

VALIDACIÓN DE MODELO DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA ESPECTRAL PARA CÉLULAS IN-VITRO

Laura Zúñiga Osorio*
Instituto Balseiro

(Laboratorio Avanzado)
(Dated: 6 de junio de 2024)

La técnica de Espectroscopía de impedancia eléctrica celular permite el monitoreo en tiempo real del comportamiento celular. Esta técnica puede detectar la evolución de la formación del monocapa celular desde su siembra hasta la confluencia. En este último estado, es posible estimar los valores biofísicos de las células aplicando el modelo de Giaever y Keese al comportamiento de impedancia del cultivo celular. Este modelo se aplicó en mediciones de cultivos sometidos a ensayos de herida y cicatrización eléctrica. Se compararon los valores biofísicos obtenidos previo y posterior al ensayo, junto a una serie de microfotografías correspondientes a cada instancia particular. Se encontró que las estimaciones del modelo por los parámetros biofísicos estiman la completa cicatrización del cultivo celular. Esto coincide con lo observado en las microfotografías, aunque en estas mismas se observa un reordenamiento con respecto a la monocapa normal.

I. INTRODUCCIÓN

La espectroscopía de impedancia eléctrica celular (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*, ECIS) es un método que posibilita medir la impedancia eléctrica de células adherentes cultivadas *in vitro*, es decir, en un sustrato biocompatible. Esta técnica permite obtener información detallada sobre parámetros biofísicos relevantes como las propiedades capacitivas de las membranas celulares, su morfología, movilidad, adhesión al sustrato y entre células [1–3].

ECIS permite el monitoreo en tiempo real del comportamiento celular y es útil en estudios de señalización celular y diagnóstico temprano de enfermedades [4]. Además, esta técnica puede detectar la evolución de la formación de monocapas celulares hasta su confluencia mediante mediciones de impedancia eléctrica, correlacionando las magnitudes medidas con los valores físicos de las células. Las mediciones experimentales muestran la evolución temporal de las propiedades eléctricas en la formación de monocapas confluentes, influenciadas por el crecimiento celular, las propiedades fisicoquímicas del medio circundante y las características de los electrodos [5].

A. Mediciones de impedancia

El primer paso para abordar la descripción del sistema es familiarizarse con mediciones típicas de resistencia y capacidad en células normales. Para ello se tuvo acceso a mediciones de impedancia eléctrica correspondientes a la línea Madin Darby Canine Kidney tipo II (células epiteliales normales de riñón canino, abreviado MDCK).

Todos los datos experimentales incluidos en este trabajo fueron provistos por el grupo de trabajo de Mariela Bellotti, Fabián Bonetto y Esteban Acerbo, los cuales se adquirieron en el laboratorio de Cavitación y Biotecnología del Centro Atómico Bariloche.

El instrumental básico para la aplicación de la técnica ECIS consta de un generador de ondas, un amplificador lock-in, una computadora y un sustrato biocompatible con microelectrodos integrados. Las mediciones se hicieron empleando un arreglo de microelectrodos comercial como el que se muestra en la figura 1. Está compuesto por 12 filas de 8 *wells*. Dentro de cada *well* se encuentran dos microelectrodos de 350 μm de diámetro, a través de los cuales circula corriente. El sistema de medición permite el monitoreo de la actividad hasta de 20 *wells*.

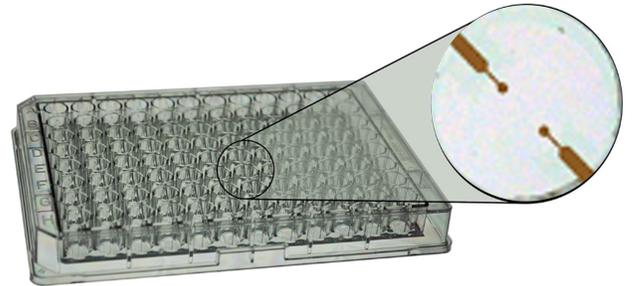


Figura 1. Arreglo comercial de electrodos utilizado en las mediciones de ECIS. Imagen extraída del sitio web del fabricante [6].

Se utilizaron frecuencias en el rango de 250 Hz a 64 kHz. Se eligió que la corriente inyectada a las células fuese menor a $1\mu\text{A}_{r.m.s}$ para que no se generaran cambios detectables en su estructura y se pudiese considerar una técnica no invasiva [7].

El gráfico de la Figura 2 muestra los registros de resistencia R y capacitancia C en una celda de cultivo (*well*)

* laura.zuniga@ib.edu.ar

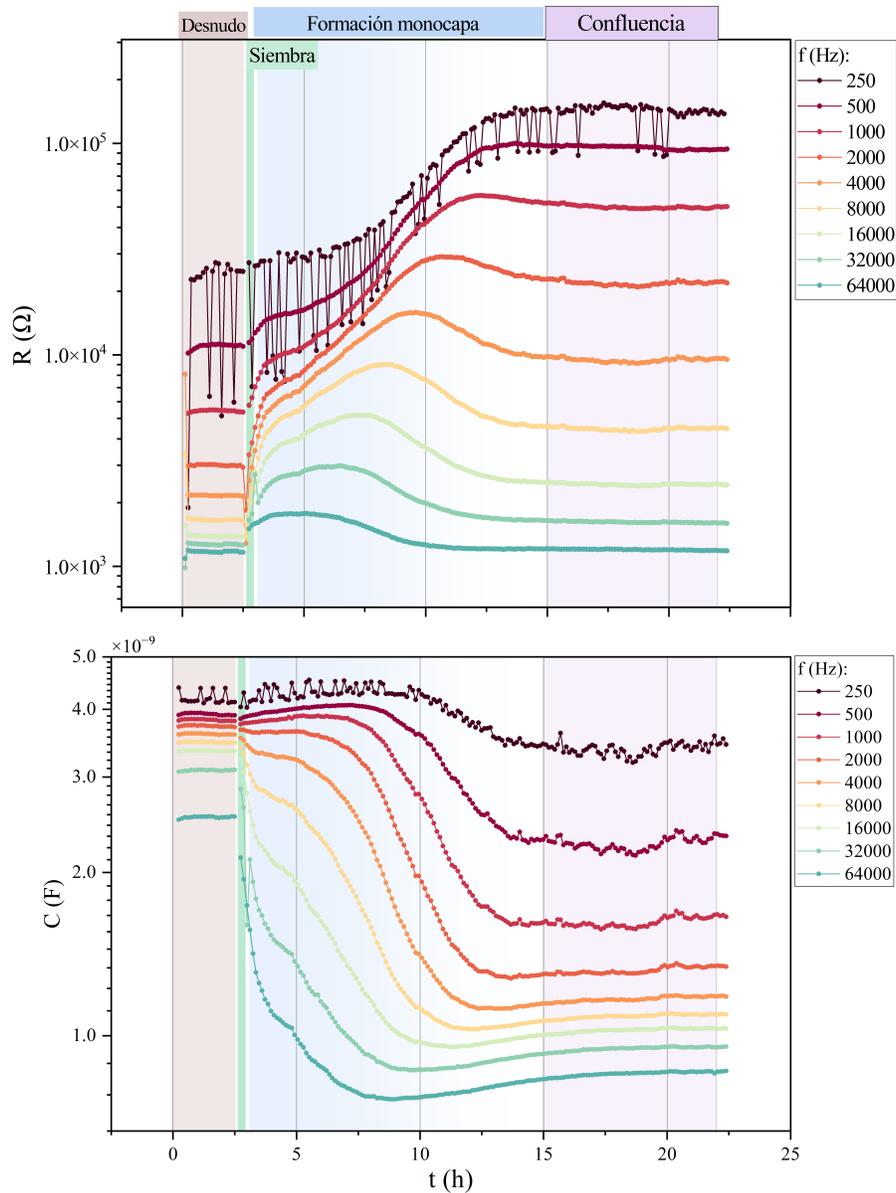


Figura 2. Datos experimentales de resistencia y capacidad equivalente en un cultivo de células MDCK, medidas a $0,1V_{rms}$ y frecuencias distintas. Se resaltan las 4 etapas que identifican la evolución del sistema. Los datos fueron provistos por M. Bellotti, F. Bonetto y E. Acerbo.

en función del tiempo. Aunque el experimento se realizó en 2 *wells* simultáneamente, solo se presenta un conjunto de datos por ser este representativo. Las etapas en las que se divide la evolución son:

a. Desnudo. Es la primera etapa de medición y corresponde al microelectrodo en contacto con el medio de cultivo, el cual es una solución electrolítica que da paso a una conducción de corriente con portadores del tipo iónico [5].

b. Siembra. En condiciones de esterilidad, se añade la suspensión que contiene las células en los *wells* y se retorna a la incubadora.

c. Formación de la monocapa. Es el régimen transitorio en el que predomina la formación de uniones intercelulares que se limitan a un plano bidimensional, conocido como monocapa, adhiriéndose al fondo del *well* y cubriéndolo por completo. Es importante resaltar que esta forma específica de establecer enlaces es característica de células epiteliales como las MDCK y no de todas las

células en general. Durante este período aumenta la impedancia medida, lo que concuerda con la suposición de que las células se pueden representar mediante elementos resisto-capacitivos que bloquean el paso de corriente al propagarse sobre el microelectrodo.

d. Confluencia. Las células normales formadoras de monocapas poseen la propiedad de detener su reproducción y movimiento una vez que se ha ocupado todo el espacio disponible. Este estado de máxima extensión y unión celular se denomina *confluencia*, el cual puede ser identificado eléctricamente como el régimen en el que la impedancia se maximiza y llega a un régimen cuasi-estacionario [4]. Las fluctuaciones a pequeña escala en esta fase son típicas de un sistema biológico, en el que sus componentes están en constantes procesos de interacción y actividad metabólica.

En el gráfico anterior se observa una separación entre las curvas de R y C medidas a distintas frecuencias. Ignorando el ruido que padecen las mediciones a $f = 250$ Hz, notamos que la resistencia en confluencia es significativamente mayor que la del electrodo desnudo a bajas frecuencias, mientras que a altas frecuencias, las resistencias en ambas etapas son similares.

Basándose en estas observaciones, los dres. Ivar Giaever y Charles Keese idearon un modelo [2] que representa al cultivo celular confluyente en términos de elementos circuitales: las uniones intercelulares son equivalentes a resistencias y las membranas celulares son dos capacitores en serie.

En la Figura 3 se muestra el esquema una monocapa inmersa en un medio de cultivo sobre un electrodo. A esta configuración se le denomina *ensamble electrodo-sustrato-células*. La corriente que surge de este último se distribuye entre la resistencia de unión intercelular y de la capacidad de la membrana para continuar por el medio de cultivo y llegar al contraelectrodo (no representado).

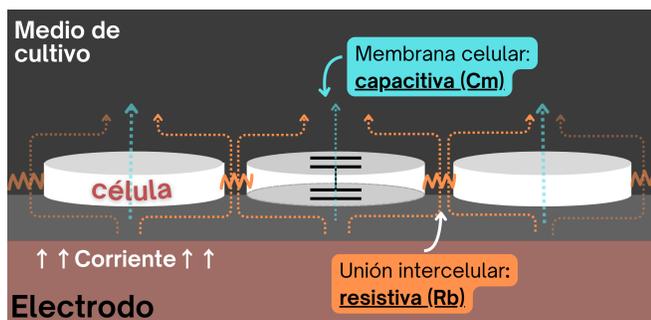


Figura 3. Esquema del ensamble electrodo-sustrato-células empleado en la técnica ECIS. Se considera que la corriente puede circular a través las uniones intercelulares, equivalentes a resistencias en paralelo, o a través de las membranas celulares, equivalentes a capacitores en serie.

A bajas frecuencias, el camino resistivo representa una menor impedancia y predomina la circulación de corriente a través de las uniones intercelulares. Por el contrario,

a altas frecuencias, el camino predominante es a través de la membrana celular (agrupada como un solo elemento circuital). El balance eléctrico propuesto por Giaever y Keese de este sistema se describe a continuación.

B. Modelo de G&K

El modelo parte de considerar un electrodo infinito cubierto por una capa compacta de células cilíndricas, también infinita. Esta capa está inmersa en un medio de cultivo líquido con resistividad ρ , dejando un espacio de altura h entre el electrodo y la capa celular. Su representación se muestra en la Figura 4.

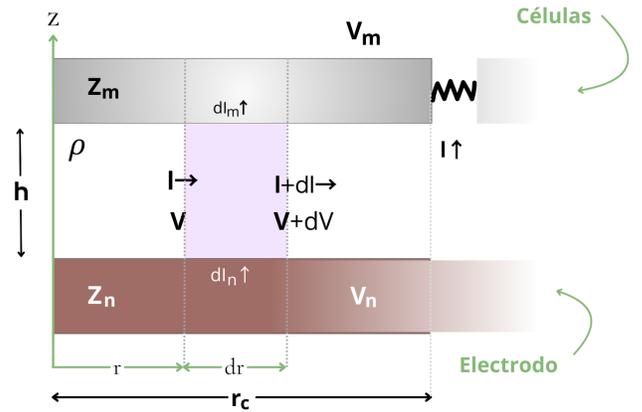


Figura 4. Vista lateral esquemática del conjunto electrodo-medio-célula, planteando simetría cilíndrica. Se añaden las variables de voltaje, corriente, impedancia y resistividad que se incluyen en el modelo G&K. Extraído y adaptado de [5].

Los parámetros que se miden directamente son la resistividad del medio de cultivo ρ , la impedancia específica del electrodo Z_n y el radio celular promedio r_c [5]. El modelo plantea que el potencial entre la membrana basal y el electrodo no depende de la posición vertical z ni del ángulo ϕ , por lo que el balance de flujo de corriente es unidimensional en dirección al radio r medido desde el centro de una célula arbitraria.

El balance de flujo de corriente se realiza sobre un volumen de control diferencial de ancho dr , resaltado en rosa en la Figura 4. De izquierda a derecha, vemos que el flujo radial de corriente I a través de la sección cilíndrica $2\pi r h$ produce la caída de potencial por unidad de área dada por:

$$-dV = \frac{\rho dr}{2\pi r h} I. \quad (1)$$

En la dirección vertical tenemos dos caídas de potencial. La primera de ellas se produce entre el medio de cultivo y el electrodo, produciendo una caída de potencial por unidad radial de área expresada como

$$V_n - V = \frac{Z_n}{2\pi r dr} dI_n. \quad (2)$$

En la parte superior se tiene un flujo entre las membranas celulares y el medio de cultivo:

$$V - V_m = \frac{Z_m}{2\pi r dr} dI_m. \quad (3)$$

La impedancia específica de la célula Z_m se le atribuye exclusivamente al comportamiento capacitivo de las membranas basal y apical conectadas en serie. Por ello, se puede escribir como

$$Z_m = -\frac{i}{2\pi f(C_m/2)}, \quad (4)$$

donde C_m es la capacidad específica efectiva de las membranas celulares.

La ecuación de conservación de la carga dicta que las corrientes que entran y salen del volumen de control deben ser iguales, esto es,

$$dI = dI_n - dI_m. \quad (5)$$

Comenzando por la ecuación 1 y derivándola:

$$\frac{d}{dr} \left[\frac{dV}{dr} + \frac{\rho}{2\pi r h} I \right] = 0, \quad (6)$$

$$\frac{d^2 V}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dV}{dr} + \frac{\rho}{2\pi r h} \frac{dI}{dr}. \quad (7)$$

Reemplazamos la ecuación de conservación (5) en el término dI/dr de 7 y las respectivas expresiones de dI_n/dr y dI_m/dr se sustituyen por las ecs. 2 y 3:

$$\frac{d^2 V}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dV}{dr} - V\gamma^2 + \beta = 0, \quad (8)$$

$$\text{con } \gamma^2 = \left[\frac{\rho}{h} \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right) \right] \text{ y } \beta = \frac{\rho}{h} \left(\frac{V_n}{Z_n} + \frac{V_m}{Z_m} \right). \quad (9)$$

La solución del voltaje como función del radio es una función de Bessel modificada de primera especie I_0 sustrada con un término independiente:

$$V(r) = A \cdot I_0(\gamma r) + \frac{\beta}{\gamma^2}, \quad (10)$$

de donde se ha omitido la función de Bessel de segunda especie $N_0(\gamma r)$ dado que diverge en $r = 0$. Como todas las células poseen vecinas en iguales condiciones, se impone que la corriente en el borde de la célula se vea

obligada a circular hacia arriba pasando por las uniones intercelulares. Por ley de Ohm,

$$V(r = r_c) = R_b I(\gamma r_c). \quad (11)$$

donde R_b es la resistencia específica de las uniones intercelulares. Para despejar la constante de A de la ec. 10 se aplican las propiedades de las funciones de Bessel, tras lo cual resulta la siguiente expresión para $V(r)$:

$$V(r) = \frac{Z_m}{Z_n + Z_m} \frac{V_m - V_n}{I_0(\gamma r_c) + \frac{R_b}{\pi r_c^2} \frac{2\pi r_c h}{\rho} I_1(\gamma r_c)} I_0(\gamma r_c) + \frac{\beta}{\gamma^2}. \quad (12)$$

Nos interesa conocer la impedancia específica del electrodo cubierto de células Z_n , que en la práctica es la variable accesible a las mediciones de la técnica ECIS. Entre la parte superior a las células y el electrodo se tiene la caída de potencial efectiva normalizada por el área transversal de la célula, dada por

$$V_n - V_m = \frac{Z_{cov}}{\pi r_c^2} I. \quad (13)$$

Finalmente, la corriente I se calcula integrando la ec. 2 en todo el radio celular, así que reemplazamos el resultado en 13 y llegamos a la siguiente expresión para Z_{cov} [5]:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{Z_{cov}} \\ &= \frac{1}{Z_n(Z_n + Z_m)} \left[Z_n + \frac{Z_m}{\frac{\gamma r_c}{2} \frac{I_0(\gamma r_c)}{I_1(\gamma r_c)} + R_b \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right]. \end{aligned} \quad (14)$$

Es conveniente definir un parámetro $\alpha = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h}}$ para que el ajuste del modelo sobre los datos experimentales de Z_{cov} dependa solo de las incógnitas α , R_b y C_m . En el presente trabajo se determinan los parámetros que minimizan la dispersión mediante la iteración del método de Levenberg-Marquardt [1].

C. Una aplicación al método ECIS: ensayos de herida y cicatrización

La técnica ECIS se emplea para estudiar de forma continua y detallada el fenómeno de cicatrización de heridas. La posibilidad de medir la evolución completa de la recuperación es útil a la hora de estudiar cambios en la morfología celular en respuesta estímulos físicos y bioquímicos, caracterizar fármacos cicatrizantes, entre otras aplicaciones. Se propone como una mejora a las técnicas

tradicionales que dependen de la adquisición de imágenes fotográficas por microscopio y no pueden registrar la evolución en tiempo real.

La manera convencional de inducir una herida sobre una monocapa consiste en raspar su superficie utilizando una aguja o micropipeta. En cambio, con ECIS se genera una descarga eléctrica que provoca la muerte por electroporación irreparable de las células adheridas al microelectrodo sin afectar la integridad de la monocapa por fuera de esta región [7]. En ambos casos, la herida se cierra gracias a la proliferación y migración de las células sanas. Las áreas de herida que resultan del daño mecánico no pueden reproducirse de forma consistente, lo que sí se alcanza utilizando ECIS.

En la siguiente sección se incluyen datos de resistencia y registros fotográficos obtenidos en un experimento de herida y cicatrización. El objetivo es identificar las señales que se registran por ambos métodos con las etapas distintivas del proceso, en búsqueda de complementar el análisis teórico del modelo G&K con una aplicación práctica.

II. PROCESAMIENTO Y AJUSTE

A. Frecuencia de detección óptima

Tomando los datos de los dos *wells* disponibles, calculamos el promedio de los valores R y C en las etapas de desnudo (abreviado *nak* por su expresión en inglés) y cubierto o confluyente (*cov*) para cada f , asociándoles un error de medición $\delta = 10\%$ a cada uno, según se ha reportado en la bibliografía para mediciones equivalentes con el mismo equipo en este laboratorio [1]. La normalización de los datos de confluencia sobre los datos de desnudo se graficó como función de f y se le asignó un error del 14,1% calculado mediante propagación de errores. El espectro obtenido se muestra en la figura 5.

Por una parte, los espectros normalizados nos permiten verificar que, dentro del error, las mediciones de los distintos *wells* son indistinguibles para frecuencias mayores a 250 Hz, mostrando una repetitividad en el comportamiento eléctrico de cultivos independientes.

Por otro lado, el espectro de resistencia normalizado alcanza sus valores máximos entre 0,5 - 1 kHz. Se considera que este es el rango de frecuencias donde las mediciones de resistencia son más sensibles a la presencia de la monocapa. Podemos interpretar que el valor óptimo no se da a la mínima frecuencia (como era de esperarse) porque estas mediciones se ven más afectadas por ruido electrónico.

A altas frecuencias se puede considerar que no hay distinción entre la medida de confluyente y desnudo, manteniéndose en un valor estable no nulo que se asocia al comportamiento resistivo del medio y a la geometría del microelectrodo. Se le denomina *resistencia de constricción* (R_{const}) [1], la cual agrupa la influencia del medio

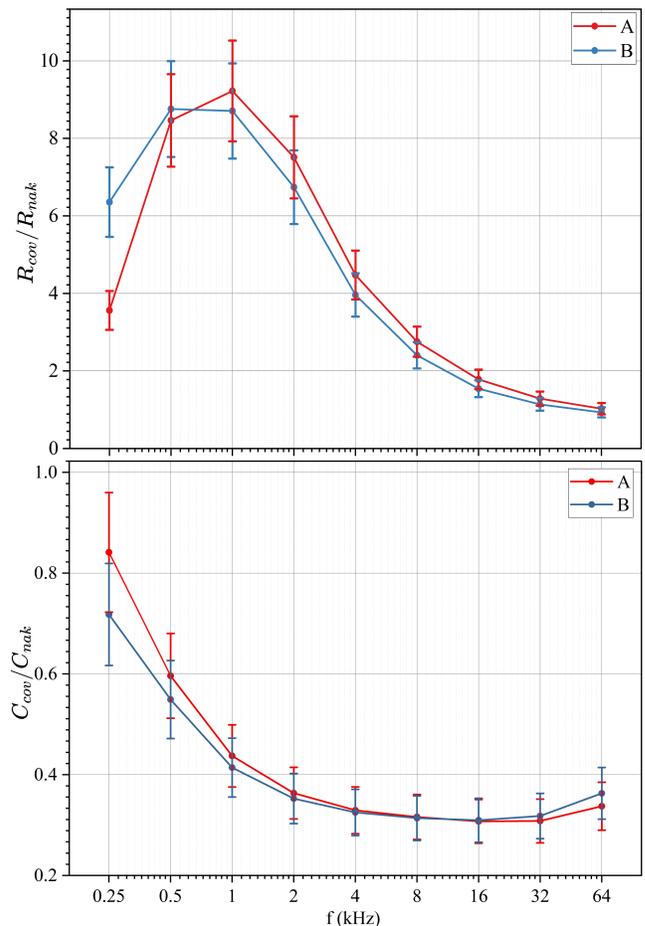


Figura 5. Espectros de resistencia y capacidad en confluencia (*cov*) normalizados con respecto al espectro desnudo (*nak*), para mediciones simultáneas en dos *wells*. Las frecuencias donde se maximiza la sensibilidad a la detección de la monocapa corresponden al máximo (resp. mínimo) de R_{cov}/R_{nak} (resp. C_{cov}/C_{nak}).

de cultivo y de la geometría del microelectrodo.

Del espectro de capacitancia normalizado hallamos que el cociente C_{cov}/C_{nak} no se minimiza para la medición en la frecuencia más alta. Esto se debe a que el amplificador Lock-In pierde sensibilidad al medir a frecuencias mayores a 50 kHz, por lo que la mejor visualización de la capacitancia se logra en el rango 8-32 kHz.

B. Ajuste del modelo G&K

Para hallar la correspondencia entre los datos experimentales y el modelo de Giaever y Keese se comienza por ingresar valores aleatorios en los parámetros libres α , R_b y C_m , los cuales se ingresan en las ecuación 14. También se ingresan los datos experimentales del radio celular r_c y la impedancia del desnudo $Z_{nak}^{(exp)}$. Del valor calculado $Z_{cov}^{(fit)}$ se obtienen la resistencia y capacidad,

comparándolas con su valor experimental mediante el estimador χ^2 :

$$\chi^2 = \left(\frac{R_{cov}^{(exp)} - R_{cov}^{(fit)}}{\delta R_{cov}^{(exp)}} \right)^2 + \left(\frac{C_{cov}^{(exp)} - C_{cov}^{(fit)}}{\delta C_{cov}^{(exp)}} \right)^2.$$

Para minimizar este estimador y extraer los parámetros de mejor ajuste, se aplicaron tres iteraciones del método de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt, implementado en un script de Python.

El conjunto de parámetros computados para los dos *wells* como función del tiempo se muestran en la figura 6.

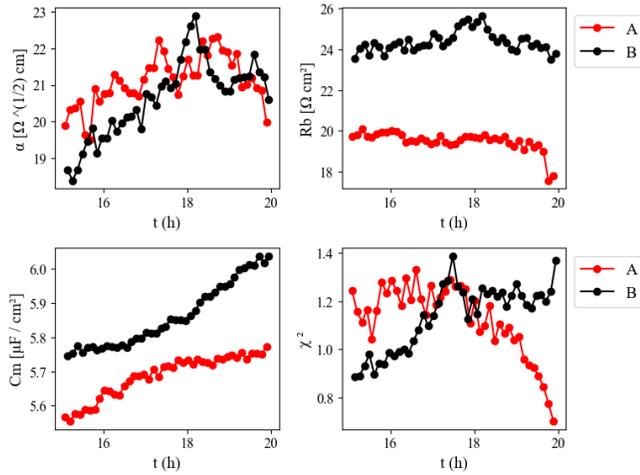


Figura 6. Evolución de parámetros de ajuste del modelo G&K calculados para dos *wells* denominados A y B.

En el cuadro superior izquierdo se observa que los valores de α coinciden para ambos electrodos, lo que se asocia de forma inversa con la altura de la monocapa con respecto al microelectrodo (manteniendo fijos los parámetros del radio celular y resistividad específica del medio):

$$h = \frac{\rho r_c^2}{\alpha^2} \sim 60 \text{ nm}.$$

Podemos considerar que esta es la altura característica de adherencia de las células al microelectrodo durante el estado confluyente.

La resistencia específica de las uniones intercelulares R_b y la capacidad específica de la membrana C_m se hallaron levemente distintas entre *wells*, pero son compatibles con el orden de magnitud reportados en diversas fuentes [3, 5]. Es admisible observar variaciones de estos parámetros con el tiempo dado que no se trata de un sistema físico inerte sino de un organismo vivo, pero la tendencia que siguen estas variaciones solo se podría explicar si se tuvieran en cuenta variables adicionales que están por fuera del alcance de este trabajo.

En la tabla I se incluye la mediana de los parámetros obtenidos del ajuste.

Parámetro	Valor obtenido
$\alpha (\Omega^{1/2} \text{cm})$	20 ± 9
$R_b (\Omega^{1/2} \text{cm}^2)$	21 ± 6
$C_m (\mu\text{F}/\text{cm}^2)$	6 ± 1

Tabla I. Parámetros del ajuste obtenidos por el método de Levenberg-Marquardt, comparados con los de referencia.

La evolución del parámetro χ^2 permite afirmar que el modelo se ajusta de forma razonable a los datos experimentales, a pesar de sus limitaciones. Los valores alcanzados son lo suficientemente bajos como para considerar que las variables propuestas por Giaever y Keese son adecuadas para estudiar los fundamentos de la respuesta eléctrica celular.

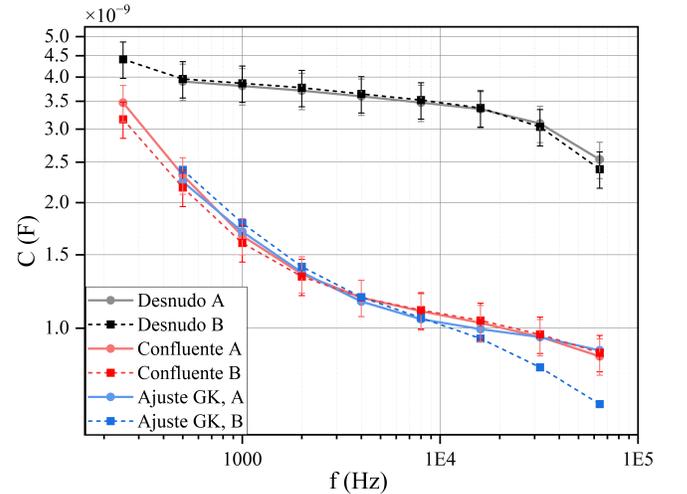
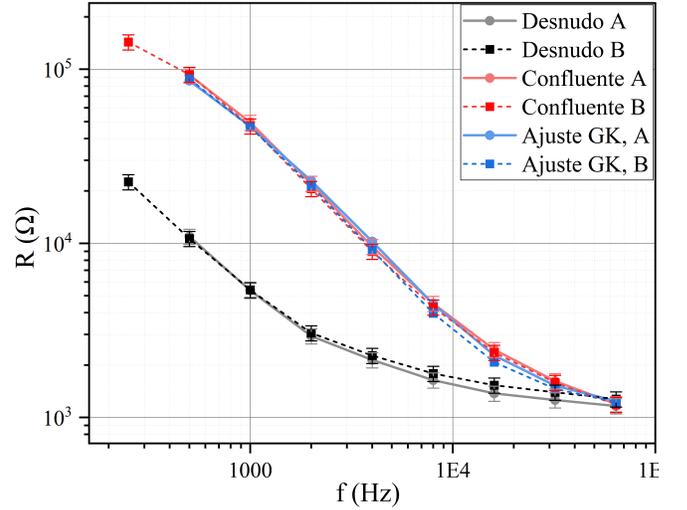


Figura 7. Espectros RC experimentales y ajustados por el modelo de Giaever y Keese, correspondientes a células MDCK en confluencia. Se incluye el espectro del electrodo desnudo.

En la figura 7 se grafican los espectros de desnudo y confluencia por separado, con sus respectivos errores experimentales. Se omitió el cálculo de los parámetros a

bajas frecuencias ya que estos vienen afectados por ruido, dificultando la convergencia del método. Para el resto del espectro, los valores de resistencia y capacidad predichos por el ajuste corresponden en buena medida con los datos experimentales.

III. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA ECIS A ENSAYOS DE HERIDA Y CICATRIZACIÓN

Como se anticipó en la sección inicial, utilizamos la técnica ECIS para analizar la dinámica de cicatrización de heridas inducidas eléctricamente. Esta sección trata por separado la información que aportan los datos de impedancia y las fotografías, para después integrarlas en la descripción de un experimento con esta orientación. Todos los datos experimentales fueron provistos por el mismo grupo mencionado en la sección IA.

A. Información aislada de impedancia

Si se produce una lesión que abarque toda la zona del microelectrodo, idealmente se espera que la corriente pueda fluir con libertad a través de la herida y la impedancia refleje los valores del desnudo. Una vez que se pierde la inhibición por contacto en la frontera, las células comienzan a reproducirse para ocupar el espacio vacío.

La figura 8 muestra la evolución de la resistencia inmediatamente después de un evento de electrocución a una monocapa confluyente ($5V_{pp}$ por 30 s), señalado en gris.

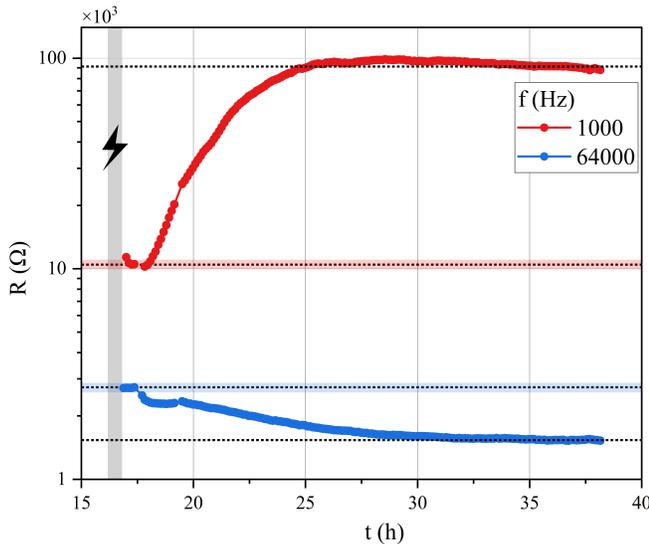


Figura 8. Evolución de resistencia posterior a evento de electrocución, donde se muestran las mediciones en la frecuencia de detección óptima (1 kHz) y en la máxima disponible (64 kHz). Las líneas punteadas horizontales son los valores aproximados de R post-electrocución (línea gruesa) y en confluencia (línea fina).

La tendencia creciente de R medida a 1 kHz es consistente con la hipótesis de regeneración, mientras que el comportamiento decreciente a 64 kHz se podría considerar anómalo. Si sabemos que a altas frecuencias se debería medir una resistencia cercana al valor de desnudo, podemos inferir que los residuos de células muertas impiden la libre circulación de la corriente. Con esto, se afirma que la herida eléctrica no es equivalente a la herida mecánica.

Los residuos celulares no se pueden modelar de manera uniforme como se hizo con las células en confluencia. Por esto, las imágenes que se obtengan después de la electrocución son clave para poder describir el fenómeno dentro del alcance del presente trabajo, sin tener que acudir a modelos teóricos más complejos que el de G&K.

B. Procesamiento de imágenes

Antes de pasar al material fotográfico del experimento de herida y cicatrización, se considera pertinente exhibir una imagen típica de un cultivo celular sobre un electrodo (Figura 9-(I)). Fue capturada por Esteban Acerbo utilizando un microscopio óptico Nikon ECLIPSE Ts-2, usando contraste de fase. En ella se observa el cabezal de un microelectrodo comercial cubierto por una monocapa confluyente de células MDCK-II.

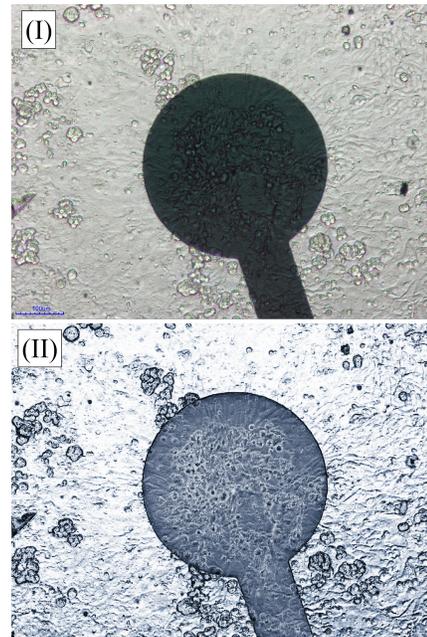


Figura 9. Cabezal de microelectrodo cubierto por monocapa de células MDCK-II en confluencia, fotografiado con un microscopio óptico Nikon ECLIPSE-Ts2. (I) Imagen original. (II) Imagen procesada por una modulación senoidal.

La fotografía original 9-(I) no tiene un contraste lo suficientemente alta como para poder reconocer el contorno las células individuales. Es por ello que se analizó el efec-

to de distintos filtros digitales y se optó por emplear una modulación del tipo senoidal:

$$F(p) = \sin(\lambda p),$$

donde p son cada una de las componentes del píxel en representación RGB y normalizadas para abarcar los valores $[0, 2\pi]$. El factor λ se elige para que los máximos de la función se alcancen en rangos de colores que se quieren resaltar. En particular, el uso del valor $\lambda = 1,6$ se con-

sideró pertinente para resaltar el contorno de las células del fondo tras una caracterización cualitativa de la imagen procesada. El resultado se muestra en la figura 9-(II).

En esta imagen se pueden observar geometrías diversas para distintas células que forman el cultivo. Cabe destacar que el modelo describe el comportamiento de un cultivo de células idénticas y perfectamente cilíndricas, siendo esto un artificio para simplificar la matemática del balance eléctrico y no por reflejar la realidad del sistema biológico.

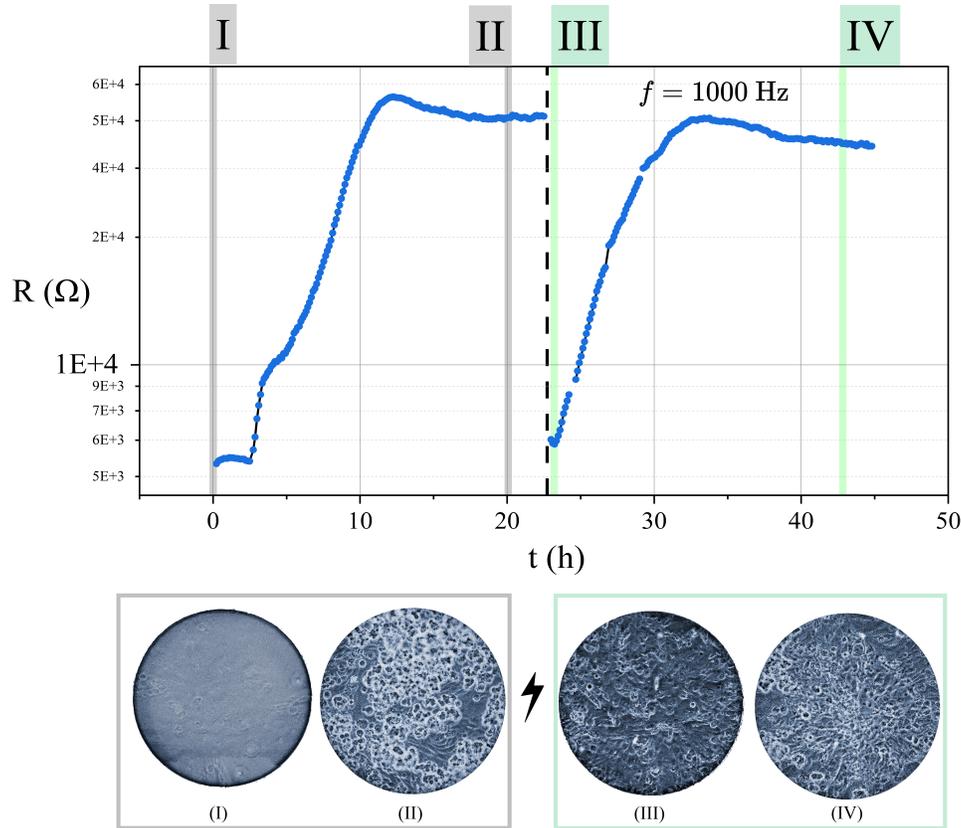


Figura 10. (Arriba) Evolución de resistencia medida a 1000 Hz en un experimento de herida y cicatrización. Los eventos de electrodo desnudo (I), confluencia (II), electrocución (III) y cicatrización (IV) se relacionan con las 4 fotografías de los recuadros inferiores.

C. Identificación de fotografías con comportamiento resistivo

Se analizaron 132 imágenes tomadas a lo largo de las 50 horas del experimento realizado por el grupo de trabajo en 2023. Están divididas de la siguiente manera: por cada *well* (A y B) fotografiaron los 2 microelectrodos, y para cada microelectrodo se utilizaron 3 pantallas de contraste distintas. La captura de las 12 fotografías tarda del orden de 3 minutos, por lo que se pueden considerar simultáneas si se toma como referencia la duración del

experimento.

Estos registros fueron clasificados y procesados, de los cuales se seleccionaron 4 imágenes representativas de los eventos de desnudo (I), confluencia (II), electrocución (III) y cicatrización (IV). En la figura 10 se muestran las imágenes recortadas sobre el área de un microelectrodo, en paralelo con la evolución de la resistencia medida a 1 kHz.

En la imagen (I) se observa una superficie plana, acorde a la ausencia de células. En contraste, la imagen (II) permite ver el relieve de la monocapa formada ~ 15 h

después de la siembra. La resistencia en ambos eventos está en un régimen estacionario, alcanzando valores más altos en la confluencia que en el desnudo (propio de frecuencias bajas). Este conjunto de identificadores visuales y eléctricos se toma como patrón para reconocer una evolución normal.

En la línea punteada negra se señala el evento de electrocución. La imagen (III) muestra un relieve amorfo asociado a los restos de la estructura celular. Son un impedimento al paso de corriente en menor grado que lo es la monocapa, por lo que la resistencia medida en (III) es baja pero no retoma su valor de desnudo. De la tendencia creciente de R podemos inferir que la presencia de residuos no generan inhibición por contacto con las células vivas del contorno. Esto es, que la zona con células muertas es equivalente a un espacio libre para que se de reproducción y migración celular, como se da con heridas mecánicas.

Pasadas 20 horas de la electrocución, la imagen (IV) representa confluencia. A simple vista, se observa un reordenamiento de las células asociado a su migración hacia el centro del electrodo. Evaluamos si esta nueva configuración es relevante para distinguir entre una monocapa normal y una cicatrizada, acudiendo al análisis de resistencia en los instantes (II) y (IV). Los valores a los que converge R son indistinguibles dentro del error experimental del 10%, por lo que se propone que la cicatrización devuelve la monocapa a la confluencia sin que el reordenamiento sea relevante.

La validación de esta última hipótesis se realiza comparando los parámetros de ajuste calculados en (II) y (IV). La impedancia de desnudo Z_n se toma igual para ambos ajustes y es la medida en ausencia de células (I). Los resultados con su error se reportan en la tabla II.

Parámetro	Conf. normal	Conf. cicatrización
$\alpha(\Omega^{1/2}\text{cm})$	20 ± 10	20 ± 9
$R_b(\Omega^{1/2}\text{cm}^2)$	24 ± 6	24 ± 4
$C_m(\mu\text{F}/\text{cm}^2)$	59 ± 8	57 ± 7

Tabla II. Parámetros de mejor ajuste calculados en dos etapas del experimento de herida y cicatrización: en confluencia normal y posterior a la cicatrización.

Los valores obtenidos son indistinguibles dentro del error que resulta del jacobiano, por lo que podemos afirmar que el modelo de Giaever y Keese es robusto ante el reordenamiento de las células en el electrodo.

IV. CONCLUSIONES

Se calculó la evolución de la impedancia eléctrica espectral (resistencia y capacidad), de datos experimentales provistos por el laboratorio para cultivos MDCK-II normales sobre microelectrodos comerciales. Identificamos el rango de frecuencia de máxima sensibilidad de los valores de resistencia y capacidad calculados.

Se reprodujo la deducción de las ecuaciones del modelo de Giaever y Keese, las cuales fueron utilizadas para cálculo de parámetros biofísicos de un cultivo celular en confluencia.

Se analizó la evolución de la cicatrización de una herida eléctrica ocasionada a una monocapa celular confluyente. Antes y después de la herida se calcularon los parámetros del modelo de G&K junto con el error χ^2 en función del tiempo.

Se analizó la evolución de impedancia espectral de un cultivo durante un ensayo de herida y cicatrización eléctrica. La cicatrización completa se reconoció como el comportamiento cuasi estático de valores similares a la confluencia previa a la herida. El estado del cultivo pre y post ensayo no presentan diferencias significativas en los parámetros biofísicos estimados por el modelo.

Por otra parte, las distintas etapas del ensayo se identificaron con las microfotografías. Tras analizar y procesar éstas imágenes, se observó un reordenamiento de la matriz celular sobre el electrodo a causa de la herida. Este cambio en forma y orientación celular no afecta las estimaciones hechas por el modelo.

-
- [1] A. C. Buchini-Labayen, *Desarrollo de algoritmos para impedancia eléctrica espectral con aplicación a dispositivos médicos*, Tesis de maestría, Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo (2021).
- [2] I. Giaever and C. R. Keese, Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **81**, 3761 (1984).
- [3] C. Lo, C. Keese, and I. Giaever, Impedance analysis of mdck cells measured by electric cell-substrate impedance

sensing, Biophysical Journal **69**, 2800 (1995).

- [4] F. Giana, *Desarrollo de una técnica basada en mediciones de impedancia eléctrica para la discriminación in vitro entre células cancerosas y no cancerosas*, Tesis doctoral, Instituto Balseiro (2018).
- [5] E. Urdapilleta, *Respuesta eléctrica de monocapas celulares en cultivos in-vitro*, Tesis de maestría, Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo (2004).
- [6] <https://www.biophysics.com/cultureware.php>, ECIS

Cultureware website.

- [7] E. Acerbo, *Mediciones de impedancia eléctrica espectral en células y desarrollo de un arreglo dual de amplificadores Lock-In*, Tesis de maestría, Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo (2022).
- [8] C. R. Keese, J. Wegener, S. R. Walker, and I. Giaever, Electrical wound-healing assay for cells in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 1554 (2004).
- [9] H. Ngoc-Le, J. Kim, J. Park, S. Cho, *et al.*, A review of electrical impedance characterization of cells for label-free and real-time assays, *BioChip* **13**, 295 (2019).
- [10] E. Noiri, Y. Hu, W. Bahou, C. Keese, I. Giaever, and M. Goligorsky, Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry* **272**, 1747–1752 (1997).