

“CONTADOR ÓPTICO DE CÉLULAS EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS”

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un sistema o un dispositivo electrónico que es capaz de estimar la cantidad de células en medios de cultivo líquido. El objeto de la presente solicitud se ubica dentro del campo de la ingeniería electrónica, biotecnología, ingeniería química e instrumentos de medida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el estado de la técnica se conocen diferentes productos de conteo de partículas o células, entre los documentos de solicitudes de patente que incluyen este tipo de dispositivos encontramos:

La solicitud con número de referencia **US8852524** y título ***“CELL COUNTING SLIDE WITH LATERAL RESERVOIR FOR PROMOTING UNIFORM CELL DISTRIBUTION”***, que se refiere a un dispositivo de recuento de células que contiene una cámara y uno o más depósitos a lo largo de la periferia de dicha cámara o sección de recuento de células. Ésta y los depósitos juntos forman una cavidad en el interior de la guía de recuento de células. El dispositivo en muchos casos es una combinación de dos placas, una que forma la base y la otra que ocupa el lugar del cubreobjetos en el tanque de recuento de células convencionales. Las dos placas pueden ser componentes individuales que se apilan juntas para su uso, o pueden fusionarse como una unidad. Alternativamente, pueden formarse (moldearse o mecanizarse) como una sola pieza (unitaria). En todos los casos, la profundidad (o altura) de la sección de conteo de células que define la profundidad de la suspensión de celdas durante el conteo, se establece por el piso y el techo de la sección, que son dos superficies planas opuestas y paralelas. La placa superior es transparente para permitir el conteo desde arriba, y en muchos casos, todo el recinto es transparente.

El depósito se extiende preferiblemente a lo largo de un lado de la cámara. En muchos casos, la cámara tiene forma rectangular y el reservorio se extiende a lo largo de uno de los lados más cortos (laterales) del rectángulo, y en muchos de estos casos, se incluyen dos reservorios, uno en cada uno de los dos lados opuestos. En cualquier caso, el depósito se extiende debajo del piso de la sección de conteo celular y es más profundo que el espacio entre el piso y el techo de la sección de conteo de células, preferiblemente por un factor de al menos dos. La suspensión se puede alimentar al depósito a través de un puerto en la placa superior de la corredera, como por ejemplo con un tanque. La suspensión puede ser alimentada al depósito a través de un punto de suministro en la placa superior del dispositivo, que puede ser un tubo de vidrio (pipeta). Cuando se suministra una

suspensión de esta forma, el depósito se llena antes de que dicha suspensión entre en la sección de conteo celular. Solo en el momento en que el depósito se llena la suspensión entra en la sección de recuento celular.

La suspensión puede ser alimentada al depósito a través de un punto de suministro en la placa superior del dispositivo, que puede ser un tubo de vidrio (pipeta). Cuando se suministra una suspensión de esta forma, el depósito se llena antes de que dicha suspensión entre en la sección de conteo celular. Solo en el momento en que el depósito se llena la suspensión entra en la sección de recuento celular.

Las profundidades de la sección de conteo y el depósito(s) pueden variar. Para una sección de conteo celular que es de $1\text{e-}4\text{m}$ en profundidad, por ejemplo, sean obtenidos mejores resultados con un depósito de 0.0003m a 0.001m , y preferiblemente de cercana a los 0.0005m de profundidad. Adicionalmente, el depósito no requiere una profundidad uniforme.

En el mismo sentido, encontramos la solicitud de patente de invención con número de referencia **US9354155** y titulada **“CELL COUNTING SYSTEMS AND METHODS”** que describe un dispositivo inteligente o sistema automatizado para captura múltiple de imágenes digitales de una muestra, desde diferentes áreas de visualización. Las imágenes se analizan y se presenta un resultado de la prueba en función del conteo de células en todas las imágenes digitales. El sistema puede ser especialmente aplicable a la prueba de muestras que tienen bajas concentraciones celulares, ya que la variabilidad entre las pruebas puede reducirse en comparación con un sistema que basa sus resultados en solo una imagen de la muestra. El sistema puede contar las células en una primera imagen digital de la muestra y puede capturar o analizar una o más imágenes, solo cuando se reconoce que se necesitan mediciones adicionales, para garantizar la precisión y repetibilidad adecuadas de la prueba.

El sistema de conteo celular señalado posee un portamuestras con un soporte que incluye una ventana transparente en la cual la muestra se dispersa. En el dispositivo se proporciona un respiradero para permitir que el aire se escape entre las placas a medida que la muestra entra. El sistema de conteo de células incluye componentes para detectar una imagen a través de la ventana transparente, y también incluye elementos para analizar la imagen con el fin de estimar el número de células. Los resultados de la prueba se presentan al usuario en una pantalla. Una fuente de luz ilumina parte de la ventana, la fuente de luz puede ser un diodo emisor de luz (LED), una luz incandescente, una luz fluorescente u otro tipo de luz. Una lente proyecta una imagen de un área de visualización en un sensor de luz de conjunto. El área de visualización incluye solo una parte de la ventana. El sensor de luz de matriz puede ser un sensor de dispositivo de carga acoplada (CCD), un

sensor semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), u otro tipo de sensor de imagen electrónico. Dicho sensor incluye una serie de sitios sensibles a la luz llamados píxeles. Cada píxel del sensor acumula carga eléctrica a una velocidad proporcional a la intensidad de la luz que cae sobre el píxel.

Para leer una imagen digital del área de visualización en el sistema citado, los píxeles del sensor se pueden restablecer y el sensor se expone a la luz durante un período de tiempo fijo. La cantidad de carga en cada píxel se convierte en un voltaje, y los voltajes se leen y se convierten en valores numéricos. La imagen digital es una matriz de los valores numéricos que representan las intensidades de luz que caen en los píxeles respectivos. En algunas realizaciones, la información de color también se puede recopilar. En algunas realizaciones, el sensor de luz de conjunto puede incluir aproximadamente 4 millones de píxeles. Un controlador interactúa con el sensor de luz de conjunto para recoger la imagen digital. Por ejemplo, dependiendo del tipo de sensor, el controlador puede proporcionar señales de sincronización al sensor de luz de la matriz, proporcionando información de configuración u otras señales de control. El controlador también recibe información que indica las lecturas de luz tomadas en los píxeles. Según el tipo de sensor y la arquitectura del sistema, la información puede ser en forma de voltaje analógico para ser convertidos a valores digitales por el controlador, o puede que ya se hayan convertido a valores digitales en el sensor.

Finalmente, encontramos la solicitud referenciada con el número **US2013038727** y titulada **“CELL IMAGE CAPTURING AND REMOTE MONITORING SYSTEMS”** que se refiere a un sistema de captura y monitorización remota de datos de cultivos celulares, que incluye un módulo sensor de imágenes con una o más cámaras para capturar imágenes fijas y/o en movimiento de cultivos celulares imágenes de cultivos celulares y células ubicadas en un soporte y/o en un líquido ubicado en un recipiente de cultivo dentro de una incubadora. Las imágenes se pueden tomar a diferentes aumentos, y desde diferentes ubicaciones permanentemente. Los datos e imágenes capturados se transmiten de forma inalámbrica a una unidad de control, y/u otro dispositivo de transmisión de datos conectado de forma inalámbrica y ubicado en forma remota, como un PDA, para que un investigador lo revise y analice para determinar el estado y la viabilidad de las células, y el estado del cultivo celular. El sistema de captura y monitoreo remoto de imágenes que se describe en el presente documento evita que un investigador entre en contacto directo con las muestras biológicas, y así su manipulación y posible contaminación.

A pesar de que los documentos citados se relacionan con sistemas o dispositivos para estimar la cantidad de células en medios de cultivos líquido, en ninguno de ellos es posible realizar la estimación celular *“in situ”* visualizando los datos y

almacenándolos en tiempo real en el computador, de tal manera que es posible consultar y graficar la información en el momento que se requiera.

Adicionalmente, en el estado de la técnica y en ninguna de las invenciones citadas se utiliza un sensor infrarrojo (IR) que permita estimar la cantidad de células que hay en un medio líquido sobre el terreno evitando sacar muestras o detener el proceso para realizar la cuantificación celular. Tampoco es posible en la mayoría de los casos monitorear permanentemente la información suministrada por el sensor infrarrojo (IR) a través del computador y ver en tiempo real la evolución del crecimiento celular. Lo anterior, trae una gran ventaja sobre todos los equipos diseñados para este propósito ya que las tareas rutinarias de toma de muestras y datos pueden ser realizadas de forma automática.

Por todo lo anterior, existe la necesidad de proporcionar un dispositivo capaz de estimar la cantidad de células en medios de cultivos líquido que se acople a superficies planas, que realice la estimación celular en el lugar requerido y donde los datos se pueden visualizar y almacenar en tiempo real en el computador, que además sea portable, de fácil instalación y automatizado para que permita la lectura de los datos de manera continua.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Para solucionar el problema formulado antes, la solicitud en estudio propone un contador óptico de células en medios de cultivo líquidos. El dispositivo es capaz de estimar la cantidad de células en medios de cultivos líquido. El contador fue diseñado especialmente para ser acoplado en superficies planas. A diferencia de la mayoría de dispositivos de este tipo, en esta propuesta, la estimación celular se realiza *in situ*. Adicionalmente, los datos se pueden visualizar y almacenar en tiempo real en el computador, de tal manera que es posible consultar y graficar la información en el momento que se requiera.

El dispositivo utiliza un sensor infrarrojo (IR) que permite estimar la cantidad de células que hay en el medio líquido. La estimación como ya se dijo se hace "*in situ*", por lo que no se requiere sacar muestras o detener el proceso para realizar la cuantificación celular. Además, la conexión al computador permite monitorear en tiempo real la información suministrada por el sensor y ver todo el tiempo la evolución del crecimiento celular. Estas características son convenientes en cuanto a que las tareas rutinarias de toma de muestras y datos pueden ser realizadas de forma automática, dando más independencia al personal científico.

La invención aquí propuesta será definida y explicada con mayor detalle a continuación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con el objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un grupo de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1 presenta en perspectiva un ejemplo de implementación del dispositivo en estudio donde se aprecian todos los elementos que componen la invención, en términos generales, la invención consta de hardware y software diseñados a la medida, con un sensor infrarrojo (1) que se ubica en una agarradera cuadrada (2) que va sobre el biorreactor (BR), un circuito electrónico (4), un dispositivo programable (5), un puerto USB (6) y un computador en el que se aloja el software (7).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, describiremos en detalle el dispositivo de la presente invención. A la vista de la figura reseñada 1, dicho dispositivo se caracteriza por tener un sensor infrarrojo (IR) que permite estimar la cantidad de células que hay en el medio líquido. La estimación de las mencionadas células se realiza "*in situ*", por lo que no se requiere sacar muestras o detener el proceso para realizar la cuantificación celular. Cuando se realiza la conexión al computador se logra monitorear todo el tiempo la información suministrada por el sensor y ver en tiempo real la evolución del crecimiento celular. Estas características son convenientes en cuanto a que las tareas rutinarias de toma de muestras y datos pueden ser realizadas de forma automática, dando más independencia al personal científico.

La alimentación de energía de la invención es de 12 V (pudiendo funcionar en un rango entre 10 V y 15 V). Otra de las ventajas del producto en estudio es que tiene un bajo peso que facilita su transporte. El dispositivo posee un circuito de alimentación, que está conformado por un transformador, un puente de diodos, un condensador, un regulador de voltaje y 2 diodos emisores de luz (LEDs). Adicionalmente, tiene un fusible (cuya función es proteger el circuito contra variaciones de voltaje). Los elementos de dicho circuito están ubicados en una tarjeta de circuito impreso PCB (Printed Circuit Board) unidos por pistas de cobre. La salida del regulador del voltaje genera el voltaje requerido para que el circuito encargado de estimar la cantidad de células funcione.

El conjunto de elementos físicos o materiales que constituyen el sistema (hardware) se revelan en la figura 1. Este dispositivo utiliza un sensor infrarrojo (1) ubicado en una agarradera cuadrada (2). Dicha agarradera se ubica sobre el biorreactor (BR),

biorreactor (BR) o contenedor (3) en el que se encuentra el cultivo en medio líquido. La señal generada por el sensor infrarrojo es resultado de un circuito electrónico (4). Esta señal de voltaje análoga suministrada por el circuito electrónico va a un dispositivo programable (5). El circuito electrónico (4) y el dispositivo programable (5) están ubicados en el mismo contenedor, el cual, se conecta por puerto “*Universal Serial Bus*” (Bus Universal en Serie) o interfaz para la conexión de periféricos a diversos dispositivos USB (6) al computador en el que se corre el programa o software (7) desarrollado para el producto.

El programa de ordenador o software (7) calcula la cantidad de células de acuerdo con la señal de voltaje análoga recibida del circuito electrónico con base en una ecuación previamente establecida:

$$C(x) = 0.1168 \cdot e^{1.0458x}$$

Donde: x es la señal de voltaje análoga que se recibe y $C(x)$ es la cantidad de células estimadas según el voltaje medido.

Esta ecuación, relaciona la cantidad de energía (en forma de luz) absorbida con la cantidad de células presentes en el cultivo. El software también permite visualizar y almacenar en el computador la información correspondiente a la estimación de la cantidad de células que hay en el cultivo. Adicionalmente permite ver de forma gráfica la evolución del crecimiento celular.

El biorreactor (BR), foto-biorreactor (FBR) o contenedor (3) debe ser plano con paredes transparentes (policarbonato, acrílico o vidrio) de máximo 1 cm (0,01 m) de espesor. La distancia entre las paredes debe ser de hasta 5 cm (0,05 m).

La agarradera cuadrada (2) se caracteriza por estar fabricada en plástico, tener un área de 5x5 cm (0,05x0,05 m), alojar el sensor infrarrojo (IR) y tener un tornillo que le permite ajustarse al espesor del BR, FBR o contenedor (3).

El circuito electrónico (4) encargado de estimar las células está conformado por: transistores, resistores, diodos, transformador, reguladores de voltaje, amplificador operacional, condensadores, y diodos emisores de luz (LED).

En el circuito estimador de células (4) se utilizan un emisor y un receptor infrarrojo. El emisor se conecta a la alimentación positiva directamente y la tierra del circuito a través de un resistor. El receptor IR se conecta a la alimentación positiva a través de un resistor y a la tierra con otro resistor. Si el emisor y el receptor están en línea de vista, el receptor se activa y permite que circule la corriente en un sentido. La señal de voltaje análoga se toma desde el colector del receptor y esta señal ingresa a un seguidor de voltaje conformado. La señal pasa por un circuito RC para ser filtrada.

Este circuito estimador de células (4) entrega una señal de voltaje análoga que varía acorde a la cantidad de células estimadas acorde a la señal que recibe del sensor IR (1). Esta señal de voltaje va a un dispositivo programable (5).

El dispositivo programable (5) tiene una salida que va al puerto USB del computador. En el computador se aloja el programa de ordenador o software que calcula la cantidad de células (7) y que almacena y manipula los datos obtenidos del dispositivo programable (5). Además, el software (7) contiene la interfaz que permite la interacción entre el hombre y el computador (HCI, Human-computer interaction). Otra característica del software, es que funciona en múltiples sistemas operativos.