

Caracterización de células MDCK-II mediante técnica ECIS e implementación de un arreglo experimental de dos amplificadores LOCK INs para medir micromovimiento.

Ulacco, Iago Nicolás¹.

¹*iago.ulacco@ib.edu.ar*
Instituto Balseiro. Argentina.

5 de junio del 2025

Resumen

Se caracterizó la línea celular MDCK-II mediante la técnica ECIS. Se observó la evolución de cultivos ante ensayos de herida eléctrica y cicatrización. Se observó una reducción en la impedancia del sistema, correspondiente a muerte celular y el posterior aumento por cicatrización del tejido. También se implementó un arreglo de dos amplificadores LOCK-INs para medir micromovimiento y la impedancia espectral simultáneamente. A partir del análisis de micromovimiento se obtuvo una dimensión fractal de $D = 1.94(3)$ para el estado celular confluyente. Este valor se estimó utilizando el algoritmo de Higuchi, previamente validado con la función de Weierstrass.

1 Introducción

La técnica de detección de impedancia eléctrica célula-sustrato (Electrical Cell-Impedance Sensing, ECIS) es un método no invasivo que permite medir la impedancia espectral eléctrica de un cultivo celular monocapa entre dos electrodos. El cultivo celular se antepone al paso de corriente, y esta puede circular por dos caminos; atravesando la célula por la membrana plasmática o a través de uniones intercelulares, véase figura 1. La capa celular se modela como un circuito RC en paralelo, ya que la corriente puede circular por ambos caminos simultáneamente. Las uniones intercelulares se modelan mayormente como resistores, y la membrana celular como un capacitor. Al excitar el sistema con corriente alterna, a bajas frecuencias la reactancia capacitiva será dominante, y por ende la corriente fluirá predominantemente por las uniones intercelulares. Esto resulta en una impedancia monitoreada mayormente resistiva. Análogamente, para frecuencias altas será predominantemente capacitiva. Es por esto que es necesario medir en un rango de frecuencias de excitación.

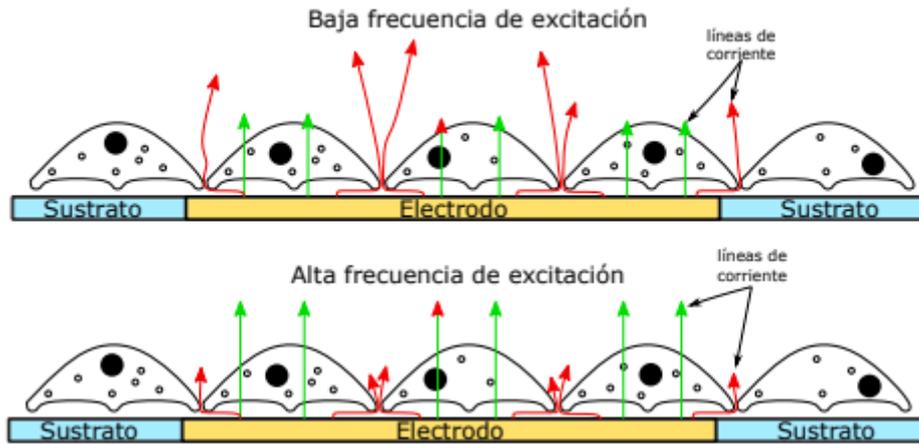


Figura 1: Ilustración de las líneas de corrientes en un sistema de detección de impedancia célula-sustrato. Las uniones intercelulares son predominantemente resistivas y la célula, capacitiva.

Adicionalmente, se ha observado que la evolución temporal de la impedancia del sistema presenta fluctuaciones alrededor de un valor medio, debido a pequeños cambios en las líneas de corriente. Estos se denominan micromovimiento celular y se ha visto que tienen un comportamiento fractal [1]. Se entiende por fractal a una estructura geométrica que es similar a diferentes escalas. El tamaño del fractal transforma con una potencia del cambio de escala, que se entiende como la dimensión fractal, que no necesariamente coincide con su dimensión geométrica. En otros estudios se vio que dicho parámetro provee información del estado biológico de la muestra [2].

En este trabajo se caracterizó la línea celular MDCK-II (células epiteliales de riñón de cócker hembra sana) mediante la técnica ECIS. Se observó su comportamiento en un ensayo de herida y cicatrización por corriente invasiva desde el estado confluyente. También se modificó un sistema tradicional de medición ECIS para poder medir simultáneamente micromovimiento y la impedancia espectral. De esta forma se puede acceder a mayor cantidad de información en un mismo experimento, cosa que no es posible con el arreglo estándar del laboratorio. Por otro lado, se analizó la estructura de las fluctuaciones con el algoritmo de Higuchi para determinar la dimensión fractal asociada a un estado confluyente.

2 Metodología

Las células se colocan en *wells* de cultivo con dos electrodos circulares impresos en la base, véase figura 2b. La estructura es una placa *multiwell* que permite la conexión de varios cultivos al circuito de medición. La misma se coloca en una incubadora que asegura condiciones controladas de $37^{\circ}C$ y con 5% de CO_2 durante la medición. Esta configuración favorece la reproducción y crecimiento de células mamíferas [3].

En la figura 2a se observa un esquema del arreglo experimental utilizado. La placa *multiwell* se conecta a través de un selector de canales (multiplexor) a una fuente de señal que envía una sinusoidal con una amplitud de corriente no invasiva ($< 1 \mu A$).

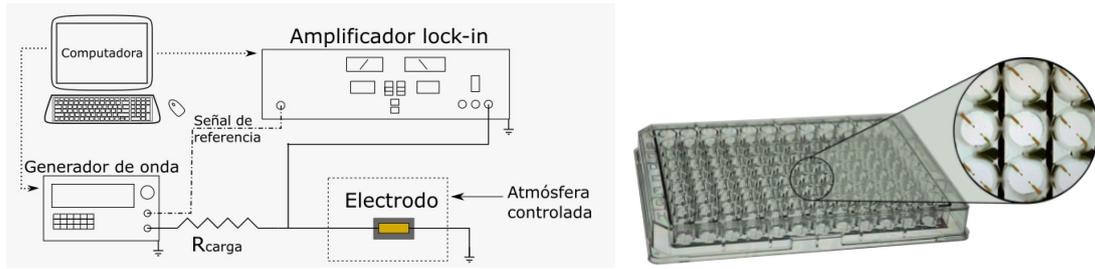


Figura 2: (Derecha) Esquema del arreglo experimental tradicional. (Izquierda) well comercial de Applied Biophysics.

En simultáneo un amplificador Lock-In (LIA) conectado en paralelo mide la tensión. Utilizando una computadora, se seleccionan las frecuencias de excitación (9 frecuencias geoméricamente espaciadas entre 250 Hz y 64 kHz), se registran los datos, y la misma comanda el multiplexor para cambiar al siguiente electrodo. Luego de medir todos los electrodos de interés, se repite el ciclo continuamente. Este protocolo permite monitorear la respuesta de varios cultivos de forma ininterrumpida.

Para llegar a la instancia de experimentación se utiliza el estado de cultivo de mayor impedancia, en el que este cubre toda la superficie del well. La formación del cultivo comienza con la medición del well sin células, seguidamente, se depositan células disociadas en la superficie del sustrato (y el electrodo). Estas se duplican hasta ocupar toda el área disponible formando una monocapa y cubriendo los caminos de corriente. El tipo de células estudiadas presentan inhibición por contacto, lo que significa que no se reproducen si se encuentran rodeadas de vecinos. En consecuencia, al cubrir toda el área del well, el cultivo alcanza un estado estacionario, que se denomina confluyente, y se refleja en el comportamiento de la señal de impedancia.

El arreglo descrito en la figura 2a no puede medir micromovimiento y el espectro simultáneamente, ya que solo excita y mide con una única frecuencia. Es por ello que se diseño e implementó un cambio en el arreglo experimental para medir con un LIA micromovimiento, y con un segundo LIA, el espectro de impedancia eléctrica. Para esto, también se adaptó su software de adquisición de datos (en Visual Basic 2022). La frecuencia seleccionada fue 5927 Hz , que corresponde a un número primo que está cerca del centro geométrico del espectro medido. En la figura 3 se observa el esquema de la nueva configuración.

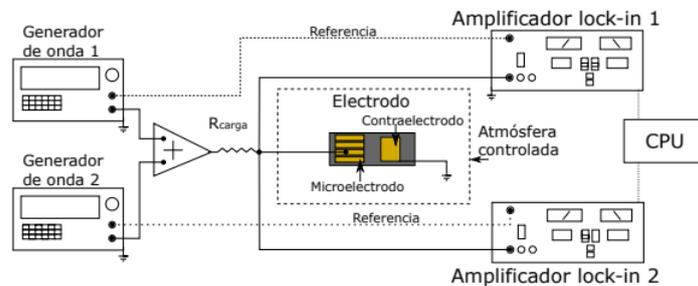


Figura 3: Esquema del arreglo experimental implementado con dos Lock-Ins y el chip sumador, que permite medir micromovimiento y el espectro simultáneamente.

3 Resultados y discusión

En la figura 4 se muestra la evolución temporal de la impedancia durante la formación de la monocapa. Se ve que aumenta, lo cual es consistente con el modelo del cultivo como una impedancia en serie al electrodo. Las fases medidas fueron negativas, por lo que es posible analizar al circuito como un RC equivalente.

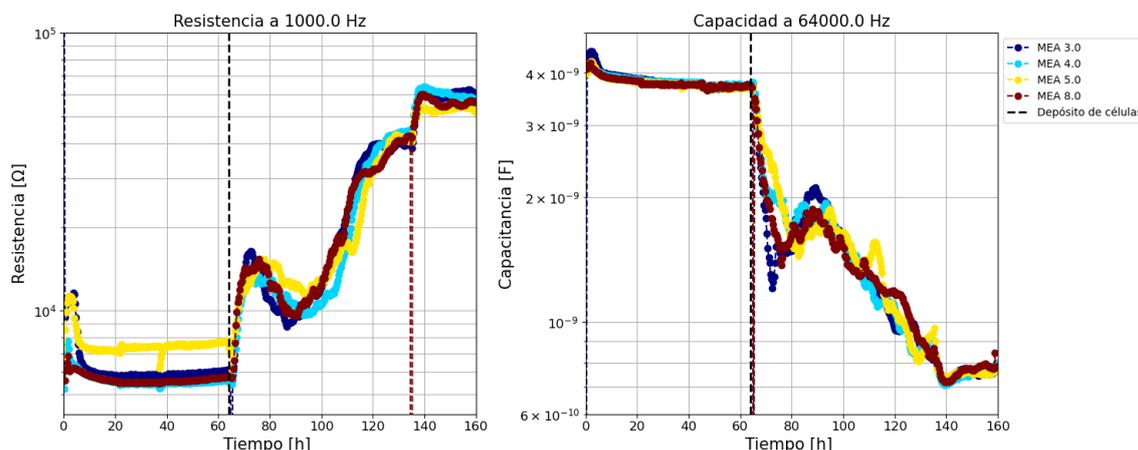


Figura 4: Resistencia y capacitancia del cultivo antes y después del depósito de las células. Evolucionan hasta alcanzar confluencia.

La evolución en el tiempo durante el proceso de siembra del espectro se aprecia en la figura 5. Consistente con el modelo, a bajas frecuencias la resistencia es mayor que la reactancia capacitativa (que va con el inverso del producto de la capacitancia y la frecuencia).

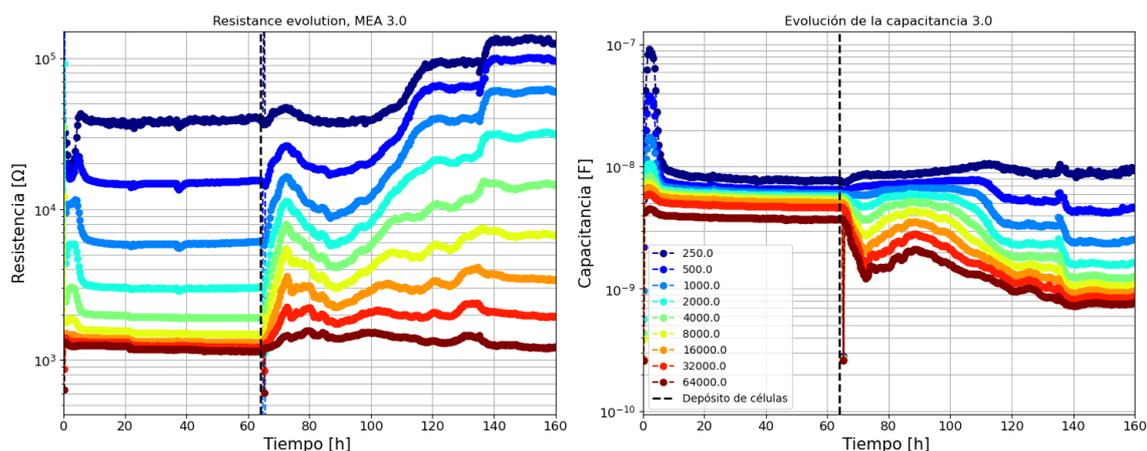


Figura 5: Resistencia y capacitancia del cultivo antes y después del depósito de las células para cada frecuencia. Se aprecia que la resistencia es mayor a bajas frecuencias.

Por otro lado, en la figura 6 se observa el efecto del sometimiento del cultivo a una corriente invasiva, de 1.9 mA a 40.000 Hz por 45. La corriente es suficiente para hacer aberturas en la membrana plasmática y no dar tiempo a repararla, resultando en muerte

celular. La reducción de la impedancia a niveles del electrodo sin célula, es consistente con la muerte de las mismas sobre el electrodo. Las células fuera de este, al no tener más inhibición por contacto comienzan a dividirse para cubrir la herida. Al cicatrizar la impedancia recupera valores cercanos a la confluencia mantenida por el cultivo control (que no fue electrocutado).

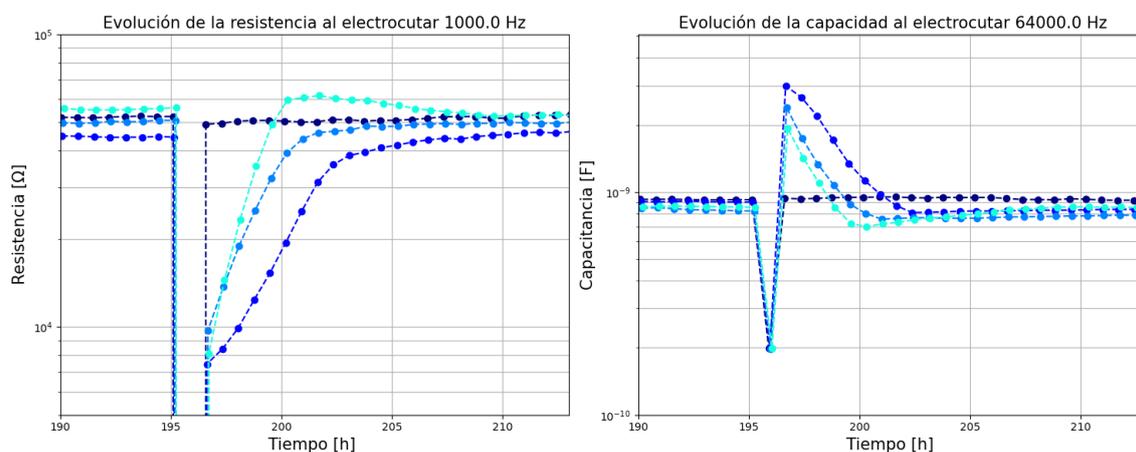


Figura 6: Evolución de tres ensayos de herida y cicatrización sobre un cultivo confluyente. La discontinuidad (líneas punteadas) es porque se desconecta el circuito para electrocutar.

Es posible verificar visualmente lo ocurrido durante el ensayo con microfotografía. En este caso se usó el microscopio óptico Nikon Eclipse T2. La figura 7 corresponde al ensayo de herida. En la de la derecha se ve una formación más oscura y rugosa sobre el electrodo, que se debe a células muertas por la electrocución.

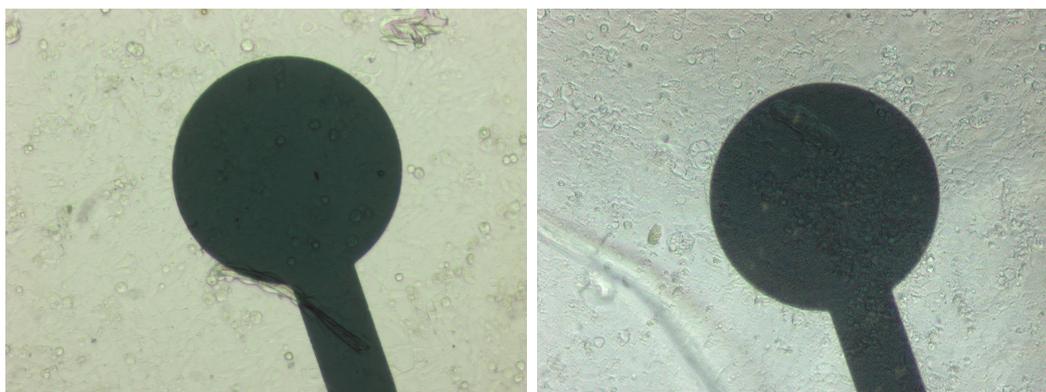


Figura 7: Imágenes por microscopía de un cultivo antes (izquierda) y después (derecha) de la herida eléctrica. La formación rugosa y más oscura en esta última son células muertas que quedan por encima de la capa celular.

Luego de caracterizar la respuesta eléctrica de la línea MDCK II en el proceso de formación del cultivo, y en un ensayo de herida y cicatrización utilizando el esquema experimental estandar, se implementó el sistema de dos LIAs para adicionalmente monitorear micromovimiento de forma simultanea. Este nuevo esquema fue testeado comparandolo

la medición de distintos cultivos e impedancias pasivas con el sistema estandar. En la figura 8 se aprecian los valores de impedancia medidos del sistema nuevo (R_n o C_n) normalizados con los del sistema estandar (R_s o C_s). De esta forma se denota la discrepancia en los valores medidos por ambos sistemas ante la misma impedancia medida. Se ve que la diferencia es dependiente de la frecuencia.

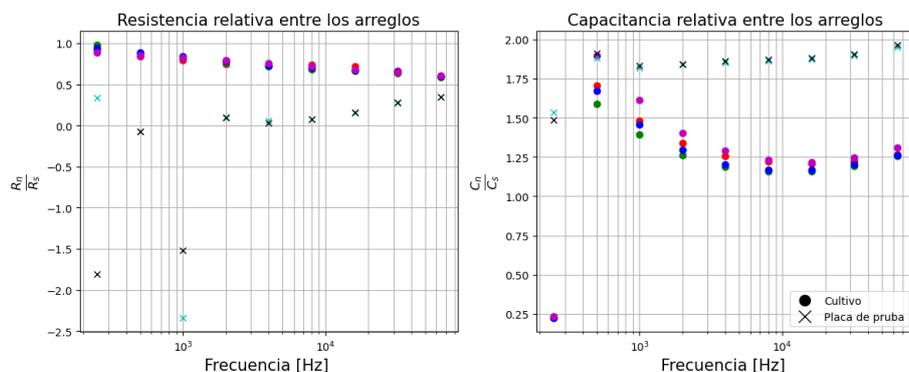


Figura 8: Impedancia relativa entre los espectros de los arreglos estándar (s) y el nuevo (n).

El objetivo de este arreglo era medir micromovimiento simultáneamente al espectro, en este caso se probó con la frecuencia de 5927 Hz . En la figura 9 se ve la evolución de la impedancia. El valor medido es consistente con el espectro medido con el nuevo sistema.

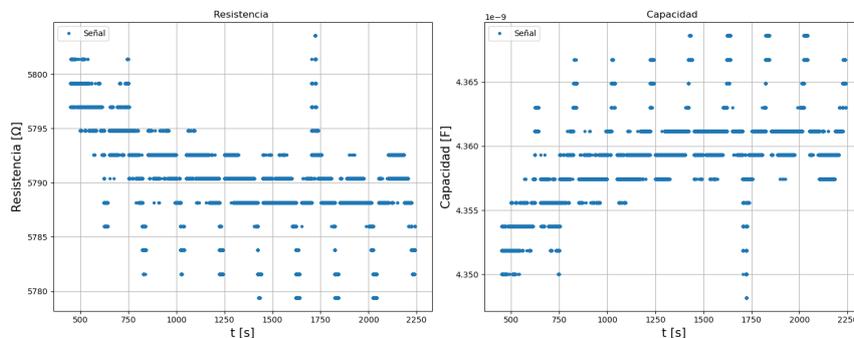


Figura 9: Fluctuaciones en el tiempo de la impedancia de un cultivo a 5927 Hz .

Para analizar estas fluctuaciones como estructura fractal se aplicó el método de Higuchi. Este consta de tomar r sucesiones de la forma $y_m(m + Mr) \in y(t)$ (la señal) para un cierto $m \in T$ (conjunto de todos los puntos) y hacer el promedio entre elementos sucesivos de la misma, que es L_r . Si $L_r \propto r^{-D}$ entonces se dice que D es la dimensión fractal. El algoritmo fue implementado en python y testeado con la función de Weirstrass. Esta presenta una estructura fractal conocida y manipulable. Se observó que la estimación de dimensión fractal se hace correctamente para una señal de al menos 10500 puntos. Es por esto que para realizar una estimación estadística de la dimensión fractal del cultivo se segmentó de dicha longitud. Seguidamente, para cada segmento se estimó la dimensión fractal, obteniendo un valor promedio con su dispersión. Como observamos en la figura 8

la medición del equipo nuevo no es compatible con la de referencia. No obstante, como la diferencia se debe a un corrimiento del valor y la estructura fractal corresponde a fluctuaciones en su entorno, se conjetura que la dimensión fractal sea la misma. En la figura 10 se observan los ajustes realizados para obtener la dimensión para el micromovimiento de la resistencia en 1 electrodo, en cada uno de los segmentos de 10500 puntos. Considerando su promedio, se estima una dimensión fractal de 1.94(3) excitando a 5927 Hz . Se obtienen resultados idénticos para la capacitancia.

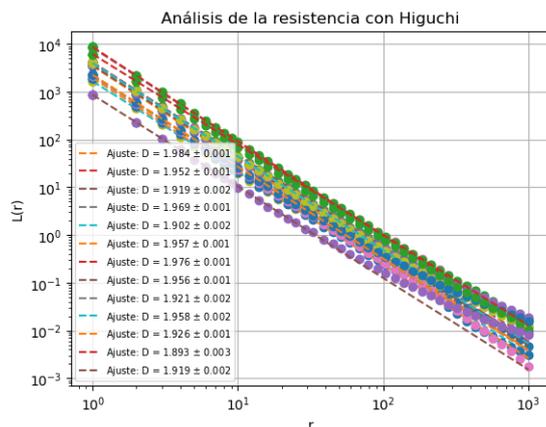


Figura 10: Estimaciones de la dimensión fractal del micromovimiento utilizando el algoritmo de Higuchi.

4 Conclusiones

Se estudió la línea celular tipo MDCK II mediante la técnica de detección de impedancia célula-sustrato. Se determinó su impedancia y observó su comportamiento durante el crecimiento celular, y luego de un ensayo de herida y cicatrización. El aumento de la misma es consistente con su modelado como circuito RC en paralelo, y el estacionario alcanzado es un indicio de confluencia. La herida se evidenció como una disminución de la impedancia, lo cual se pudo verificar visualmente mediante microscopía óptica. La evolución a valores de impedancia previos a la herida se interpreta como una cicatrización.

Por otro lado, se implementó un arreglo experimental para medir simultáneamente el espectro y el micromovimiento, usando dos amplificadores Lock-In, dos fuentes y un chip sumador. Se compararon las mediciones entre ambas configuraciones experimentales. Se encontró una discrepancia dependiente en frecuencia de excitación. También se estudió las fluctuaciones de la impedancia en el tiempo, que estudios previos reportaban con un comportamiento fractal; se logró identificar una dimensión fractal mediante el empleo del algoritmo de Higuchi. A futuro queda corroborar que la estructura identificada no cambié entre los arreglos. Esto se conjetura porque el cambio observado corresponde a corrimiento y en sí misma la estructura de la impedancia debería ser única. También se sugiere hacer mediciones apagando una de las fuentes alternadamente, para identificar frecuencias filtradas que se observan como picos en la impedancia.

Bibliografía

- [1] Ivar Giaever and Charles R Keese. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17):7896–7900, 1991.
- [2] Esteban Acerbo. *Mediciones de impedancia eléctrica espectral en células y desarrollo de un arreglo dual de amplificadores Lock-In*. Tesis de maestría en ciencias físicas, Instituto Balseiro, 2022.
- [3] R Ian Freshney. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.