



TÍTULO DE PATENTE No. 416988

Titular(es): BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

Domicilio: 4 Sur No. 104, Col. Centro, 72000, Puebla, MÉXICO

Denominación: FABRICACIÓN DE UNA MATRIZ DE ELECTRODOS DE SILICIO ALEATORIAMENTE DISTRIBUIDOS PARA EL REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL TEJIDO CEREBRAL.

Clasificación: **CIP:** H01B1/22; H01B1/02; H01B1/04; H01B1/24; H01L21/28; H01L31/0224
CPC: H01B1/22; H01B1/02; H01B1/04; H01B1/24; H01L21/28; H01L31/0224

Inventor(es): JESÚS ANDRÉS ARZOLA FLORES; ENRIQUE QUIROGA GONZÁLEZ; ENRIQUE SOTO EGUIBAR; AUDREY MAGDALENA ORTEGA RAMÍREZ; GABRIEL GUARNEROS BEJARANO; IGNACIO MARTÍNEZ GARCÍA; JOSÉ LUIS RAMOS RAMÍREZ; OCTAVIO GONZÁLEZ PETLACALCO; ALVARO CÉSAR SALAS OCAMPO; ERIC GARCÍA HUITZITL; JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ TIRO; MARÍA FERNANDA SAVIÑÓN FLORES

SOLICITUD

Número:
MX/a/2018/012593

Fecha de Presentación:
15 de octubre de 2018

Hora:
13:09

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 15 de octubre de 2038

Fecha de Expedición: 9 de septiembre de 2024

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V, inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V, inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autenticidad, se podrá comprobar en www.gob.mx/mpi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56||MX/2024/93673|MX/a/2018/012593|Título de patente normal|2072|LCG|Pág(s)
1|t3zUrGB6jLscSvPkzZr7d1aeYhQ=

Sello Digital:

hImuTI2PuVhwNI4aDCfTETegQFs1MCSsBtMO0TP09UvCnvM8LWNy76LT6VdpXvWpTF8QyimYVTRcwJ8zWn332a7S
D52QZK6R3ncA14wVufdGXZ9xoSVOnkj016Kzft4jjs6hOZOeadR7bjsLcPjyd2HnP5gd4rzv6NAZQoftt2dCEkVJer
GrNaJL4oVj5H32O/LsVpPnf4TyBhir8ydsM+1AyaFz6U3sxQLyLJxUM0Nb6z3ihYnbfIT9X88vEXBhhzrOs2MfQ0k4
YR5UgQBw627LD5bKuNn2HW5LEal88hNc8QudZYRsDeLfhgcFbN196aDFhAUP9ZpV8TiQZCdQ==



MX/2024/93673

FABRICACIÓN DE UNA MATRIZ DE ELECTRODOS DE SILICIO ALEATORIAMENTE DISTRIBUIDOS PARA EL REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE TEJIDO CEREBRAL

5 Campo de la invención

La presente invención corresponde al campo técnico de la fabricación de una matriz de electrodos de Si, para el registro de actividad eléctrica de tejido cerebral.

Estado de la técnica

La necesidad de encontrar nuevos métodos que puedan detectar y diagnosticar enfermedades relacionadas con el cerebro ha despertado la curiosidad de muchos científicos, no solo del área de la salud, sino también del área de la Física y las Matemáticas, todos en busca de explicaciones y soluciones, sin embargo esto ha resultado muy complejo. En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de sistemas dinámicos no lineales en Biología [Kelly S, *et al.*, 2002], en especial el sistema nervioso central [Curran E. & Stokes M., 2003], en el que se detectan diversas enfermedades, síndromes y trastornos, como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, Huntington, Epilepsia, etc. Este interés se debe a que los sistemas biológicos, frecuentemente muestran una dinámica no lineal y caos. La epilepsia es una patología neurodegenerativa muy común, donde hay una tendencia a presentar convulsiones que se originan en ciertas regiones del cerebro, conocidas como focos epilépticos, y que además es usualmente mal diagnosticada [Engel K., *et al.*, 2005]. La epilepsia se define como una alteración crónica del cerebro con varias etiologías, caracterizadas por crisis recurrentes, debidas a excesivas descargas eléctricas de las neuronas [Schwartz A., 2004]. Existen diferentes tipos de epilepsia,

las cuales se dividen en dos grupos principales: epilepsia focal (o parcial) y epilepsia generalizada. Cualquier persona puede desarrollar epilepsia, ocurre en todas las edades, razas y clases sociales [Engel K., *et al.*, 2005]. La técnica más usual para el diagnóstico de la epilepsia es la electroencefalografía (EEG), la cual consiste en el registro y evaluación de los potenciales eléctricos generados por el cerebro [Schwartz A., 2004]. La evaluación de un EEG se hace mediante inspección visual de las curvas, usando ciertos criterios conocidos; tales como, formas de ondas consideradas como características propias de procesos patológicos, por ejemplo, ataques epilépticos, tumores cerebrales entre otras, sin embargo dichos criterios son únicamente cualitativos, por lo cual naturalmente presentan un margen de error inmensurable.

Las interfaces neuronales artificiales son una solución para el estudio de la actividad eléctrica cerebral in vitro e in vivo principalmente en individuos en situación de discapacidad motora, bloqueo de las vías de comunicación, o expresión de las experiencias cognoscitivas. En el caso particular de lesiones medulares, sólo en los Estados Unidos de América se tienen 250000 casos, con 11000 pacientes nuevos cada año [Kelly S, *et al.*, 2002]. Estas estadísticas justifican las intensas investigaciones desarrolladas en el campo de interfaces neuronales, sobre todo si se considera que la probabilidad de que los pacientes participen es alta [Kelly S, *et al.*, 2002, Curran E. & Stokes M., 2003, Engel K., *et al.*, 2005]. Los sistemas para el registro de la actividad bioeléctrica de neuronas individuales en primates y humanos se desarrollaron hace aproximadamente cuarenta años, pero sólo en la última década se potenció el implante de arreglos de electrodos directamente en el cerebro y arreglos de electrodos para el registro de actividad de redes neuronales in vitro [Engel K., *et al.*, 2005]. Este hecho se debe a la elevada carga computacional que se requiere para

procesar y decodificar las complejas señales derivadas de la actividad de múltiples neuronas individuales [Mussa-Ivaldi F. & Miller L., 2003]. La digitalización de la actividad eléctrica se debe realizar a altas velocidades (20 KHz) en varios canales. Adicionalmente deben separar los potenciales de acción y el ruido, para después

5 traducir la actividad neuronal en un comando de acción apropiado. Todas estas actividades deben realizarse en un tiempo de unos 200 ms [Donoghue, 2002]. Si bien los progresos recientes en el desarrollo de una interfaz electrodo-cerebro-máquina completa han sido importantes, aún se tienen limitantes en cuanto a la estabilidad, funcionalidad y costo de los electrodos y hacen falta avances en materiales

10 biocompatibles [Ball T., *et al.*, 2004]. La interacción electrodo-tejido neuronal exige tanto biocompatibilidad de la superficie del electrodo como biocompatibilidad estructural. Esta última se refiere al diseño, tamaño y superficie total del electrodo, propiedades que se relacionan con el daño ocasionado por la acción mecánica de introducir el electrodo en el tejido, y con las fuerzas o distribución de presiones

15 generadas en las regiones adyacentes. Hablando de la biocompatibilidad de los materiales en contacto con el tejido, es importante considerar que su potencial disolución, incluso en cantidades mínimas, podría generar respuestas del tejido, como inflamación, alergia, rechazo, entre otras. El tejido neuronal responde de diversas maneras a la introducción de los electrodos, aunque en todos los casos se produce un

20 daño tisular. Es conocido que el Silicio (Si) posee propiedades que lo hacen un material biocompatible [Navarro X., *et al.*, 2005; Rodio J., *et al.*, 2014; Fangqiong T., *et al.*, 2012; Gerion D., *et al.*, 2001] debido a su estabilidad bajo condiciones fisiológicas, por lo tanto es el material adecuado para la fabricación de una matriz multielectrodo, sin embargo, es un material dieléctrico y es necesario depositar sobre él algún material

metálico para asegurar el paso de corriente eléctrica a través del arreglo de micro-hilos. Para fabricar el arreglo de micro-hilos es necesario el uso de técnicas como el micromaquinado. El micromaquinado es un conjunto de herramientas para el diseño y fabricación que sirven para hacer estructuras y elementos en una escala muy por

5 debajo de nuestras facultades de percepción humana, la microescala. Una de estas técnicas es la litografía. Matrices multielectrodo de silicio fabricadas mediante la técnica de micromaquinado por litografía son excelentes candidatos para el registro de señales eléctricas en el tejido cerebral. Sin embargo, la litografía en la microescala es un proceso que necesita por lo general equipo complicado como lo son las alineadoras

10 de mascarillas, que permiten definir estructuras con resolución de hasta 1 micrómetro. La propuesta de este trabajo es el desarrollo de un electrodo de Si micro estructurado con hilos de diámetros sub-micrométricos, distribuidos de forma aleatoria, por medio de la técnica de grabado químico asistido por metal (MACE por sus siglas en inglés). Se adquirirán señales de voltaje vs tiempo (series de tiempo) en regiones de hilos, y

15 no de hilos individuales. El procesamiento de señales posterior a la adquisición de datos podría dar resultados comparables a cuando se usan puntos individuales. Es bien sabido que a nivel de la organización neuronal de animales superiores es posible la presencia de fenómenos no lineales. Esta dinámica no lineal ha sido descrita a muchos niveles, desde el análisis de EEG hasta los resultados obtenidos de la

20 dinámica de modelos de redes neuronales. En cualquier caso, todos los estudios permiten observar un marcado comportamiento no lineal en los registros de actividad eléctrica de muy diversas áreas del sistema nervioso [Qianjum H. & Jianlin S., 2011], por lo tanto, es posible el uso de técnicas matemáticas propias de los sistemas no

lineales, en el estudio de señales de actividad eléctrica neuronal obtenidas de matrices multielectrodo.

La solicitud de patente WO2018085840 describe un sistema basado en un conjunto de electrodos, con un solo cuerpo unitario, la pluralidad de aperturas consiste en varios
5 sitios de electrodos configurados para acoplarse con tejido neuronal y realizar registro del mismo.

La solicitud de patente EP3183338 describe la obtención de cultivos de neuronas derivados de células madre pluripotentes inducidas por el ser humano, las cuales exhiben disparos sincrónicos de redes neuronales, dicha actividad neuronal puede
10 detectarse mediante una matriz múltiple de electrodos.

La patente WO2016070100 Describe una sonda de circuito neuronal (NCP) que combina un arreglo de multielectrodos, con una sonda local automatizada, la sonda se posiciona para interactuar con una o más células como neuronas o un circuito neuronal. La sonda interactúa con las células registrando señales eléctricas de la
15 matriz de electrodos.

La patente WO2014085787 proporciona diseños de sonda o multielectrodos que permiten grabar fácilmente dos regiones cerebrales simultáneamente y espacialmente distintas. Se describe el método y proceso de fabricación para dichas sondas.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo de la metodología para la obtención de matrices multielectrodo.

5 En la figura 2 se muestra la comparación entre un sustrato sin grabar, un sustrato con grabado y un sustrato lijado.

En la figura 3 se muestra un sustrato grabado

En la figura 4 se observan nano partículas de plata sobre los microhilos de Si. En ella se aprecia microhilos de Si decorados con partículas de Ag.

En la figura 5 se muestra el diseño obtenido en formato CAD de la cámara de registro.

10 En la figura 6 se observa el soporte y cámara de registro; donde se muestran los contactos eléctricos que se unirán con la cara posterior de la matriz multielectrodo.

En la figura 7 se observa el esquema del sistema de registro, mostrando la instrumentación básica de montaje.

15 En la figura 8 se observa la actividad eléctrica del 1er. registro de tejido neuronal primario. El registro se realizó en el canal marcado con color naranja y la estimulación sobre el canal marcado con una estrella.

Mejor método de llevar a cabo la invención

El procedimiento para la fabricación de la matriz multielectrodo mediante el método de Grabado Químico Asistido por Metal (MACE) consta de 6 etapas, las cuales se describen a continuación.

5 Etapa 1: Deposito de plata

1.-Se preparó 0.5 L de solución 0.01 M de AgNO_3 (Merck).

Solución 1: Se mezclaron 25 mL de solución 0.01 M de AgNO_3 (Merck), 0.5 mL de HF (48 %, Emsure) y 0.5 g de Polietilenglicol (Aldrich).

Se colocó una muestra de Si tipo p con orientación cristalina (100) y resistividad 15-25

10 Ωcm de 1 cm^2 en la solución de depósito de plata durante 1 min.

Etapa 2: Grabado

Una vez sumergida la muestra de Si en la solución de depósito de plata durante 1 min, se colocó en una solución con 35 mL de H_2O desionizada, 4 mL de HF (48 %, Emsure) y 1 mL de H_2O_2 (30 %, CTR Scientific), durante 10 min a 35°C .

15 Etapa 3: Sobregrabado

Una vez realizado el grabado químico, se procedió a colocar la muestra de Si en una solución con 100 mL de H_2O desionizada y 2 g de Polietilenglicol (Aldrich) a 50°C por 30 min a agitación constante, lo anterior para pasivar la superficie de la muestra.

Pasados los 30 min, la muestra se colocó en una solución con 100 mL H_2O desionizada, 0.45 g de KOH (Aldrich) y 2 g de Polietilenglicol (Aldrich), a 50°C por 1

20 min.

Etapa 4: Fabricación de contactos eléctricos

Concluido el procedimiento de grabado y sobregrabado se procedió a la fabricación de los contactos eléctricos en lado posterior de la matriz multielectrodo mediante fotolitografía. El proceso de fotolitografía consistió en aplicación de una delgada capa de fotorresina negativa (Diaz Sentizer) mediante la técnica de spin coating.

- 5 Posteriormente se procedió a transferir un patrón geométrico para definir el área para los contactos eléctricos.

Etapas 5: Deposito de plata sobre electrodos y contactos eléctricos

- Fabricados los microhilos de Si en lado anterior y los contactos eléctricos en el lado posterior de la matriz multielectrodo, se procedió a realizar el depósito de plata (Ag) sobre ellos para mejorar el contacto eléctrico. Para la cara anterior de la matriz multielectrodo, es decir, el área donde se encuentran los microhilos Silicio, se empleó una solución con 25 mL de H₂O desionizada, 0.15 mL de HF (48 %, Emsure), 0.5g de Polietilenglicol (Aldrich) y 5 mL de solución 0.001M de AgNO₃ (Merck). La muestra se expuso a la solución por 6 min.

- 15 Para la cara posterior, es decir, el área donde se encuentran de nidos los contactos eléctricos, se utilizó una solución con 25 mL de AgNO₃ (Merck) a 0.01M, 0.5 mL de HF (48 %, Emsure) y 0.5 g de Polietilenglicol (Aldrich). La muestra se expuso a la solución por 3 min.

Etapas 6: Tratamiento térmico

- 20 Para mejorar el contacto eléctrico entre la plata depositada en ambos lados de la matriz multielectrodo, se realizó un tratamiento térmico a 200°C durante 5 h en atmosfera de N₂.

Ejemplo 1. Pruebas de Biocompatibilidad

Una vez fabricada la matriz multielectrodo, se procedió a realizar las pruebas de biocompatibilidad para estudiar la supervivencia celular sobre la matriz.

La matriz multielectrodo se desinfectó mediante su exposición a radiación UV por 2 h para eliminar cualquier agente patógeno para posteriormente realizar la pruebas de biocompatibilidad.

Para determinar la biocompatibilidad, se cultivaron células epiteliales de ovario de hamster chino CHO K-1 (ATCC No. CCL61), las cuales fueron sembradas sobre las matrices de electrodos, dentro de cajas de cultivo con 2 mL de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modied Eagle's medium) enriquecido con 10 mL HEPES, 2 mL de glutamina, 10% de suero fetal bovino, 2 mL de piruvato y antibiotico-antimicótico.

Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C en una atmosfera de aire con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Transcurrido el tiempo de cultivo, se retiró el volumen total de medio de cada pozo, el cual fue sustituido por 1.7 mL de medio DMEM 100% y se adicionaron 300L de MTT (Sigma Aldrich) de una concentración stock de 1 mg/mL, las cajas se colocaron nuevamente dentro de la incubadora durante 4 h. Finalmente se retiró el medio con MTT y se disolvieron los cristales de formazan contenidos en las células con 2 mL de DMSO. Las cajas de 6 pozos con el DMSO se colocaron en un agitador horizontal durante 10 minutos previamente a las mediciones con el espectrofotómetro.

Se realizaron dos mediciones con un espectrofotómetro (EPOC Instruments, Biotec, USA) a las longitudes de onda de 540 nm y 570 nm. La primera medición se realizó directamente de las cajas (2 mL) que contuvieron las micromatrices de electrodos y la segunda medición se realizó en cajas de 96 pozos, con 100L de la solución con

formazan. Las mediciones fueron comparadas con cubreobjetos control tratados con poli D-lisina. Se adiciono también un control negativo tratado con triton-100X.

Ejemplo 2. Registro de actividad eléctrica de tejido neuronal primario

Realizada la prueba de biocompatibilidad, se procedió a realizar el cultivo celular primario, en el cual se emplearon neuronas corticales obtenidas de ratas Long-Evans (previamente anestesiadas con sevoflurano y posteriormente sacrificadas por decapitación) en edades de P2 a P3,

Una vez disociados, los hipocampos se sometieron a un tratamiento enzimático con tripsina a 0.1% en solución HBSS sin Calcio y Magnesio por 30 min a 37°C, tras lo

cual, las células fueron lavadas y disociadas mecánicamente (con ayuda de pipetas Pasteur pulidas a fuego), posteriormente, se centrifugaron por 30 segundos a 1500 rpm y se lavaron con HBSS, esto se repitió 3 veces. Finalmente las células se sembraron en la matriz multielectrodo y se mantuvieron en cultivo por 11 das a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂ y 95% aire en medio Neurobasal-A (Invitrogen, USA)

suplementado con nutrientes B-27 (Invitrogen, USA), 0.5 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilia y 100 U/mL de estreptomycin (Sigma, USA). El medio se recambio cada 3 días. Llegado el día 9 del cultivo, el medio fue remplazado por solución fisiológica de registro (en mM: NaCl, 145; KCl, 2.5; HEPES, 10; glucosa, 10; CaCl₂, 2; and MgCl₂, 1; pH 7.4) Posteriormente la actividad espontanea se registró al día 11 de cultivo. Los

experimentos se realizaron registrando la red de neuronas hipocampales. Para la solución de registro se empleó una solución extracelular de KCl, 3 mM; CaCl₂, 2 mM; MgCl₂, 1 mM; glucosa, 10 mM; y HEPES, 10 mM (pH 7.4). El registro se realizó usando una tasa de muestreo de 1 kHz. Los experimentos fueron realizados a 25°C.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz para registro de tejido neuronal a base de electrodos de silicio micro
estructurado con hilos de diámetros sub-micrométricos distribuidos aleatoriamente,
caracterizada porque consiste de una placa de silicio tipo *p* con orientación cristalina y
resistividad de 15-25 Ohms/cm, recubierta de AgNO₃, con una cara anterior con
microhilos de silicio lograda mediante grabado químico con H₂O/HF/H₂O₂, y
sobregabado químico y secuencial con H₂O/polietilenglicol, y H₂O/KOH/polietilenglicol;
y con la cara posterior con contactos eléctricos a base de fotorresina negativa; en donde
ambas caras, anterior y posterior, están recubiertas de AgNO₃ por inmersión en solución
de H₂O/HF/polietilenglicol/AgNO₃ y tratamiento térmico a 200 °C.

RESUMEN

En la presente invención se describe el diseño y fabricación de una matriz multielectrodo mediante una metodología económica, reproducible y escalable, para el registro de la actividad eléctrica de cultivo neuronal primario, con el fin de registrar la actividad de redes neuronales, a las cuales se les inducen artificialmente episodios similares a la epilepsia. Dicha matriz multielectrodo permite el análisis de señales obtenidas de múltiples regiones de la red neuronal, con el propósito de identificar mediante el análisis de técnicas propias de los sistemas dinámicos no lineales, parámetros de orden que permitan discernir cualitativamente y cuantitativamente la actividad eléctrica epileptogénica de la actividad eléctrica no epileptogénica.

Figura 1

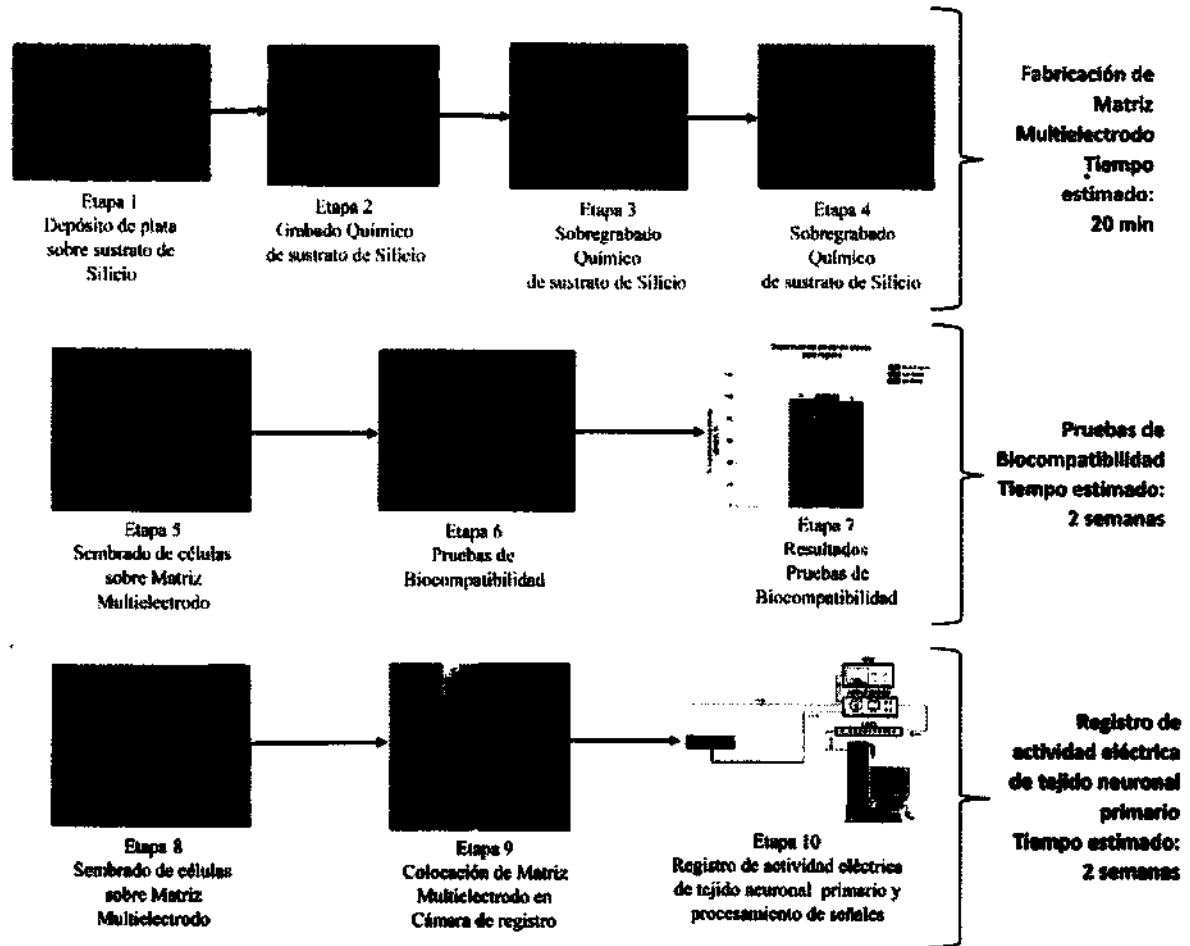


Figura 2

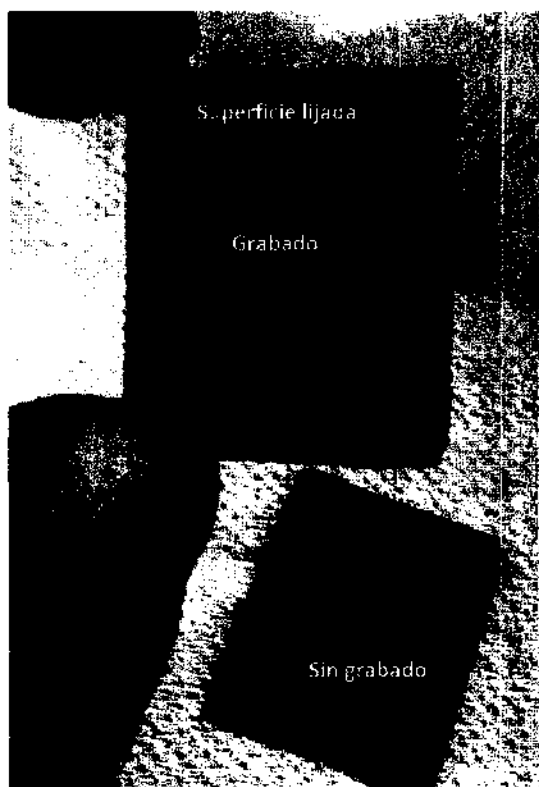


Figura 3



Figura 4

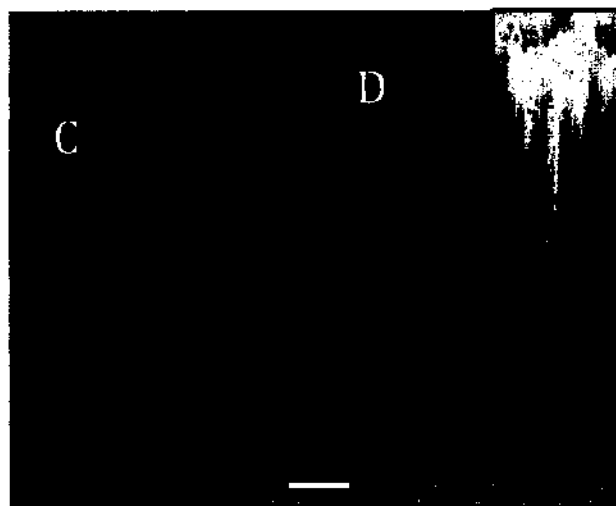


Figura 5

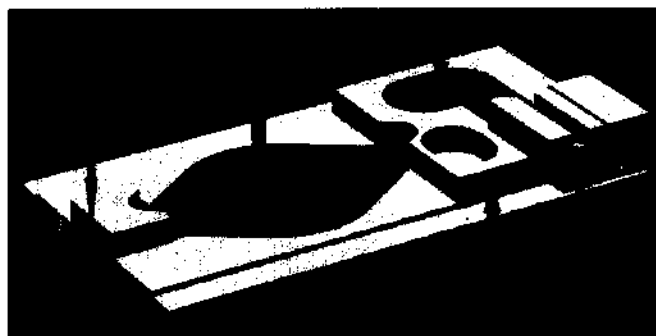


Figura 6

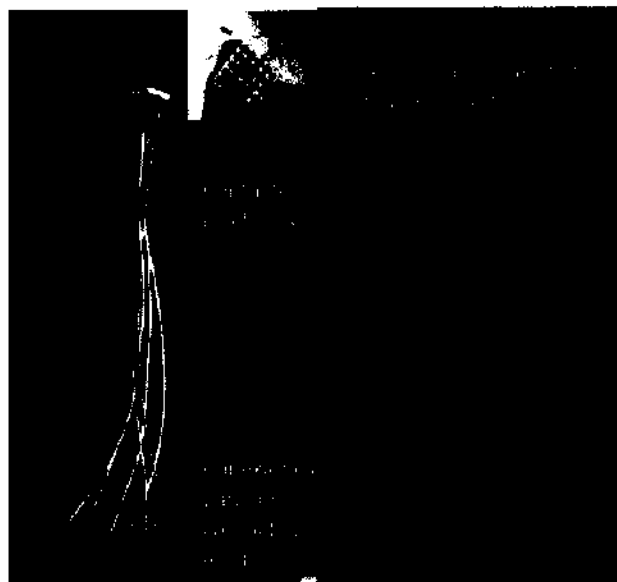


Figura 7

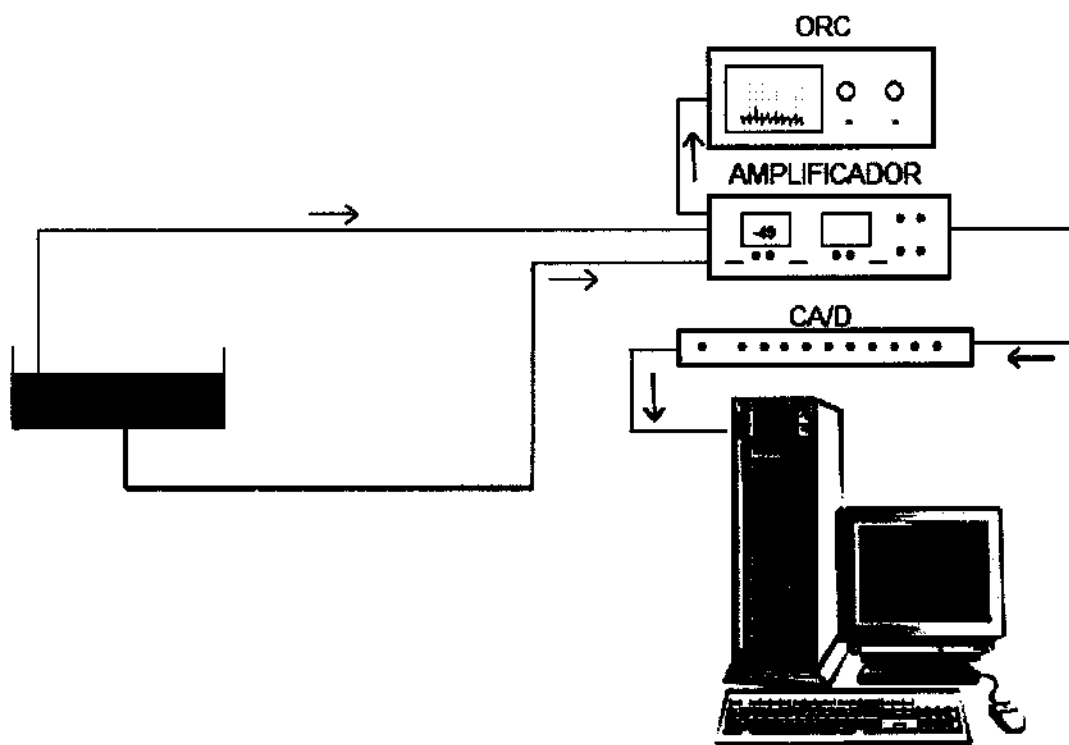


Figura 8

