

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 905**

51 Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)

G01N 21/47 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2016** **PCT/US2016/038308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016** **WO16205775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2016** **E 16812602 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 3311140**

54 Título: **Determinación de la concentración extracelular de analitos con sensores nanoplasmonicos**

30 Prioridad:

19.06.2015 US 201562181939 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.10.2021

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE NAVY (100.0%)
Naval Research Laboratory 875 North Randolph
Street Suite 1425
Arlington, Virginia 22203, US**

72 Inventor/es:

**RAPHAEL, MARC P.;
CHRISTODOULIDES, JOSEPH A.;
BYERS, JEFF M. y
DELEHANTY, JAMES B.**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 862 905 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Determinación de la concentración extracelular de analitos con sensores nanoplasmonicos

5 Campo técnico

Los aspectos de la modalidad ilustrativa se refieren a la detección de analitos en un fluido y encuentran una aplicación particular en relación con la detección de proteínas extracelulares mediante el uso de sensores nanoplasmonicos.

10

Antecedentes

De bacteria a eucariota, el destino de una célula está directamente ligado a su entorno químico local. La medición de las concentraciones y gradientes de proteínas externas mediante receptores unidos a la membrana es útil en el estudio de la diferenciación, la motilidad y la proliferación celular. Tales dependencias se han deducido al introducir gradientes artificiales en cultivos celulares. Sin embargo, las mediciones directas de las concentraciones espacio-temporales de analitos, que las propias células producen a través de la secreción, siguen siendo difíciles de alcanzar.

15

Un obstáculo ha sido la falta de un ensayo que pueda medir las concentraciones extracelulares de proteínas en tiempo real sin interrumpir las vías de señalización de interés. Este requisito no invasivo en tiempo real limita en gran medida las técnicas que pueden emplearse, incluidos los métodos comunes de etiquetado fluorescente. Por ejemplo, aunque las proteínas de fusión fluorescentes han sido útiles en el estudio de las mediciones intracelulares de proteínas, la técnica no se presta a la señalización extracelular. Una etiqueta, tal como la etiqueta de proteína verde fluorescente (GFP) de aproximadamente 27 kDa, por ejemplo, puede comprometer la capacidad de la proteína etiquetada para navegar por las complejidades de la vía secretora (Wiedenmann y otros, "Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging: Opportunities, Limitations, and Challenges," *Humana Press* 61(11): 1029-1042 (2009); Costantini, y otros, "Fluorescent Proteins in Cellular Organelles: Serious Pitfalls and Some Solutions," *DNA Cell Biol.* 32(11):622-627 (2013)).

20

25

Incluso si las proteínas se secretan con éxito, el resultado es un brillo fluorescente difuso fuera de la célula que es difícil de cuantificar. Los anticuerpos etiquetados con fluorescencia usados para los ensayos de inmuno sándwich se han introducido con éxito fuera de las células vivas para medir las secreciones (Bailey, y otros, "DNA-encoded antibody libraries: A unified platform for multiplexed cell sorting and detection of genes and proteins," *J. Am. Chem. Soc.* 129(7):1959-1967 (2007); Han, y otros, "Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(5):1607-1612 (2012); Shirasaki, y otros, "Real-time single-cell imaging of protein secretion," *Scientific Reports* 4 (2014)). Sin embargo, la adición de estas sondas relativamente grandes (típicamente 150 kDa) es un impedimento para la señalización aguas abajo y las técnicas típicamente implican el aislamiento de células individuales. En ambos ejemplos, la capacidad de establecer relaciones causales entre las concentraciones de proteínas secretadas y el destino celular, ya sea que la señalización sea de naturaleza autocrina, paracrina o endocrina, se ve obstaculizada por las propias sondas.

35

40

Los nanosensores de estado sólido tienen el potencial de superar este estancamiento. Las sondas tal como los nanodiamantes y las nanoestructuras metálicas son biocompatibles, no sufren fotoblanqueo y, ventajosamente desde la perspectiva de la secreción de proteínas, son técnicas sin etiqueta. Los sensores de nanodiamantes son detectores de campos magnéticos altamente sensibles que resultan de las vacantes de nitrógeno, lo que hace que la técnica sea particularmente aplicable a la detección de metaloproteínas (Horowitz, y otros, "Electron spin resonance of nitrogen-vacancy centers in optically trapped nanodiamonds", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(34): 13493-13497 (2012); Ermakova, y otros, "Detection of a Few Metallo-Protein Molecules Using Color Centers in Nanodiamonds," *Nano Lett.* 13(7):3305-3309 (2013)). Las nanopartículas metálicas exhiben una resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) que es sensible a los cambios en el índice de refracción local del medio circundante. Sus superficies pueden biofuncionalizarse para la detección de proteínas, lípidos y ADN en entornos libres de células (Sepulveda, y otros, "LSPR-based nanobiosensors," *Nano Today* 4(3):244-251 (2009); Mayer, y otros, "A single molecule immunoassay by localized surface plasmon resonance," *Nanotechnology* 21(25) (2010); Haes, y otros, "A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.* 124(35): 10596-10604 (2002); Nusz, y otros, "Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod," *Anal. Chem.* 80(4):984-989 (2008); Jonsson y otros, "Supported lipid bilayer formation and lipid-membrane-mediated biorecognition reactions studied with a new nanoplasmonic sensor template," *Nano Lett.* 7(11):3462-3468 (2007); Dahlin, y otros, "Specific self-assembly of single lipid vesicles in nanoplasmonic apertures in gold," *Adv. Mater.* 20(8):1436-1442 (2008); Endo, y otros, "Label-free detection of peptide nucleic acid-DNA hybridization using localized surface plasmon resonance based optical biosensor," *Anal. Chem.* 77(21):6976-6984 (2005); Lo, y otros, "Monitoring of DNA-protein interaction with single gold nanoparticles by localized scattering plasmon resonance spectroscopy," *Methods* 64(3):331-337 (2013)). Además, las configuraciones ópticas LSPR se integran fácilmente con configuraciones estándar de microscopía de campo ancho que han permitido la detección de secreciones de proteínas en presencia de miles de células, así como secreciones unicelulares en tiempo real (Oh, otros, "Integrated Nanoplasmonic Sensing for Cellular

55

60

65

Functional Immunoanalysis Using Human Blood," ACS Nano 8(3):2667-2676 (2014); Endo y otros, "Label-free cell-based assay using localized surface plasmon resonance biosensor," Anal. Chim. Acta 614(2):182-189 (2008); Raphael y otros, Quantitative Imaging of Protein Secretions from Single Cells in Real Time. Biophys. J. 105(3):602-608 (2013)). Sin embargo, la medición de las concentraciones extracelulares de proteínas tanto en el espacio como en el tiempo, para modelar y cuantificar las vías de señalización, sigue siendo un desafío (Kolitz, y otros, "Measurement and Modeling of Signaling at the Single-Cell Level," Biochemistry 51(38):7433-7443 (2012)).

Además, los métodos que usan técnicas basadas en espectrometría son muy restrictivos, ya que solo permiten cuantificar la respuesta de un único arreglo, y el espectrómetro requiere mucha luz y un tiempo de exposición significativo, lo que podría ser perjudicial para las células vivas.

Por lo tanto, sería deseable tener un método y un sistema para medir las concentraciones de analito extracelular en el espacio y el tiempo, sin la necesidad de usar un marcado fluorescente y sin la necesidad de usar un espectrómetro.

Se mencionan las siguientes referencias:

Publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0273002, publicada el 18 de septiembre de 2014, titulada NANOSPLASMONIC IMAGING TECHNIQUE FOR THE SPATIO-TEMPORAL MAPPING OF SINGLE CELL SECRETIONS IN REAL TIME por Marc P. Raphael, y otros.

Publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0095100, publicada el 3 de abril de 2014, titulada CALIBRATING SINGLE PLASMONIC NANOSTRUCTURES FOR QUANTITATIVE BIOSENSING por Marc P. Raphael, y otros.

Publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0093977, publicada el 3 de abril de 2014, titulada LIGHT MICROSCOPY CHIPS AND DATA ANALYSIS METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE LOCALIZED SURFACE PLASMON RESONANCE (LSPR) BIOSENSING AND IMAGING por Marc P. Raphael, y otros.

Descripción de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de la modalidad ilustrativa, un método para determinar concentraciones extracelulares de un analito incluye recibir datos del sensor de uno o más arreglos de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas en un chip de imagenología por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi) en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva durante una pluralidad de tiempos. Los datos de intensidad se determinan para las nanoestructuras, en base a los datos del sensor para cada una de la pluralidad de tiempos. Los datos de ocupación fraccional se determinan para las nanoestructuras, en base a los datos de intensidad para cada una de la pluralidad de tiempos. Se determinan los datos de concentración extracelular del analito, en base a los datos de ocupación fraccional para cada una de la pluralidad de tiempos.

Una o más de las etapas del método pueden realizarse con un procesador.

De acuerdo con otro aspecto del método, el método puede comprender además determinar el movimiento del analito en el fluido a partir de los datos de concentración extracelular mapeando los datos de concentración extracelular del analito para el chip LSPRi.

De acuerdo con otro aspecto de la modalidad ilustrativa, un sistema implementado por ordenador para determinar concentraciones extracelulares de un analito incluye un chip de imagenología por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi), un componente sensor para recibir datos del sensor durante una pluralidad de tiempos, un componente de intensidad que determina los datos de intensidad de la imagen en base a los datos del sensor para la pluralidad de tiempos, un componente de ocupación fraccional que determina los datos de ocupación fraccional en base a los datos de intensidad para cada una de la pluralidad de tiempos, y un componente de concentración que determina los datos de concentración extracelular en base a los datos de ocupación fraccional para cada una de la pluralidad de tiempos. El chip LSPRi incluye un sustrato y uno o más arreglos de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas formadas sobre el sustrato. Cada arreglo está en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva. Un procesador implementa los componentes.

De acuerdo con otro aspecto de la modalidad ilustrativa, un método para determinar las concentraciones extracelulares de un analito en un fluido incluye proporcionar al menos un arreglo de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas en un chip de imagenología por resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPRi) en contacto con un fluido que contiene en al menos una célula viva. Para cada una de una pluralidad de tiempos, los datos del sensor se reciben de uno o más de los arreglos de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas. Los datos de ocupación fraccional se determinan para las nanoestructuras en base a los datos del sensor para cada una de la pluralidad de tiempos. La concentración extracelular del analito se mapea espacial y temporalmente, en base a los datos de ocupación fraccional.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 es un diagrama esquemático de una porción de un aparato usado para medir concentraciones extracelulares de un analito de acuerdo con un aspecto de la modalidad ilustrativa;
- La Figura 2 es una vista en planta superior de un chip LSPRi de acuerdo con otro aspecto de la modalidad ilustrativa;
- 10 La Figura 3 es una vista en planta superior de un arreglo de nanoestructuras en el chip LSPR de la Figura 2;
- La Figura 4 es una vista en sección lateral de nanoestructuras funcionalizadas en el chip LSPR de la Figura 2;
- 15 La Figura 5 es un diagrama de bloques funcional de un sistema implementado por ordenador para medir concentraciones extracelulares de un analito en un medio líquido de acuerdo con otro aspecto de la modalidad ilustrativa;
- La Figura 6 es un diagrama de flujo que ilustra un método para medir concentraciones extracelulares de un analito de acuerdo con otro aspecto de la modalidad ilustrativa;
- 20 La Figura 7 es un gráfico de intensidad de imagen normalizada frente al tiempo para la cámara CCD ilustrativa;
- La Figura 8 es un gráfico de la intensidad de la imagen normalizada frente a la ocupación fraccional obtenida en tres experimentos;
- 25 Las Figuras 9-11 ilustran esquemáticamente el análisis de datos para determinar la concentración de la ocupación fraccional, donde la Figura 9 ilustra un submuestreo de ocupación fraccional a lo largo del tiempo; la Figura 10 ilustra una porción ampliada del gráfico de la Figura 9 y la Figura 11 es un gráfico que ilustra cada modelo lineal como un punto en un plano;
- 30 La Figura 12 es un gráfico de una función por partes de tres escenarios de concentración dependientes de los tiempos simulados: un aumento gradual; un fuerte aumento; y una fuerte disminución, frente al tiempo, en la determinación de concentraciones extracelulares a partir de datos simulados;
- 35 La Figura 13 es un gráfico de ocupación fraccional frente al tiempo en la determinación de concentraciones extracelulares a partir de datos simulados, con ruido Gaussiano simulado;
- La Figura 14 es un gráfico de ocupación fraccional frente al tiempo para determinar concentraciones extracelulares a partir de datos simulados con modelos lineales locales ajustados a los datos;
- 40 La Figura 15 es un gráfico de concentración extracelular simulada frente al tiempo;
- La Figura 16 es una fotografía de un chip LSPR durante la cuantificación de concentraciones extracelulares con secreciones en estado estacionario de una proteína;
- 45 La Figura 17 es un gráfico de ocupación fraccional frente al tiempo para dos arreglos locales en el chip LSPR de la Figura 16;
- La Figura 18 es un gráfico de los datos de concentración extracelular calculados para los arreglos locales de la Figura 16, después de aplicar un filtro temporal;
- 50 La Figura 19 es una fotografía de un chip LSPR durante la cuantificación de concentraciones extracelulares con un aumento abrupto de secreciones de una proteína;
- 55 La Figura 20 es un gráfico de ocupación fraccional frente al tiempo para los arreglos etiquetados en el chip LSPR de la Figura 19;
- La Figura 21 es un gráfico de datos de concentración extracelular calculados para los arreglos etiquetados de la Figura 19, después de aplicar un filtro temporal;
- 60 La Figura 22 es un gráfico de concentración determinada para un arreglo local de la Figura 16 con dos ventanas de tiempo diferentes; y
- La Figura 23 es un gráfico de la relación señal/ruido con una ventana de tiempo variable.
- 65 Modos para llevar a cabo la invención

Se describen métodos y sistemas para medir concentraciones extracelulares de un analito en donde pueden obtenerse imágenes de secreciones de células individuales a lo largo del tiempo y la distancia espacial de una o más células biológicas. La técnica es útil para determinar el flujo de analitos, tal como proteínas, lípidos y ADN, en un medio líquido.

En las modalidades descritas en la presente descripción, se usan arreglos de nanoestructuras plasmónicas de oro para la formación de imágenes en tiempo real de las concentraciones de proteínas secretadas. La inferencia de concentración a partir de imágenes nanoplasmónicas es asistida por dos técnicas. En primer lugar, cuando se normalizan, las imágenes LSPR (LSPRi) pueden usarse para determinar la fracción de ligandos de superficie activos unidos al analito (ocupación fraccional). En segundo lugar, para calcular la concentración, se usa un enfoque de análisis que se basa en el filtrado temporal que usa las constantes de ocupación fraccional y la velocidad de reacción determinadas por LSPRi como entradas. Aplicando este enfoque al mapeo espacio-temporal de las concentraciones de anticuerpos secretados de las células de hibridoma, pueden obtenerse imágenes de las secreciones de una sola célula con una resolución de tiempo de 15 segundos en un intervalo espacial que se extiende 130 μm desde el centro de la célula. Los arreglos de detección ubicados junto a las células individuales resolvieron concentraciones en estado estable entre 0,2 y 1,3 nM. También pueden medirse secreciones con aumento abrupto en las que la concentración transitoria alcanza hasta 56 nM en el transcurso de varios minutos y luego se disipa. La capacidad de medir concentraciones secretadas con alta resolución espacial y temporal tiene aplicabilidad a numerosos analitos y tipos de células.

Con referencia a la Figura 1, se muestra una ilustración de un sistema de detección **1** usado para medir concentraciones extracelulares de un analito en un medio líquido de acuerdo con un aspecto de la modalidad ilustrativa. El sistema de detección **1** incluye un aparato **10**, que incluye: un chip LSPRi **12**, que incluye un sustrato transmisor de luz **14**, tal como un cubreobjetos de vidrio, que está modelado con una pluralidad de nanoestructuras **16**, que pueden disponerse en uno o más arreglos. El cubreobjetos de vidrio puede ser del tipo usado convencionalmente en un microscopio óptico estándar.

Una cámara **18**, montada sobre el sustrato **14**, contiene un medio líquido **20**, que está en contacto con las nanoestructuras **16**. El medio líquido puede contener una o más células vivas. Una lente de objetivo **22** se coloca adyacente al sustrato para recibir las emisiones de las nanoestructuras que lo atraviesan. Un dispositivo de carga acoplada (CCD) **24**, tal como una cámara CCD, está posicionado para recibir entradas de la lente. En modalidades particulares, el aparato **10** puede incluir uno o más de: divisores de haz **25**, **26**, un polarizador lineal **27**, un polarizador lineal cruzado **28** y un espejo **30**. Pueden incluirse opcionalmente otros dispositivos de detección, tal como un espectrómetro **31**. En uso, la luz de excitación de una fuente de luz visible **35**, tal como una lámpara halógena, que pasa a través del polarizador lineal **27** e ilumina los arreglos **34** a través de la lente del objetivo **22**. Los fotones emitidos por la nanoestructura son colectados por la lente del objetivo **22**, pasados a través del polarizador lineal cruzado **28** y reflejados por el espejo **30** a la cámara CCD (etiquetada como CCD). Opcionalmente, un divisor de haz **31**, intermedio entre el espejo **30** y la CCD, permite que una porción de la energía (luz reflejada) entre en el espectrómetro **31**. Alternativamente, el espectrómetro **31** se omite del sistema **1**. Los datos de sensor **32** del (los) dispositivo(s) de detección **24**, **31** se envían a un sistema de procesamiento **33**, que se describe con mayor detalle con referencia a la Figura 5.

Con referencia a la Figura 2, se muestra una vista superior de un chip LSPRi **12** ilustrativo. El chip LSPRi **12** incluye uno o más arreglos **34** de nanoestructuras. En la modalidad que se ilustra en la Figura 2, se muestran doce arreglos **34** de nanoestructuras plasmónicas **16**. En modalidades particulares, el cubreobjetos **14** se modela mediante litografía por haz de electrones para incorporar arreglos **34** de nanoestructuras plasmónicas **16**, que pueden estar formadas predominantemente de oro. Una o más células vivas **36** están ubicadas en el medio líquido, en las proximidades del cubreobjetos **14** y los arreglos **34** de nanoestructuras **16**.

Con referencia una vez más a la Figura 1, los arreglos **34** se iluminan con una fuente **35** de iluminación visible, tal como una lámpara halógena de 100 W. Los polarizadores **26**, **28** pueden usarse para minimizar las contribuciones de fondo de la luz dispersada por el sustrato de vidrio.

Con referencia también a la Figura 3, se muestra un único arreglo **34** de nanoestructuras **16**. Cada nanoestructura **16** puede tener al menos 10 nm, o al menos 20 nm, o hasta 200 nm, o hasta 100 nm, o hasta 250 nm, de diámetro y al menos 20 nm, o al menos 50 nm, o hasta 500 nm, o hasta 200 nm, de altura. En modalidades específicas, las nanoestructuras **16** pueden tener 70-80, por ejemplo, 75 nm de diámetro y 60-100, por ejemplo, 80 nm de altura.

Las nanoestructuras **16** pueden disponerse en diferentes patrones, tal como un arreglo $n \times m$ **34**, donde cada uno de n y m es al menos 5, tal como hasta 50. Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 3, las nanoestructuras **16** pueden disponerse en un arreglo de 20×20 **34**. En modalidades particulares, las nanoestructuras **16** pueden estar separadas de 200 a 1000 nm, de centro a centro, lo que define así el intervalo de paso. Las nanoestructuras **16** pueden tener, por lo tanto, un paso de 300-500 nm. Los arreglos **34** pueden tener un paso de al menos 5 μm , o al menos 20 μm , tal como al menos 30 μm , o hasta 100 μm , o hasta 40 μm , por ejemplo, 33 μm medido desde sus respectivos centros.

Los arreglos **34** pueden tener un pico de resonancia centrado a 250-800 nm. En algunas modalidades, los arreglos **34** pueden tener un pico de resonancia centrado a aproximadamente 635 nm en medios acuosos.

- 5 Los métodos para formar los arreglos de nanoestructuras se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Estados Unidos antes mencionada Núm. 2014/0273002, 2014/0095100 y 2014/0093977.

Con referencia a la Figura 4, se muestra una vista en sección lateral ampliada de una porción del chip LSPRi **12**, con dos estructuras nanoplásmónicas funcionalizadas **16**. Las nanoestructuras **16** pueden funcionalizarse con ligandos **38** que pueden unirse a un analito objetivo específico **40** en el medio líquido. Por ejemplo, las nanoestructuras **16** pueden funcionalizarse biológicamente aplicando primero una monocapa autoensamblada de dos componentes de primer y segundo tioles en una proporción de 3:1. El (primer) componente tiol mayoritario puede terminarse con polietilenglicol para evitar la unión no específica, mientras que el (segundo) componente minoritario termina con un grupo amina (u otro grupo de unión funcional) para la unión del ligando covalente.

15 El analito **40** puede ser una proteína, tal como un anticuerpo, secretada por una o más células **36** contenidas dentro del fluido **20** de la cámara **18**. La unión del analito **40** a los ligandos **38** provoca una perturbación en el índice de refracción local de las nanoestructuras plasmónicas **16**, que se manifiesta como un desplazamiento espectral al rojo y un aumento de intensidad. Cuando se obtienen imágenes con la cámara CCD, se observa que los arreglos **34** se iluminan con el aumento del desplazamiento espectral (es decir, el aumento de la unión). Puede usarse un analito conocido **40** (por ejemplo, obtenido comercialmente con alta pureza) para normalizar la respuesta espectral de los arreglos **34** de nanoestructuras funcionalizadas **16**, por ejemplo, después de la prueba.

20 En modalidades particulares, la configuración del aparato **10** se integra con técnicas tradicionales de microscopía celular, tal como imágenes de fluorescencia y/o campo claro, que pueden ser accesibles mediante la conmutación automática de un cubo de filtro (no se muestra).

Con referencia a la Figura 5, se muestra un diagrama de bloques funcional de un sistema de procesamiento de datos de sensor implementado por ordenador **33** para determinar datos de concentración extracelular de un analito. El sistema informático **33** que se ilustra incluye una memoria **54** que almacena instrucciones de software **56** para realizar el método que se ilustra en la Figura 6 y un procesador **58** en comunicación con la memoria para ejecutar las instrucciones **56**. El sistema **33** también incluye uno o más dispositivos de entrada/salida (E/S) **60**, **64**, tal como una interfaz de red y una interfaz de entrada y salida de usuario. La interfaz de E/S **64** puede comunicarse con una o más pantallas, para mostrar información a los usuarios, y con un dispositivo de entrada de usuario, tal como un teclado o una pantalla táctil o de escritura, y/o con un dispositivo de control del cursor, tal como un mouse, bola de seguimiento, o similar, para introducir texto y para comunicar información de entrada de usuario y selecciones de comandos al dispositivo procesador **58**. La interfaz de E/S **60** recibe datos de sensor **32** desde el (los) dispositivo(s) de detección **24**, **31**. Los diversos componentes de hardware **54**, **58**, **60**, **64** del sistema de procesamiento **33** pueden estar todos conectados por un bus de datos/control **65**.

40 El sistema de procesamiento de datos **33** puede incluir uno o más dispositivos informáticos, tal como una PC, tal como un ordenador de escritorio, un ordenador portátil, un ordenador de bolsillo, un asistente digital portátil (ADP), un ordenador servidor, un teléfono celular, una tableta, un buscapersonas, una combinación de los mismos, u otro dispositivo informático capaz de ejecutar instrucciones para realizar el método ilustrativo.

45 La memoria **54** puede representar cualquier tipo de medio legible por ordenador no transitorio tal como una memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de sólo lectura (ROM), disco o cinta magnética, disco óptico, memoria flash o memoria holográfica. En una modalidad, la memoria **54** comprende una combinación de memoria de acceso aleatorio y memoria de sólo lectura. En algunas modalidades, el procesador **58** y la memoria **54** pueden combinarse en un solo chip. La memoria **54** almacena instrucciones para realizar el método ilustrativo así como los datos procesados.

50 La interfaz de red **60**, **64** permite que el ordenador se comunique con otros dispositivos a través de un enlace cableado o inalámbrico, por ejemplo, una red informática, tal como una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN), o Internet, y puede comprender un modulador/demodulador (MODEM), un enrutador, un cable y/o puerto Ethernet.

55 El dispositivo de procesador digital **58** puede realizarse de diversas formas, tal como por un procesador de un solo núcleo, un procesador de doble núcleo (o más generalmente por un procesador de múltiples núcleos), un procesador digital y un coprocesador matemático cooperante, un controlador digital, o similar. El procesador digital **58**, además de ejecutar las instrucciones **56**, también puede controlar el funcionamiento del sistema de procesamiento **33**.

60 Las instrucciones ilustradas **56** incluyen un componente sensor **66**, un componente de intensidad **68**, un componente de ocupación fraccional **70**, un componente de concentración **72**, un componente de movimiento **74** y un componente de salida **76**.

Brevemente, el componente sensor **66** recibe datos de sensor **32** de uno o más arreglos de nanoestructuras para cada una de una pluralidad de tiempos (o ventanas de tiempo, tal como al menos 5, 10, 20 o más veces). El componente de intensidad **68** determina los datos de intensidad **78** para uno o más arreglos de nanoestructuras, en base a los datos de sensor **32** para cada una de la pluralidad de tiempos. El componente **70** de ocupación fraccional determina los datos **80** de ocupación fraccional para los arreglos de nanoestructuras, en base a los datos **78** de intensidad, para cada una de la pluralidad de tiempos. El componente de concentración **72** determina los datos de concentración extracelular **82** del analito, en base a los datos de ocupación fraccional **80**, para cada una de la pluralidad de tiempos.

En algunas modalidades particulares, el sistema **52** comprende un chip de imagenología por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi) **76**, que incluye un cubreobjetos de vidrio y uno o más arreglos de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas modeladas en el cubreobjetos de vidrio en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva. En modalidades particulares, el componente de sensor **66** recibe datos de sensor de entradas **60** tal como uno o más arreglos de nanoestructuras en el chip LSPRi **76** durante una pluralidad de tiempos. En modalidades particulares, los datos del sensor pueden comprender imágenes de campo claro y/o imágenes LSPRi del chip LSPRi **76** tomadas por entradas adicionales **60** tal como un dispositivo acoplado por carga **76**.

El componente de intensidad **68** determina los datos de intensidad para uno o más arreglos de nanoestructuras en base a los datos de sensor recibidos por el componente de sensor **66**. En modalidades particulares, el componente de intensidad **68** determina los datos de intensidad para cada una de los arreglos y para cada una de la pluralidad de tiempos. De acuerdo con algunas modalidades, al menos uno de los uno o más arreglos se selecciona como un arreglo de control para restar de los arreglos experimentales. En otras modalidades, los datos de intensidad se determinan normalizando la intensidad media de cada uno de los uno o más arreglos de nanoestructuras durante una pluralidad de tiempos.

El componente **70** de ocupación fraccional determina los datos de ocupación fraccional para uno o más arreglos de nanoestructuras en base a los datos de intensidad determinados por el componente de intensidad **68**. En modalidades particulares, el componente **70** de ocupación fraccional determina datos de ocupación fraccional para cada una de la pluralidad de tiempos. De acuerdo con modalidades ilustrativas, se añade una cantidad saturante de analito al chip LSPRi al final del experimento, y se usa una relación entre los datos de intensidad y la ocupación fraccional para determinar los datos de ocupación fraccional.

El componente de concentración **72** determina los datos de concentración extracelular **82** para uno o más arreglos de nanoestructuras en base a los datos de ocupación fraccional determinados por el componente de ocupación fraccional **70**. En modalidades particulares, el componente de concentración **72** determina los datos de concentración **82** para cada una de la pluralidad de tiempos. En algunas modalidades, el componente **72** de concentración submuestra los datos de ocupación fraccional **80** durante la pluralidad de tiempos para determinar los datos de concentración **82** para cada una de la pluralidad de tiempos. En modalidades particulares, los datos de concentración **82** se determinan como una distribución de probabilidad de concentraciones potenciales para cada uno de los uno o más arreglos de nanoestructuras. En modalidades ilustrativas, los datos de concentración **82** se determinan como se describió en el método anterior.

El componente de movimiento **74** determina los datos de movimiento **84**, que indican el movimiento previsto del analito **40** en el fluido **20**, en base a los datos de concentración extracelular **82**. Esto se logra mapeando los datos de concentración extracelular para cada uno de los uno o más arreglos de nanoestructuras en la pluralidad de tiempos para proporcionar datos de concentración espacio-temporales.

El componente de salida **76** emite información **86**, que puede incluir uno o más de: los datos de concentración **82**, los datos de movimiento **84** y/o información en base a los mismos.

En una modalidad, el sistema **1** no incluye un espectrómetro. En esta modalidad, el componente de sensor **66** no recibe datos de sensor **32** de un espectrómetro, y el componente de intensidad **68** y el componente de ocupación fraccional **70** determinan los datos de intensidad y los datos de ocupación fraccional sin datos de un espectrómetro. En otra modalidad, el sistema **1** puede integrarse con técnicas de microscopía celular tradicionales, tal como imágenes de fluorescencia y/o campo claro, a las que puede accederse mediante la conmutación automática de un cubo de filtro. En algunas modalidades, la formación de imágenes de luz transmitida y/o la formación de imágenes de fluorescencia pueden realizarse simultáneamente con la formación de imágenes LSPR.

El término "software", tal como se usa en la presente descripción, pretende abarcar cualquier colección o conjunto de instrucciones ejecutables por un ordenador u otro sistema digital para configurar el ordenador u otro sistema digital para realizar la tarea que es la intención del software. El término "software", tal como se usa en la presente descripción, pretende abarcar las instrucciones almacenadas en un medio de almacenamiento tal como RAM, un disco duro, disco óptico, etc. una ROM o así sucesivamente. Tal software puede organizarse de diversas formas y puede incluir componentes de software organizados tal como bibliotecas, programas en base a Internet almacenados en un servidor remoto o así sucesivamente, código fuente, código interpretativo, código objeto, código

directamente ejecutable, etc. Se contempla que el software pueda invocar código a nivel de sistema o llamadas a otro software que resida en un servidor u otra ubicación para realizar ciertas funciones.

Con referencia a la Figura 6, se ilustra un método implementado por ordenador para determinar concentraciones extracelulares de un analito. El método comienza en S100.

En S102, los datos del sensor **32** son recibidos por el sistema de procesamiento **33** desde uno o más arreglos **34** de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas **16**. En modalidades particulares, los datos del sensor pueden recibirse mediante el uso de un dispositivo de carga acoplada **24**, tal como una cámara CCD. En otras modalidades, los datos del sensor pueden comprender formas adicionales de datos de sensor, tal como datos de sensor de técnicas de formación de imágenes por fluorescencia y campo claro. En modalidades ilustrativas, los datos de sensor no se reciben mediante el uso de un espectrómetro óptico.

En S104, se determinan los datos de intensidad **78** para los arreglos **34** de nanoestructuras **16**.

En S106, los datos de ocupación fraccional **80** para los arreglos **34** de nanoestructuras **16** se determinan en base a los datos de intensidad **78**. La ocupación fraccional, denotada f , representa la fracción de los arreglos **34** de nanoestructuras **16** que tienen una molécula de analito **40** unida a ellas.

En S108, se determinan los datos **82** de concentración extracelular del analito, en base a los datos **80** de ocupación fraccional de los arreglos **34** de nanoestructuras **16**. Con el fin de determinar la concentración de analito a partir de los datos de sensor, la característica cualitativa del brillo del arreglo **34** en la cámara CCD **24** se cuantifica en términos de los datos de ocupación fraccional.

Opcionalmente, en S110, el movimiento de un analito extracelular puede determinarse espacial y temporalmente en base a los datos de concentración extracelular **82**. En modalidades particulares, los datos de concentración extracelular se determinan para uno o más de los arreglos **34** de nanoestructuras **16**. En base a los datos de concentración extracelular determinados, las distribuciones de probabilidad de la concentración para cada arreglo **34** pueden mapearse tanto en tiempo como en espacio, por ejemplo, para una secuencia de 5, 10, 20, 100 o más intervalos de tiempo de al menos 1, 5, 10 o más segundos, o hasta 100 o 1000 segundos, en un intervalo espacial que se extiende al menos 1, 10, 20, 50 o 100 μm , o más, desde el centro de la celda.

En S112, se emite información, tal como datos de concentración, datos de movimiento, información en base a ellos o una combinación de los mismos.

El método termina en S114.

El método que se ilustra en la Figura 6 puede implementarse en un producto de programa informático que puede ejecutarse en un ordenador. El producto de programa informático puede comprender un medio de grabación legible por ordenador no transitorio en el que se graba (almacena) un programa de control, tal como un disco, disco duro o similar. Las formas comunes de medios legibles por ordenador no transitorios incluyen, por ejemplo, disquetes, discos flexibles, discos duros, cinta magnética o cualquier otro medio de almacenamiento magnético, CD-ROM, DVD o cualquier otro medio óptico, una RAM, un PROM, EPROM, FLASH-EPROM u otro chip o cartucho de memoria, o cualquier otro medio no transitorio desde el cual un ordenador pueda leer y usar. El producto del programa de ordenador puede ser integral con el ordenador (por ejemplo, un disco duro interno de RAM), o puede estar separado (por ejemplo, un disco duro externo conectado operativamente con el ordenador), o puede estar separado y acceder a través de un Red de datos digitales, tal como una red de área local (LAN) o Internet (por ejemplo, tal como un arreglo redundante de discos económicos o independientes (RAID) u otro almacenamiento de servidor de red al que el ordenador accede indirectamente, a través de una red digital).

Alternativamente, el método puede implementarse en medios transitorios, tal como una onda portadora transmisible en la que el programa de control se incorpora como una señal de datos mediante el uso de medios de transmisión, tal como ondas acústicas o de luz, tal como las generadas durante las comunicaciones de datos por ondas de radio e infrarrojos, y similares.

El método ilustrativo puede implementarse en una o más ordenadores de propósito general, ordenador(es) de propósito especial, un microprocesador o microcontrolador programado y elementos de circuito integrado periférico, un ASIC u otro circuito integrado, un procesador de señal digital, un circuito electrónico o lógico cableado como un circuito de elemento discreto, un dispositivo lógico programable como PLD, PLA, FPGA, CPU de tarjeta Gráfica (GPU) o PAL, o similares. En general, cualquier dispositivo, capaz de implementar una máquina de estados finitos que a su vez sea capaz de implementar el diagrama de flujo que se muestra en la Figura 6, puede usarse para implementar el método para determinar las concentraciones extracelulares de un analito. Como se apreciará, aunque todas las etapas del método pueden implementarse por ordenador, en algunas modalidades una o más de las etapas pueden realizarse al menos parcialmente de manera manual. Como también se apreciará, no es necesario que todas las etapas del método procedan en el orden ilustrado y pueden realizarse menos, más o diferentes etapas.

Ahora se proporcionarán más detalles del sistema y del método.

En la modalidad ilustrativa, los datos de intensidad de imagen **78** se determinan (en S104) en base a los datos de sensor **32** recibidos desde el dispositivo de carga acoplada **24**, sin el uso de un espectrómetro. Para determinar los datos de intensidad **78**, la intensidad media $I(t)$, en el tiempo t de cada arreglo **34**, medida por el dispositivo de carga acoplada **24**, se normaliza, por ejemplo, dividiendo la diferencia entre $I(t)$ e I_0 por un valor constante para obtener un valor de intensidad normalizado en el tiempo t :

$$I_N(t) = (I(t) - I_0) / (I_f - I_0),$$

donde I_0 e I_f son los valores de intensidad del arreglo inicial y saturada **34**, respectivamente.

Quando se usa un espectrómetro convencional, la ocupación fraccional muestra una relación no lineal con la intensidad de la imagen, lo que dificulta su cuantificación. Sin embargo, se ha descubierto que existe una relación lineal entre los datos de intensidad de imagen normalizados recibidos de los sensores que usan una cámara CCD **24** y los datos de ocupación fraccional. Por lo tanto, es posible determinar datos de ocupación fraccional sin el uso de un espectrómetro. Se ha observado que esta relación se mantiene tanto si el analito es, por ejemplo, un anticuerpo de 150 kDa, tal como las proteínas anti-c-myc o neutravidina de 60 kDa que se unen a una superficie biotinilada. Sin embargo, si la cámara CCD **24** tiene una fuerte dependencia de la longitud de onda de su eficiencia cuántica (QE) en las proximidades de la resonancia, tienden a introducirse no linealidades. El tamaño y el paso (es decir, el espacio entre) las nanoestructuras **16** pueden diseñarse de manera que la resonancia se ubique en una región relativamente plana de la respuesta QE de la cámara **24** mientras que también se desplaza al rojo de las longitudes de onda de excitación usadas para las etiquetas fluorescentes comunes, tal como GFP y proteína roja fluorescente (RFP).

La Figura 7 muestra un gráfico de la intensidad de imagen normalizada de una cámara CCD mediante el uso del aparato de la Figura 1 usando un arreglo de 400 nanoestructuras de nanoestructuras de oro con un paso de 500 nm excitadas con una lámpara halógena. El único arreglo de 20x20 está alineado con la fibra óptica.

La Figura 8 muestra la intensidad de la imagen normalizada frente a la ocupación fraccional determinada espectralmente obtenida en tres experimentos separados, ilustrando la relación lineal entre ellos. Los Experimentos 1 y 2 usan anticuerpos monoclonales anti-c-myc que se unen a un arreglo funcional c-myc en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y medios libres de suero, respectivamente, y el Experimento 3 usa la unión de neutravidina para nanoestructuras biotiniladas.

Los datos de ocupación fraccional **80** calculados en S106 pueden incluir la ocupación fraccional estimada (media) μ_i para un arreglo, y su varianza (por ejemplo, desviación estándar) σ_i , para cada una de M imágenes en el tiempo t_i , donde i es un índice que hace referencia a los datos recopilados de la i -ésima imagen de M imágenes, donde M puede ser el número de arreglos **34**. Estos datos LSPRI procesados pueden denominarse $D = \{t_i, \mu_i, \sigma_i | i = 1, \dots, M\}$.

En modalidades particulares, los datos de ocupación fraccional se determinan para uno o más de los arreglos **34** de nanoestructuras funcionalizadas **16**.

Con base en los datos de ocupación fraccional, la ley de acción de masas puede aplicarse para determinar la concentración de analito, C, mediante el uso de la fórmula:

$$\dot{f} = k_a C \cdot (\bar{1} - f) - k_d f,$$

donde f es la derivada en el tiempo de la ocupación fraccional f , k_a es la constante de velocidad de asociación para las nanoestructuras funcionalizadas **16**, y k_d es la constante de velocidad de disociación para las nanoestructuras funcionalizadas **16**.

Para este enfoque, $\bar{f}$ y $\dot{f}$, junto con sus incertidumbres relacionadas, primero se determinan conjuntamente. En modalidades particulares, la etapa de determinar los datos de concentración extracelular del analito incluye en primer lugar submuestrear los datos de ocupación fraccional mediante el uso de un filtro temporal **42** sobre la pluralidad de tiempos, y calcular los datos de ocupación fraccional derivados del tiempo, tal como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 9-11.

Con referencia a la Figura 9, los datos de ocupación fraccional se grafican una pluralidad de tiempos. Se muestra una ventana de tiempo o filtro temporal **42**. Los datos de ocupación fraccional dentro de la ventana están submuestreados. La ventana de tiempo **42** se mueve a lo largo del eje de tiempo submuestreando los datos de ocupación fraccional dentro de cada ventana **42**. La ventana de tiempo **42** mostrada tiene un centro en el tiempo t'_c y una anchura h , que representa un intervalo de tiempo.

La ocupación fraccional derivada del tiempo puede determinarse en base a los datos de ocupación fraccional submuestreados. En algunas modalidades, se calculan uno o más modelos lineales locales **44** para cada uno de los casos de submuestreo en base a la ventana de tiempo **42**. Específicamente, un modelo de la media de ocupación fraccional $\bar{f}$ y un modelo de la media de tiempo derivado de ocupación fraccional $\dot{f}$ se determinan, en base a los modelos lineales locales **44** calculados para cada submuestra de datos de ocupación fraccional.

La Figura 10 es una vista ampliada de las muestras alrededor de t'_c de la Figura 9. Las barras verticales representan la desviación estándar σ_i , para cada punto de datos de ocupación fraccional, μ_i . Se muestra una pluralidad de modelos lineales locales **44** que podrían ajustarse a los datos (dada la desviación predicha σ_i) para la ventana de tiempo **42**, centrada en el tiempo t'_{cy} con un ancho h .

Dada la distribución normal (μ_i, σ_i) para la ocupación fraccional en cada t_i , puede determinarse la probabilidad de que cada uno de los diferentes modelos lineales locales **44** que expliquen los datos y se seleccione el más probable. Cada ventana de tiempo o filtro temporal **42** da un peso W_i a los datos submuestreados aumentando la varianza de los datos en el intervalo de h . Específicamente, los datos de ocupación fraccional más alejados del centro t'_c de la ventana de tiempo **42** contribuyen menos a los modelos lineales locales **44** que los datos de ocupación fraccional más cercanos al centro t'_c .

En modalidades particulares, la probabilidad de diferentes modelos lineales locales que se ajustan a los datos puede expresarse y determinarse mediante el uso de una fórmula de probabilidad logarítmica negativa:

$$L = -\ln p(f, \dot{f}|t, h; D)$$

$$= \sum_{i=1}^n \left(w(t_i|t, h) \cdot \frac{[f + \dot{f} \cdot (t_i - t) - \mu_i]^2}{2\sigma_i^2} \right)$$

+ opcionalmente términos independientes de $\bar{f}$ y $\dot{f}$)

donde $w(t_i|t, h)$ son los pesos asignados a t_i por el filtro temporal **42**, e i es un índice que hace referencia a una pluralidad de puntos de datos de 1 a n puntos de datos.

Pueden usarse varias funciones para $w(t_i|t, h)$ que definen el filtro temporal **42**. En algunas modalidades, la función que define el filtro temporal **42** puede ser un perfil gaussiano genérico, que se muestra esquemáticamente como gráficos de barras **50** en la Figura 9. Por ejemplo, el filtro temporal puede estar dado por la ecuación:

$$w(t_i|t, h) = e^{-(t_i - t)^2 / 2h^2}$$

donde t es el centro de la ventana de tiempo **42** y h es el ancho de la ventana de tiempo **42**.

En otras modalidades, puede elegirse como filtro una función simétrica de escala de ubicación diferente (por ejemplo, Lorentzian, Epanechnikov). La función elegida debe ser positiva y tener un valor máximo de uno.

El ancho, h , es un parámetro libre que puede fijarse para todo el conjunto de datos o configurarse de forma adaptativa para cada centro t . La propiedad estadística de la compensación de sesgo-varianza es una consideración al seleccionar h , porque un ancho estrecho (h pequeña) proporciona una estimación muy local de $\bar{f}$ y $\dot{f}$ pero una gran variación debido al pequeño número de muestras ruidosas. Un ancho más amplio (h grande) muestrea más datos y reduce la varianza, pero el sesgo aumentará si las no linealidades en $\bar{f}$ y $\dot{f}$ emergen en grandes escalas de tiempo.

En modalidades particulares, la distribución de probabilidad, L , puede determinarse y expresarse como una distribución normal bivariada con cinco parámetros: $\bar{f}$, $\dot{f}$, p_{xx} , p_{xy} , y p_{yy} , en donde $\bar{f}$ y $\dot{f}$ son parámetros medios del

modelo determinados por los modelos lineales locales **44** y ρ_{xx} , ρ_{xy} , y ρ_{yy} son los elementos de la inversa de la arreglo de covarianza.

Mediante el uso del método de Laplace, puede usarse una expansión en serie de Taylor de L al segundo orden en el valor máximo de L para expresar L como una distribución normal bivariada:

$$L = \text{const.} + \frac{1}{2} \begin{pmatrix} f - \bar{f} \\ \dot{f} - \dot{\bar{f}} \end{pmatrix}^T \Sigma^{-1} \begin{pmatrix} f - \bar{f} \\ \dot{f} - \dot{\bar{f}} \end{pmatrix}, \quad \Sigma^{-1} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} \\ \sigma_{xy} & \sigma_{yy} \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} \rho_{xx} & \rho_{xy} \\ \rho_{xy} & \rho_{yy} \end{pmatrix}$$

en donde: T es la transpuesta, Σ es un arreglo de covarianza de 2 por 2 y los términos σ son los elementos de la arreglo de covarianza definidos por los términos de segundo orden de la expansión de la serie de Taylor.

Tomando las primeras derivadas de L con respecto a $\bar{f}$ y $\dot{\bar{f}}$, y establecerlos en cero produce un conjunto de ecuaciones para la ubicación, $\bar{f}$ y $\dot{\bar{f}}$, del valor máximo de L :

$$\left. \frac{\partial L}{\partial \bar{f}} \right|_{f=\bar{f}, \dot{f}=\dot{\bar{f}}} = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \frac{\bar{f} + \dot{\bar{f}} \cdot (t_i - t) - \mu_i}{\sigma_i^2} = 0$$

$$\left. \frac{\partial L}{\partial \dot{\bar{f}}} \right|_{f=\bar{f}, \dot{f}=\dot{\bar{f}}} = \sum_{i=1}^n w_i \cdot (t_i - t) \cdot \frac{\bar{f} + \dot{\bar{f}} \cdot (t_i - t) - \mu_i}{\sigma_i^2} = 0$$

Tomar las segundas derivadas de L proporciona las ecuaciones para la matriz de covarianza inversa:

$$\rho_{xx} = \frac{\partial^2 L}{\partial \bar{f}^2} = \sum_{i=1}^M \frac{w_i}{\sigma_i^2}, \quad \rho_{xy} = \frac{\partial^2 L}{\partial \bar{f} \partial \dot{\bar{f}}} = \sum_{i=1}^M \frac{w_i}{\sigma_i^2} \cdot (t_i - t), \quad \text{y} \quad \rho_{yy} = \frac{\partial^2 L}{\partial \dot{\bar{f}}^2} = \sum_{i=1}^M \frac{w_i}{\sigma_i^2} \cdot (t_i - t)^2$$

en modalidades particulares, debido a que ningún término adicional depende de $\bar{f}$ y $\dot{\bar{f}}$, la parametrización de L como distribución normal bivariada es exacta para modelos lineales.

Las segundas derivadas pueden usarse para reescribir las ecuaciones anteriores como:

$$\rho_{xx} \bar{f} + \rho_{xy} \dot{\bar{f}} = \underbrace{\sum_{i=1}^M \frac{w_i}{\sigma_i^2} \mu_i}_{\equiv a} \quad \rho_{xy} \bar{f} + \rho_{yy} \dot{\bar{f}} = \underbrace{\sum_{i=1}^M \frac{w_i}{\sigma_i^2} \mu_i \cdot (t_i - t)}_{\equiv b}$$

y resuelto para obtener:

$$\bar{f} = \frac{\rho_{yy} a - \rho_{xy} b}{\rho_{xx} \rho_{yy} - \rho_{xy}^2} \quad \text{y} \quad \dot{\bar{f}} = \frac{\rho_{xx} b - \rho_{xy} a}{\rho_{xx} \rho_{yy} - \rho_{xy}^2}$$

donde a y b son sumas sobre la media ponderada y la media ponderada multiplicada por su diferencia de tiempo, respectivamente.

La distribución de probabilidad normal bivariada para $p(\bar{f}, \dot{\bar{f}} | t, h; D)$ puede expresarse como:

Por lo tan
procesad

En moda
distribució

$$p(f, \dot{f}|t, h; D) = \frac{(\rho_{xx}\rho_{yy} - \rho_{xy}^2)^{1/2}}{2\pi} \cdot \exp \left[-\frac{1}{2} \begin{pmatrix} f - \bar{f} \\ \dot{f} - \bar{\dot{f}} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} \rho_{xx} & \rho_{xy} \\ \rho_{xy} & \rho_{yy} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f - \bar{f} \\ \dot{f} - \bar{\dot{f}} \end{pmatrix} \right] \quad \text{los LSPRi como una}$$

$$p(c|t, h; D) = \frac{1}{Z} \int_0^1 df \int_{-\infty}^{\infty} d\dot{f} p(c|f, \dot{f}) p(f, \dot{f}|t, h; D)$$

donde c es una concentración adimensional definida por $c = C/K_D = k_d/k_a$,

Z es una función de normalización, que puede definirse por

$$Z = \int_0^{\infty} dc p(c|t, h; D),$$

y

$p(f, \dot{f}|t, h; D)$ es una distribución normal bivariada como se describió anteriormente.

Integrando sobre los parámetros del modelo f y $\dot{f}$, puede determinarse la distribución de probabilidad de la concentración c , en cada momento t , de interés, asumiendo un modelo de unión cinética particular representado por $p(c|f, \dot{f})$.

La probabilidad $p(c|f, \dot{f})$ representa la relación de la ocupación fraccional con la concentración y, por lo tanto, es la contribución del modelo de unión cinética. Una ecuación determinista que relaciona estas cantidades con base en la Ley de Acción de Masas puede expresarse como:

$$c = \gamma(f, \dot{f}),$$

donde

$$\gamma(f, \dot{f}) \equiv \frac{k_d^{-1} \dot{f} - f}{1 - f}$$

Por lo tanto, $p(c|f, \dot{f})$ puede expresarse como:

$$p(c|f, \dot{f}) \propto \delta(c - \gamma(f, \dot{f}))$$

y la integral bidimensional puede reducirse a una integral de línea:

$$\begin{aligned} p(c|t, h; D) &= \frac{1}{Z} \int_0^1 df \int_{-\infty}^{\infty} d\dot{f} \delta(c - \gamma(f, \dot{f})) p(f, \dot{f}|t, h; D) \\ &= \frac{1}{Z} \sqrt{1 + (1 + c)^2} \int_0^1 df p(f, \dot{f}(c, f)|t, h; D) \end{aligned}$$

donde

$$\dot{f}(c, f) = k_d c - k_d(1 + c) \cdot f.$$

Finalmente, la integral puede determinarse numéricamente en cada tiempo t sobre valores suficientes de c para estimar el ancho de la distribución de probabilidad y, por lo tanto, el error asociado.

La distribución de probabilidad de c , $p(c|t,h;D)$, puede expresarse como:

$$p(c|t,h;D) = \frac{1}{Z(t,h;D)} \sqrt{1 + (1+c)^2} \cdot e^{-\frac{1}{2}G + \frac{B^2}{2A}} \int_0^1 df e^{-\frac{A}{2}(f - \frac{B}{A})^2}$$

donde los coeficientes A , B y G , son funciones de la concentración y de los parámetros de la distribución normal bivariada, pero son independientes de f :

$$A(c) = \rho_{xx} - 2k_d\rho_{xy}(1+c) + k_d^2\rho_{yy}(1+c)^2$$

$$B(c) = \rho_{xx}\bar{f} + k_d\rho_{xy}\left(k_d^{-1}\bar{\dot{f}} - c - \bar{f} \cdot (1+c)\right) - k_d^2\rho_{yy}\left(k_d^{-1}\bar{\dot{f}} - c\right) \cdot (1+c)$$

$$G(c) = \rho_{xx}\bar{f}^2 + 2k_d\rho_{xy}\bar{f}\left(k_d^{-1}\bar{\dot{f}} - c\right) + 2k_d^2\rho_{yy}\left(k_d^{-1}\bar{\dot{f}} - c\right)^2$$

Cada uno de los coeficientes A , B y G son adimensionales.

Con referencia a la Figura 11, se ilustra esta integración. Cada modelo lineal local **44** es un punto en el plano $\bar{f}$ - $\bar{\dot{f}}$ **46**.

Todos los posibles modelos lineales locales **44** se resumen mediante la distribución de probabilidad $p(\bar{f}, \bar{\dot{f}}|t,h;D)$, una

distribución normal bivariada (representada como contornos elípticos) **48** con cinco parámetros: el valor medio $(\bar{f}, \bar{\dot{f}})$

y las entradas $(\sigma_{xx}, \sigma_{xy}, \sigma_{yy})$ en la matriz de covarianza Σ de 2 por 2. Mediante el uso de la ley de acción de masas para el modelo de unión cinética, puede asignar una concentración a cada punto $(\bar{f}, \bar{\dot{f}})$. La probabilidad de una

concentración c particular, en un tiempo t , se determina integrando $p(\bar{f}, \bar{\dot{f}}|t,h;D)$ a lo largo de las líneas de

concentración constante que se muestran como las líneas discontinuas que irradian desde el punto $(1, -1)$. El valor constante de la concentración de cada línea aumenta en el sentido de las agujas del reloj, y cada integral de línea se evalúa sucesivamente para determinar $p(c|t,h;D)$ para todo c .

La integral de Gauss en el intervalo de 0 a 1 puede resolverse en términos de funciones de error, $erf(x)$. En otras modalidades, la integral se determina mediante el uso de integración numérica. Por ejemplo, la distribución de probabilidad de concentraciones extracelulares se resuelve mediante el uso de la función integral en MATLAB, que emplea cuadratura adaptativa global. La distribución de probabilidad de las concentraciones puede determinarse mediante la repetición de la integral en una malla logarítmica de manera uniforme en el espacio de los valores de c que van desde 10^{-4} hasta 10^5 para cada una de una pluralidad de tiempos t . Por ejemplo, el cálculo puede repetirse para al menos 100, o al menos 500, o al menos 1000, valores de c .

En modalidades particulares, la función de normalización Z se calcula mediante integración numérica no adaptativa mediante el uso de únicamente los valores de c seleccionados.

Las distribuciones de probabilidad resultantes $p(c|t,h;D)$ pueden sumarse en subintervalos de c para producir intervalos de confianza en cada tiempo t , típicamente al 5% y 95% de la probabilidad total.

Se contemplan diversas aplicaciones del sistema y del método. En un entorno de cocultivo, la naturaleza sin etiquetas de las mediciones permite que las mediciones de concentración absoluta y el gradiente de concentración de un tipo de célula se correlacionen con la respuesta de otro, lo cual es útil para determinar las relaciones causales entre las secreciones y las respuestas celulares tal como la motilidad y la división. A nivel de células individuales, la técnica puede usarse para identificar secreciones polarizadas útiles en la biología del desarrollo y la migración celular. Además, el hecho de que la técnica se integre con las técnicas comúnmente usadas en microscopía de fluorescencia permite investigaciones de las células tanto con etiqueta como sin etiqueta. Las aplicaciones de impresión, tal como la litografía de chorro de tinta y la litografía por inmersión, pueden usarse para ampliar la funcionalidad de aplicaciones de multiplexación capaces de cuantificar una variedad de proteínas secretadas en paralelo.

Sin pretender limitar el alcance de la modalidad ilustrativa, los siguientes ejemplos ilustran la aplicación del sistema y del método.

Ejemplos

1. Fabricación y Funcionalización de Nanoestructuras Plasmónicas

Se modelaron arreglos de nanoestructuras sobre cubreobjetos de vidrio Núm. 1,5 girando una estructura protectora de dos capas que consta de polimetacrilato de metilo y copolímero de metacrilato de metilo de lactato de etilo con espesores de 180 nm y 250 nm respectivamente. La reserva se modeló con haz de electrones mediante el uso de dosis de $300 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ y posteriormente se desarrolló durante un minuto en una solución 2:1 de alcohol isopropílico:metil isobutil cetona. Se depositó una capa de 5 nm de Ti seguida de 70 nm de Au en un evaporador de haz de electrones Temescal. A continuación, se retiró la capa protectora de bicapa sumergiéndola en acetona durante 4 horas.

Se usó incineración de plasma de radiofrecuencia (RF) (40 W) con 300 mTorr de una mezcla de hidrógeno al 5% y argón al 95% para limpiar las superficies de vidrio y oro de las astillas. Las nanoestructuras de oro se funcionalizaron en un baño de tior de base etanólica de dos componentes (0,5 mM), que contenía una proporción de 3:1 de $\text{SH}-(\text{CH}_2)_8\text{-EG}_3\text{-OH}$ to $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_3\text{-NH}_2$ durante 18 horas, donde EG significa monómero de etilenglicol. El extremo amina se hizo reaccionar con una solución de 10 mg/mL del reticulante heterobifuncional sulfo-N-succinimidil-4-formilbenzamida (Solulink) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, seguido de una conjugación de péptido c-myc funcionalizado con hidrazina (Solulink) en tampón PBS a pH 6,0 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los estudios de biotina-neutravidina, se recubrió gota a gota el chip 0,3 mM de sulfo-NHS-biotina (Thermo) en PBS durante 30 min. Las virutas se enjuagaron con DDW y se secaron con gas nitrógeno. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-c-myc (Sigma) disponibles comercialmente para normalizar la respuesta del arreglo al final de cada experimento.

2. Configuración de Microscopía y Corrección de Deriva

La luz de la lámpara halógena se pasó primero a través de un filtro paso largo 594 y luego por el tren de iluminación Koehler de un microscopio invertido (Zeiss AxioObserver) antes de seguir la trayectoria de la luz descrita en la Figura 1. El objetivo usado fue un objetivo de inmersión en aceite de apertura numérica de 63X, 1,46. Para las mediciones espectrales, se usó una fibra óptica de 600 μm de diámetro para recolectar la luz dispersa de un solo arreglo y se detectó con un espectrofotómetro en base a una CCD refrigerada termoelectricamente (Ocean Optics QE65000) en un tiempo de integración de 1 s. Para las imágenes se usó una cámara CCD termoelectrica (Hamamatsu ORCA R2) con tiempos de integración entre 200 y 250 ms. Un escenario calentado y un recinto con temperatura controlada mantuvieron la temperatura del escenario a $37,0 \pm 0,04 \text{ }^\circ\text{C}$ (Zeiss). La humedad y el CO_2 se regularon al 98% y al 5%, respectivamente, haciendo fluir una mezcla de gas y aire a través de una botella de agua caliente y dentro del recinto. La desviación en el plano se corrigió con el software de alineación de imágenes (Zeiss Axiovision) mientras que el enfoque se estabilizó mediante el uso de un dispositivo de corrección de enfoque de hardware integrado (Zeiss Definite Focus).

3. Cultivo de Células

Células del clon 9E10 de Hibridoma (ATCC) se cultivaron en medio de crecimiento completo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico/antimicótico en una incubadora de cultivo de tejidos humidificado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de 5% de CO_2 . Las células se mantuvieron a una densidad de $3\text{-}5 \times 10^5$ células/mL mediante la modalidad de pases cada dos días que mantuvieron la viabilidad a 90-95%. Antes de los estudios de LSPRI, las células se sedimentaron mediante centrifugación (900 rcf x 5 min) y se lavaron dos veces con RPMI-1640 SFM para la eliminación de los anticuerpos secretados y el suero. Para la obtención de imágenes, se inyectaron manualmente 75 μL de $0,5\text{-}2 \times 10^6$ células/mL de solución celular en la cámara de fluidos. La densidad de la superficie celular se controló permitiendo que las células se asentaran en la superficie durante 5 a 10 minutos y luego SFM fluyendo en comunicación de microfuidos para eliminar las que aún estaban en solución.

4. Análisis de los Datos

Todos los análisis se realizaron mediante el uso del entorno Matlab 2013b de acuerdo con modalidades ilustrativas de los métodos y los sistemas descritos en la presente descripción.

a. Medidas Simuladas

Con referencia a las Figuras 12-15, la determinación de los datos de concentración extracelular simulada se ilustra mediante el uso del método y el sistema descritos para las constantes de velocidad del ligando-receptor de $k_a = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 10^{-3}\text{s}^{-1}$, y $K_D = 1 \text{ nM}$. En la Figura 12, se muestra una función por partes de tres escenarios de concentración dependientes del tiempo simulados: un aumento gradual; un fuerte aumento; y una fuerte disminución. En la Figura 13 se muestra, la ocupación fraccional dependiente del tiempo se determinó resolviendo la

ecuación $\dot{f} = k_a C (1 - f) - k_d f$, con ruido gaussiano añadido típico, de una configuración experimental. En la Figura 14, se muestran los ajustes del modelo lineal local a la ocupación fraccional. En este ejemplo simulado, al filtro temporal se le da un ancho establecido h de 270 segundos. En la Figura 15, la concentración extracelular simulada C_{KD} se representa gráficamente en una pluralidad de tiempos de acuerdo con un aspecto de los métodos y sistemas descritos. Los círculos y las barras de error representan el modo determinado de la distribución de concentración dividido por K_D en un intervalo de confianza del 5% al 95%.

Debido a la tasa de asociación relativamente alta del par receptor-ligando, los aumentos de concentración lentos y rápidos se reproducen fielmente en el análisis con cierta curvatura en los vértices debido a la anchura del filtro. La etapa de concentración decreciente se reproduce pero con un retardo de tiempo de aproximadamente 250 segundos debido a la relativamente largo ligando del receptor de tiempo de unión media, $1/k_d = 1000$ segundos, que resulta en retraso sensibilidad a descensos bruscos de la concentración.

b. Secreciones de Estado Estacionario

Las secreciones en estado estacionario de un analito por varias células se cuantifican mediante el uso de los métodos y sistemas descritos. Se introdujeron células de hibridoma secretoras de anti-c-myc en un chip LSPRi con nanoestructuras funcionalizadas con c-myc **16**. La densidad de las células se ajustó de manera que el campo de visión incluyera de 2 a 3 células. A una distancia de 70 μm o más de las células, la concentración de anticuerpos secretados cayó por debajo del límite de detección del arreglo (aproximadamente 100 pM), lo que permite que esos arreglos se usen como controles negativos. Al tener tales arreglos de control en el mismo campo de visión, las variaciones de intensidad global, tal como las debidas a la deriva del enfoque, podrían restarse de la señal de los arreglos adyacentes a las células. Al final de cada experimento, se introdujo una solución saturante de anticuerpos comerciales anti-c-myc para normalizar la intensidad de LSPRi y calcular la ocupación fraccional. Las constantes de velocidad cinética usadas en el análisis se determinaron con un instrumento SPR comercial (BioRad XPR36) mediante el uso de un protocolo de funcionalización de superficie idéntico al de los sustratos nanoplásmicos: $k_a = 2.68 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 4.75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, y $K_D = k_d/k_a = 1.77 \text{ nM}$.

En la Figura 16, se muestra LSPRi fusionada e imágenes de campo claro que muestran dos células de hibridoma entre 12 arreglos de nanoestructuras plasmónicas. Los arreglos locales, etiquetadas como Arreglo 1 y Arreglo 2, se usaron para medir la concentración de anticuerpos cerca de las células superior e inferior, respectivamente, mientras que el arreglo remoto, etiquetado como Arreglo 3, se usó como control.

En la Figura 17, la ocupación fraccional determinada por LSPRi se muestra para el Arreglo 1 y el Arreglo 2 después de restar los datos del arreglo de control del Arreglo 3. Los datos de ocupación fraccional indican que la célula inferior secretaba a una tasa mayor que la célula superior.

En la Figura 18, los datos de concentración extracelular calculados para los arreglos 1 y 2 se muestran después de aplicar un filtro temporal con $h = 270$ segundos. Los símbolos y las barras de error representan la moda de la distribución de probabilidad de concentración dividida por K_D con un intervalo de confianza del 5% al 95%. Los datos de concentración muestran una concentración constante durante 40 minutos, tal como se esperaba para un escenario de secreción en estado estable, con una concentración promedio de 1,30 nM cerca de la célula inferior frente a 230 pM para la célula superior.

c. Aumento abrupto de Secreciones

Se introdujeron células de hibridoma secretoras de anti-c-myc en un chip LSPRi con nanoestructuras funcionalizadas con c-myc, tal como en el ejemplo de secreción en estado estacionario. La Figura 19 muestra imágenes LSPRi fusionadas y de campo claro que muestran un grupo de tres células de hibridoma entre 8 arreglos. Los arreglos etiquetados como arreglo 1 y arreglo 2 se usaron para medir la concentración a diferentes distancias de la célula, mientras que el arreglo etiquetado como arreglo 3 se usó como control. La Figura 20 muestra la ocupación fraccional determinada por LSPRi de los tres arreglos etiquetados. La Figura 21 muestra la concentración extracelular determinada para los tres arreglos etiquetados mediante el uso de un filtro temporal con una $h = 45 \text{ s}$. Los símbolos y las barras de error representan el modo calculado de la distribución de probabilidad de concentración dividido por el K_D en cada punto de tiempo con un intervalo de confianza del 5% al 95%.

El arreglo etiquetado como arreglo 1 midió un aumento en la ocupación fraccional que se elevó a 0,28 en el transcurso de 2 minutos. Esto está en marcado contraste con las células de la Figura 16 en el que se necesitaron 40 minutos para alcanzar una ocupación fraccional máxima de 0,08. La concentración para el arreglo 1, ubicado a 24 μm del centro de las tres células, alcanzó un máximo de 56 nM en 2 minutos. El rápido aumento y disminución de la concentración se resolvió mejor mediante el uso de un filtro temporal con $h = 45 \text{ s}$. El aumento abrupto de secreción también se registró mediante el arreglo 2 ubicado a 43 μm del centro de las tres células. La concentración máxima en este arreglo fue de 9 nM y se retrasó en el tiempo 91 segundos desde el arreglo 1, consistente con un aumento abrupto de anticuerpos secretados que se difunden hacia afuera desde las tres células.

d. Señal a Ruido contra el valor h

Los métodos y sistemas descritos en la presente descripción para determinar los datos de concentración extracelular son adaptables en el sentido de que la anchura del filtro temporal, tal como se describe mediante h , puede ajustarse para adaptarse mejor a los datos. Los valores de h más largos mejoran la relación señal/ruido (S/R) a expensas de reducir la resolución temporal.

Por ejemplo, con referencia a la Figura 22, la concentración determinada para el arreglo 2 en la Figura 16 se representó para $h = 270$ s y $h = 150$ s. La concentración sigue siendo la misma, pero el error es considerablemente menor para los puntos de datos de $h = 270$ s. Debido a la naturaleza del estado estable de la secreción, las barras de error se superpusieron para todos los datos y no se perdió información temporal al usar el valor de h más largo.

Con referencia a la Figura 23, se muestra el efecto de variar h sobre la relación S/R para las concentraciones determinadas del arreglo 2 de la Figura 16. En general, la S/R aumenta linealmente al aumentar los valores de h .

Una comparación de los valores de h usados en las Figuras 18 y 21 destaca el valor de adoptar un enfoque adaptativo para la determinación de datos de concentración extracelular. Los datos de la Figura 16, al ser del estado estable por naturaleza, pueden acomodar el valor de h más largo sin pérdida de información temporal y aprovechar la relación señal-ruido mejorada. En la Figura 21, sin embargo, la relación señal-ruido se reduce por el valor de h más corto, pero los picos en el tiempo se resuelven fácilmente. El intervalo dinámico de los sensores nanoplásmicos también se destaca por estas dos figuras, en las que el pico de 56 nM de la Figura 21 es 244 veces mayor que la concentración medida en la célula inferior de la Figura 16. En general, el sensor diseñado de manera óptima tendrá un valor K_D centrado dentro del intervalo de posibles secreciones.

Se apreciará que las variantes de lo descrito anteriormente y otras características y funciones, o alternativas de las mismas, pueden combinarse en muchos otros sistemas o aplicaciones diferentes. Los expertos en la técnica pueden realizar posteriormente diversas alternativas, modificaciones, variaciones o mejoras imprevistas o no anticipadas en las mismas, que también pretenden estar abarcadas por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar las concentraciones extracelulares de un analito (40), el método que comprende:

para cada una de una pluralidad de tiempos, recibir datos del sensor (32) de al menos un arreglo (34) de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas con ligando (16) de un chip (12) de formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi), el arreglo (34) está en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva (36);

determinar los datos de intensidad (78) para las nanoestructuras (16), en base a los datos del sensor (32) para cada una de la pluralidad de tiempos; y

determinar los datos de ocupación fraccional (80) para las nanoestructuras (16) en base a los datos de intensidad (78) para cada una de la pluralidad de tiempos, en donde los datos de ocupación fraccional (80) son una fracción de ligandos de superficie activa (38) unidos a analito (40); y

caracterizado porque el método incluye además una etapa de determinar los datos de concentración extracelular (82) del analito (40) en base a los datos de ocupación fraccional (80); y

los datos del sensor (32) se reciben del al menos un arreglo de sensores (34) mediante un dispositivo de carga acoplada (24), y los datos de ocupación fraccional (80) para las nanoestructuras (16) se determinan como una función lineal de los datos de la intensidad normalizada $I_N(t)$ que corresponde a:

$$I_N(t) = (I(t) - I_0) / (I_f - I_0)$$

en donde $I(t)$ es la intensidad media en el tiempo t de cada arreglo (34) e I_0 e I_f son los valores de la intensidad del arreglo inicial y saturado, respectivamente.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el analito (40) comprende una proteína secretada por al menos una célula (36).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método se realiza sin el uso de un espectrómetro.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los datos del sensor (32) se reciben desde un dispositivo de carga acoplada (24) posicionado para recibir emisiones de al menos uno de los arreglos (34).

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además determinar el movimiento del analito (40) en el fluido a partir de los datos de concentración extracelular mapeando los datos de concentración extracelular del analito (40) para cada uno de los al menos un arreglo (34) de nanoestructuras (16) sobre la pluralidad de tiempos.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además calibrar el chip LSPRi (12) saturando las nanoestructuras (16) con una concentración conocida del analito (40).

7. Un producto de programa informático que comprende medios no transitorios que almacenan instrucciones que, cuando se ejecutan por un ordenador, realizan el método de acuerdo con la reivindicación 1.

8. Un sistema implementado por ordenador para determinar los datos de concentración extracelular de un analito, el sistema comprende:

un chip de formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi) (12) que comprende:

un sustrato; y

al menos un arreglo (34) de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas (16) formada sobre el sustrato, estando el arreglo (34) de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas (16) en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva;

un componente de sensor (66) para recibir datos de sensor (32) de uno o más arreglos (34) de nanoestructuras (16) durante una pluralidad de tiempos;

un componente de intensidad (68) que determina los datos de intensidad (78) para el al menos un arreglo (34) de nanoestructuras (16), en base a los datos del sensor (32) para cada una de la pluralidad de tiempos;

un componente de ocupación fraccional (70) que determina datos de ocupación fraccional (80) para el al menos un arreglo (34) de nanoestructuras (16) en base a los datos de intensidad (78) para cada una de la pluralidad de tiempos; y **caracterizado porque** el sistema incluye un componente de concentración (72)

que determina los datos de concentración extracelular (82) del analito (40) en base a los datos de ocupación fraccional (80); y
un procesador (33) que implementa los componentes; y

los datos del sensor (32) se reciben desde el al menos un arreglo de sensores (34) por un dispositivo de carga acoplada (24), y
los datos de ocupación fraccional (80) para las nanoestructuras (16) se determinan como una función lineal de los datos de la intensidad normalizados $I_N(t)$ que corresponde a:

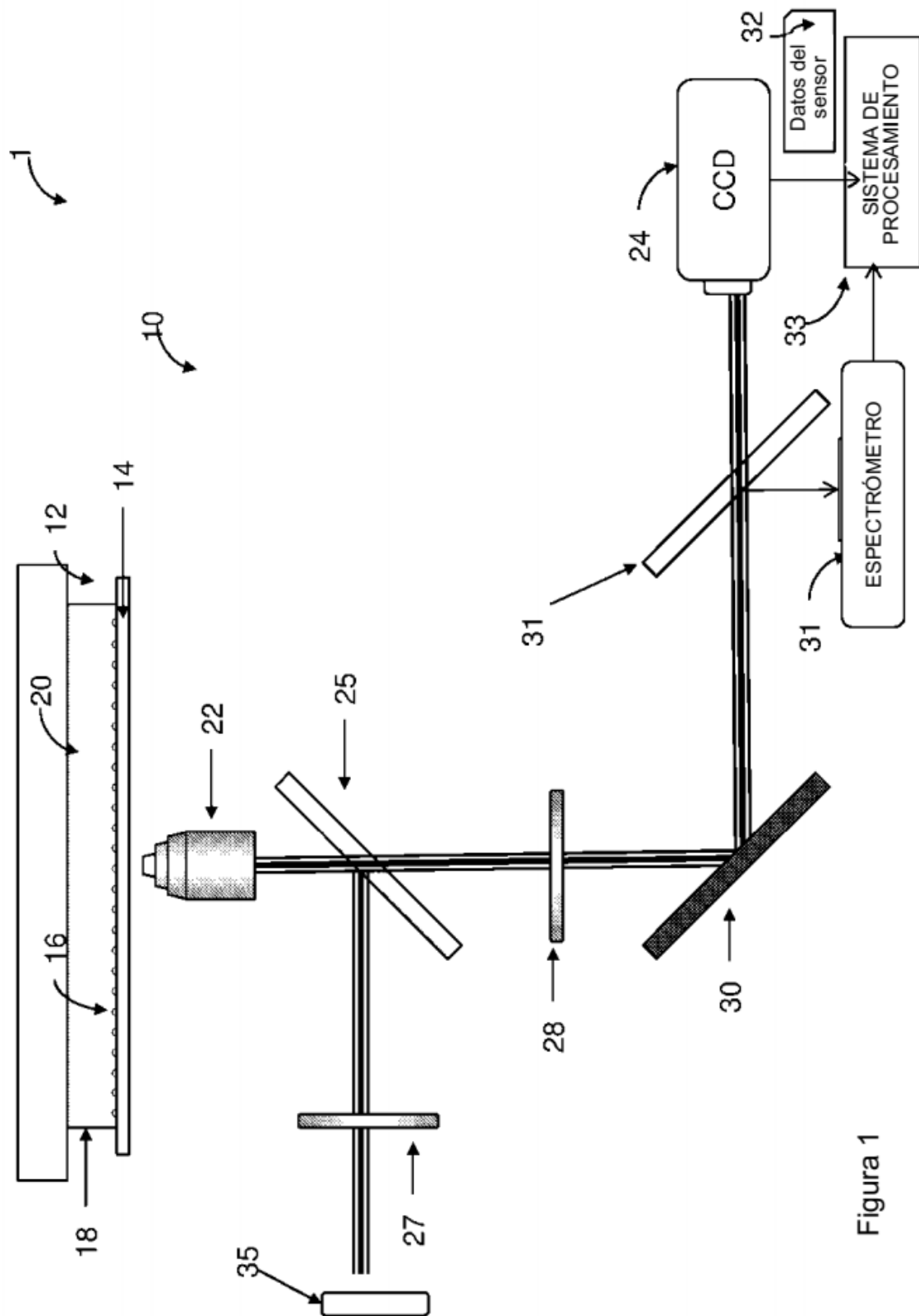
$$I_N(t) = (I(t) - I_0) / (I_f - I_0)$$

donde $I(t)$ es la intensidad media en el tiempo t de cada arreglo (34) e I_0 e I_f son los valores de intensidad del arreglo inicial y saturada, respectivamente.

9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el sistema comprende además un componente de movimiento (74) que determina el movimiento del analito (40) en el fluido (20) a partir de los datos de concentración extracelular (82) mapeando los datos de concentración extracelular para cada uno del al menos un arreglo (34) de nanoestructuras (16) en la pluralidad de tiempos; o el sistema comprende además un dispositivo de carga acoplada (24) posicionado para recibir emisiones del al menos un arreglo (34) de nanoestructuras (16).

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además las etapas de:

proporcionar al menos un arreglo (34) de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas (16) en un chip de formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizado (LSPRi) (12) en contacto con un fluido que contiene al menos una célula viva (36); y mapear espacial y temporalmente la concentración extracelular del analito en base a los datos de ocupación fraccional.



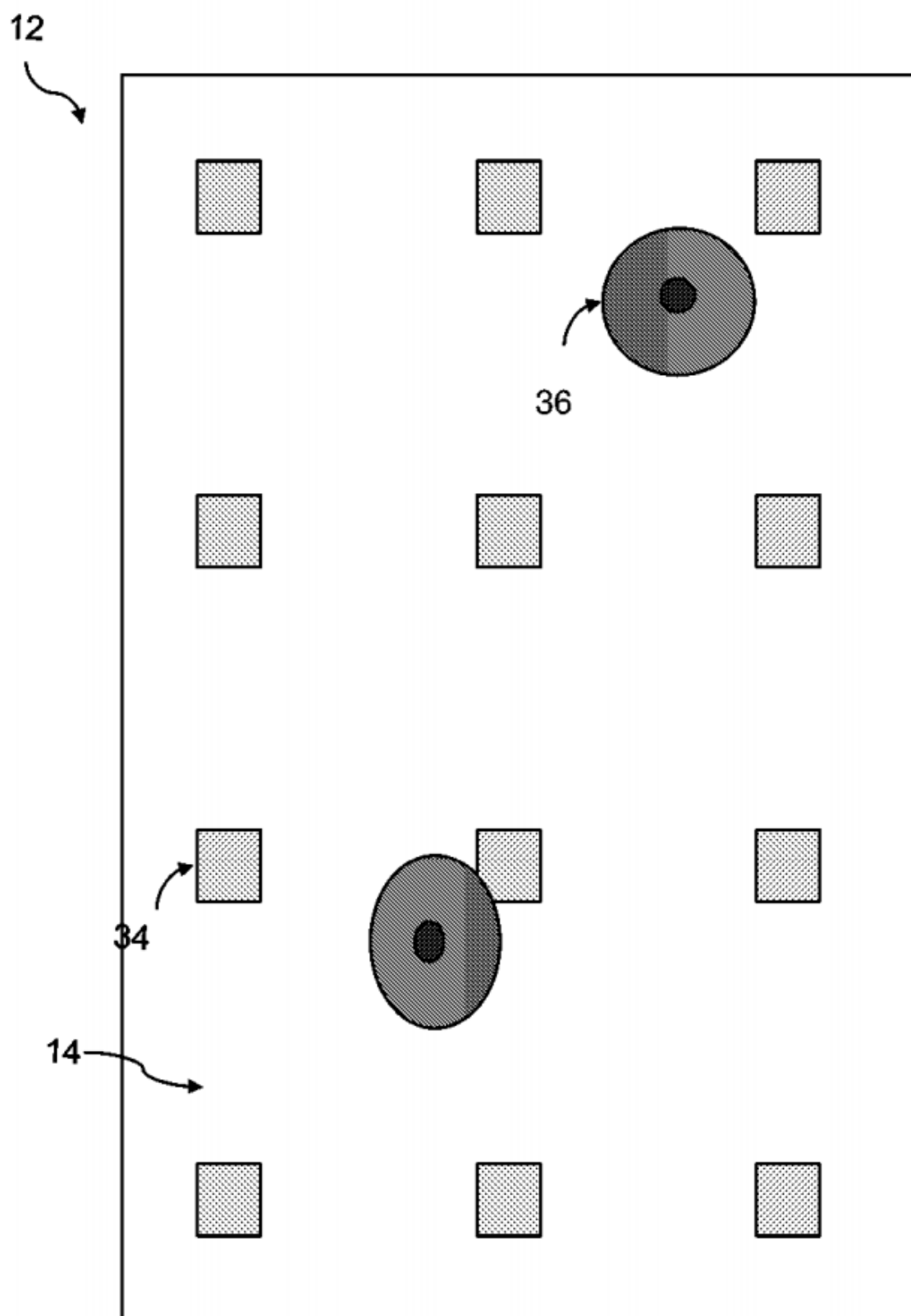


Figura 2

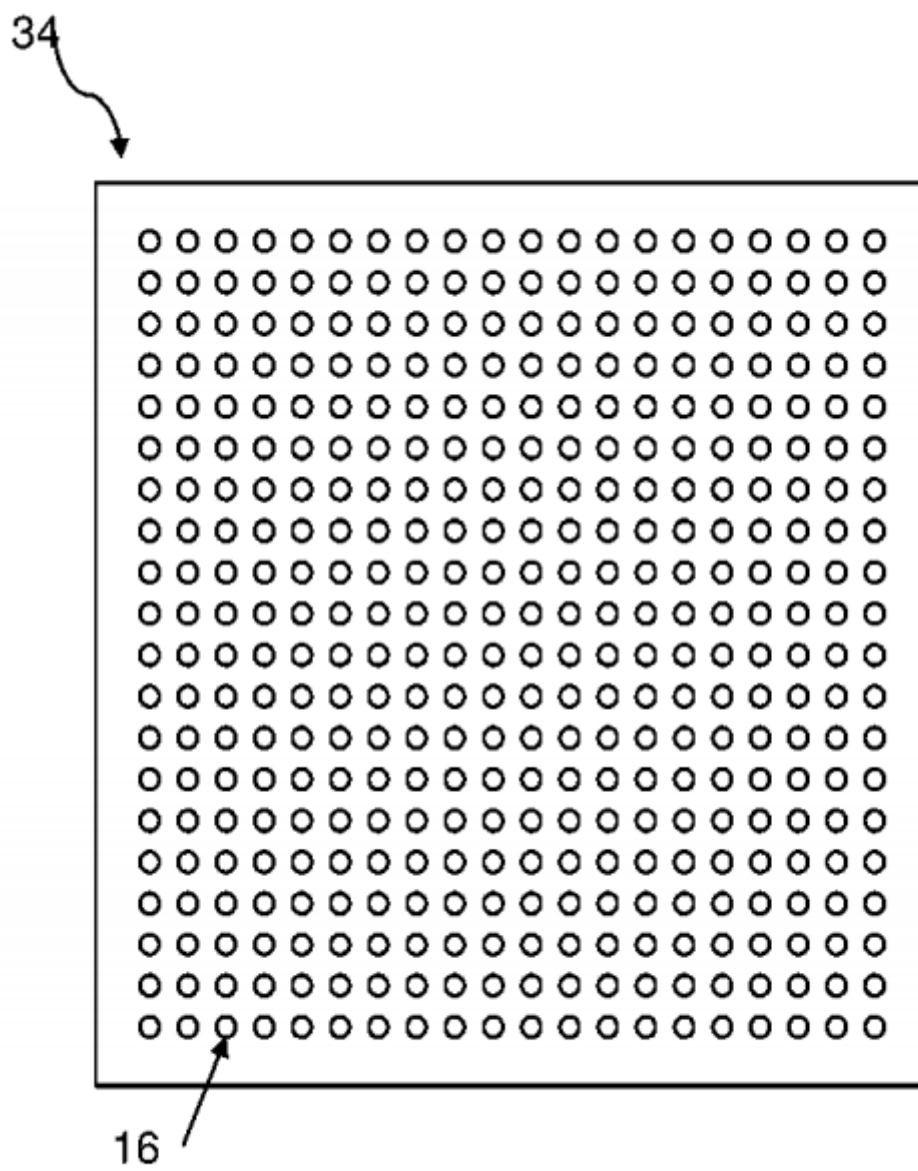


Figura 3

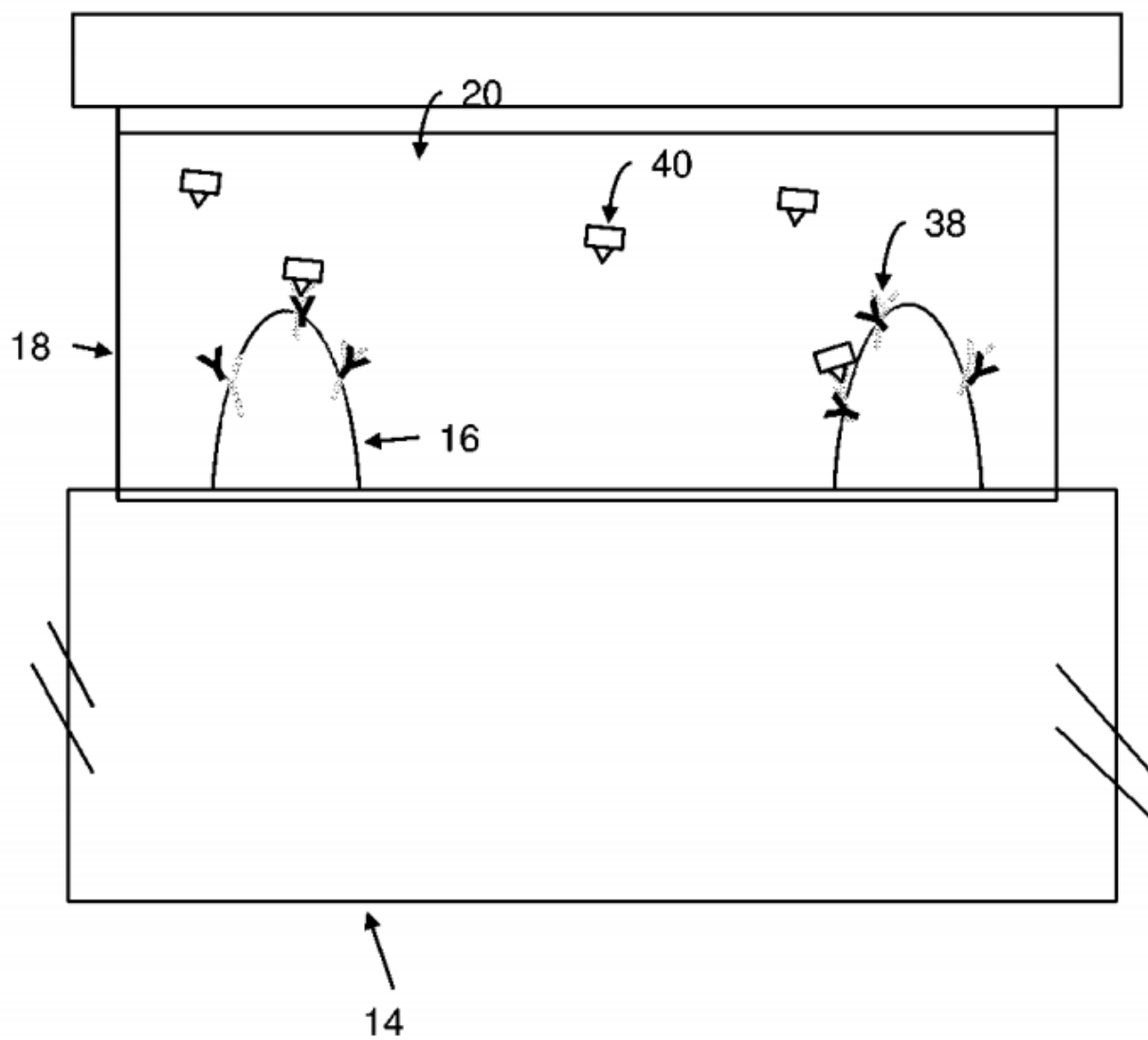


Figura 4

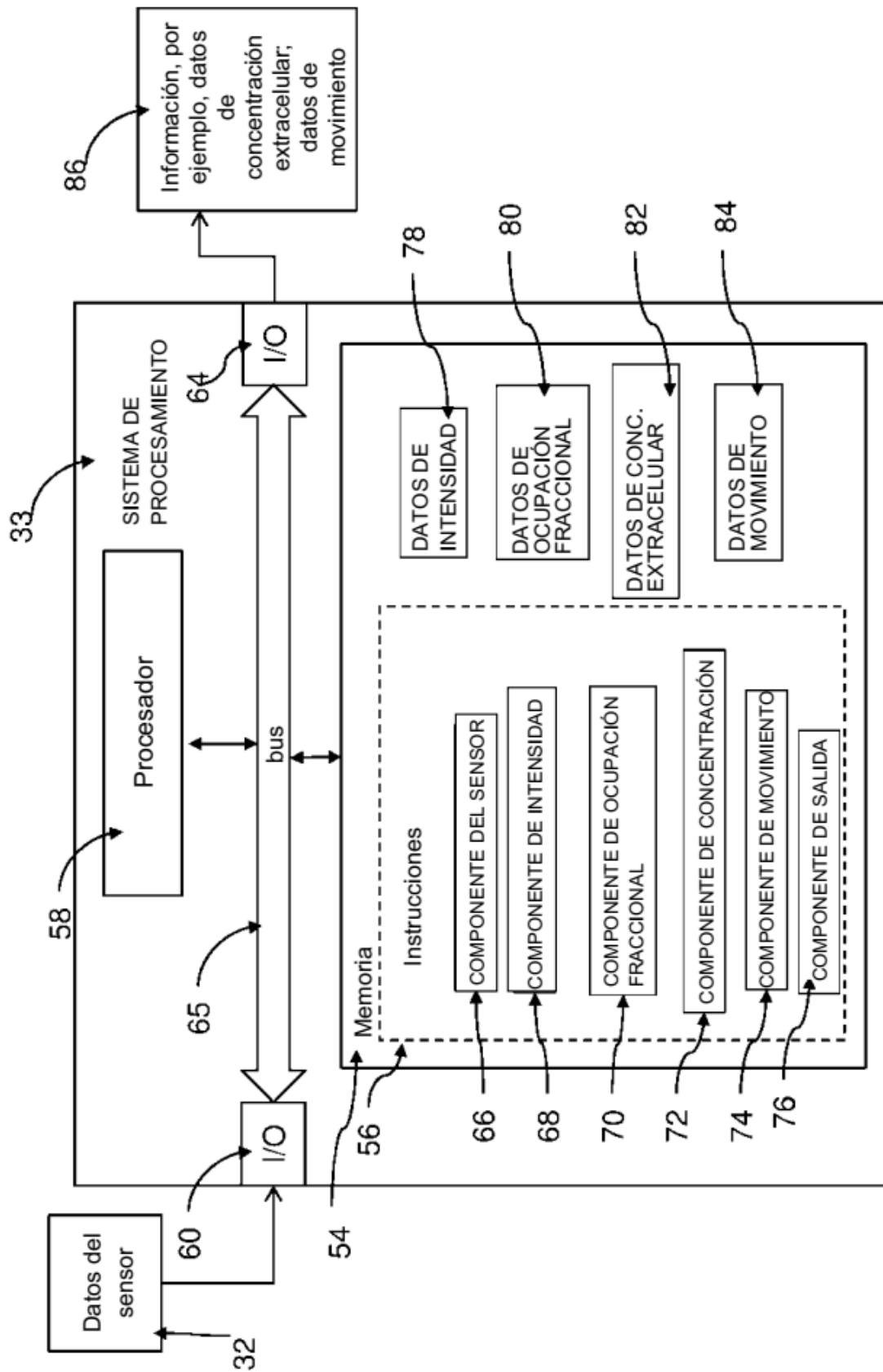


Figura 5

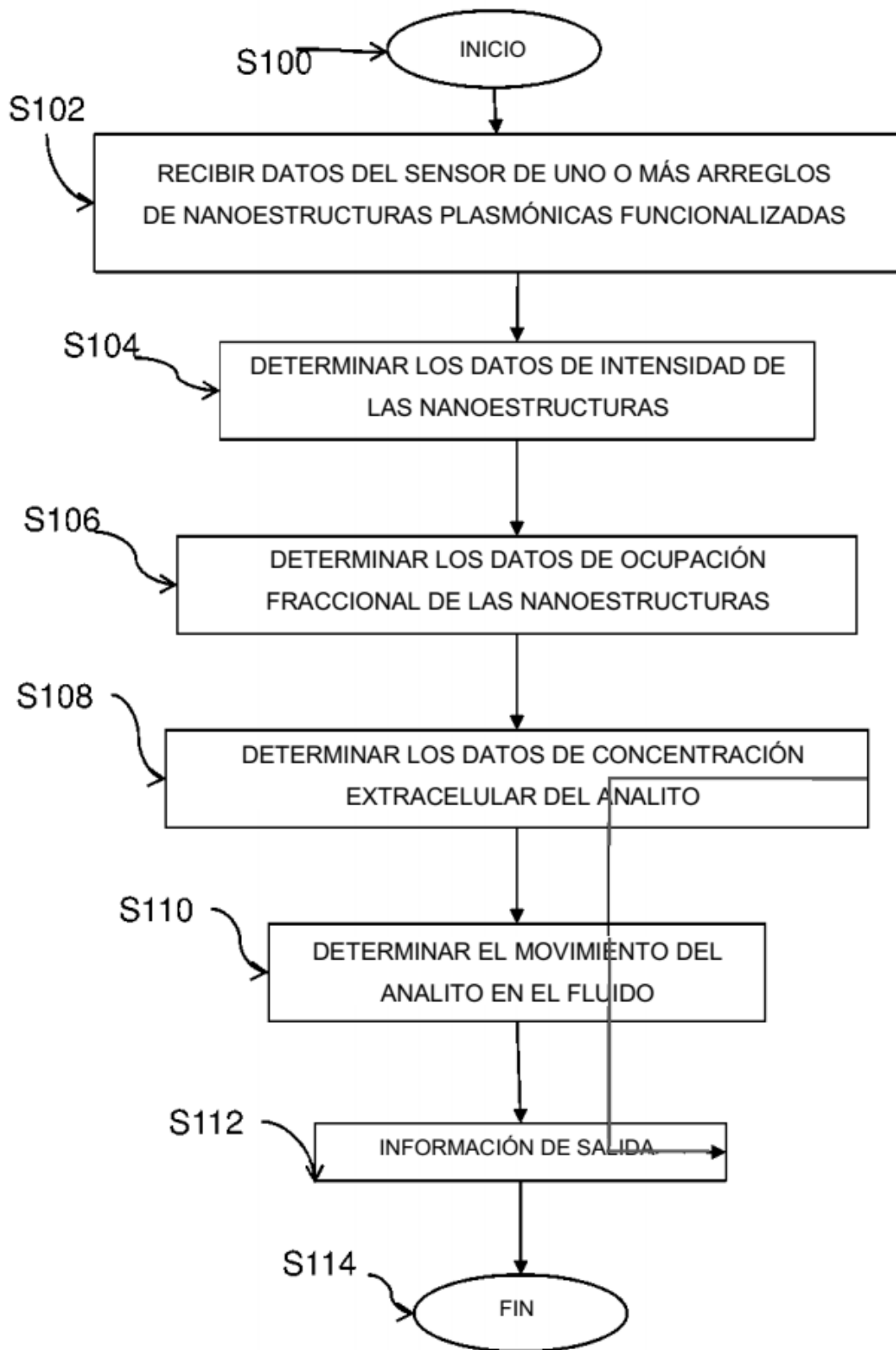


Figura 6

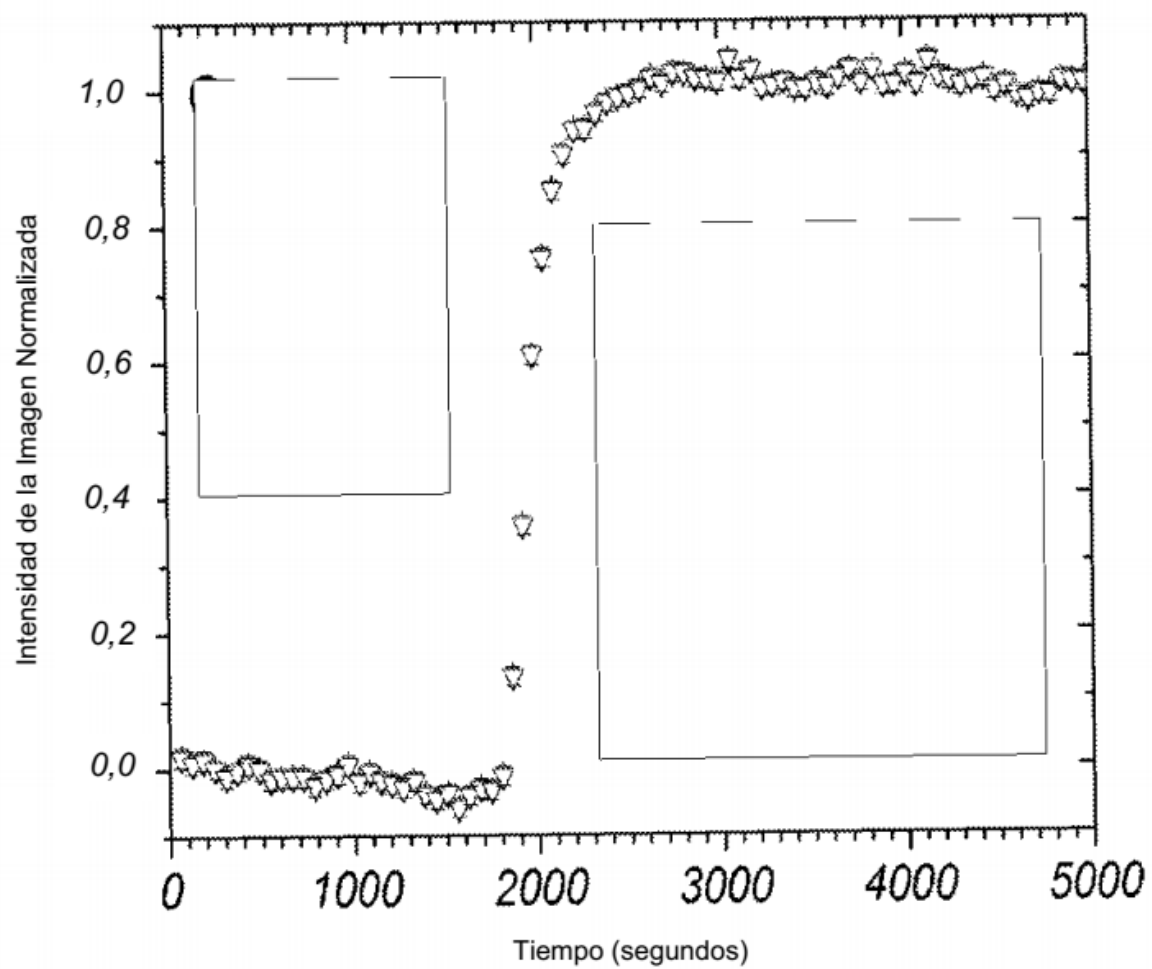


Figura 7

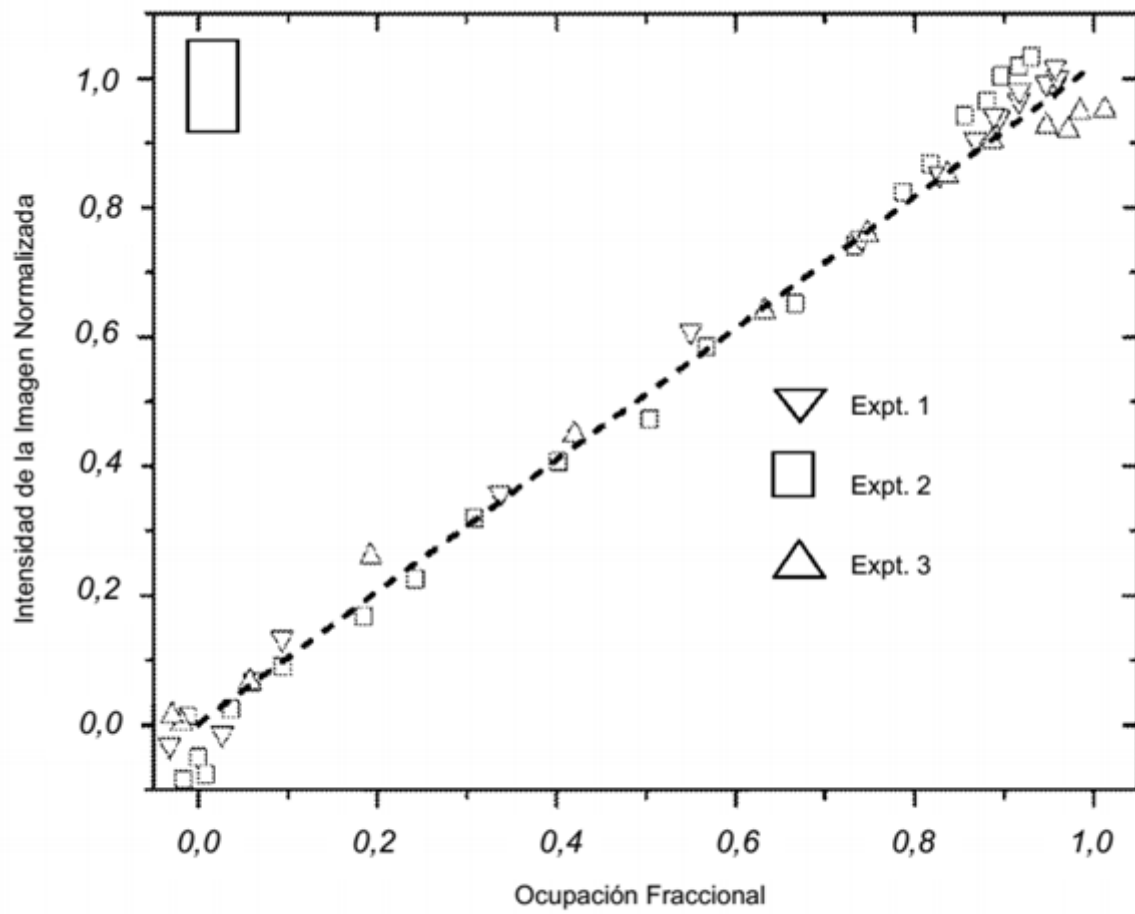


Figura 8

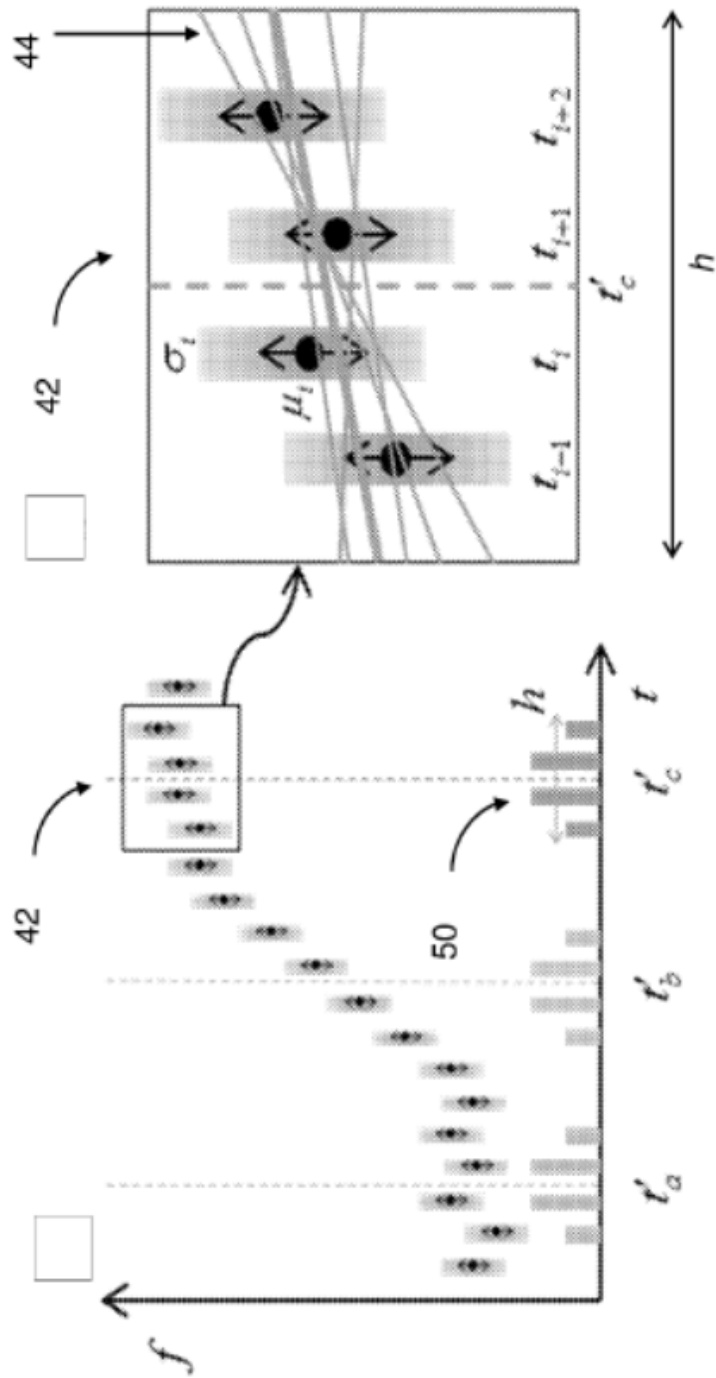


Figure 9

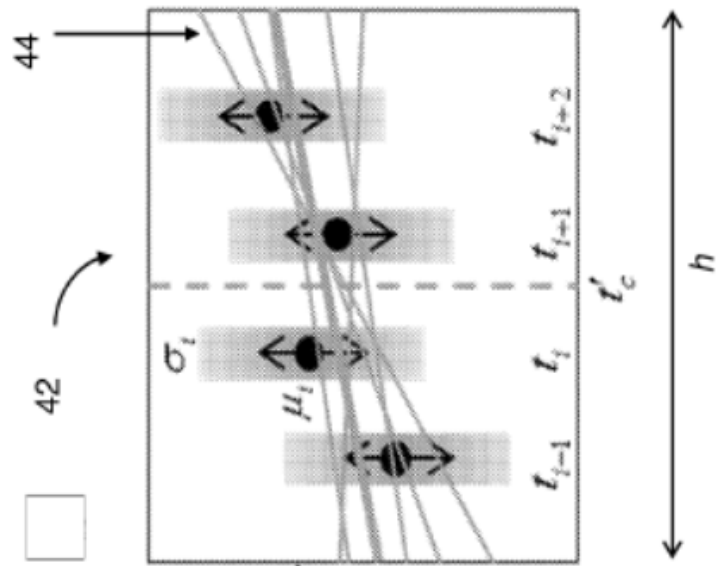


Figure 10

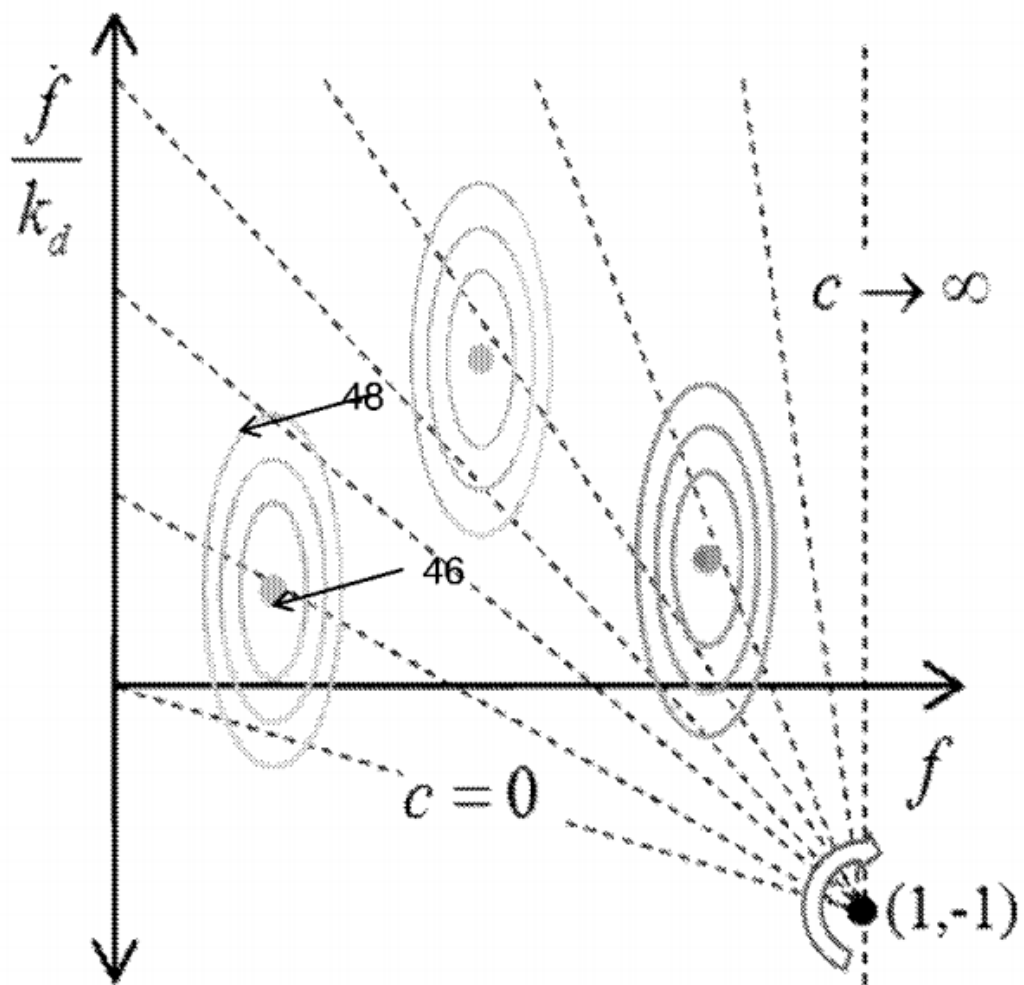


Figura 11

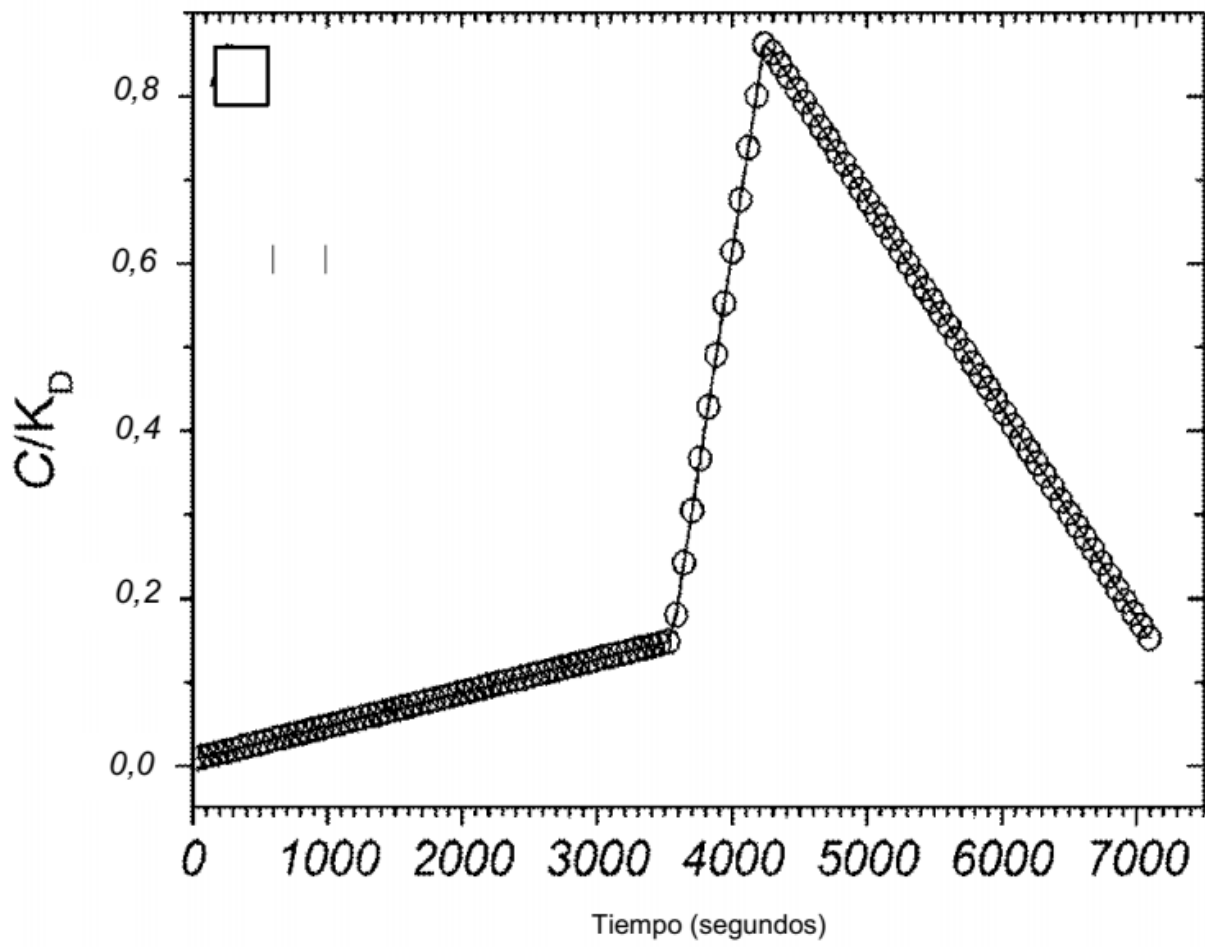


Figura 12

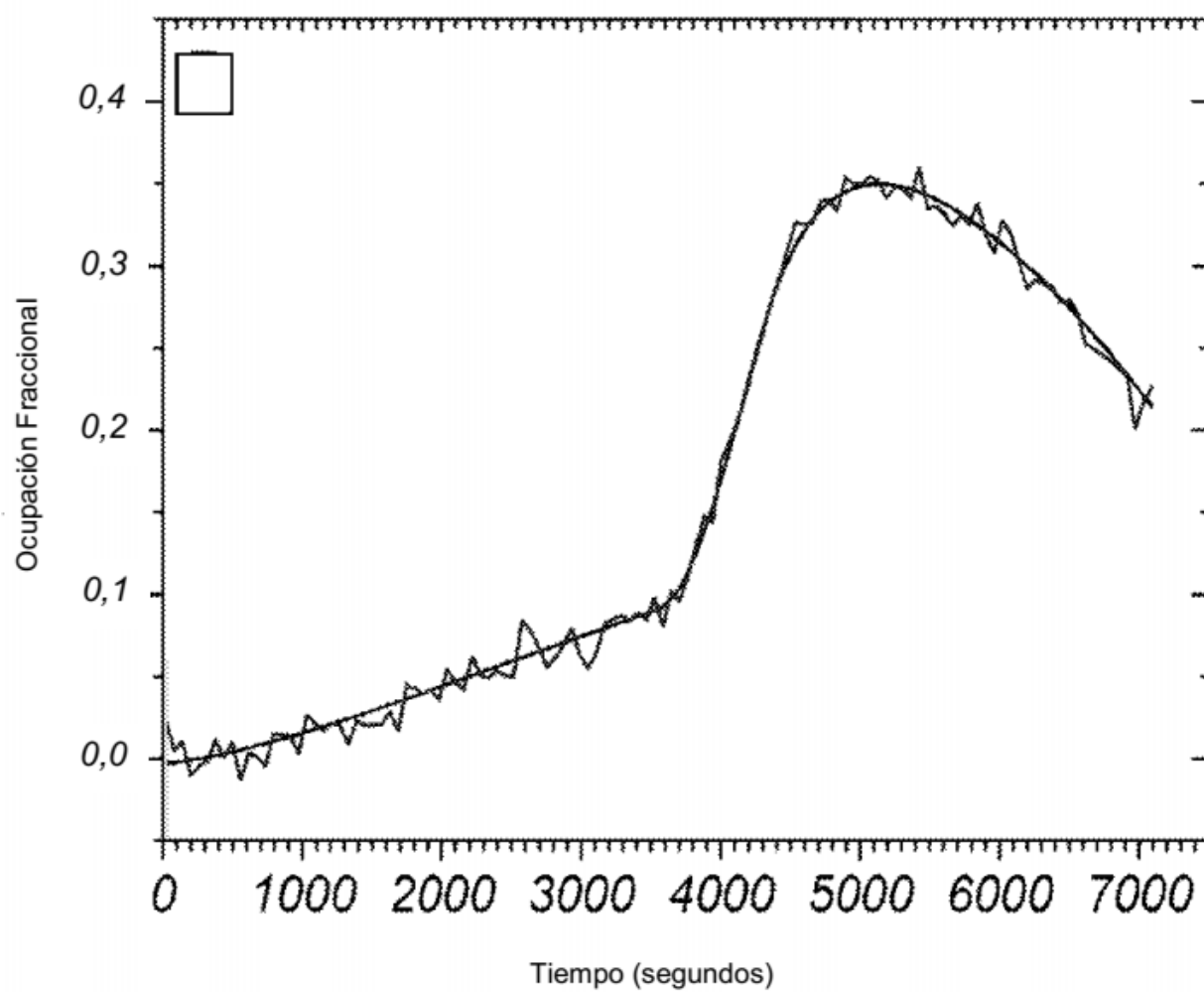


Figura 13

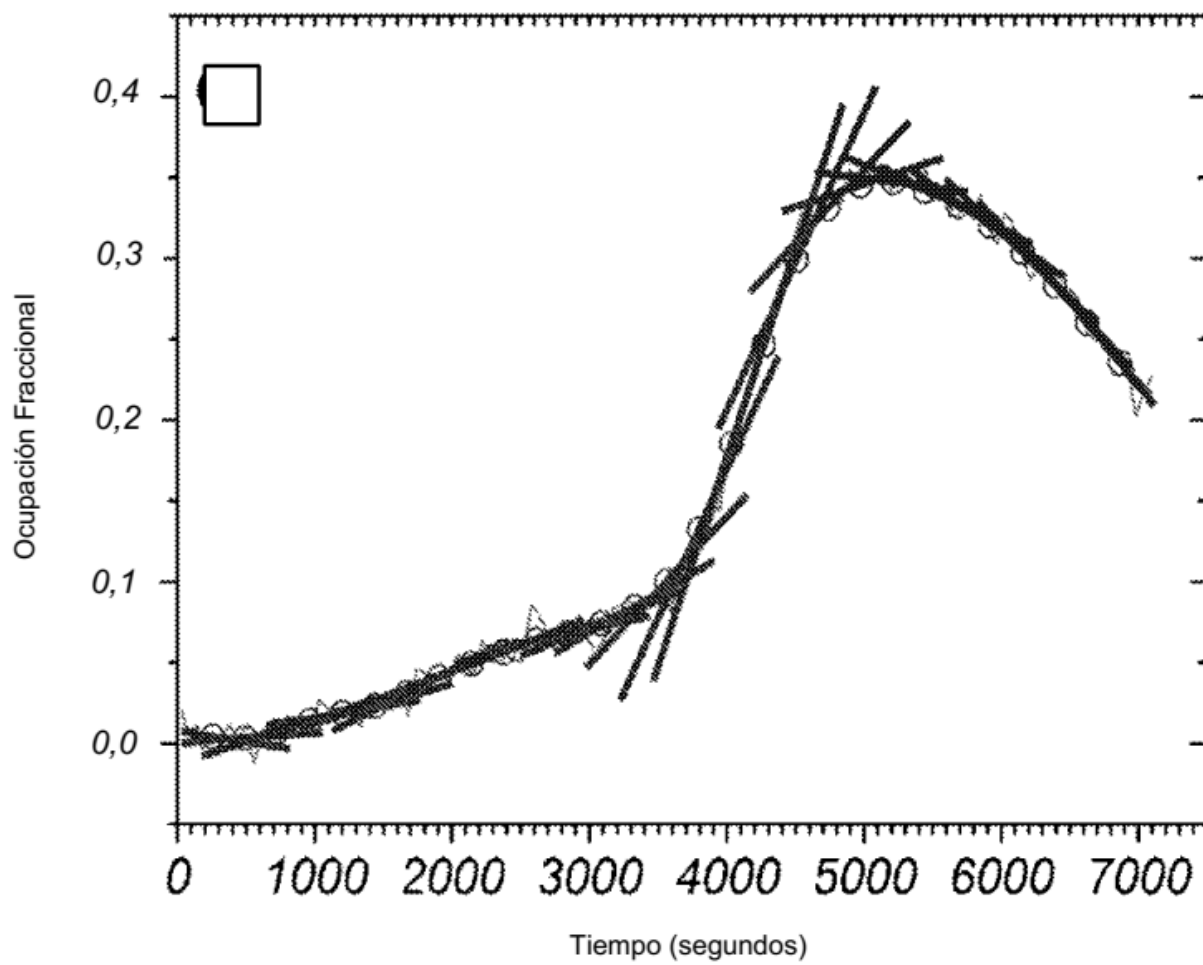


Figura 14

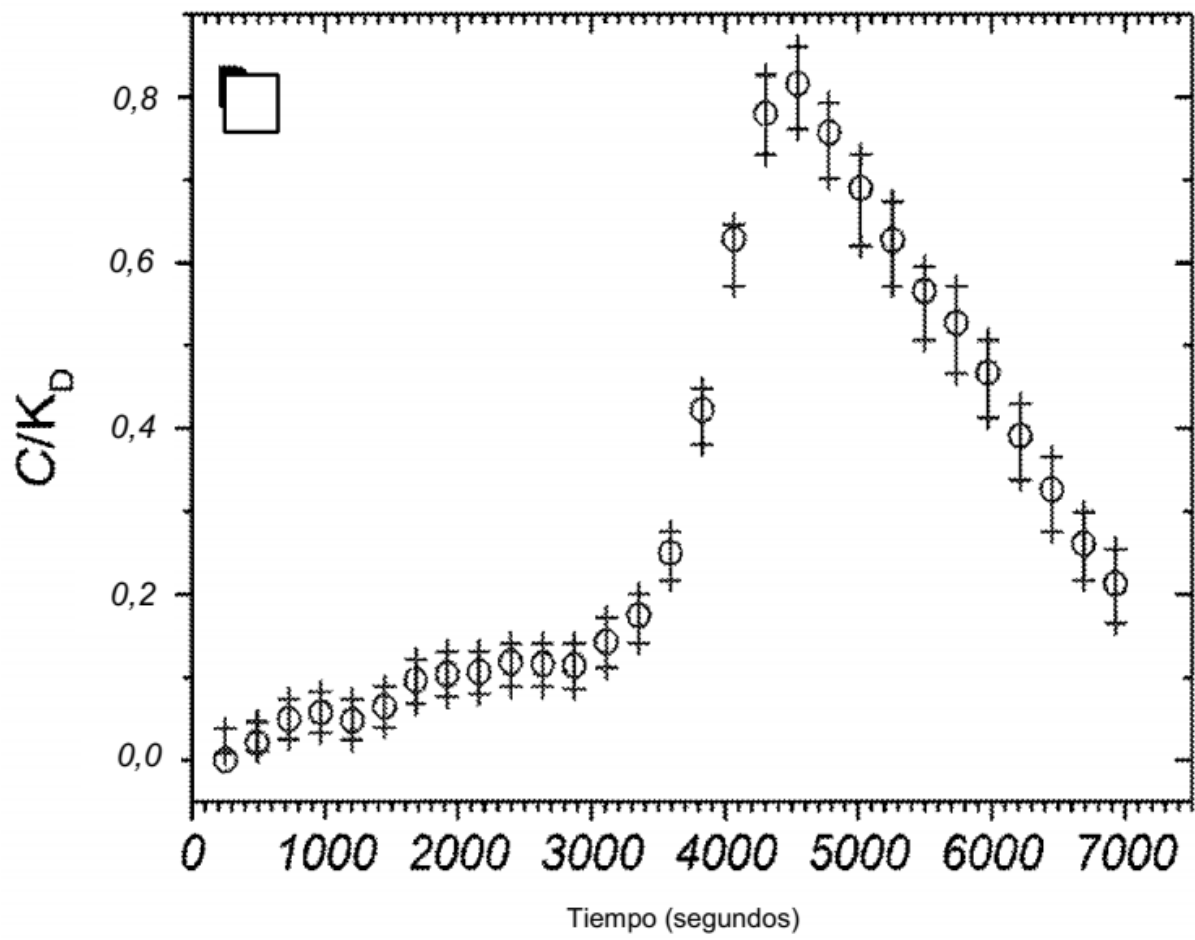


Figura 15

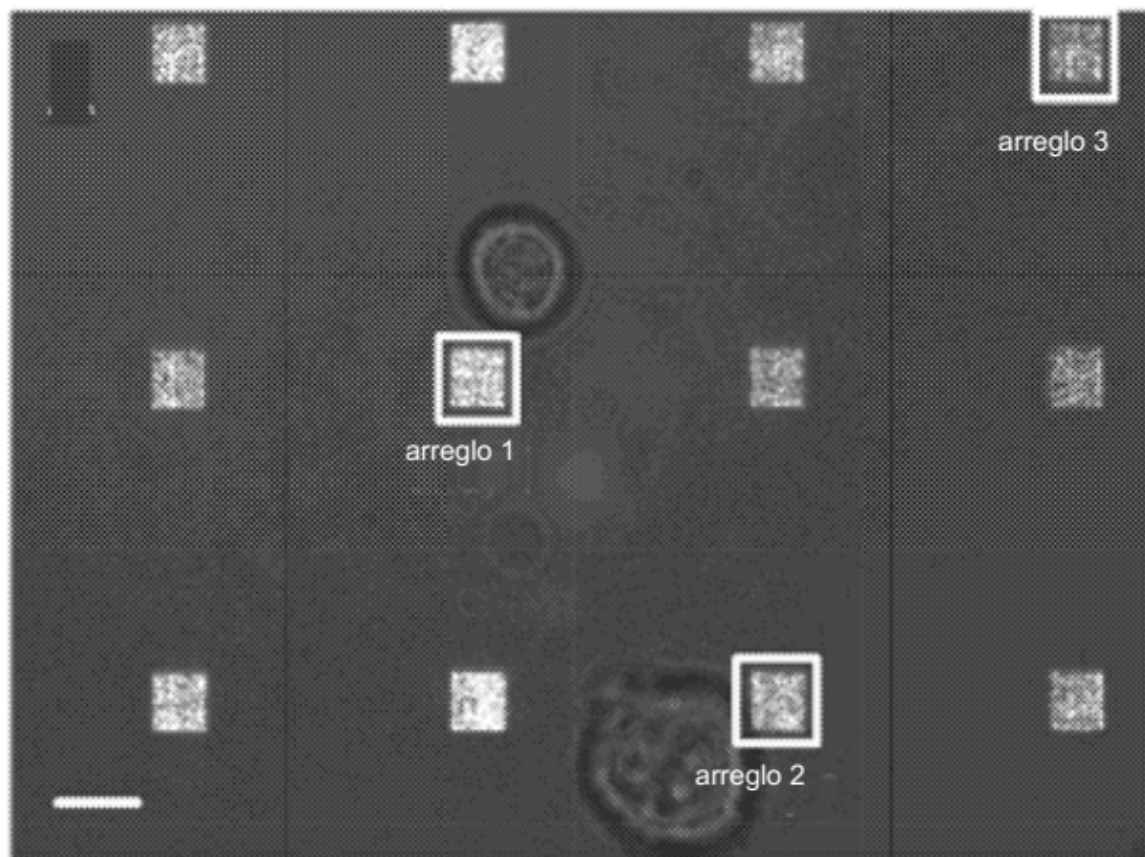


Figura 16

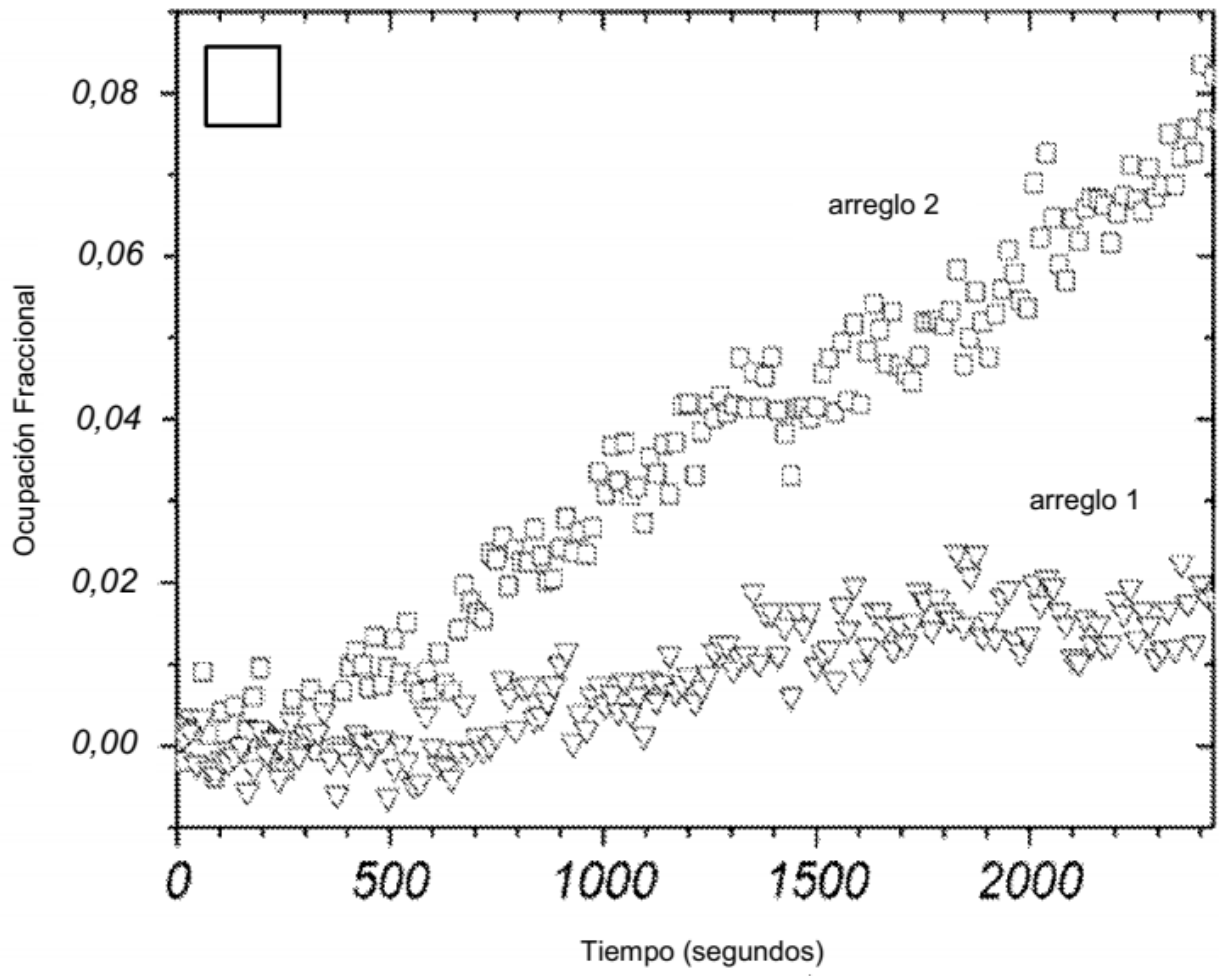


Figura 17

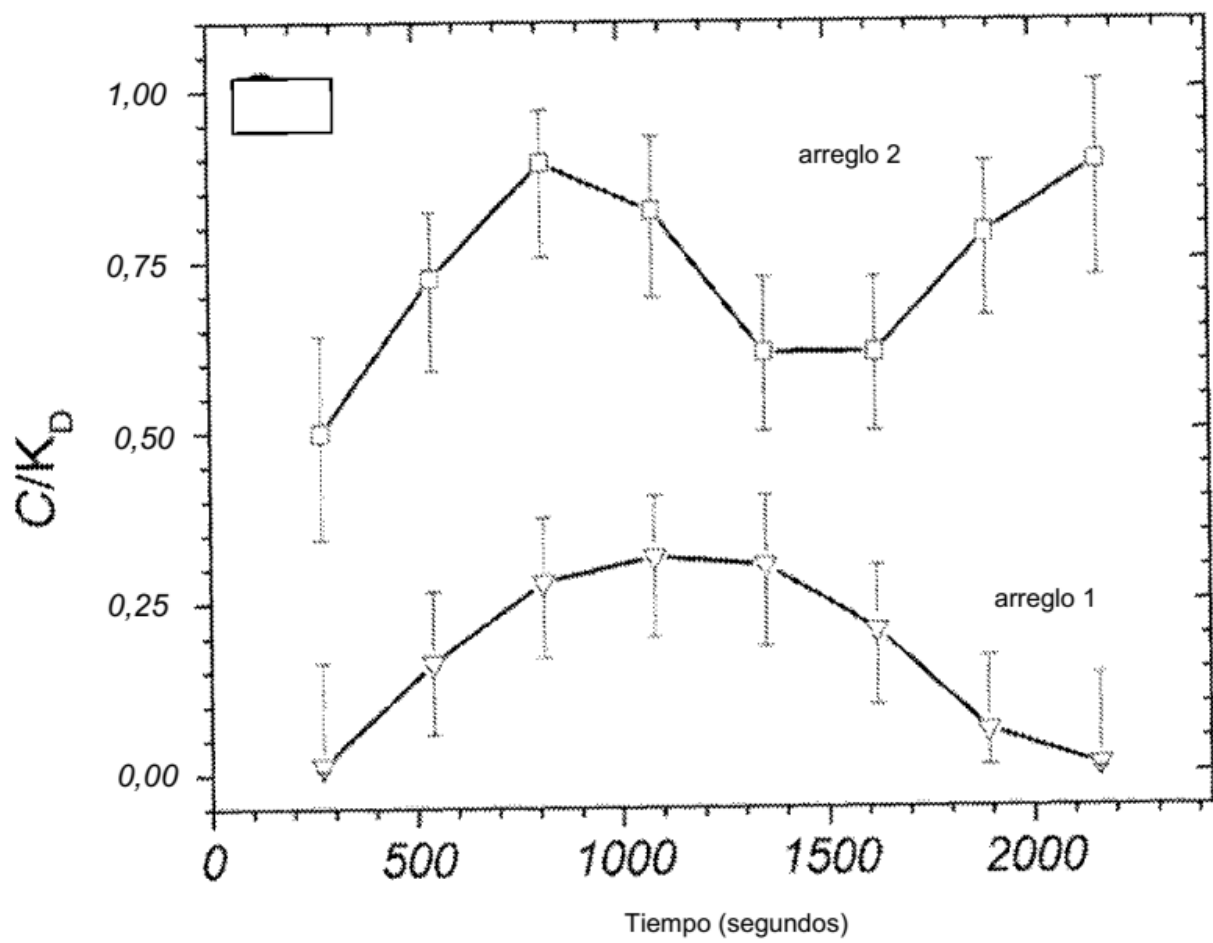


Figura 18

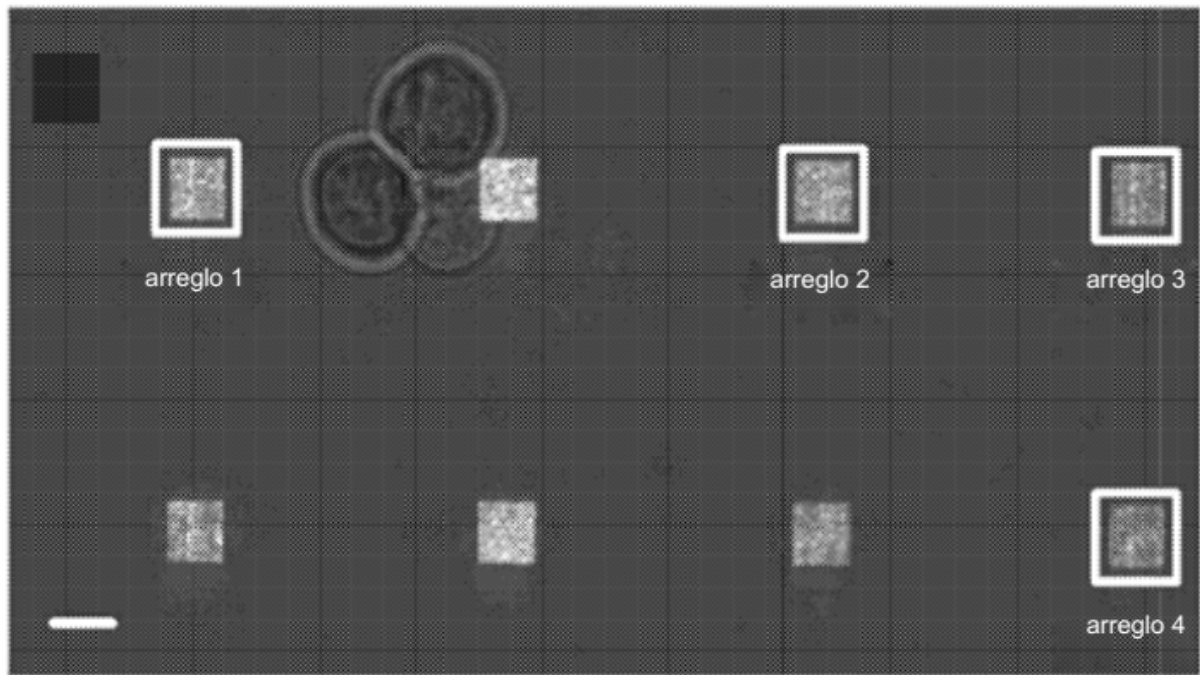


Figura 19

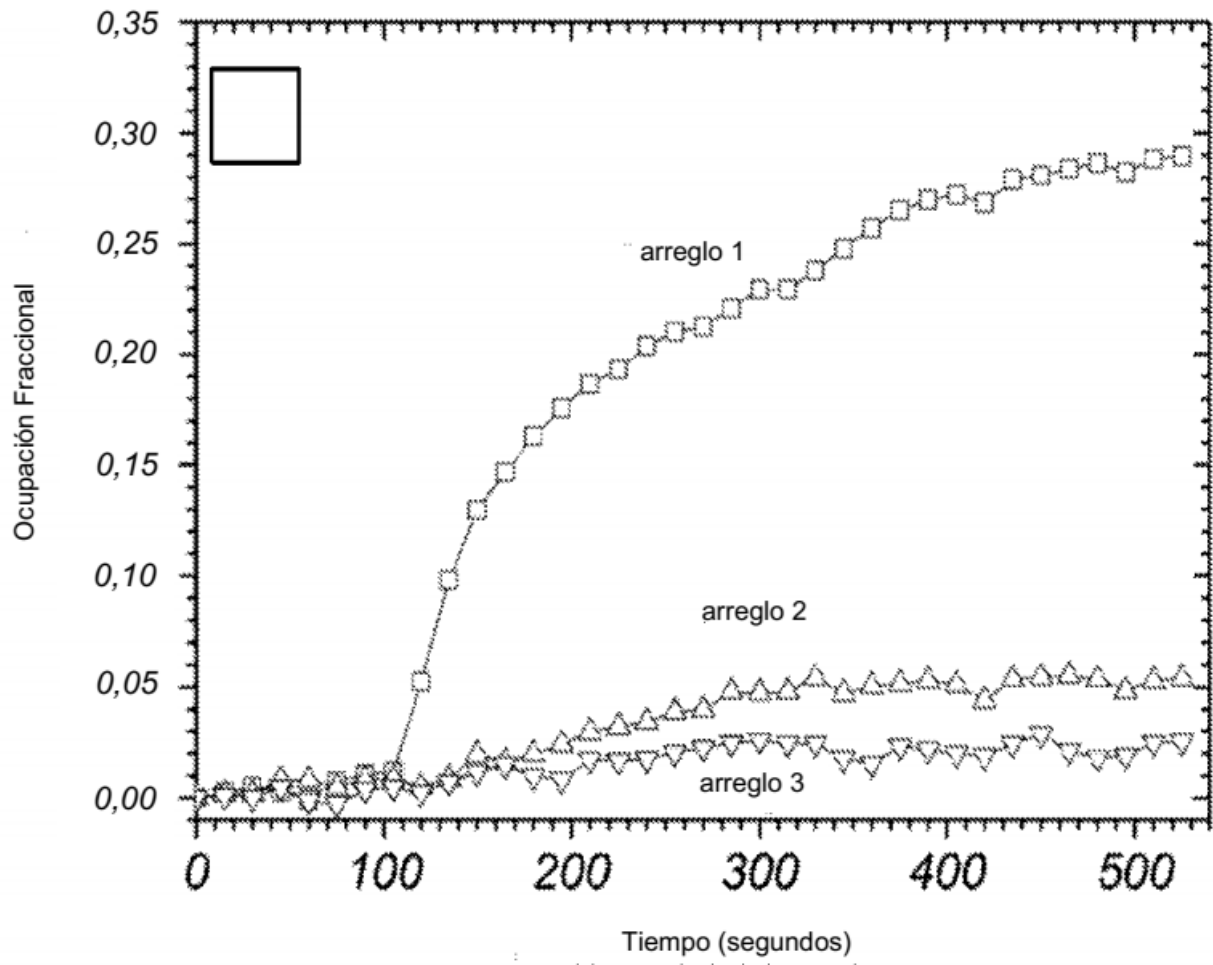


Figura 20

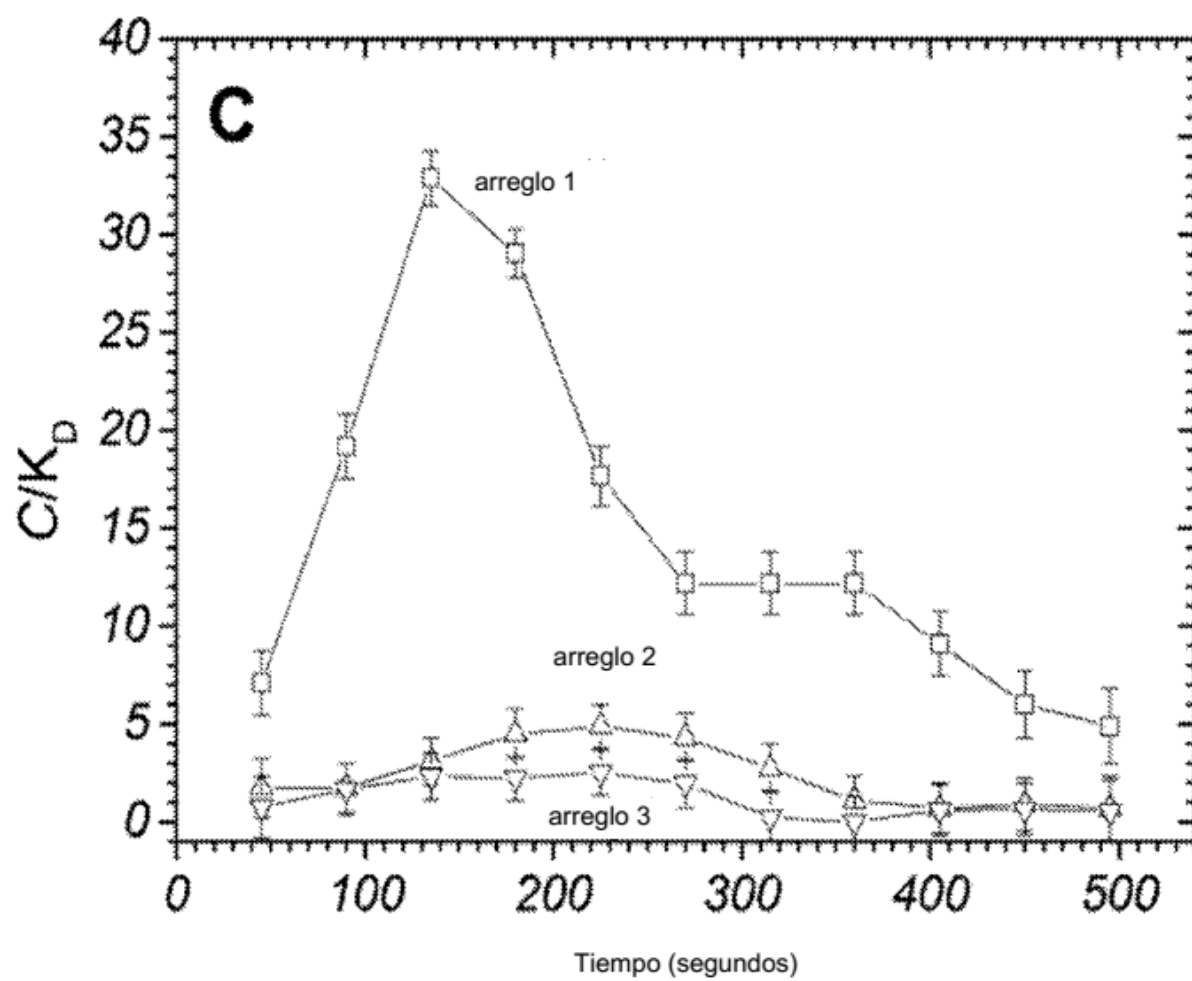


Figura 21

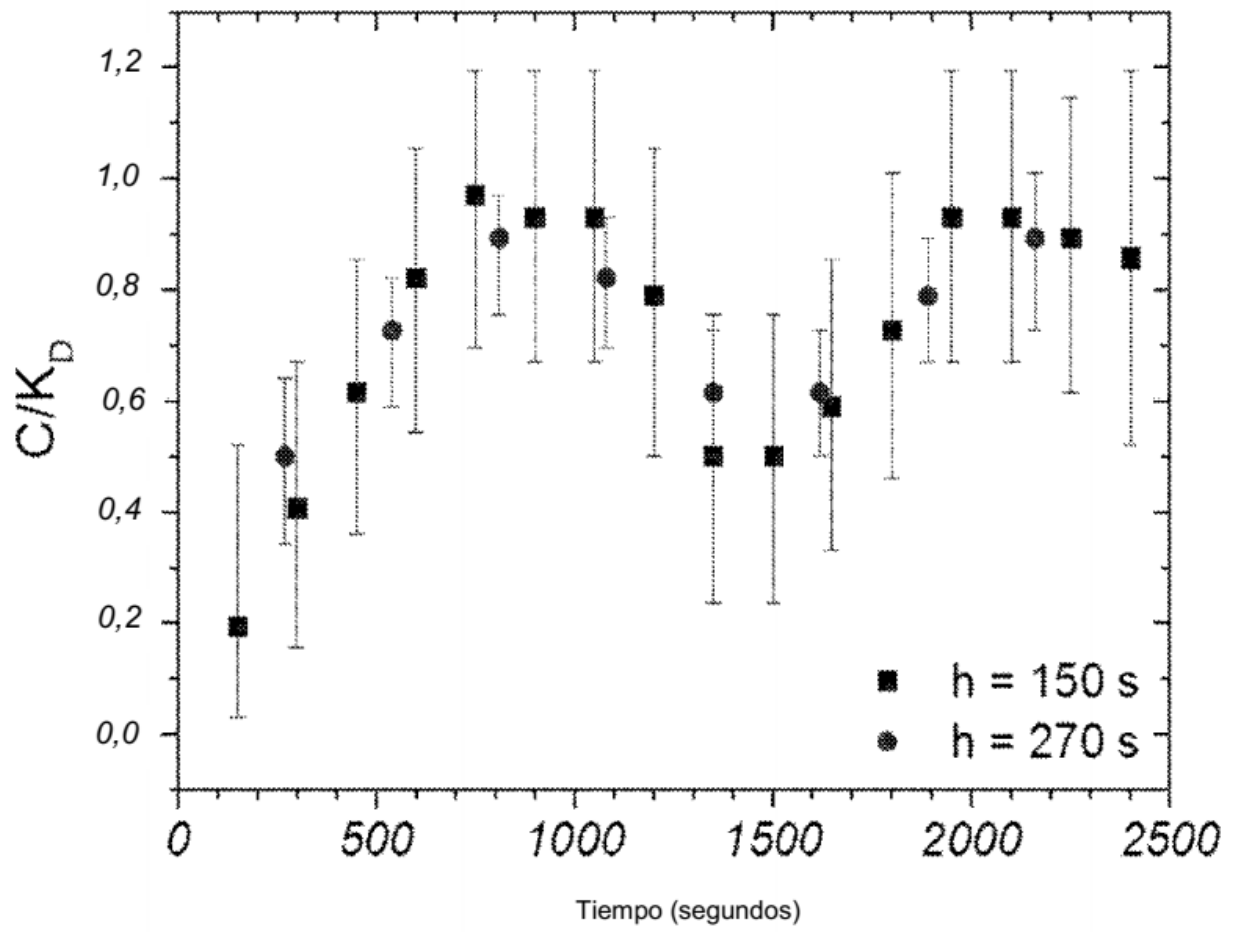


Figura 22

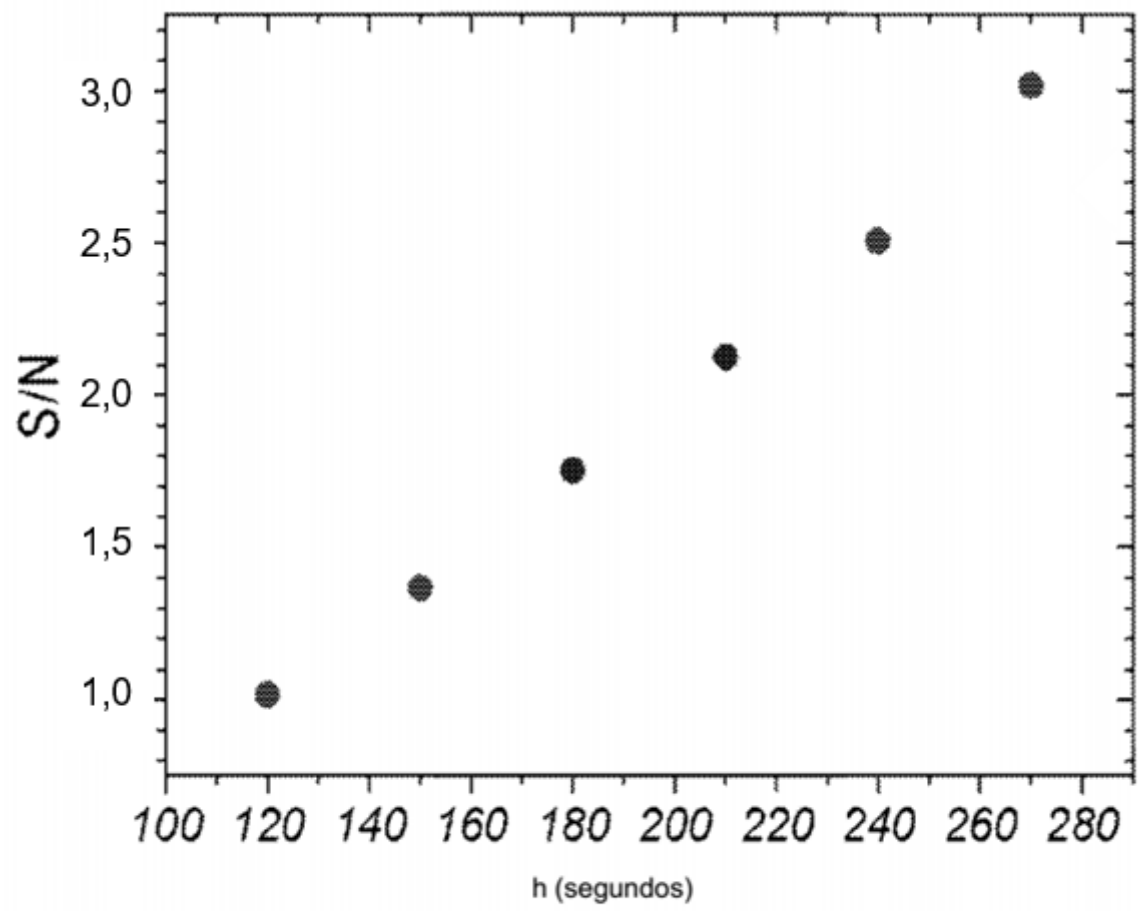


Figura 23