

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 810**

21 Número de solicitud: 201400682

51 Int. Cl.:

**A61B 5/053** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**06.08.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.03.2016**

Fecha de la concesión:

**19.12.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**27.12.2016**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2015/000101**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
Vicerrectorado de Transferencia Tecnológica  
Paseo de las Delicias s/n Pabellón de Brasil  
41013 Sevilla (Sevilla) ES**

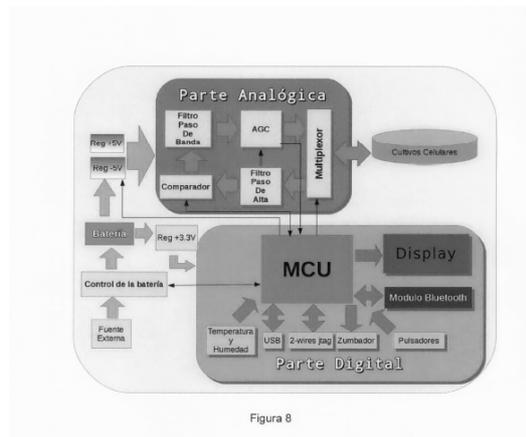
72 Inventor/es:

**MALDONADO JACOBI, José Andrés;  
HUERTAS SÁNCHEZ, Gloria y  
YÚFERA GARCÍA, Alberto**

54 Título: **Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en un test de oscilación utilizando circuitos integrados**

57 Resumen:

La 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 electroda como sensores de bioimpedancia e implementa un circuito "oscilador biológico" de medida con circuitos integrados. Se propone utilizar los parámetros de oscilación (frecuencia, amplitud, fase, etc.) como marcadores empíricos para realizar una interpretación adecuada en términos de identificación del tamaño de las células, conteo de células, crecimiento celular, ritmo de crecimiento, etc...



ES 2 562 810 B1

## DESCRIPCIÓN

Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real e inalámbrica de cultivos celulares basado en un test de oscilación utilizando circuitos integrados

5

### **Objeto de la invención**

El objeto de la presente 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 electrodos como sensores de bioimpedancia e implementa un circuito "oscilador biológico" de medida con circuitos integrados. Se propone utilizar los parámetros de oscilación (frecuencia, amplitud, fase, etc.) como marcadores empíricos para realizar una interpretación adecuada en términos de identificación del tamaño de las células, conteo de células, crecimiento celular, ritmo de crecimiento, etc...

10  
15 La invención se enmarca dentro de la medida de impedancia eléctrica de material biológico. También se refiere a un dispositivo electrónico sensor y toda la circuitería necesaria para llevar a cabo dicha medida

### **Estado de la técnica**

20 Caracterizar en detalle el número de células en un cultivo en un momento específico, así como medir la razón de proliferación de las células, tiene amplia implicación en biomedicina, tanto a nivel técnico como biológico. La densidad de las células en el plato o recipiente de cultivo afectará el éxito de muchas técnicas diferentes, incluyendo transfección, infección, reacción a muchos productos químicos, drogas, motilidad, etc... El conocimiento en el tiempo de la densidad celular de cultivos celulares y su evolución temporal puede ayudar a mejorar la calidad de los experimentos realizados por profesionales en laboratorios biomédicos, así como a reducir los costes materiales y de recursos humanos.

30 Desde un punto de vista biológico, se trata de una herramienta potente para el estudio de una célula: la excesiva proliferación es el sello de célula cancerígena y cualquier tratamiento físico o químico que reduzca la velocidad del crecimiento celular conduce a la potencial terapia oncológica; La falta de proliferación normalmente indica la muerte excesiva de células, debido a mecanismos extrínsecos o intrínsecos, o la activación de caminos celulares envejecidos (la

senectud celular). Así, la comprensión de los procesos que reducen o aceleran la velocidad de proliferación de un cultivo es un instrumento potente de investigación.

5 Sin embargo, a pesar de su importancia, los biólogos no pueden supervisar la proliferación celular en detalle. A este nivel, se han de afrontar dos problemas técnicos importantes. En primer lugar, los protocolos para estimar el número de células en una placa de cultivo convencional son altamente invasivos, y afectan profundamente la biología de las células. En la mayoría de los casos las células más largas no pueden ser usadas para experimentos subsecuentes. En segundo  
10 lugar, los científicos sólo pueden tomar instantáneas del cultivo en puntos específicos. Así, para la mayor parte de investigadores que usan células mamíferas, la única alternativa es establecer experimentos paralelos y reconstituir la progresión de un cultivo usando dichos experimentos. En muchos casos esta metodología conduce a un análisis retrospectivo, y la comprensión de cómo se  
15 han comportado las células sólo puede hacerse al final del experimento, como un agregado de varios sub-experimentos similares.

Muchos parámetros biológicos y procesos pueden ser detectados y controlados mediante la medida de su bioimpedancia, con la ventaja de ser una técnica no  
20 invasiva y relativamente barata. El crecimiento de una 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 micro-electrodos mediante cambios de impedancia [1-4].

25 Esta técnica (Electrical Cell-substrate Impedance Spectroscopy, ECIS) fue inventada por Ivar Giaever y Charles Keese en 1986 [1], 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 micro-electrodos por los que se introduce una corriente alterna, midiéndose la  
30 impedancia eléctrica resultante. Esta patente inicial [5] 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  
35 de potencial y una membrana dieléctrica con micro-agujeros 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  $\Phi$ , 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 información de un cultivo celular en tiempo real y de forma inalámbrica. Se basa en el uso de un array bidimensional de electrodos como sensores de bioimpedancia, circuitos integrados para la implementación del circuito de medida (oscilador) y en la utilización de las señales eléctricas resultantes (oscilaciones) como parámetros de interpretación del estado del cultivo.

La idea es conceptualmente distinta a los métodos anteriormente reportados, ya que no usa señales de excitación. Se trata de convertir el "circuito biológico" (formado por el cultivo celular, los electrodos y unos pocos componentes electrónicos añadidos) en un oscilador. Cualquier modificación de la parte biológica (por ejemplo un cambio en el número de células) producirá cambios tanto en la frecuencia como la amplitud de las oscilaciones y esta alteración llegará a ser observable para sacar conclusiones sobre el comportamiento del cultivo en tiempo real.

Por todas estas razones, cualquier aportación técnica que facilite la monitorización de la progresión celular, especialmente una monitorización a tiempo real, tiene un impacto inmediato en las ciencias biológicas; más en particular aquellas que

reduzcan los efectos negativos sobre las células y que permitan medir de forma continua el número de células en un plato. De esta forma, vale la pena desarrollar técnicas de medida que permitan a investigadores supervisar la evolución de sus experimentos en tiempo real, con un montaje sencillo y autónomo, como es el caso de esta invención.

#### 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. Alocilja, 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.Pallas, 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] P. Daza, A. Olmo, D. Cañete, and A. Yúfera. Monitoring Living Cell Assays with Bio-Impedance Sensors. Sensors and Actuators B: Chemical. Elsevier, pp: 605-610: vol.176. January. 2013.
- 5 [15] G. Huertas et al. Oscillation-Based Test in Mixed-Signal Circuits (Frontiers in Electronic Testing). Springer. 2006.
- [16] J. Gibson. Nonlinear Automatic Control. McGraw-Hill. Japan, 1963.
- 10 [17] P. Fleischer, A. Ganesan and K. Laker, A Switched Capacitor Oscillator with Precision Amplitude Control and Guaranteed Start-Up, IEEE Journal of Solid-State Circuits, Vol. SC-20, No. 2, April 1985.
- 15 [18] 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.** Sistema de medida bio-electrónico. **(a)** Modelo eléctrico de un electrodo. **(b)** Modelo eléctrico de un electrodo parcialmente cubierto por células ( $ff = A/A_c$ ). **(c)** Circuito para el testado de la bioimpedancia célula-electrodo. Valores para un electrodo de tamaño  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ :  $R_s = 5.4 \text{ k}\Omega$ ,  $Z(\omega) = C_1 || R_p$ , with  $C_1 = 0.37 \text{ nF}$  and  $R_p = 25 \text{ M}\Omega$ .  $R_{\text{gap}} = 75 \text{ k}\Omega$ .

25 **Figura 2.** Diagrama de bloques del sistema de medida propuesto objeto de esta invención.

**Figura 3.** Dependencia de los parámetros de oscilación ( $f_{\text{osc}}$ ,  $a_{\text{osc}}$ ) con el solapamiento del área de la célula con el electrodo definido por el factor de llenado,  $ff$ . La sensibilidad aproximada es  $0.16 \text{ Hz}/\mu\text{m}^2$  para  $f_{\text{osc}}$ , usando un micro-electrodo cuadrado de  $50 \mu\text{m}$  de lado.

35 **Figura 4.** **(a)** Relación entre la amplitud de la salida secundaria y la frecuencia de oscilación. **(b)** Dependencia de la amplitud de la salida secundaria ( $A_{\text{osc}2}$ ) con el solapamiento célula-electrodo definido con  $ff$ . La sensibilidad aproximada es  $0.2 \text{ mV}/\mu\text{m}^2$  para la salida secundaria,  $V_{\text{out}2}$ , usando un micro-electrodo de  $50 \mu\text{m}$  de lado.

**Figura 5.** Ejemplo esquemático del filtro usado en la invención.

40

**Figura 6.** Ejemplo de esquemático del filtro filtro paso de alta más comparador usado en la invención.

5 **Figura 7.** Ejemplo de esquemático del AGC usado en la invención.

**Figura 8.** Diagrama de bloques del sistema global usado en la invención.

**Figura 9.** Diagrama de la multiplexación.

10 **Descripción de la invención**

La impedancia de un sistema de dos electrodos (Figura 1 (a)) ha sido ampliamente estimada [3, 13, 14]. Particularmente, en este trabajo, se ha considerado un micro-electrodo que puede estar total o parcialmente cubierto por células en el cultivo. El factor de relleno ( $ff$ ) representa la cantidad de área del electrodo (A) cubierta de  
 15 células. Variando desde  $ff=0$ , si no se detecta la presencia de ninguna célula, hasta  $ff=1$ , con la totalidad del área ocupada por células.

Nuestro objetivo es, usando el modelo eléctrico para la bioimpedancia (Figura 1 (b)) anteriormente reportado [3, 13, 14], obtener el área de solapamiento de las  
 20 células con el electrodo ( $A_c$ ) empleando las medidas realizadas con la circuitería propuesta.

La respuesta en magnitud y fase para  $Z_{\text{cell-electrode}}(s)$  se puede obtener a partir del montaje de la Figura 1 (c). El resistor  $R_{in}$  permite mantener la corriente que fluye a  
 25 través del sistema electrodo-célula en niveles de señal adecuados (1-20 $\mu$ A para proteger la célula y 10-50mV para las restricciones del modelado del electrodo [3]).

El sistema objeto de la presente invención realiza las medidas del sistema bio-electrónico ( $Z_{\text{cell-electrode}}$ ), lo que llamaremos de ahora en adelante CCUT (del inglés  
 30 Cell-Culture Under Test, es decir, cultivo celular bajo testado). Este bio-sistema se transforma en un oscilador robusto, añadiéndole algunos componentes (Figura 2). Para forzar las oscilaciones, se ha implementado un lazo de realimentación positiva. La técnica, exige predecir con exactitud los parámetros de oscilación (frecuencia y amplitud), tanto analíticamente o por medio de simulaciones [15-17].  
 35 También es necesario evitar la dependencia de estos parámetros con la característica de saturación de los elementos activos, como ocurre en los osciladores comunes. Una solución a este problema es usar un elemento no lineal

(un simple comparador) cerrando un lazo de realimentación para garantizar las oscilaciones auto mantenidas [15-17]. Este elemento no lineal también proporciona un control preciso de la amplitud de las oscilaciones. Por otro lado, necesitamos asegurar que este sistema cumpla con un conjunto (relativamente) simple de condiciones de oscilación que pueda dar información sobre los parámetros de oscilación. Una manera simple de obtener este objetivo es emplear un filtro paso de banda en el lazo, como planteamos en el bloque general de circuito en la Figura 2.

Por simplicidad, consideramos el caso de un filtro paso de banda de segundo orden y un comparador con niveles de saturación  $\pm V_{ref}$ . Este sistema de lazo cerrado verifica las premisas requeridas: es autónomo, la no linealidad es separable e independiente de la frecuencia y la función de transferencia lineal contiene el suficiente filtrado paso de baja para despreciar los armónicos de alto orden en la salida del comparador. De esta forma, las ecuaciones que gobiernan las condiciones de oscilación pueden manejarse fácilmente.

Eligiendo adecuadamente el filtro paso de banda, el sistema de lazo cerrado de la Figura 2 se puede forzar a oscilar y su ecuación de descripción (DF) de primer orden [15],  $N(a)+1/H(s)=0$ , tiene una solución oscilatoria  $(\omega_{osc}, a_{osc})$ , siendo  $\omega_{osc}$  la frecuencia de oscilación y  $a_{osc}$  la amplitud de oscilación. La función DF será en este caso  $N(a)$ , mientras que  $H(s)$  es la función de transferencia del sistema de lazo abierto.

Matemáticamente, la ecuación característica es:

$$1 + N(a)H(s) = 0 \tag{1}$$

donde,  $N(a)$  es la DF del comparador y  $H(s)$  el sistema modificado.

La función BP general vendrá dada por,

$$H_{BP}(s) = \frac{k_1^* \omega_0^* s}{s^2 + \frac{\omega_0^*}{Q^*} s + \omega_0^{*2}} \tag{2}$$

siendo  $\omega_0^*$ ,  $Q^*$  y  $k_1^*$  los parámetros BPF.

La función de transferencia  $V_{out}/V_{in}$  del sistema bio-electrónico de la Figura 1 (c) la llamaremos,  $H_z(s)$ ,

$$H_z(s) = \frac{k_2 s^2 + k_1 \frac{\omega_o}{Q} s + k_o \omega_o^2}{s^2 + \frac{\omega_o}{Q} s + \omega_o^2} \quad (3)$$

- 5 Donde los parámetros constantes ( $\omega_o$ ,  $Q$  y  $k_o$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ) están directamente relacionados con el tamaño del electrodo, la tecnología y el material biológico (ff). La expresión de la función total estará dada por,

$$H(s) = H_{BP}(s) \cdot H_z(s) \quad (4)$$

10

Para forzar las oscilaciones, un par de polos complejos conjugados del sistema global tienen que estar ubicados sobre los ejes imaginarios. El camino para determinar las condiciones de oscilación (ganancia, frecuencia y amplitud) es resolver la ecuación (1).

- 15 Esto es equivalente a encontrar una solución del conjunto de ecuaciones

$$1 + N(a_{osc})H(s) = (s^2 + \omega_{osc}^2)(s^2 + Bs + A) = 0 \quad (5)$$

Siendo los coeficientes dados por las ecuaciones,

20

$$\begin{aligned} B &= \frac{\omega_o}{Q} + \frac{\omega_o^*}{Q^*} + N(a_{osc})k_1 k_2 \frac{\omega_o^*}{Q^*} \\ A + \omega_{osc}^2 &= \omega_o^2 + \frac{\omega_o}{Q} \cdot \frac{\omega_o^*}{Q^*} + \omega_o^{*2} + N(a_{osc})k_1 \frac{\omega_o^*}{Q^*} k_1 \frac{\omega_o}{Q} \\ B \cdot \omega_{osc} &= \frac{\omega_o^*}{Q^*} \omega_o^2 + \frac{\omega_o}{Q} \omega_o^{*2} + N(a_{osc})k_1 \frac{\omega_o^*}{Q^*} k_o \omega_o^2 \\ \omega_{osc}^2 \cdot A &= \omega_o^2 \omega_o^{*2} \end{aligned} \quad (6)$$

- 25 Existe una solución de oscilación. Los parámetros de oscilación principales son función del área del cultivo celular ocupada. Esta dependencia se muestra en la Figura 3, para la frecuencia y la amplitud de las oscilaciones. La salida del filtro biológico (la entrada al comparador en la Figura 2) es aproximadamente sinusoidal debido a la característica paso de banda de la estructura global. Este hecho permite usa la aproximación lineal establecida por el método de la función de

descriptiva [15-17] para el tratamiento lineal del elemento no lineal. La función de transferencia del comparador, según esto, vendrá dada por:

$$N(a_{osc}) = \frac{4V_{ref}}{\pi a_{osc}} \quad (7)$$

Donde, como ya se dijo,  $V_{ref}$  es la referencia de tensión del comparador (cuyo valor puede ser barrido para obtener niveles de señal adecuados) y  $a_{osc}$  es la amplitud de las oscilaciones.

Obsérvese que para nuestro ejemplo (Figura 3), la frecuencia de oscilación incrementa monótonamente en el rango [7560, 7920] Hz (0.16Hz/ $\mu\text{m}^2$  del área de electrodo ocupada por células) y las amplitudes de oscilación [0, 40] mV, a medida que crece el solapamiento del área de la célula en el electrodo. Debido a que el nivel de señal de salida  $V_{out}$  (ver Figura 2) es muy pequeño por las restricciones del modelo del electrodo, consideramos la señal secundaria ( $V_{out2}$  en la Figura 2) como salida potencial (cuyo valor está relacionado con la frecuencia de oscilación), lográndose una mejora en el rango dinámico.

Si  $f(t)$  es la salida cuadrada del comparador, puede expresarse en términos de su desarrollo en serie de Fourier:

$$f(t) = \frac{4}{\pi} V_{ref} [\text{sen}(\omega_{osc}t) + \frac{1}{3}\text{sen}(3\omega_{osc}t) + \frac{1}{5}\text{sen}(5\omega_{osc}t) + \dots]$$

Por otro lado, la ganancia del filtro paso de banda con respecto a la frecuencia de oscilación es:

$$GAIN = k_1^* \frac{w_o^* w_{osc}}{Q^*} / \sqrt{(w_o^{*2} - w_{osc}^2)^2 + (\frac{w_o^* w_{osc}}{Q^*})^2}$$

Resultado la siguiente expresión de la amplitud de la salida secundaria:

$$A_{osc2} = \frac{2V_{ref}}{\pi} k_1^* \frac{w_o^* w_{osc}}{Q^*} / \sqrt{(w_o^{*2} - w_{osc}^2)^2 + (\frac{w_o^* w_{osc}}{Q^*})^2} \quad (8)$$

Mostramos en la Figura 4 (a), cómo es esta dependencia y en la Figura 4 (b) cómo se mejora el rango dinámico si usamos la salida secundaria.

Las razones que hacen atractiva esta invención son: el concepto es muy simple, evita la necesidad de un equipamiento complejo y caro para la generación de estímulos (de hecho, no requiere ninguna señal externa de entrada) y para la interpretación de la respuesta (las medidas a realizar son relativamente simples

[15]). Estas características son las que abren la puerta para extender el concepto a monitorización en tiempo real como proponemos aquí.

### **Modo de realización de la invención**

5 El esquemático del sistema principal (oscilador para las medidas) se mostró previamente en la Figura 2. Está compuesto, como dijimos, de tres bloques fundamentales: un filtro paso de banda (BP), el bloque de bioimpedancia y un comparador. Se requiere también de algún tipo de mecanismo de *start-up*.

#### 10 *Filtro paso de banda:*

Un estudio teórico en profundidad de nuestro “oscilador biológico” (cuando se considera el caso particular de un micro-electrodo de oro, cuadrado, de 50  $\mu\text{m}$  de lado, que puede estar cubierto parcial o totalmente de células en el cultivo) revela que la frecuencia óptima para el filtro paso de banda en orden a conseguir un modo de oscilación adecuado está alrededor de 8kHz. Sin embargo, de cara a obtener mayor flexibilidad, debido a la naturaleza de diferentes clases de electrodos, se ha implementado un filtro ajustable. Se eligió un filtro de variable de estado porque con esta topología se puede ajustar independientemente la frecuencia de resonancia,  $\omega_0$ , y el factor de calidad, Q. La Figura 5 muestra la implementación del filtro completo.

Por simulación se pueden obtener los posibles valores de resistencia y, con ello, los valores de  $\omega_0$  (una vez seleccionados los valores de  $R_m$  y C en la Figura 5). Estos valores tienen que ser elegidos para tener un rango de frecuencias desde 6.5kHz a 13kHz y una variación casi lineal sobre el rango completo. Este se consigue tomando  $R_m=10\text{k}\Omega$  and  $C=1.2\text{nF}$ .

#### *Comparador:*

La Figura 6 muestra el comparador usado. Está compuesto de tres bloques, el comparador en sí mismo, un filtro paso de alta y un amplificador en configuración no inversora. La señal de salida de la bioimpedancia se filtra primero para reducir el ruido de baja frecuencia (principalmente los 50Hz de la red eléctrica) con un filtro paso de alta Sallen-Key ajustable a 1kHz y con Q variable para permitir una selección precisa de la desviación de fase en la frecuencia de resonancia del filtro paso de banda. Entonces, la señal se amplifica x20 con una configuración no inversora y pasa al comparador donde gracias a los 6mV de histéresis se consigue la anulación del ruido. También, su rápida respuesta garantiza desviación de fase

baja. Además, debido a su entrada *enable* podemos mantener el sistema en *standby* mientras cambia la bioimpedancia o mientras el sistema está en su modo normal.

5 *Control automático de ganancia (AGC):*

Este elemento (Figura 7) se incluye por la ventaja de garantizar una tensión de salida constante para diferentes niveles de ocupación. El AGC permite usar un nivel de tensión mayor a través de la bioimpedancia a bajo nivel de ocupación y un nivel de tensión menor a altos niveles de ocupación. Esto hace al sistema menos sensible al ruido y resuelve los problemas que debemos afrontar con señales de decenas de milivoltios obtenidas para los niveles más bajo de ocupación. Con el uso del AGC la información sobre el nivel de ocupación reside en la tensión aplicada al amplificador de ganancia programable, que llamaremos  $V_g$  a partir de ahora. Este componente está compuesto de tres bloques: un amplificador de ganancia variable, un rectificador inversor de precisión y un amplificador no inversor (Figura 7).

*Circuito digital:*

El sistema objeto de la presente invención se compone de electrodos, sobre los cuales se realiza el cultivo celular, la circuitería necesaria para construir el oscilador y medir la impedancia, un circuito transmisor de radiofrecuencia para el envío inalámbrico de datos, y un micro-controlador para procesar los datos. El esquema de la arquitectura del sistema se muestra en la Figura 8.

25 La parte digital está compuesta por un microcontrolador responsable de activar el bio-oscilador, elegir la salida multiplexada (Figura 9) (si particularizamos el sistema para la medida a través de electrodos, de  $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ) e interactuar con los usuarios.

30 El MCU necesita tener un ADC de al menos 6 bits para tener un 1,56% de precisión al medir  $V_g$ , temporizador con disparo externo y contador, modulo multiplicador, puerto serie, puerto usb y suficientes entradas y salidas de propósito general para poder conectar unos pulsadores, un display, un sensor de temperatura y humedad, un zumbador piezoelectrico y otros dispositivos o periféricos que se consideren necesarios o importantes.

El MCU activa el bio-oscilador, elige la celda deseada por medio del multiplexor, mide la frecuencia de oscilación del sistema y el valor del voltaje a  $V_g$  en el módulo AGC y calcula el valor del factor de relleno. Éste se muestra en el display o puede configurarse el sistema para enviarlo por medio de su puerto serie a una  
5 conexión inalámbrica (Bluetooth por ejemplo) a algún dispositivo que acepte dicha conexión (teléfono móvil, ordenador...) El sistema también mide y envía información sobre la temperatura y la humedad, sobre el estado de la batería, el tiempo transcurrido, así como cualquier otra información que se considere importante. La conexión inalámbrica también permite al usuario configurar el  
10 dispositivo.

Un zumbador piezoeléctrico actúa a modo de alarma y avisa al usuario cuando se produzcan situaciones que él mismo haya establecido. Una conexión USB puede usarse para acceso al registro de datos de experimentos realizados y también para actualizar el *firmware* del sistema. También se dota al sistema de un display  
15 que permite mostrar la información sobre el factor de relleno y otros datos si la conexión inalámbrica no puede usarse.

Todo 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  
20 propios del cultivo celular. De igual forma, el circuito transmisor y receptor de señales de radiofrecuencia permite la programación inalámbrica del bio-oscilador pudiendo ser establecidos remotamente los parámetros de control y medida descritos anteriormente.

25 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.

30 Este sistema de monitorización permite obtener de forma inalámbrica las medidas que muestran la evolución del cultivo celular en el tiempo, 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  
35 en forma digital permite un posterior procesado de los datos para un estudio más avanzado de la evolución del cultivo.

**Reivindicaciones**

- 5
1. Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares formado esencialmente por un array bidimensional de electrodos como sensores de bioimpedancia donde se convierte el "circuito biológico" en un oscilador y se usa las señales eléctricas (oscilaciones) como parámetros de interpretación del estado del cultivo. El sistema está compuesto por:
    - a) micro-electrodos como sensores de bioimpedancia
    - 10 b) que forman parte de un circuito oscilador de medida de bioimpedancia en bucle cerrado,
    - c) que se conecta a un circuito de transmisión y recepción de señales de radiofrecuencia y
    - d) un micro-controlador para la monitorización e interpretación de datos.
- 15
2. Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares según la reivindicación 1, caracterizado porque los micro-electrodos se implementan a través de procesos CMOS.
- 20
3. Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de los siguientes elementos:
    - 25 a) un array bidimensional de micro-electrodos electrodos,  $Z_{\text{cell-electrode}}(s)$ ,
    - b) un circuito oscilador compuesto por:
      - b1) un circuito de testado de bioimpedancia que incorpora el array de micro-electrodos,
      - 30 b2) un filtro paso de banda, situado a la entrada del circuito de testado de bioimpedancia,
      - b3) un comparador, situado a la salida del circuito de testado de bioimpedancia.

Todos ellos dispuestos en bucle cerrado para la construcción del oscilador que genera las señales de información del estado del cultivo celular.

Además, el oscilador propuesto incorpora como elementos de circuito:

35

b4) un bloque AGC para el control de los niveles de señal adecuados y para la interpretación de las medidas, situado a la salida del filtro paso de banda.

5 b5) un filtro paso de alta para eliminar señales de ruido que puedan invalidar los datos, situado a la entrada del comparador,

b6) un multiplexor situado a la salida del AGC, para la selección del canal de medida.

10 c) un modulo de comunicaciones bluetooth, conectado al micro-controlador MCU,

d) y un micro-controlador (MCU) para la monitorización y procesamiento de la información, que incluye sensores de temperatura y humedad para el control del proceso.

15

4. Sistema de medida de bioimpedancia para la monitorización en tiempo real y de forma inalámbrica de cultivos celulares según la reivindicación 1, caracterizado porque el circuito transmisor y receptor de señales de radiofrecuencia es compatible con los estándares 802.11, 802.15 o similares.

20

25

30

35

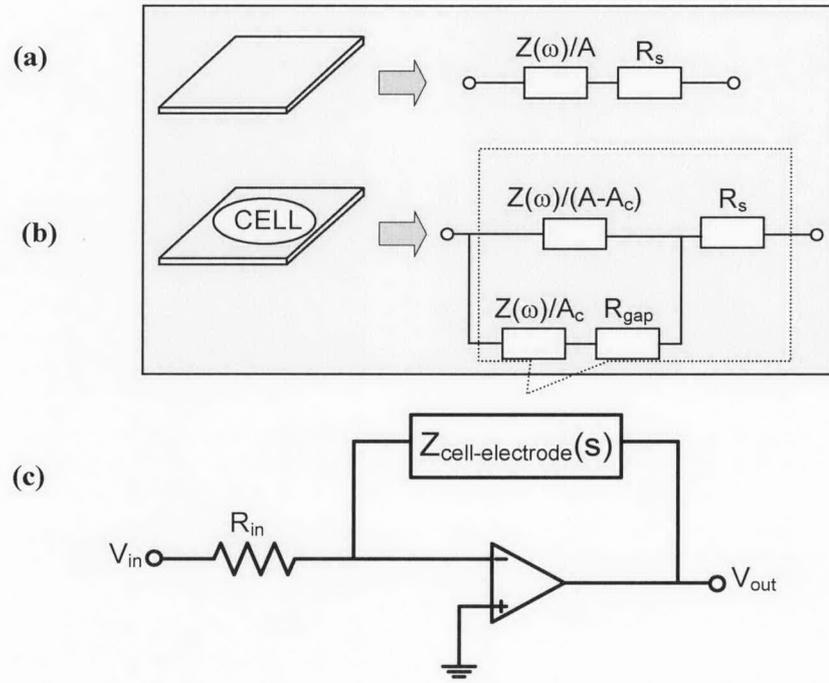


Figura1

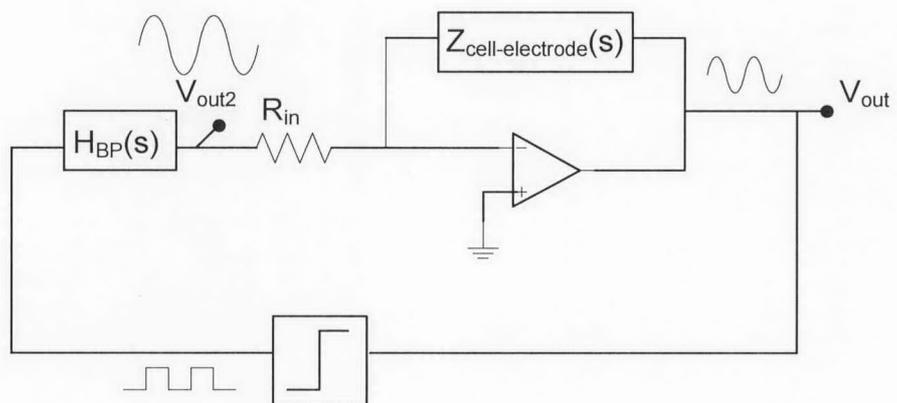


Figura 2

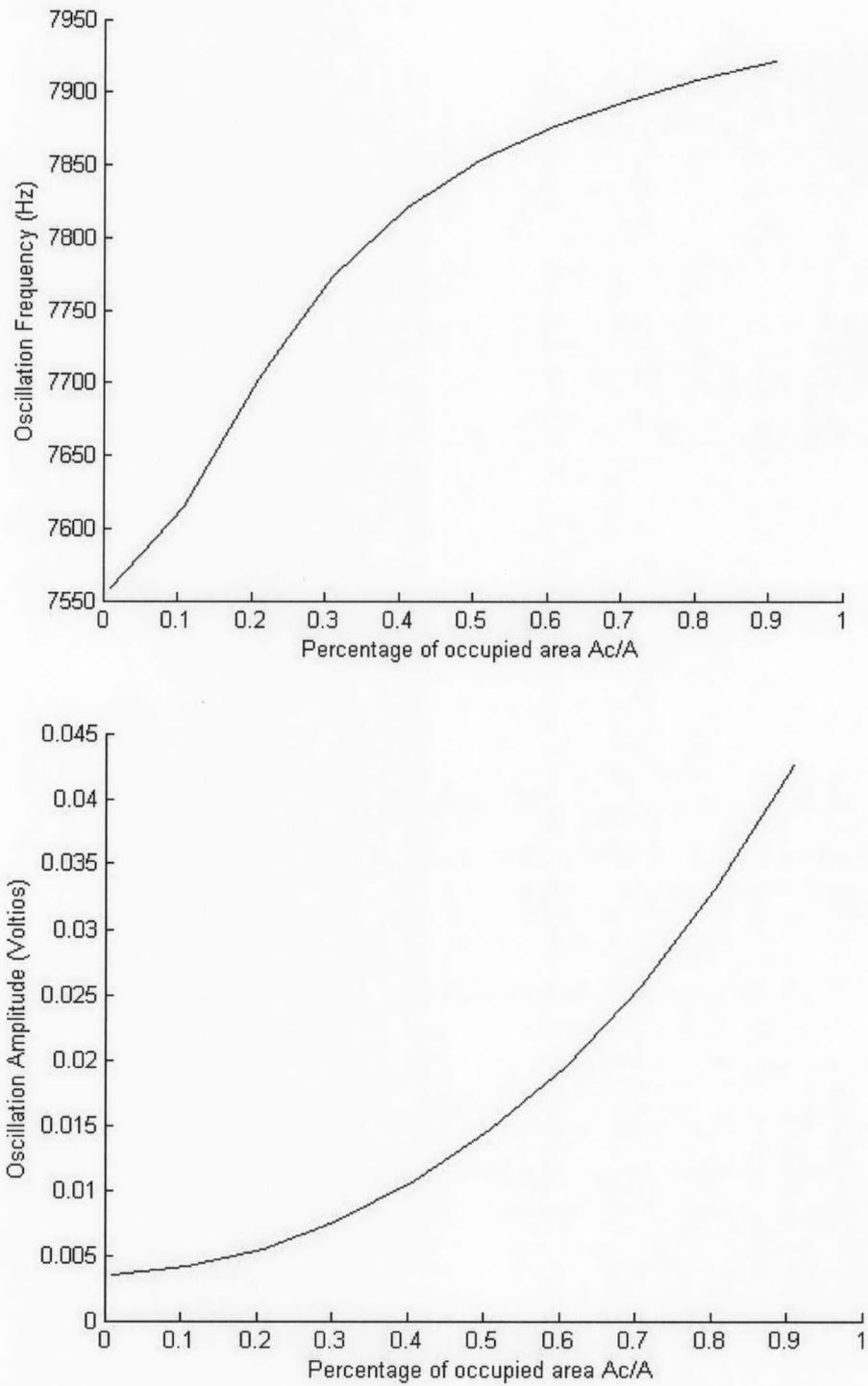


Figura 3

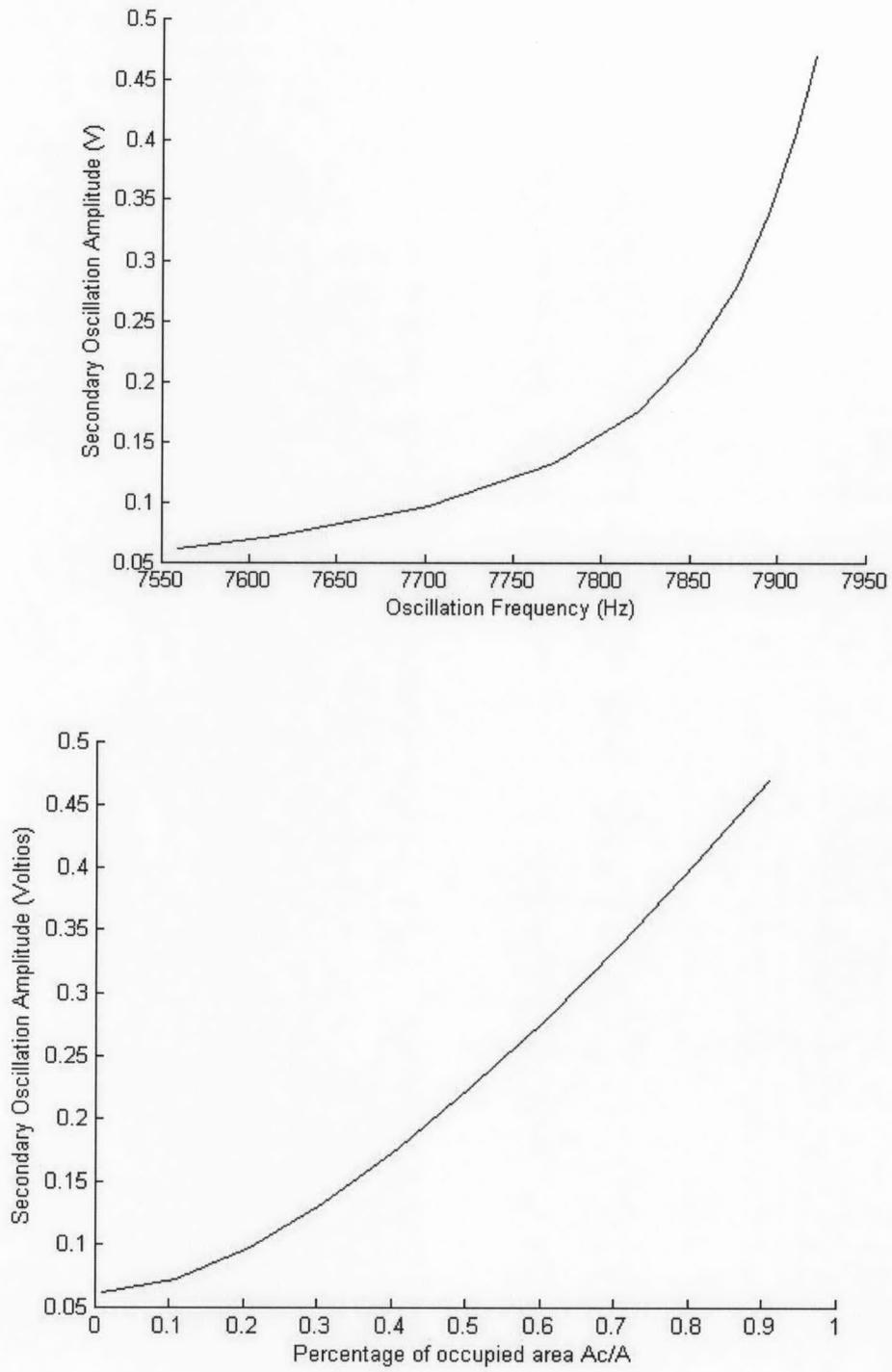


Figura 4

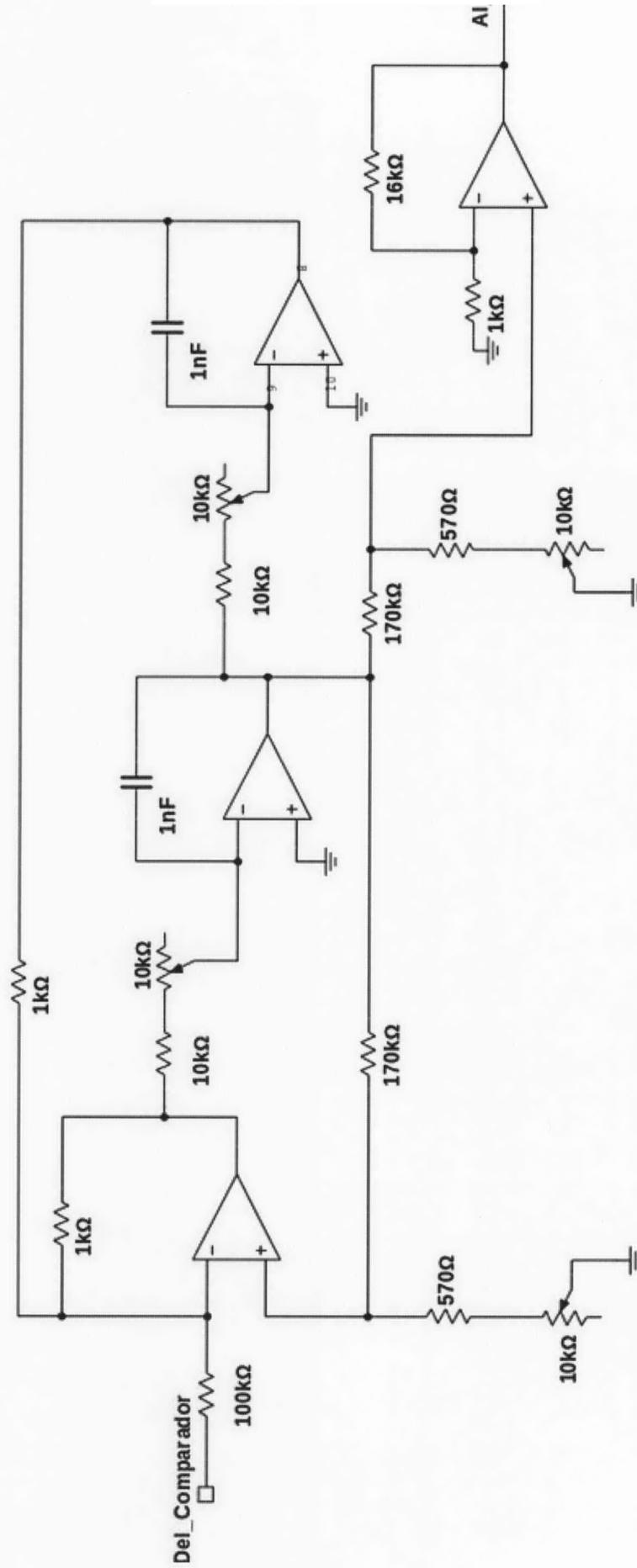


Figura 5

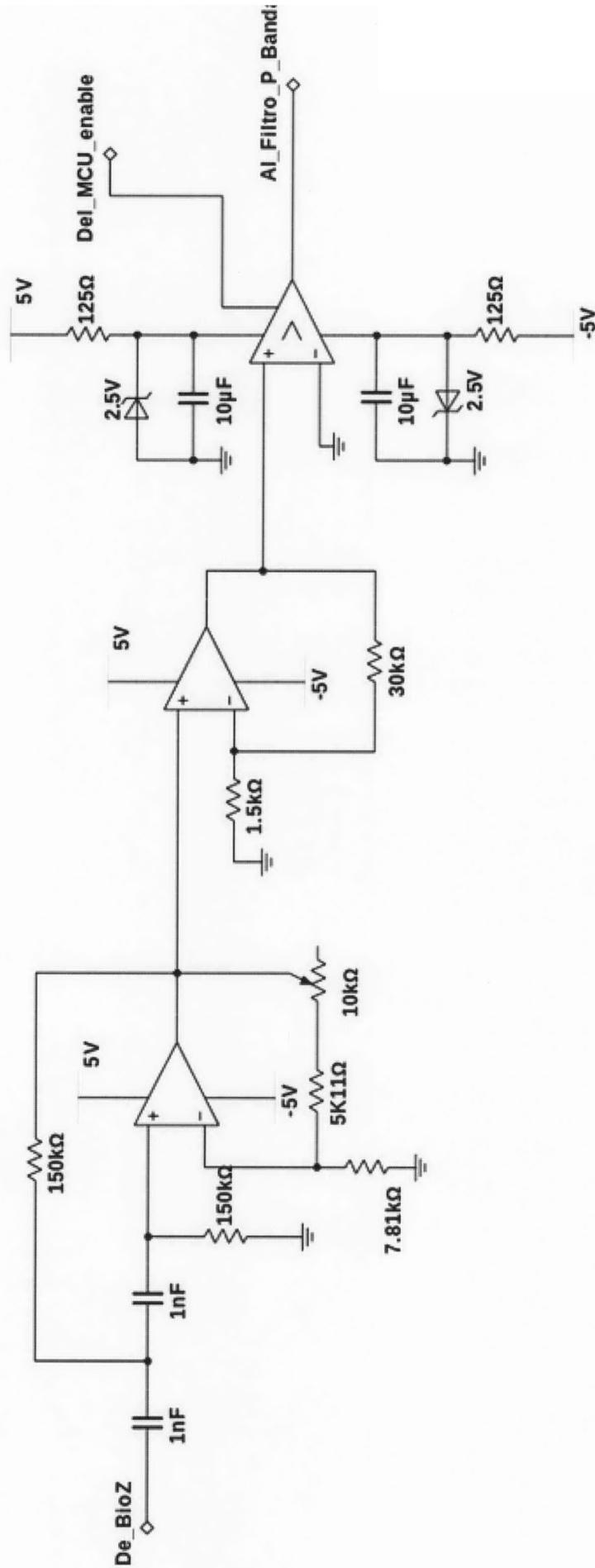


Figura 6

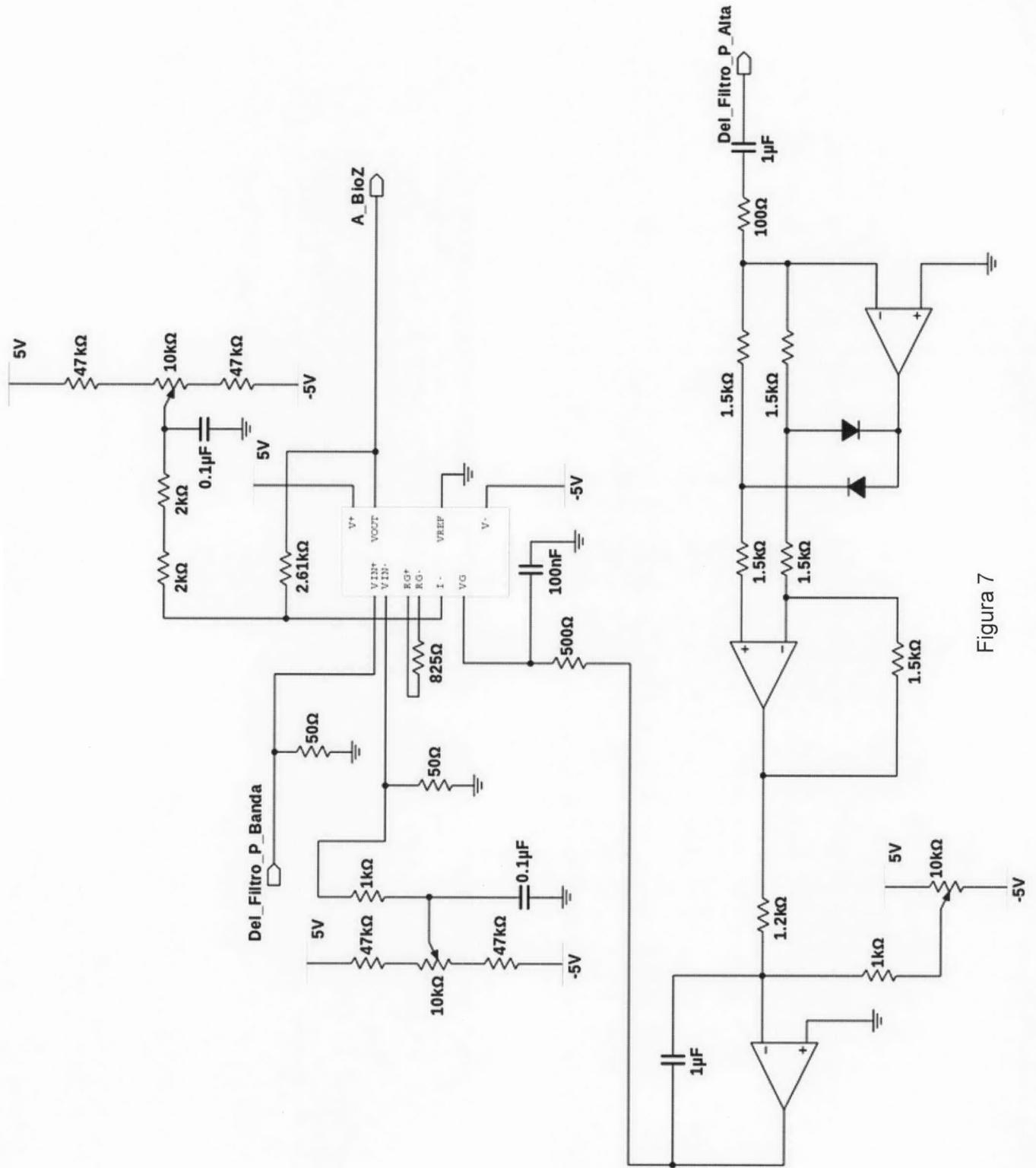


Figura 7

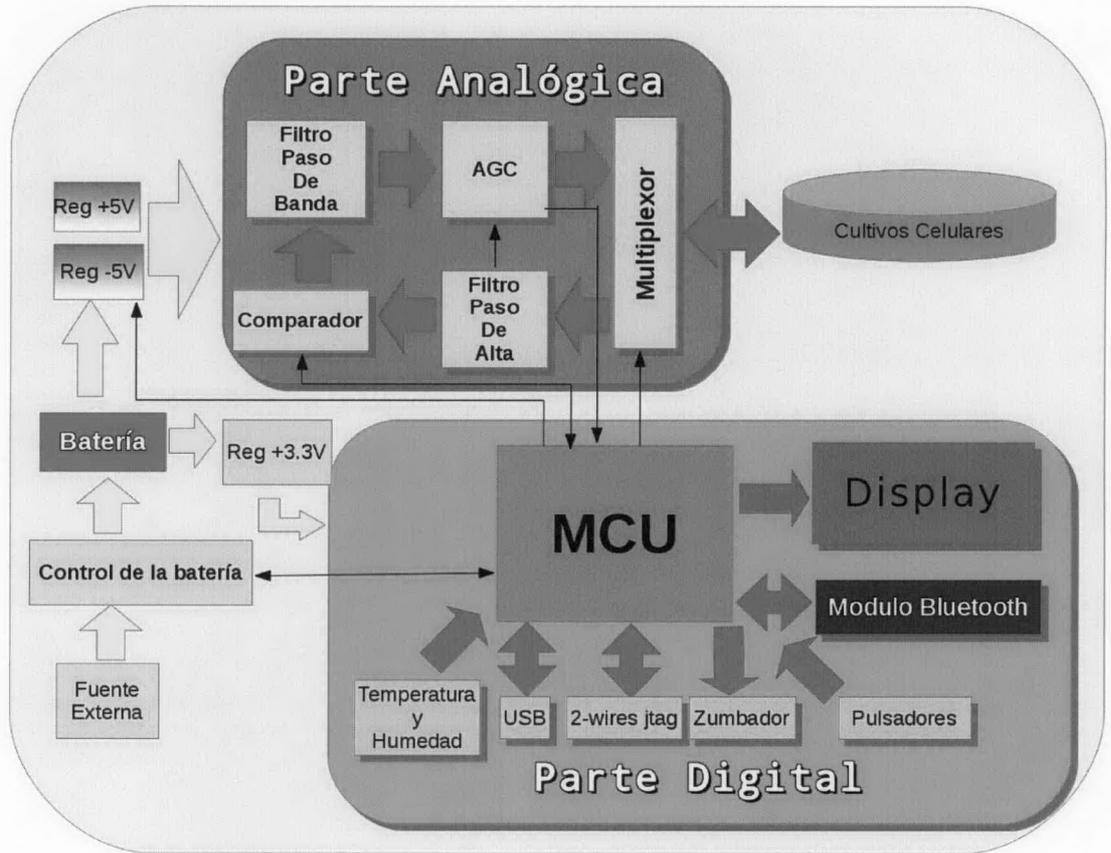


Figura 8

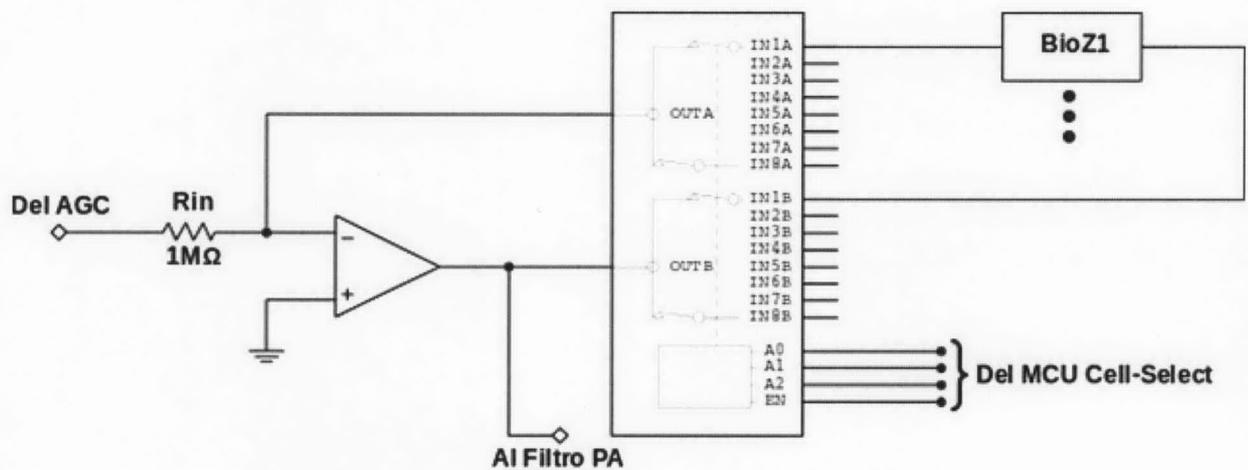


Figura 9