

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/107645 A1

(43) Fecha de publicación internacional
9 de septiembre de 2011 (09.09.2011)

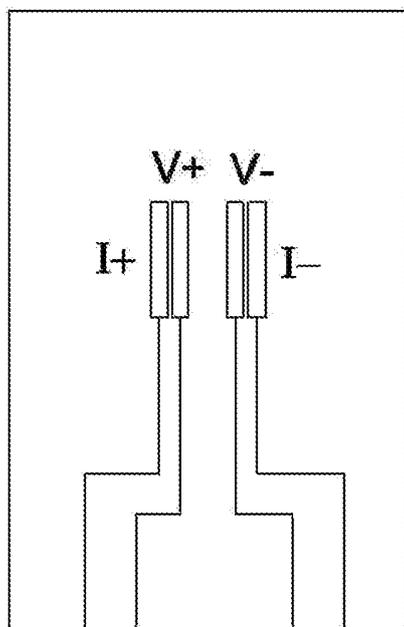
PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61B 5/053 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070131
- (22) Fecha de presentación internacional:
28 de febrero de 2011 (28.02.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201030307 2 de marzo de 2010 (02.03.2010) ES
- (71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE VALLADOLID** [ES/ES]; Plaza del Colegio de Santa Cruz, 8, E-47002 Valladolid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*):
GUIMERA BRUNET, Antón [ES/ES]; Campus Universidad Autónoma, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). **VILLA SANZ, Rosa** [ES/ES]; Campus Universidad Autónoma, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). **GABRIEL BUGUÑA, Gemma** [ES/ES]; Campus Universidad Autónoma, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). **MALDONADO LÓPEZ, Miguel José** [ES/ES]; Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén 17, E-47011 Valladolid (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NON-INVASIVE SENSOR FOR DETERMINING FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE CORNEA, DEVICE INCLUDING SAID SENSOR AND USE THEREOF

(54) Título : SENSOR NO INVASIVO PARA DETERMINAR CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA CÓRNEA, DISPOSITIVO QUE INCLUYE DICHO SENSOR Y SU USO



(57) Abstract: The invention relates to a sensor and a device including said sensor for non-invasively obtaining data that can be used to determine the functional characteristics of the cornea, in particular to establish a correlation between the impedance to different frequencies and the permeability of the endothelium and the epithelium and the hydration level of the stroma.

(57) Resumen: Sensor y dispositivo que incorpora dicho sensor para la obtención, de forma no invasiva, de datos útiles para determinar las características funcionales de la córnea, en particular para establecer una correlación entre la impedancia a diferentes frecuencias y la permeabilidad del endotelio y del epitelio y el nivel de hidratación del estroma.

Fig. 5

WO 2011/107645 A1



GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

**SENSOR NO INVASIVO PARA DETERMINAR CARACTERÍSTICAS
FUNCIONALES DE LA CÓRNEA, DISPOSITIVO QUE INCLUYE DICHO
SENSOR Y SU USO**

DESCRIPCIÓN

5 **OBJETO DE LA INVENCION**

El objeto de la presente invención se refiere a un sensor y a un dispositivo que incorpora dicho sensor para la obtención de forma no invasiva, de datos útiles para el diagnóstico del estado de la córnea.

Más concretamente se trata de un dispositivo que permite medir la
10 impedancia de la córnea a diferentes frecuencias para establecer una correlación entre la impedancia y la permeabilidad del endotelio y del epitelio y el nivel de hidratación del estroma, para de esta forma determinar las características funcionales de la córnea.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La córnea es la estructura hemisférica transparente localizada al frente del órgano ocular, que permite el paso de la luz y que protege al iris y cristalino. Tiene forma de casquete esférico con un diámetro medio en el humano de 11,5 mm y posee propiedades ópticas de refracción significativas, aportando aproximadamente un 70% de la capacidad total de enfoque del ojo.

20 La córnea consta de tres capas; la más externa es el epitelio corneal, compuesto por epitelio pluriestratificado no queratinizado con gran potencial regenerativo; la media es el estroma, la capa más ancha de las tres; y la más interna es el endotelio monoestratificado que consta de una sola capa de células. Se distinguen dos membranas que separan el estroma de las otras dos capas
25 corneales: la membrana de Descemet, que separa el estroma del endotelio, y la membrana de Bowman, que separa el estroma del epitelio.

El epitelio representa el 10 % del grosor total de la córnea (550 µm

aproximadamente en el humano) y está formado por varias capas celulares que actúan de barrera protectora a agentes externos. El transporte de iones a través de las células de la capa epitelial es uno de los responsables de regular la funcionalidad corneal.

5 El estroma está formado en humanos por unas 200 – 250 láminas de fibras de colágeno dispuestas de forma paralela a la superficie corneal. El estroma es el responsable final de las propiedades biomecánicas de la córnea, así como de su curvatura y de su transparencia. Para mantener su transparencia no dispone de capilares para nutrirlo, de modo que los nutrientes se suministran a través del
10 epitelio y del endotelio. Por otro lado, el grado de hidratación del estroma está directamente relacionado con la transparencia de la córnea, permaneciendo en un continuo estado de deshidratación.

El endotelio consta de una monocapa de células cuboideas que forman un mosaico hexagonal y mantiene la transparencia del tejido controlando la
15 hidratación del estroma. Por un lado, existe un flujo por difusión entre las células del endotelio controlado por las uniones entre éstas (tight junctions). Por otro lado, las células del endotelio están especializadas en bombear agua del estroma al humor acuoso, creando un flujo activo mediante la bomba fluídica y asegurando la homeostasis de la córnea. Una característica del endotelio corneal, a diferencia del
20 epitelio, es su incapacidad para la renovación celular. Esto origina una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligadas las células a cubrir toda la superficie corneal posterior, produciéndose como consecuencia una pérdida de su capacidad para controlar el nivel de hidratación del estroma. Este envejecimiento puede darse de forma exagerada en
25 distrofias y como consecuencia de patología, cirugía ocular o uso de fármacos oftalmológicos.

La Figura 1 muestra las diferentes capas que componen la córnea, así como los mecanismos principales de control del nivel de hidratación del estroma: difusión a través del epitelio, difusión y bombeo a través del endotelio. Aunque el
30 estudio de la permeabilidad de estas capas es de gran interés clínico, hasta ahora sólo se han realizado estudios basados en medidas in-vitro, generalmente con

tejidos extirpados y colocados en un dispositivo sensor específico. También existen algunos estudios que toman medidas “in vivo” en animales, pero utilizando métodos muy invasivos, lo que generalmente comporta la inutilización del tejido para estudios posteriores y imposibilidad de hacerlo en una clínica con pacientes.

- 5 En la práctica clínica se suele usar la medida del grosor de la córnea (paquimetría) como medida indirecta de la disfunción corneal.

El estudio de las propiedades eléctricas pasivas de las diferentes capas de la córnea, se utiliza habitualmente en estudios in-vitro para evaluar la permeabilidad de éstas. Pero los métodos utilizados en estos estudios no son
10 aplicables a las medidas in-vivo. Los medios celulares y acelulares presentan un comportamiento diferente frente a la corriente eléctrica. En general, los tejidos están compuestos por células embebidas en un medio extracelular. A bajas frecuencias, < 1 kHz, la corriente se distribuye por el medio extracelular (fundamentalmente una solución iónica con comportamiento resistivo), mientras
15 que a frecuencias más altas, > 100 kHz, la corriente es capaz de atravesar las paredes celulares y el medio intracelular (el comportamiento de las membranas es capacitivo y el medio intracelular es resistivo). La Fig. 2 representa gráficamente esta diferencia de comportamiento en función de la frecuencia. En base a este comportamiento de los tejidos biológicos se puede analizar el estado de las
20 diferentes capas de la córnea utilizando medidas basadas en las propiedades eléctricas pasivas de esta, como es el caso de las medidas de impedancia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona un sensor de medida de la impedancia útil para determinar las características funcionales de la córnea, así como un dispositivo que comprende dicho sensor.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un sensor de medida de la impedancia que comprende n microelectrodos, estando n comprendido entre 4 y
30 30, dispuestos sobre un sustrato, siendo el tamaño y disposición de los microelectrodos adecuados para que hagan simultáneamente contacto con una córnea, y donde los microelectrodos se seleccionan para realizar la medida en

grupos de 4 a modo de 2 microelectrodos externos y 2 microelectrodos internos.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo de medida de la impedancia que comprende un sensor según se ha descrito anteriormente y un equipo de medida de impedancias multifrecuencia conectado
5 bien sea físicamente por cables o bien sea por telemetría a dicho sensor.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un sensor o de un dispositivo que comprende dicho sensor según se ha descrito anteriormente para la medida de la impedancia para determinar las características funcionales de la córnea.

10 El término "microelectrodos" hace referencia a microelectrodos que únicamente requieren el contacto con la superficie de la córnea para efectuar la medida de impedancia. Por otro lado, la expresión "tamaño y configuración adecuados para que hagan simultáneamente contacto con una córnea" se refiere a que, para poder realizar correctamente la medida de la impedancia, todos los
15 microelectrodos utilizados deben hacer contacto eléctrico con la córnea, lo cual implica limitaciones de tamaño y disposición relativa de los microelectrodos.

Para realizar una medida, se conecta el sensor de la invención al equipo de medida de impedancias. Estos equipos funcionan inyectando una corriente eléctrica en el medio cuya impedancia se desea medir a través de los
20 microelectrodos, obteniéndose simultáneamente el potencial eléctrico resultante a través de otros microelectrodos. A partir de estos datos, se calcula la impedancia del tejido.

Se ha probado que aumentos de permeabilidad de las capas endotelial y epitelial, que son celulares, se deben normalmente al aumento de los espacios
25 intercelulares o a la disminución del número de células, lo cual provoca una disminución de la impedancia. Este aumento de la permeabilidad de las capas endotelial y epitelial provoca a su vez un aumento de la hidratación del estroma, lo que también tiene como consecuencia una disminución de la impedancia debido a un aumento de la concentración iónica.

El equipo de medida de impedancias incorpora medios para inyectar una corriente eléctrica de frecuencia variable en la córnea y medios para la lectura simultánea del potencial resultante, obteniendo así datos de la impedancia del tejido para una medida multifrecuencial en el rango de 10 Hz a 1 MHz.

5 Las medidas efectuadas en distintos rangos de frecuencias y con los microelectrodos adecuados dan lugar a unos valores de impedancias que permiten obtener conclusiones acerca del estado funcional de las distintas capas de la córnea.

10 Se ha observado que en el caso de frecuencia < 1 KHz la conductividad medida depende básicamente de la conductividad de la capa epitelial. Debido a su baja conductividad a bajas frecuencias, la cantidad de corriente eléctrica que puede atravesarla es prácticamente nula, de forma que la caída de tensión registrada depende de la conductividad del epitelio corneal.

15 En el rango de $1 \text{ KHz} < \text{frecuencia} < 100 \text{ KHz}$, el análisis de la medida de la impedancia resulta más complejo, ya que intervienen varios factores. La conductividad de las capas celulares (epitelio y endotelio) es dos órdenes de magnitud mayor que la del resto de capas, permitiendo el paso de una cantidad de corriente significativa a las capas acelulares (estroma y humor acuoso). Por otro lado, la conductividad del humor acuoso es más elevada que la del estroma, por lo
20 que la corriente eléctrica tenderá a circular por esta capa. La cantidad de corriente que puede atravesar el endotelio y circular con el humor acuoso se relaciona directamente con la conductividad del endotelio, y a su vez con su permeabilidad. En consecuencia, si aumenta la corriente que circula por el humor acuoso, la impedancia registrada baja, lo cual indica un aumento de la permeabilidad del
25 endotelio.

En el rango de frecuencia $> 100 \text{ KHz}$ la corriente eléctrica es capaz de atravesar células, de modo que la medida de la impedancia depende de la conductividad del estroma y del humor acuoso, por ser las capas de mayor tamaño. La conductividad del humor acuoso se puede considerar constante, de
30 modo que las variaciones en la impedancia medida se relacionan con las

variaciones de la conductividad del estroma, y éstas a su vez con su grado de hidratación.

En una realización particular de la invención, los microelectrodos están dispuestos de forma planar sobre el sustrato.

5 En otra realización particular de la invención, el sensor comprende 10 microelectrodos.

Los microelectrodos conductores pueden ser de material metálico o no metálico, preferentemente de un material biocompatible.

10 En una realización particular de la invención, los microelectrodos son de material metálico seleccionado entre oro, platino, níquel, aluminio, titanio, nitruro de titanio, cromo y posibles aleaciones de los mismos;

En otra realización particular de la invención, los microelectrodos son de material no metálico seleccionado entre nanotubos de carbono, grafeno y polímeros conductores.

15 Estos microelectrodos pueden ser modificados mediante procesos que mejoran sus prestaciones. Así por ejemplo, se pueden depositar nanotubos de carbono o electro-depositar platino negro u oro para mejorar el contacto con el tejido y se pueden depositar hidrogeles como el polihidroximetilmetacrilato(pHEMA) para estabilizar los procesos anteriores.

20 En otra realización particular de la invención, dichos microelectrodos tienen forma alargada y están dispuestos en paralelo según su lado más largo, estando configurados los microelectrodos bien para inyectar una corriente eléctrica o bien para medir un potencial.

25 Por otra parte, el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos está constituido por un material biocompatible y puede ser rígido o flexible, preferentemente transparente, lo cual permite a la persona que realiza la medida

observar si los microelectrodos están haciendo contacto con la superficie de la córnea. Asimismo, un sustrato rígido puede ser esencialmente plano o presentar un ángulo de curvatura que permita su adaptación sobre la superficie de la córnea. En el caso de un sustrato rígido, el material se selecciona entre silicio, carburo de silicio, vidrio y PCB (printed circuit board, RF4). En el caso de un sustrato flexible, el material se selecciona entre polímeros como pueden ser: SU8, polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS), poliimida, polietileno naftalato (PEN), polietilentereftalato (PET), poliestireno, polímero de cicloolefina (COP) y policarbonato.

10 En una realización particular de la invención, el sustrato es rígido y los microelectrodos tienen una longitud de 2 mm y una anchura de 0,3 mm.

En otra realización particular de la invención, el sustrato es flexible y los microelectrodos tienen una longitud de 1 mm y una anchura de 0,3 mm

15 La Figura 3A muestra un esquema de las diferentes capas que definen el sensor, el sustrato y los microelectrodos.

El sensor podrá ser adaptado de diferentes maneras para su puesta en práctica para la realización de las medidas de impedancia. Se contempla la posibilidad de la fabricación del sensor en forma de lentilla, la adaptación del sensor a un soporte o a un recipiente que pueda contener córneas aisladas.

20 Asimismo se ha probado que los valores de la impedancia medidos dependen de la geometría de los microelectrodos utilizados. De la misma forma la contribución de las propiedades eléctricas de cada capa de la córnea a la impedancia total medida es diferente. Se puede decir que las capas más cercanas a los microelectrodos tienen una sensibilidad mayor, de forma que una variación en sus propiedades eléctricas provocará una variación mayor en la impedancia total. De esta forma, la profundidad de la medida realizada depende de la distancia relativa entre los microelectrodos.

El sensor de la presente invención presenta la ventaja de que la medición

de la impedancia de la córnea a diferentes frecuencias para establecer una correlación entre la impedancia y la permeabilidad del endotelio y del epitelio y el nivel de hidratación del estroma, se puede determinar con el uso del mismo sensor descrito anteriormente combinando convenientemente cuatro microelectrodos de los varios presentes en el sensor, ya que permite modular la amplitud de la distancia relativa entre ellos. Así, en la Figura 3B se observa como el uso de diferentes microelectrodos permite determinar la permeabilidad de las diferentes capas de la córnea. El diseño y uso de los microelectrodos cumple con unos determinados parámetros.

A continuación se indican los valores máximos y mínimos de los parámetros que definen la geometría de los microelectrodos, y se facilitan los valores óptimos para que el sensor detecte las alteraciones en las tres capas principales de la córnea. La Fig. 4 esquematiza estos parámetros en un sensor formado por diez microelectrodos. En este caso los microelectrodos son de igual longitud y anchura y se encuentran dispuestos paralelos con 2 microelectrodos externos (I+, I-) y 2 microelectrodos internos (V+, V-), pudiendo ser también factible la disposición de los microelectrodos como externos (V+, V-) y 2 microelectrodos internos (I+, I-), ver Fig. 5.

Los parámetros son:

We es la anchura de cada electrodo y está comprendida entre 0,03 mm y 1mm, siendo preferentemente 0,3 mm,

Le es la longitud del electrodo, y está comprendida entre 0,03 mm y 11mm, siendo preferentemente 1mm o 2 mm,

Ws es la anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos, y está comprendida entre 0,2 mm y 11mm. El valor preferente de este parámetro depende de la capa de la que se desea obtener información, siendo 5 mm para el caso de la capa endotelial, 1 mm para el caso del epitelio y 1,8 mm para el caso del estroma.

Nre es la relación de la separación entre microelectrodos donde **Nre = Sei/Se**, en el que **Sei** es la distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos y **Se** es la distancia entre las líneas medias de un electrodo interno y el

electrodo externo más próximo, y está comprendida entre 20 y 0,1, siendo preferentemente 3.

Por otra parte se ha comprobado que variando la anchura del sensor **Ws** varía la sensibilidad del sensor a una determinada capa, ya que este parámetro determina la profundidad de la medida. Al variar la anchura del sensor los rangos de frecuencia detallados con anterioridad se alteran ligeramente, desplazándose a frecuencias más altas al reducir la anchura del sensor.

Para sensores de anchura $W_s > 3$ mm se pueden detectar variaciones en las tres capas de la córnea.

Para sensores de anchura $1,5 \text{ mm} < W_s < 3$ mm se pueden detectar variaciones en el estroma y el epitelio, siendo el rango óptimo para detectar alteraciones en la conductividad del estroma.

Para sensores de anchura $W_s < 1,5$ mm sólo se pueden detectar variaciones en la capa epitelial.

Como se ha detallado con anterioridad, el estado funcional de cada capa de la córnea se correlaciona con la medida de la impedancia de la córnea en función de la anchura del conjunto de electrodos seleccionado (W_s) y de la frecuencia a la que se realiza la medida. Así, la siguiente tabla resume los valores de estos dos parámetros para el caso de cada capa de la córnea.

20

	Epitelio	Endotelio	Estroma
W_s	$W_s < 1,5 \text{ mm}$	$W_s > 3 \text{ mm}$	$1,5 \text{ mm} < W_s < 3 \text{ mm}$
Frecuencia	$\text{Freq} < 1 \text{ kHz}$	$1 \text{ kHz} < \text{Freq} < 100 \text{ kHz}$	$\text{Freq} > 100 \text{ kHz}$

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

La Figura 1 muestra esquemáticamente las diferentes capas que forman la córnea (la lágrima, el epitelio celular, el estroma acelular, el endotelio celular y el

humor acuoso) y los principales mecanismos de control del nivel de hidratación del estroma. En línea continua se muestra el flujo por difusión del humor acuoso al estroma a través del endotelio, en línea discontinua se muestra el flujo por bombeo del estroma al humor acuoso a través del endotelio y en línea semidiscontinua se muestra el flujo por difusión de la lágrima al estroma a través del epitelio.

La Figura 2 muestra esquemáticamente el comportamiento de la corriente eléctrica a diferentes frecuencias al atravesar capas celulares. En línea discontinua se representan las bajas frecuencias, < 1 kHz, y se observa que la corriente se distribuye por el medio extracelular. En línea continua se muestran las altas frecuencias, > 100 kHz, y se observa que la corriente atraviesa la pared celular y el medio intracelular.

La Figura 3A muestra un esquema de las diferentes capas que definen el sensor, el sustrato y los microelectrodos. La Figura 3B ejemplifica cómo el uso del mismo sensor combinando convenientemente microelectrodos de los varios presentes en el sensor, permite la penetración de la corriente a las diferentes capas de la córnea.

La Figura 4 muestra el ejemplo de un sensor con 10 microelectrodos, donde se definen los diferentes parámetros de la geometría del sensor: W_e , anchura del microelectrodo; L_e ; longitud del microelectrodo; W_s , anchura del conjunto de microelectrodos seleccionados para realizar la medida; S_e , distancia entre las líneas medias de un microelectrodo interno y el microelectrodo externo más próximo; S_{ei} , distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos.

La Figura 5 muestra un ejemplo de un sensor formado por cuatro microelectrodos dispuestos sobre un sustrato, detallando los dos microelectrodos externos ($I+$, $I-$) y los dos microelectrodos internos ($V+$, $V-$) para realizar una medida de impedancia a cuatro puntas.

DESCRIPCIÓN DE UNA REALIZACIÓN PREFERENTE

Se describe a continuación una realización preferente del dispositivo objeto

de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas.

En este ejemplo se usó un sensor con 10 microelectrodos de oro depositado sobre un sustrato de vidrio. Para evitar que las pistas hicieran contacto eléctrico con la córnea, éstas se cubrieron mediante una capa aislante de SiO₂-
5 Si₃N₄ (300 nm + 700 nm). La forma de los microelectrodos y de la capa aislante se realizaron mediante procesos de fotolitografía estándares en procesos de microtecnología.

La correlación entre las medidas de la impedancia de la córnea y la funcionalidad de las diferentes capas de la córnea se validaron mediante pruebas
10 experimentales en conejos. De esta forma, se indujeron alteraciones funcionales en la córnea mediante la administración de cloruro de benzalconio (BAC) diluido al 0.05% en volumen. Este compuesto altera las uniones entre las células provocando un aumento de la permeabilidad de las capas corneales.

Para detectar alteraciones en la capa epitelial se seleccionó una
15 configuración de microelectrodos con una Ws de 1 mm y una Nre de 3. El equipo de impedancia inyectó una corriente de 10 uA a 100 Hz entre los microelectrodos externos y registró la caída de potencial en los microelectrodos internos, obteniéndose la medida de la impedancia de la córnea. La medida obtenida a 100 Hz fue de 10 KΩ ± 2 KΩ en el caso de una córnea sana y de 4 KΩ ± 1 KΩ en el
20 caso de una córnea con la capa epitelial alterada. Repitiendo el mismo procedimiento, para detectar alteraciones en la capa endotelial se seleccionó una configuración de microelectrodos con una Ws de 5 mm y una Nre de 3, obteniéndose una medida a 10 kHz de 2 KΩ ± 0.5 KΩ para una córnea sana y una medida de 200 Ω ± 100 Ω para una córnea con la capa endotelial alterada.
25 Siguiendo el mismo procedimiento experimental se midió el aumento de la hidratación del estroma debido al aumento de la permeabilidad endotelio corneal. Para ello, se seleccionó una configuración de microelectrodos con una Ws de 1.8 mm y una Nre de 3, obteniéndose una medida a 1 MHz de 250 Ω ± 20 Ω para una córnea sana y una medida de 80 Ω ± 20 Ω para una córnea con la capa estromal
30 alterada.

REIVINDICACIONES

- 1.- Sensor de medida de la impedancia que comprende n microelectrodos, donde n está comprendido entre 4 y 30, dispuestos sobre un sustrato, siendo el tamaño y disposición de los microelectrodos adecuados para que hagan simultáneamente
5 contacto con una córnea, y donde los microelectrodos se seleccionan para realizar la medida en grupos de 4 a modo de 2 microelectrodos externos y 2 microelectrodos internos.
- 2.-Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 1, donde los microelectrodos están dispuestos de forma planar sobre el sustrato.
- 10 3.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el sensor comprende 10 microelectrodos.
- 4.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los microelectrodos son de material metálico seleccionado entre oro, platino, níquel, aluminio, titanio, nitruro de titanio, cromo y aleaciones de los
15 mismos.
- 5.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los microelectrodos son de material no metálico seleccionado entre nanotubos de carbono, grafeno y polímeros conductores.
- 6.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1
20 a 5, donde los microelectrodos tienen una forma alargada y están dispuestos en paralelo según su lado más largo.
7. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la anchura de cada electrodo We está comprendida entre 0,03 mm y 1mm.
- 25 8. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 7, donde la anchura de cada electrodo We es 0,3 mm.

9. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la longitud del electrodo L_e está comprendida entre 0,03 mm y 11mm.
10. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 9, donde la longitud del electrodo L_e es 1mm o 2 mm.
- 5 11. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos W_s está comprendida entre 0,2 mm y 11mm.
12. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 11, donde la
10 anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos W_s es 1 mm para el caso del epitelio, 1,8 mm para el caso del estroma y 5 mm para el caso de la capa endotelial.
13. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1
15 a 12, donde la relación de la separación entre microelectrodos $N_{re} = S_{ei}/S_e$, en el que S_{ei} es la distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos y S_e es la distancia entre las líneas medias de un electrodo interno y el electrodo externo más próximo, está comprendida entre 0,1 y 20.
14. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 13, donde la
20 relación de la separación entre microelectrodos N_{re} es 3.
15. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos es de un material rígido seleccionado entre silicio, carburo de silicio, vidrio y PCB (printed circuit board, RF4).
- 25 16 Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 15, donde los microelectrodos tienen una longitud de 2 mm y una anchura de 0,3 mm.
17. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1

a 14, donde el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos es de un material flexible seleccionado entre SU8, polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS), poliimida, polietileno naftalato (PEN), polietilentereftalato (PET), poliestireno, polímero de cicloolefina (COP) y polycarbonato.

18 Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 17, donde los microelectrodos tienen una longitud de 1 mm y una anchura de 0,3 mm

19. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde el sustrato es transparente.

10 20. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el sensor se realiza en forma de lentilla, adaptado a un soporte o adaptado a un recipiente que pueda contener córneas aisladas.

15 21. Dispositivo de medida de la impedancia que comprende un sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y un equipo de medida de impedancias multifrecuencia.

22. Dispositivo de medida de la impedancia según la reivindicación 21 donde el sensor y el equipo de medida de impedancias multifrecuencia están conectados mediante cables.

20 23. Dispositivo de medida de la impedancia según la reivindicación 21 donde el sensor y el equipo de medida de impedancias multifrecuencia están conectados por telemetría.

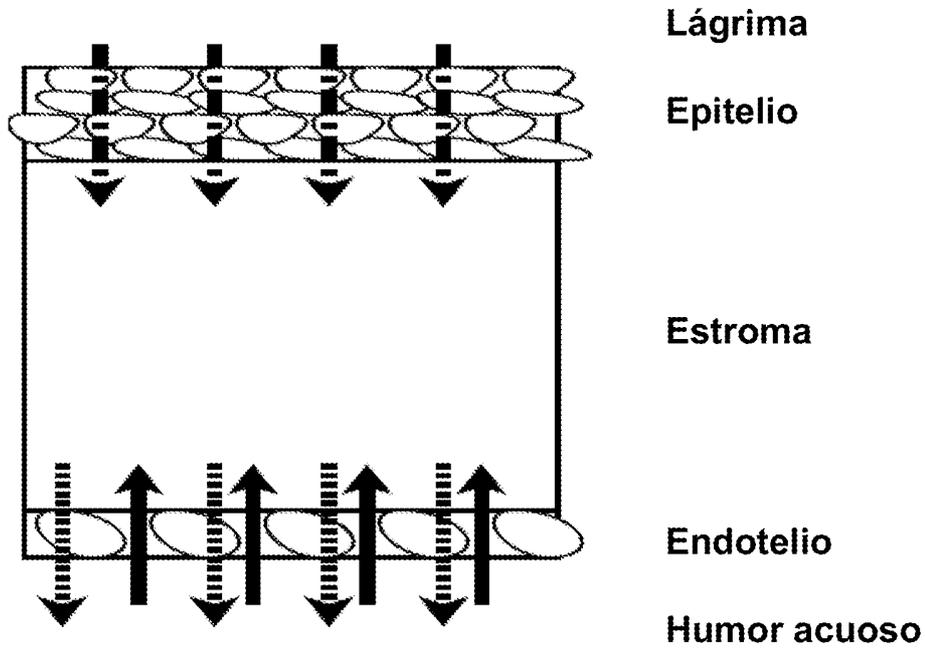
25 24. Uso de un sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o de un dispositivo que comprende dicho sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, para la medida de la impedancia para determinar las características funcionales de la córnea.

25. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características

funcionales del epitelio donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados W_s es menor de 1,5 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida es menor de 1 kHz.

26. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características
5 funcionales del endotelio donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados W_s es mayor de 3 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida está comprendida entre 1 kHz y 100 kHz.

27. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características
10 funcionales del estroma donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados W_s está comprendida entre 1,5 mm y 3 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida es mayor de 100 kHz.



-  Flujo por difusión a través del epitelio.
-  Flujo por difusión a través del endotelio.
-  Flujo por bombeo a través de las células endotelio.

Fig. 1

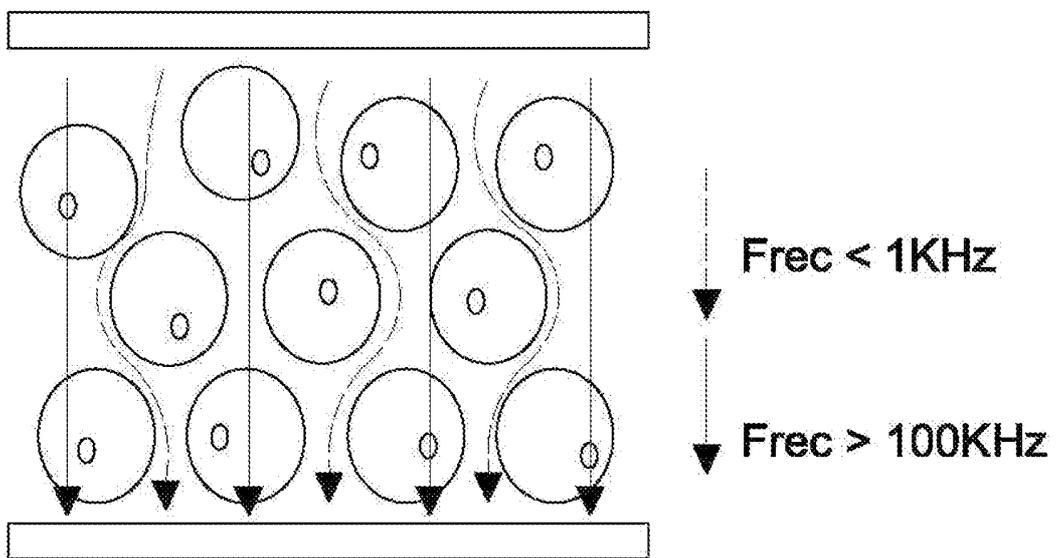


Fig. 2



Fig. 3A

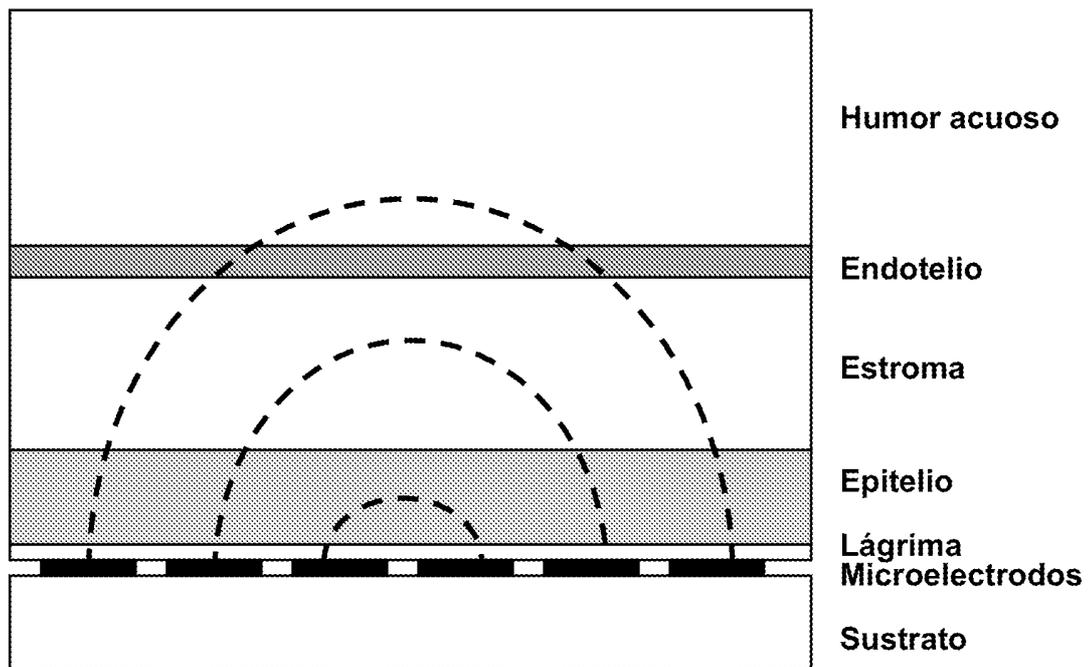
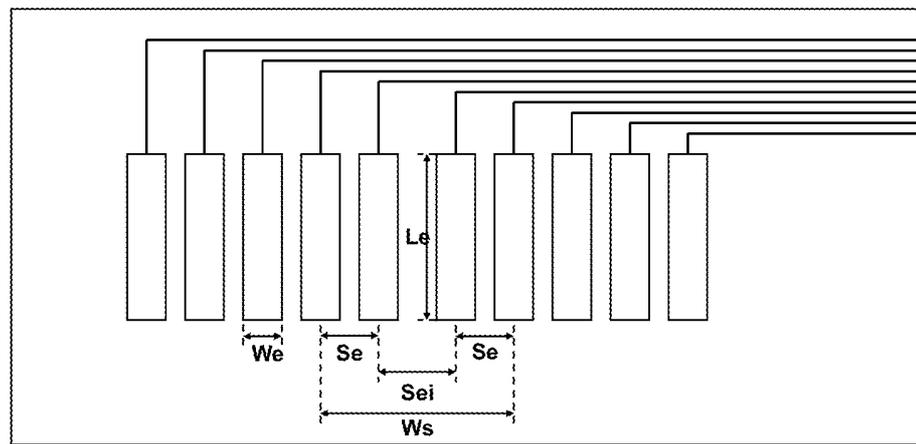


Fig. 3B

Fig. 4



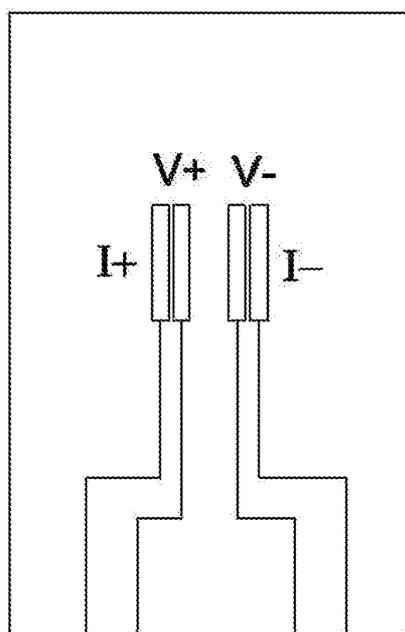


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B5/053 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, INSPEC, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Guimera A. et al. "Non-invasive assessment of corneal endothelial permeability by means of electrical impedance measurements", Medical Engineering & Physics, December 2010, vol. 32, n° 10, pages 1107 – 1115	1
Y	Ivorra A. et al. "Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals", Biosensors & Bioelectronics, 15.12.2003, Elsevier, UK, vol. 19, n° 4, pages 391 – 399	1,2,4,6,15,19
A		3,5,7-14,16-18,20-27

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
27/07/2011

Date of mailing of the international search report
(29/07/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Cárdenas Villar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495393

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070131

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Biermann H et al. "Messung der elektrischen Impedanz an normalen und pathologischen Hornhäuten", Fortschritte der Ophthalmologie: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 1991, vol. 88, n° 1, pages 17 – 20	1,2,4,6,15,19
A	Benvenuto A. et al. "Impedance microprobes for myocardial ischemia monitoring", 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology. Proceedings, October 2000, pages 234 – 238	1,2,4,6,15,19
A	ES 2324189 A1 (CSIC) 31.07.2009Todo the document	1
A	DataBase BIOSIS/BIOSIS, AN PREV199396046087, Watanabe Makio et al. "Dielectric measurements on the rabbit cornea using a surface electrode", abstract, 1993	1
P,A	CN 101766473 A (Peking University People S Hos) 07.07.2010Reivindicaciones 1 – 4, 8; paragraph 16	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070131

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2324189 AB	31.07.2009	WO2008041128 A EP2068707 A EP20070858935 US2010100002 A JP2011505169 A	10.04.2008 17.06.2009 30.11.2007 22.04.2010 24.02.2011
----- CN101766473 A -----	----- 07.07.2010 -----	----- NONE -----	----- -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070131

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61B5/053 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, INSPEC, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	Guimera A. et al. "Non-invasive assessment of corneal endothelial permeability by means of electrical impedance measurements", Medical Engineering & Physics, diciembre 2010, vol. 32, nº 10, páginas 1107 – 1115	1
Y	Ivorra A. et al. "Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals", Biosensors & Bioelectronics, 15.12.2003, Elsevier, UK, vol. 19, nº 4, páginas 391 – 399	1,2,4,6,15,19
A		3,5,7-14,16-18,20-27

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. **27/07/2011** Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. **29-JULIO-2011 (29/07/2011)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado A. Cárdenas Villar Nº de teléfono 91 3495393
---	---

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070131

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	Biermann H et al. "Messung der elektrischen Impedanz an normalen und pathologischen Hornhäuten", Fortschritte der Ophthalmologie: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 1991, vol. 88, nº 1, páginas 17 – 20	1,2,4,6,15,19
A	Benvenuto A. et al. "Impedance microprobes for myocardial ischemia monitoring", 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology. Proceedings, octubre 2000, páginas 234 – 238	1,2,4,6,15,19
A	ES 2324189 A1 (CSIC) 31.07.2009 Todo el documento	1
A	Base de datos BIOSIS/BIOSIS, AN PREV199396046087, Watanabe Makio et al. "Dielectric measurements on the rabbit cornea using a surface electrode", resumen, 1993	1
P,A	CN 101766473 A (Peking University People S Hos) 07.07.2010 Reivindicaciones 1 – 4, 8; párrafo 16	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070131

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2324189 AB	31.07.2009	WO2008041128 A EP2068707 A EP20070858935 US2010100002 A JP2011505169 A	10.04.2008 17.06.2009 30.11.2007 22.04.2010 24.02.2011
----- CN101766473 A -----	----- 07.07.2010 -----	----- NINGUNO -----	----- -----