alterna (AC), mientras que el procesamiento se basa en el principio de demodulación coherente [10] o muestreo síncrono [11], [12]. En ambos, el procesamiento de circuitos debe estar sincronizado con las señales de excitación, como un requisito para que la técnica funcione, obteniendo el mejor ruido el rendimiento cuando se incorporan las funciones de filtro adecuado (High-Pass (HP) o Low-Pass (LP)).

Este trabajo presenta un nuevo sistema de medida de impedancia para muestras biológicas útil para obtener imágenes 2D de un cultivo celular en tiempo real y de forma inalámbrica, a diferencia de otros sistemas encontrados en la bibliografía. Se basa en el uso de un array bidimensional de electrodos como sensores de bioimpedancia, tecnología CMOS para la implementación del circuito de medida y en la novedosa utilización de modelado eléctrico para la reconstrucción de imágenes, otra de las características que dota al sistema de una mayor precisión en la tarea de reconstrucción basada en bioimpedancia.

DOCUMENTOS RELEVANTES

[1] I. Giaever et al., "Use of Electric Fields to Monitor the Dynamical Aspect of Cell Behaviour in Tissue Culture," IEEE Transaction on Biomedical Engineering, vol BME-33, nº 2, pp: 242-247, Feb. 1986.

[2] S. M. Radke and E. C. Alcolija, "Design and Fabrication of a Microimpedance Biosensor for Bacterial Detection," IEEE Sensor Journal, vol 4, nº 4, pp: 434-440, Aug. 2004.

[3] D. A. Borkholder: "Cell-Based Biosensors Using Microelectrodes," PhD Thesis, Stanford University. Nov. 1998.

- [4] A. Yúfera et al., "A Tissue Impedance Measurement Chip for Myocardial Ischemia Detection". IEEE transaction on Circuits and Systems: Part I. vol.52, nº:12, pp: 2620-2628. Dec. 2005.
- [5] I. Giaever, C. R. Keese, Cell substrate electrical impedance sensor with multiple electrode array, , US 5,187,096, Feb. 16, 1993.
- [6] I. Giaever, C. R. Keese, Electrical wounding assay for cells in vitro, US 7,332,313 Feb. 19, 2008.
- [7] I. Giaever, C. R. Keese, Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture, US 7,399,631, July 15, 2008.
- [8] B. Rubinsky, Y. Huang, Cell viability detection using electrical measurements, US 6,927,049 B2, Aug. 9, 2005.
- [9] P. Owen Whitters, Método y aparato para mostrar bio-impedancia en múltiples frecuencias, ES 2 118 133 T3.
- [10] J.J. Ackmann, Complex bioelectric impedance measurement system for the frequency range from 5–1 MHz, Annals of Biomedical Engineering 21 (1993) 135–146.
- [11] R.Pallzs, J.G.Webster, Bioelectric impedance measurements using synchronous sampling, IEEE Transactions on Biomedical Engineering 40 (8) (1993) 824–829.
- [12] M. Min, A. Kink, R. Land and T. Parve, Method and device for measurement of electrical bioimpedance, US 7,706,872 B2, Apr 27, 2010.
- [13] X.Huang et al., "Simulation of Microelectrode Impedance Changes Due to Cell Growth," IEEE Sensors Journal, vol.4, nº5, pp: 576-583. 2004.
- [14] N. Joye, et al., "An Electrical Model of the Cell-Electrode Interface for High-density Microelectrode Arrays," IEEE EMBS pp: 559-562. 2008.

Descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Esquema de la arquitectura del sistema completo. El sistema se compone de una matriz 2D de electrodos, sobre la cual se realiza el cultivo celular, un circuito de excitación y de medida de impedancia, un circuito transmisor de radiofrecuencia para el envío inalámbrico de datos, y un software para la decodificación y reconstrucción de la imagen, basado en modelado eléctrico.

Figura 2. Diagrama de bloques del circuito de excitación y medida de impedancia. Los componentes principales del circuito son: un amplificador de instrumentación (AI), el convertidor AC - DC o rectificador, el amplificador de error (AE) y el oscilador de corriente con la salida de corriente programable

Figura 3. Evolución temporal de un cultivo de MCF-7, en el que se observa el crecimiento inicial, introducción de una dosis tóxica (inhibidor de proteasa) y un último proceso (a partir del minuto 4369) de lavado, a partir del cual el cultivo celular vuelve a crecer.

Figura 4. a) Selección de matriz 8x8 en cultivo celular MCF-7 b) Fill factor obtenido mediante modelado eléctrico para la matriz 8x8, definiéndose el fill factor como el porcentaje de área ocupada en cada píxel por células del cultivo, variando desde $ff=0$, si no se detecta la presencia de ninguna célula, hasta $ff=1$, con la totalidad del área ocupada por células.

Descripción de la invención

El sistema objeto de la presente invención se compone de una matriz 2D de electrodos, sobre la cual se realiza el cultivo celular, un circuito de excitación y de medida de impedancia, un circuito transmisor de radiofrecuencia para el envío inalámbrico de datos, y un software para la decodificación y reconstrucción de la imagen, basado en modelado eléctrico. El esquema de la arquitectura del sistema se muestra en la figura 1.

Cada celda de la matriz de electrodos estará compuesto por dos electrodos, un electrodo central (e_1) y uno de mayor área llamado electrodo de referencia (e_2),

entre los cuales se establece una corriente AC a una frecuencia dada, y se mide una impedancia Z_x . El modelado eléctrico, posteriormente descrito, permite corresponder la impedancia medida, Z_x , con el área cubierta por el cultivo celular en los electrodos AC. Los electrodos podrán ser fabricados con tecnología CMOS.

El diagrama de bloques del circuito propuesto para la excitación y medida de impedancia es en bucle cerrado y se muestra en la figura 2. Para la medida de la magnitud de impedancia, Z_x , se considera que la señal de excitación es corriente AC, a una frecuencia ω dada. Los circuitos están diseñados para trabajar a una amplitud constante en el sensor V_x , lo cual es conocido como condición P_{stat} .

Los componentes principales del circuito son: un amplificador de instrumentación (AI), el convertidor AC - DC o rectificador, el amplificador de error (AE) y el oscilador de corriente con la salida de corriente programable. La ganancia de voltaje del amplificador de instrumentación en su paso de banda es α_{ia} . El rectificador funciona como un detector de pico de onda completo, para medir la mayor (y la menor) amplitud de voltaje de V_o . Su salida es un voltaje DC, directamente proporcional a la amplitud del voltaje de salida del amplificador de instrumentación, con una ganancia α_{dc} . El amplificador de error, con una ganancia α_{ea} , compara la señal DC con una referencia V_{ref} , para amplificar la diferencia. El generador de corriente genera la corriente AC para excitar el sensor. Se compone de una fuente externa de voltaje AC (V_s), un amplificador de transconductancia (OTA) con transconductancia g_m y un multiplicador de voltaje cuatro cuadrantes de constante K . El voltaje generado por V_s se multiplica por V_m y es convertido a corriente por el OTA. Un simple análisis del sistema completo da la expresión aproximada para la amplitud de voltaje en V_x :

$$V_x \approx \frac{V_{ref}}{\alpha_{ia} \cdot \alpha_{dc}} \quad (1)$$

cuando se satisface la condición de que

$$Z_x \cdot G_m \cdot \alpha_{ea} \cdot \alpha_{ia} \cdot \alpha_{dc} \gg 1 \quad (2)$$

permaneciendo constante el voltaje V_x en la ecuación 1 e independiente de la carga Z_x . Considerando la relación entre la corriente i_x y el voltaje V_m ($i_x = G_m V_m$), la magnitud de la impedancia puede ser expresada como:

$$Z_x = \frac{V_x}{G_m} \cdot \frac{1}{V_m} \quad (3)$$

La ecuación 3 permite el cálculo de la magnitud de impedancia Z_x a partir del voltaje V_m , ya que V_x y G_m son conocidos de la ecuación 1 y de los parámetros de diseño. La fase de la impedancia puede ser también medida a partir de V_ϕ , como se muestra en la figura 2. En particular, se propone la utilización de tecnología CMOS 0.35 μ m para la implementación del circuito, con un voltaje de alimentación de 3V.

El circuito transmisor y receptor de señales de radiofrecuencia emitirá, en forma digital o analógica, la señal de bioimpedancia. Esto permite la monitorización de forma inalámbrica del cultivo celular, sin necesidad de extraer las muestras de la incubadora o de interferir en los procesos propios del cultivo celular. De igual forma, este circuito transmisor y receptor de señales de radiofrecuencia permite la programación inalámbrica del circuito de excitación y de medida de bioimpedancia, pudiendo ser establecidos remotamente parámetros tales como la frecuencia de muestreo, amplitud de la de corriente de excitación y demás parámetros descritos anteriormente.

Este circuito transmisor y receptor de señales de radiofrecuencia podrá ser implementado de forma que los datos se transmitan a una frecuencia de 2.4 Ghz u otras bandas disponibles, y de forma que sea compatible con los estándares 802.11, 802.15 o similares.

El software de monitorización obtiene varias gráficas que permiten monitorizar el comportamiento del cultivo celular, entre las que se encuentran la evolución temporal del valor absoluto de la impedancia y de la fase, para distintas frecuencias y para cada uno de los electrodos de la matriz. Asimismo, el software integrará un modelado eléctrico para la caracterización de la interfaz electrodo – célula en cada electrodo, que permitirá avanzadas funcionalidades en la reconstrucción de la imagen basada en bioimpedancia.

Los modelos eléctricos célula-electrodo son claves para la correspondencia entre simulaciones y comportamiento real de los sistemas, y por lo tanto, para la decodificación correcta de los resultados obtenidos experimentalmente, lo que se conoce en general como el problema de reconstrucción. [3, 13, 14].

La impedancia de los electrodos en líquidos iónicos ha sido ampliamente estudiada. Cuando un sólido (incluyendo metales, semiconductores y aislantes) se sumerge en una solución iónica o electrolito, los iones en la solución pueden reaccionar con el electrodo y los iones sólidos del electrodo pueden añadirse a la solución. El resultado es una interfaz compleja, electrificada o doble capa. Este complejo sistema puede ser modelado usando elementos circuitales pasivos, como ha sido descrito en numerosos textos de biomedicina y electroquímica. El modelo Helmholtz-Gouy-Chapman-Stern es el modelo comúnmente aceptado para describir eléctricamente la distribución de cargas en la interfaz del electrodo, pudiendo aproximarse por la siguiente expresión para la doble capa:

$$\sigma_{dl} + j2\pi f \varepsilon_{dl} = t \cdot \left[\frac{(2\pi f)^{1/2}}{K} + \frac{j(2\pi f)^{1/2}}{K} + jC_1 2\pi f \right] \quad (4)$$

donde σ_{dl} y ε_{dl} son la conductividad y la permitividad dieléctrica, t es el espesor de la región, C_1 es la capacidad de la interfase por unidad de superficie, que consiste en la combinación en serie de la capa de Helmholtz y la doble capa difusa, y K es una constante relacionada con la impedancia de Warburg (asociada a procesos de difusión de masa en la interfaz).

Modelamos el espacio electrodo - célula ($t_{\text{cell-electrodo}}$) mediante una región de espesor t con valor de conductividad σ_{gap} , con el siguiente valor:

$$\sigma_{\text{gap}} = \frac{t_{\text{cell-electrode}}}{t} \cdot \sigma_{\text{medium}} \quad (5)$$

Modelamos la región de carga (también llamado de la doble capa eléctrica) que se

forma en el electrolito en la interfase con la célula con una capacidad C_{hd} , definida como la serie de tres capacidades [14]:

$$\begin{aligned} C_{h1} &= \frac{\epsilon_0 \epsilon_{IHP}}{d_{IHP}} A_{ce} & (6) \\ C_{h2} &= \frac{\epsilon_0 \epsilon_{OHP}}{d_{OHP} - d_{IHP}} A_{ce} \\ Cd &= \frac{q \sqrt{2 \epsilon_0 \epsilon_d KT z^2 n^0 N}}{KT} A_{ce} \end{aligned}$$

donde A_{ce} es la superficie de la membrana adjunta, ϵ_0 es la permitividad dieléctrica del espacio libre; ϵ_{IHP} y ϵ_{OHP} son, respectivamente, interior y exterior de Helmholtz plano relativo constante dieléctrica; d_{IHP} es la distancia del plano interior de Helmholtz a la membrana; d_{OHP} es el distancia del plano exterior de Helmholtz a la membrana; ϵ_d es la capa difusa constante dieléctrica relativa; K es la constante de Boltzmann; T es la temperatura absoluta; q es la carga del electrón; z es la valencia de los iones en disolución; N_0 es la concentración masiva de iones en disolución, y N es el número de Avogadro.

Por último, el circuito equivalente de la membrana la modelamos como una resistencia R_m en paralelo con una capacidad de C_m , en una forma similar a la reportada por Joye et al. [14].

$$\begin{aligned} R_m &= \frac{1}{g_{mem} \cdot A} & (7) \\ C_m &= c_{mem} \cdot A \end{aligned}$$

Donde A es el área de la membrana, g_{mem} es la conductividad de la membrana y C_{mem} la capacidad de la membrana por unidad de área.

Por tanto, integrando el modelado eléctrico descrito en un software de análisis de elementos finitos, en el que describimos la geometría de los electrodos, podemos estudiar la correspondencia entre simulaciones y comportamiento real de los sistemas, y por lo tanto, decodificar correctamente los resultados obtenidos experimentalmente.

De igual forma, como se ha comentado anteriormente, el software de control permite seleccionar de forma remota parámetros tales como la frecuencia de muestreo o el nivel de corriente de salida, programando de forma inalámbrica el circuito de excitación y medida de bioimpedancia.

Modo de realización de la invención

Ejemplo. Análisis de cultivo celular de MCF-7 a partir de una matriz de electrodos 8x8.

En este ejemplo se presenta la particularización del sistema para la medida de impedancia en un cultivo celular de células epiteliales cancerígenas MCF-7, a través de una matriz de electrodos 8x8. El tamaño del píxel seleccionado es de 50 μm x 50 μm , similar a las dimensiones de la célula. La frecuencia de excitación de los electrodos varía desde 10 kHz a 100 kHz, obteniéndose para cada frecuencia una medida de impedancia en cada píxel de la matriz de electrodos.

El software de monitorización permite obtener de forma inalámbrica señales que muestran la evolución del cultivo celular en el tiempo, para distintas frecuencias de muestreo. La figura 3 muestra un ejemplo del histórico registrado para un cultivo de células MCF-7.

Mediante el modelado eléctrico podemos obtener una estimación del área ocupada en cada píxel por células del cultivo. Podemos utilizar el parámetro fill factor (ff), como el porcentaje de área ocupada en cada píxel por células del cultivo, variando desde ff=0, si no se detecta la presencia de ninguna célula, hasta ff=1, con la totalidad del área ocupada por células. En la figura 4 se muestra el fill factor obtenido para cada píxel de la matriz 8x8.

Con el envío inalámbrico de los datos de impedancia para cada píxel se puede monitorizar el crecimiento del cultivo celular en tiempo real, sin necesidad de realizar una inspección visual del cultivo, con el consiguiente ahorro de tiempo y con la posibilidad de implementar señales de alarma automáticas ante cambios inesperados. De igual forma, la automatización en la obtención de la información en forma digital mediante una matriz 2D permite un posterior procesado de los datos de cada píxel para un estudio más avanzado de la evolución del cultivo.

Reivindicaciones

1 - Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico, caracterizado por comprender;

a) una matriz o vector 2D de electrodos; un electrodo central (e_1) y uno de mayor área llamado electrodo de referencia (e_2),

b) un circuito de excitación y medida de bioimpedancia en bucle cerrado,

c) un circuito de transmisión y recepción de señales de radiofrecuencia compatible con los estándares 802.11, 802.15 o similares

d) y un software de monitorización y programación basado en modelado eléctrico.

2 - Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico, según reivindicación 1, caracterizado por la utilización de tecnología basada en procesos CMOS para la implementación de la matriz o vector de microelectrodos.

3 - Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por la utilización de tecnología basada en procesos CMOS para la implementación de los circuitos integrados.

4 - Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por la utilización de un amplificador de instrumentación, un convertidor AC - DC o rectificador, un amplificador de error y un oscilador de corriente con la salida de corriente programable para el circuito de excitación y medida de bioimpedancia.

5 - Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en circuitos CMOS y modelado eléctrico, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por la utilización del parámetro fill factor (ff, porcentaje de área ocupada en cada píxel por células del cultivo) para la decodificación de los resultados experimentales y la reconstrucción de imagen.

Resumen

El objeto de la presenta invención se refiere a un nuevo sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares. El sistema utiliza un array bidimensional (2D) de electrodos como sensores de bioimpedancia e implementa el circuito de medida con tecnología CMOS, utilizando modelado eléctrico para la reconstrucción de imagen.

Figuras

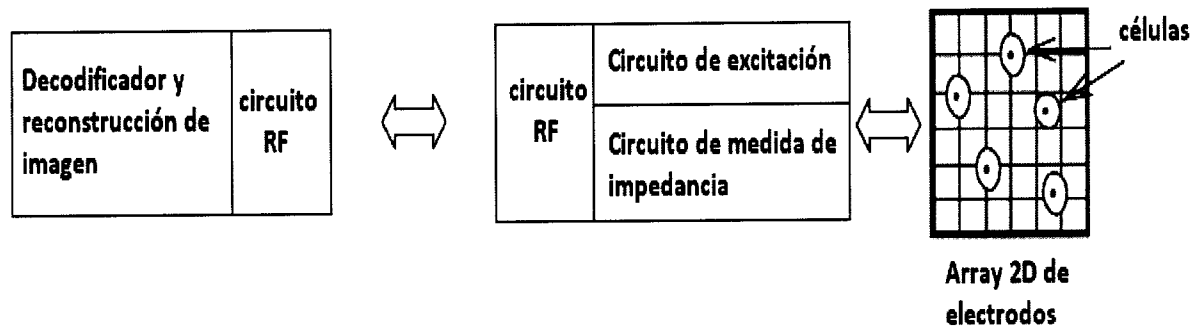


Figura 1

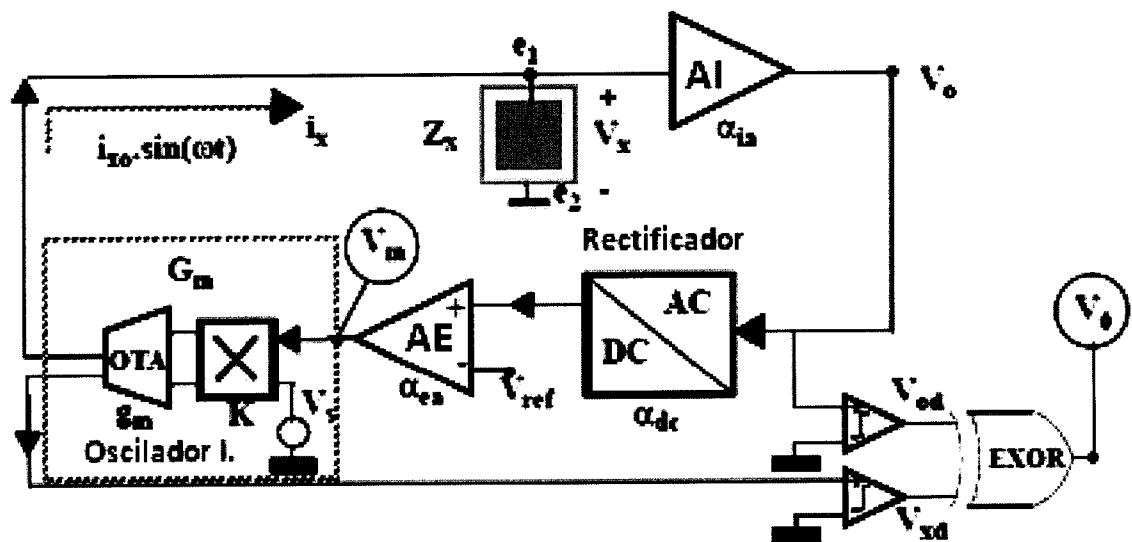


Figura 2

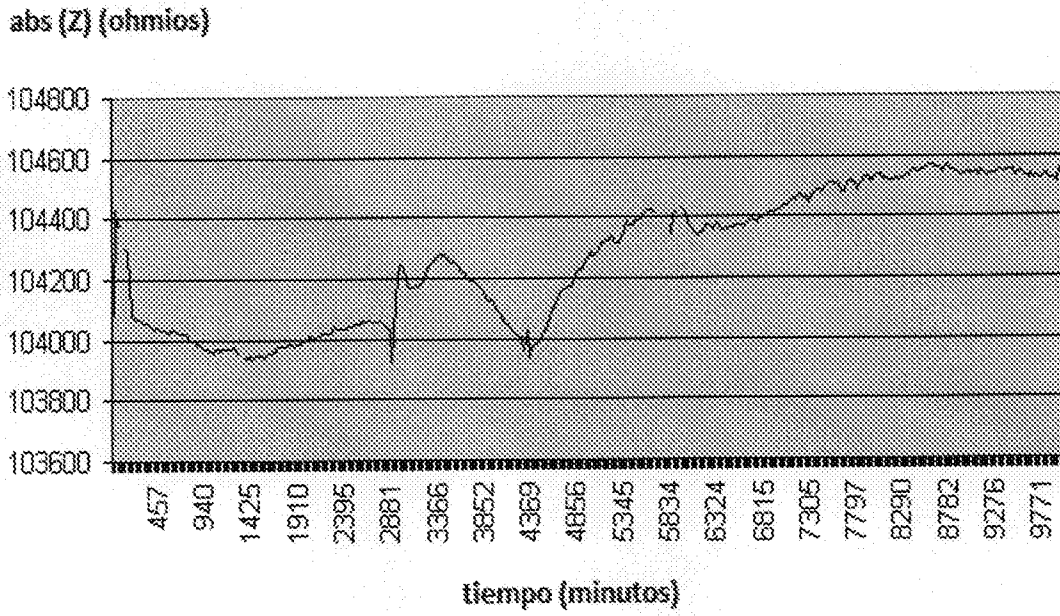


Figura 3

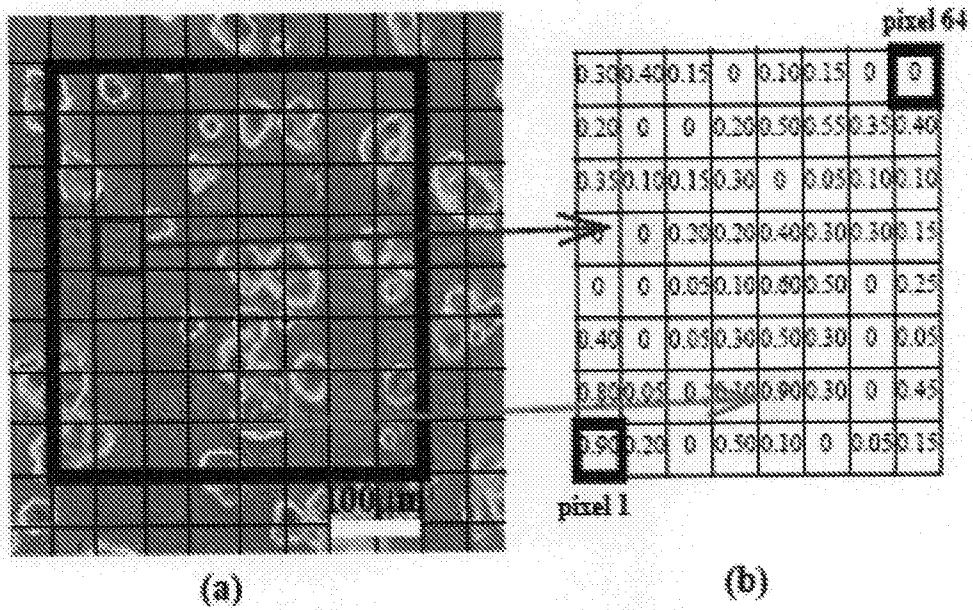


Figura 4