



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Evaluación de dispositivo microfluídico
para detección de células cancerígenas
basado en mediciones de espectroscopía
de impedancia eléctrica**

TESIS

Que para obtener el título de
Ingeniero Mecatrónico

P R E S E N T A

Ernesto Cortes Rubio

DIRECTOR DE TESIS

Serafín Castañeda Cedeño



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por tanto amor, valentía y apoyo...

CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO 1 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	5
Antecedentes	5
Métodos de Enriquecimiento Basados en Morfología	5
Métodos de Detección	6
Combinación de Métodos de Enriquecimiento y Detección	8
Métodos Basados en Ácidos Nucléicos	10
La Impedancia Eléctrica y las Tecnologías Emergentes Basadas en Espectroscopia de Impedancia Eléctrica	11
Estado del Arte.....	15
CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	20
Justificación.....	20
Planteamiento del Problema.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo General del Trabajo	21
Objetivos Específicos del Trabajo.....	21
CAPÍTULO 3 DISPOSITIVOS Y MATERIAL EMPLEADO	23
Bomba Microfluídica	24
Módulo de Flujo QFM 401	24
Micro Balanza de Cuarzo.....	25
Implementación de Circuito en PSB	26
Materiales Adicionales.....	27
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA.....	30
Diseño Experimental	30
Metodología de Experimentación.....	32
CAPÍTULO 5 RESULTADOS.....	39
CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN.....	43
CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN Y TRABAJO A FUTURO	46
Conclusión	46
Trabajo a Futuro.....	47
BIIBLIOGRAFÍA.....	49

RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa), según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la causa de muerte más frecuente en el mundo entre las/los pacientes con cáncer en general. A partir del 2006, el riesgo de muerte por CaMa excede al riesgo provocado por el cáncer cervicouterino (CaCu). La detección oportuna de Células Tumorales Circulantes (CTC) representa una posibilidad para la prevención de metástasis y recidivas durante el tratamiento oncológico. Los métodos actuales para detección de CTC como lo son la citometría de flujo, los microfiltros y la radioimagenología, requieren de equipo costoso, personal técnico altamente especializado y son poco susceptibles de utilizarse en el campo clínico, por lo que resulta pertinente el desarrollo de tecnología nueva de operación intuitiva y semiportátil, orientada a la detección de CTC.

En este trabajo hemos propuesto el diseño de un biosensor de CTC simple y accesible basado en mediciones de Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE) asistida con nanopartículas magnéticas en el que se evalúa la posibilidad de detectar células cancerígenas de CaMa a través de mediciones de bioimpedancia eléctrica, para el efecto se propone un dispositivo microfluídico que hace pasar células cancerígenas marcadas con bioconjugado "Nanopartícula Magnética-Anticuerpo" (NpM-Ab), las cuales son ancladas por técnica inmunomagnética a una superficie con electrodos de oro. La evaluación de la técnica se realizó a través de la observación de la sensibilidad que presentan mediciones de bioimpedancia eléctrica a diferentes frecuencias en diferentes concentraciones de células cancerígenas. Los resultados indican que la detección de CTC's a través del dispositivo propuesto por medio de EIE es viable y permiten sustentar el principio del funcionamiento de un biosensor para detección de CTC basado en mediciones de bioimpedancia eléctrica asistida con nanotecnología.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS) el Cáncer de Mama (CaMa) es uno de los problemas de salud más grandes del mundo. El CaMa es el más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres, representa el 23 % de los casos de cáncer total y el 14% de las muertes por cáncer. El CaMa es también la principal causa de muerte entre las mujeres en los países económicamente en desarrollo. La metástasis es la principal causa de morbimortalidad relacionada con el CaMa; además, algunos estudios muestran que el 30% de las mujeres con CaMa primario alberga micrometástasis en su médula ósea. Casi la mitad de las pacientes con CaMa localizado y tratadas con cirugía tienen una posibilidad alta de sufrir recidiva, la cual intenta reducirse sometiendo a la paciente a un tratamiento oncológico (quimioterapia, radioterapia y otros) que no muchas veces es efectivo debido a que no se conoce detalladamente el estado de las CTC en el cuerpo. En México, el CaMa es la segunda causa de muerte en mujeres de entre 30 y 54 años y desde 2006 constituye la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, por encima del Cáncer Cérvico Uterino (CaCu). En los últimos años, el número de muertes por CaMa ha mostrado un crecimiento anual de 3.5%, 4 y 30% del total de los casos se concentra en cinco estados del norte del país. [1, 2, 3, 4].

Las Células Tumorales Circulantes (CTC) son células cancerosas que se originan de tumores sólidos primarios/metastásicos y se encuentran en tránsito por el sistema circulatorio. La detección y caracterización de CTC nos permite tener un control del tratamiento oncológico del paciente con CaMa y definir si es efectivo. El conteo de las CTC permite dar una ventana de posibilidad para la supervivencia general en el cáncer de mama operable y avanzado, sin embargo, el aislamiento de CTC

es un desafío debido a su extrema rareza, hay aproximadamente entre 1 y 10 CTC por cada 10^9 del total de células sanguíneas. [5, 6, 7].

En la actualidad existen diversos métodos y tecnologías para la de detección de CTC que se basan en sus propiedades físicas y biológicas. Este es un proceso bastante complicado ya que el método ideal debe ser altamente sensible, reproducible y fácil de implementar en un entorno clínico, además de la muy baja concentración de CTC en el flujo sanguíneo. Hoy en día, se buscan mejores tecnologías para evitar las desventajas de estos métodos, como lo son el uso de equipo costoso y especializado, el personal experto y calificado, la poca accesibilidad que tiene la población a estos, entre otras. Debido a lo anterior, se precisa la búsqueda de nuevos métodos tecnológicos que nos permitan disuadir estos inconvenientes y poder tener tecnologías de alta calidad a un bajo costo y con fácil acceso [4, 7, 8]. En la mayoría de los métodos existentes, se lleva a cabo una primera etapa de enriquecimiento para aumentar la sensibilidad del ensayo. Después se continúa con una etapa de detección que idealmente protegerá la integridad de CTC [8].

Nuestro grupo de investigación, conformado por alumnos de maestría y doctorado del Instituto Politécnico Nacional, su servidor y liderado por el doctor Cesar Antonio González, ha propuesto la detección de CTC a través de mediciones de espectroscopía de bioimpedancia eléctrica asistida con nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos que reconocen proteínas de superficie. La idea central es adherir nanosondas (método o herramienta que nos permite introducir cantidades u objetos nanoscópicos en diferentes sistemas) magnéticas hechas de óxido de hierro recubiertas con un polisacárido al que se le adhiere un anticuerpo, en la superficie de CTC, separarlas y anclarlas por métodos inmunomagnéticos en la superficie de un arreglo de micro-electrodos y

realizar mediciones de bioimpedancia como técnica de detección. Como una primera aproximación a la técnica planteada, en este trabajo de investigación se propone evaluar la factibilidad técnica de emplear mediciones de bioimpedancia eléctrica para detectar células cancerígenas de mama con la propuesta de un dispositivo microfluídico en donde se realizarán dichas mediciones.

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

ANTECEDENTES

En el siguiente apartado se presentan los diferentes métodos existentes para detección de CTC's y se describirán las distintas técnicas que estos ocupan, sus porcentajes de efectividad, además de sus ventajas y desventajas. También presentaremos una breve explicación de lo que es la Impedancia Eléctrica y de la Espectroscopía de Impedancia Eléctricas, así como sus aplicaciones.

Métodos de Enriquecimiento Basados en Morfología

Separación celular basada en la centrifugación por gradiente de densidad

El presente método comienza con la separación de la sangre de la muestra usando líquidos de gradiente de densidad (Ficoll, Lymphoprep). Esto provoca que las partículas más pesadas (eritrocitos, neutrófilos) se separen de las partículas inferiores y más ligeras, incluyendo partículas mononucleares y tumorales. La disminución del uso de estos gradientes de líquidos provoca que se interrumpa la separación total. Para este problema se diseñó el degradado de OncoQuick (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) que nos proporciona una barrera porosa situada dentro de un tubo de 50 ml en el que el gradiente se coloca debajo para evitar que se mezcle con la sangre antes de la centrifugación. OncoQuick ha demostrado ser superior a Ficoll. [4, 8, 9].

Filtración celular basada en el tamaño celular

La mayoría de los leucocitos de sangre periférica oscilan entre 8 y 11 μm de tamaño y pueden ser fácilmente eliminados de la muestra por filtración a través de una membrana de poro de 8 μm de

policarbonato. Este método se conoce como aislamiento por el tamaño de células tumorales epiteliales o el ensayo Nucleopore (Whatman International Ltd., Reino Unido). Este permite el recuento de CTC por mililitro de sangre, es sensible y mantiene la integridad de la célula permitiendo la detección de CTC y una caracterización adicional. Además, la tinción citológica y el análisis citopatológico pueden distinguir fácilmente células epiteliales no tumorales de las células tumorales. Sin embargo, el tamaño de las CTC puede no ser siempre 0.8 mm lo que hace cuestionable la sensibilidad de este ensayo. [4,8, 9].

Selección inmunomagnética

La selección inmunomagnética (IMS, en sus siglas en inglés) es el método más comúnmente utilizado para el enriquecimiento de CTC e implica un anclaje de CTC a perlas magnéticas mediante el uso de anticuerpos los cuales se adhieren al antígeno epitelial humano o molécula de adhesión de células epiteliales las cuales se encuentran expresadas en las células normales y tumorales. [8] *“Para tal efecto, se busca un fenotipo celular circulante tipo EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial) positivo, CK (citoqueratina 8, 18 y 19) positivo DAPI (marcación celular) positivo y CD45 (marcación de leucocitos) negativo. [...]”* [8].

Métodos de Detección

Los dos principales enfoques para detección de CTC en esta etapa son ensayos inmunológicos utilizando anticuerpos monoclonales o ensayos basados en Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR) que explotan antígenos específicos de tejido y/o tumor. [8].

Inmunocitoquímicos

Este tipo de métodos también amados inmuno-mediados han sido ampliamente utilizados para la detección de CTC. Encontrar los marcadores para este proceso es bastante difícil ya que los antígenos que expresan las CTC son exclusivos y no compartidos por otras células sanguíneas no tumorales. Los marcadores generalmente utilizados para la detección de CTC a pesar de las tasas variables de tinción positiva y negativa son el CK, EpCAM y BerEP4 que son anticuerpos específicos de antígenos epiteliales. También se ocupan marcadores específicos de órganos como el PSA, CEA o HER-2 que tienen el mismo problema de falsos positivos ya que sólo el 30% de las células cancerosas portan HER-2 en el CaMa (HER-2 positivo) o no son enteramente específicos de órganos. Estos marcadores se usan para una prueba de inmunofluorescencia los cuales generalmente se realizan con equipos de exploración automatizados los cuales describiré a continuación. [8].

Escaneado de fibra óptica

Es un método de microscopía digital de alta velocidad automatizado el cual aplica procedimientos de impresión láser al problema de detección de células raras, el cual se genera por las células mononucleares cuando se intenta detectar CTC raro. Estas técnicas nos proporcionan ventajas como el poder excitar 300 000 células por segundo y, en volúmenes mayores (50mm de campo), permiten la detección de células marcadas inmunofluorescentemente 500 veces más rápido que otros sistemas automatizados de microscopía digital. Por consiguiente, se evita la necesidad de etapas de purificación o enriquecimiento y se alcanza 98% de sensibilidad en la detección de CTC después de la fragmentación de sangre. [8].

Citometría de flujo intravenosa de múltiples fotones

Este método no requiere ningún muestreo de sangre, por lo contrario, se administra al paciente una inyección intravenosa de una sustancia fluorescente llena de iones o moléculas unidas a un átomo de metal por unión coordinada la cual se ancla a las células tumorales y estas reaccionan o irrumpen el haz de luz de un láser que se hace pasar sobre los vasos sanguíneos y nos permiten enumerar el flujo de CTC. [8].

Combinación de los Métodos de Enriquecimiento y Detección

CellSearch™

Este sistema automatizado de enriquecimiento inmunomagnético y tinción de CTC ha mejorado las evaluaciones inmunocitoquímicas, el cual es el único que actualmente está aprobado por la Agencia de Inspección de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos. Esta prueba diagnóstica se basa en el enriquecimiento de CTC con ferrofluidos acoplados a anticuerpos con EpCAM las cuales se separan de las muestras de sangre mediante potentes imanes. Las células tumorales aisladas se identifican a través de inmunotinción específica con anticuerpos fluorescentes y se descartan células hematopoyéticas mediante la contra-tinción con anticuerpos CD45. Para eliminar cualquier reactivo se repite la etapa inmunomagnética. Por último, se procede a clasificar las células a través de un microscopio llamado "Cell-Spotter Analyzer". Este sistema ha demostrado tener éxito y actualmente la sensibilidad va aproximadamente de 5 CTC por 7.5 ml de sangre, lo cual desde el punto de vista clínico es útil para el pronóstico de pacientes con cáncer de mama, colon y próstata metastásico. [8, 9, 10].

Dispositivos microfluídicos

Este nuevo método detecta CTC usando microscopía confocal fluorescente (método que ya hemos visto en los sistemas anteriores). El sistema consiste en una matriz auto-organizada de partículas superparamagnéticas cubiertas con anticuerpos particulares contra antígenos de superficie, lo cual permite capturar células dependiendo de los biomarcadores que expresan, las cuales se depositan dentro de un microcanal, lo cual nos permite tener una matriz bastante robusta. La ventaja de este método es que el rendimiento de captura fue superior al 90%, al igual que las células obtenidas fueron viables, permitiendo estudios de CTC y biología. [8].

Chip CTC

Este dispositivo aísla eficientemente el CTC de la sangre, además de que se es reproducible. Este chip está conformado por un arreglo de 78 000 electrodos, el cual contiene anticuerpos EpCAM (este anticuerpo está expresado en carcinomas de pulmón, mama, hígado próstata colorrectal, además de que no está presente en las células sanguíneas) lo cual le proporciona que sea más sensible para CTC en las pruebas de sangre. La sangre se bombea a través del chip bajo condiciones de flujo específicas, en donde los anticuerpos EpCAM positivos se adhieren a los "microposts", los cuales son detectados a la vez por una cámara. Con este proceso Nagrath [11], logró un 99% de eficiencia al aislar CTC. El número de CTC aislados osciló entre las 5 y 174 en pacientes con cáncer de mama sobre la base de estos resultados, la sensibilidad del chip fue del 99,1% y la especificidad del 100%. Esta eficiencia es dos veces mayor que la de otros métodos actualmente disponibles. [8].

Métodos Basados en Ácidos Nucleicos

Desde su descubrimiento en 1990, este método es el más comúnmente usado para detección de CTC. Esto se logra con el diseño de cebadores oligonucleótido, estos están formados por

nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN) (éste es sintetizado por la ARN primasa), que permite que el ADN polimerasa III comience la síntesis de la nueva cadena de ADN. El cebador es la secuencia de inicio en la replicación de la cadena; los cuales son especialmente creados para el gen de interés, además de que el ADN es más estable que el mRNA empleado en otras técnicas. La técnica que se aplica específicamente es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), esta se aplica para identificar pequeños pedazos de ADN en laboratorio, y tiene diversas aplicaciones entre ellas la más importante, que es la identificación de gérmenes agresores en nuestro organismo. A pesar de que es un método bastante usado y con alta eficiencia hay dos problemas que lo asechan. El primero es que no hay un marcador de tejidos específicos en la mayoría de los tumores sólidos lo que nos puede conducir a falsos positivos y la segunda que la variabilidad de las sensibilidades de la PCR podría conducirnos a falsos negativos. Pero incluso si se permite la solución de estos problemas, esta técnica no proporciona una evaluación precisa del número de células tumorales presentes en la muestra debido a la variabilidad en la velocidad de transcripción entre las células tumorales. [8].

La Impedancia Eléctrica y las Tecnologías Emergentes Basadas en Espectroscopia de Impedancia Eléctrica

La impedancia eléctrica de una parte particular de un objeto se estima midiendo la señal de voltaje que pasa a través de esa parte infundiendo una corriente constante. Matemáticamente, la impedancia (Z) se mide dividiendo la señal de tensión medida (V) entre la señal de corriente aplicada (I). La Z es una cantidad compleja y tendrá un ángulo de fase particular (θ) dependiendo de las propiedades del tejido. En este proceso de medición de impedancia eléctrica, la impedancia bioeléctrica de un tejido corporal se mide suministrando una corriente alterna de baja frecuencia de baja amplitud (generalmente sinusoidal) al tejido

a través de un conjunto de electrodos superficiales unidos a la superficie del tejido (borde del tejido). La corriente alterna se aplica para evitar el daño tisular. En el análisis de la impedancia bioeléctrica, tenemos la impedancia = resistencia + reactancia. La resistencia es el valor de oposición al paso de la corriente que tiene el resistor o resistencia. La **reactancia** es el valor de la oposición al paso de la corriente alterna que tienen los condensadores (capacitores) y las bobinas (inductores). En este caso existe la **reactancia capacitiva** debido a los condensadores y la **reactancia inductiva** debido a las bobinas. Cuando en un mismo circuito se tienen estos elementos combinados (resistencias, condensadores y bobinas) y por ellas circula corriente alterna, la oposición de este conjunto de elementos al paso de la corriente alterna se llama: impedancia y esta tiene unidades de Ohmios (Ohms). Y es la suma de una componente resistiva (debido a las resistencias) y una componente reactiva (debido a las bobinas y los condensadores) es: $Z = R + j X$, es decir, la Impedancia (Z) es igual a la suma de los componentes resistivos (R) más los componentes reactivos (X). La jota (j) que precede a la X, nos indica que ésta (la X) es un número imaginario. No es una suma directa, es una suma fasorial (suma de fasores). Lo que sucede es que estos elementos (la bobina y el condensador) causan una oposición al paso de la corriente alterna (además de un desfase), pero idealmente no causa ninguna disipación de potencia. En la bobina, las corrientes, el condensador y la corriente alterna se ve que hay un desfase entre las corrientes y los voltajes, que en el primer caso es atrasada y en el segundo caso es adelantada. El desfase que ofrece una bobina y un condensador son opuestos y, si estos llegaran a ser de la misma magnitud, se cancelarían y la **impedancia** total del circuito sería igual al valor de la resistencia. [[12](#), [13](#),[14](#)].

La espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) es un importante campo de aplicación de mediciones de bioimpedancia. Es una técnica utilizada principalmente para caracterizar el tejido basado en el conocimiento de sus propiedades electrofisiológicas en el dominio de la frecuencia. Entre los estudios relevantes para los tejidos patológicos, una de las áreas más prometedoras es la caracterización de los tejidos cancerosos. Esta se propone para diferenciar los tejidos escamosos normales de los precancerosos y de cáncer invasivo. Se han realizado varios estudios para caracterizar los tejidos cancerígenos mediante espectroscopía de impedancia. Aunque la medición de las impedancias de los tejidos puede proporcionar información valiosa, la medición es inexacta e inconsistente debido a la compleja composición y estructura de los tejidos. Aunque recientemente esta tecnología ha resurgido teniendo grandes avances en la detección de células tumorales entre otros usos relevantes en la medicina. [11, 12].

Método de dos y cuatro electrodos

En ambos métodos existen electrodos superficiales por los cuales se inyecta la corriente, los cuales se conocen como electrodos de corriente o de accionamiento (estos se muestran en color rojo en la [figura 1](#)) y los electrodos los cuales proporcionan el voltaje alterno a diferentes frecuencias se denominan electrodos de voltaje o electrodos de detección (estos se muestran de color azul en la [figura 1](#)). Como el nombre lo dice, el método de los dos electrodos sólo utiliza solo dos electrodos para la medición de impedancia; en estos el suministro de señal de corriente y la medición de voltaje se realiza con los mismos electrodos, lo que hace surgir el problema de la impedancia de contacto lo que provoca que en los datos se dé una caída de tensión. En el método de los cuatro electrodos ([Figura 1\(b\)](#)),

se utilizan dos pares de electrodos separados, un par para la inyección de corriente y otro par para la medición de tensión, los cuales se posicionan para la medición como una matriz lineal conectados al sujeto de prueba como se muestra en la [figura 1](#) (b). En esta técnica se inyecta una corriente de amplitud constante al sujeto de prueba a través de los electrodos de corriente (de color rojo en la [figura 1](#) (b)) y las señales de voltaje obtenidas se miden con los electrodos de detección (de azul rojo en [la figura 1](#) (b)). [13].

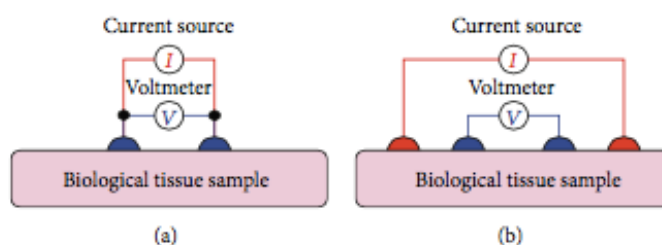


Figura 1. Medición de la impedancia bioeléctrica en la técnica: (a) medición de impedancia mediante técnica de dos electrodos, (b) medición de impedancia mediante técnica de cuatro electrodos. [13]

Análisis de impedancia bioeléctrica

En esta técnica se analiza la medición de la impedancia bioeléctrica de la composición corporal de un objeto biológico. En este análisis se mide la bioimpedancia del tejido que se produce dentro del objeto biológico cuando una corriente alterna tiende a fluir a través de él, por lo cual se encuentra en función de las propiedades del tejido, así como de la frecuencia de la corriente aplicada. Este proceso determina la impedancia bioeléctrica de una parte del cuerpo en particular que se encuentra ligada a electrodos superficiales, y esta se puede utilizar para calcular una estimación de la composición corporal. Siendo breve y concreto, un análisis de impedancia bioeléctrica es una técnica en la que la composición corporal de un objeto biológico se analiza mediante la medición de su impedancia eléctrica llamada

impedancia bioeléctrica o bioimpedancia eléctrica. El Dr. William Mills, Doctor en Medicina de la armada de Estados Unidos, inició el estudio sobre el análisis de la impedancia bioeléctrica en Mount McKinley, Alaska en 1981, para evaluar el estado de hidratación de los soldados en ambientes de clima frío con mucha altitud. Poco después, Lukaski et. al. en el USDA en Grand Forks, Dakota del Norte, publicó el primer documento sobre el análisis de la impedancia bioeléctrica y composición corporal. [13].

ESTADO DEL ARTE

En el presente apartado describiré los sistemas o, más en concreto, las técnicas existentes de EIE que se acercan a al método que se utilizará en este trabajo, así como sus aportes encontrados debido a estos.

Los avances en la EIE enfocados a las tecnologías para la detección de CTC han sido enormes en los últimos quince años. En el 2007, Arum Han y sus colaboradores mostraron en un estudio la viabilidad de diferenciar células de cáncer de mama humano de diferentes etapas de las de una línea celular de tejido mamario humano normal a través de la caracterización de sus propiedades eléctricas medidas con Bioimpedancia Eléctrica (BIE). Los cuales fueron capaces de entregarnos valores de impedancia tanto en magnitud como en fase en función de la frecuencia aplicada. (Figura 2) [11].

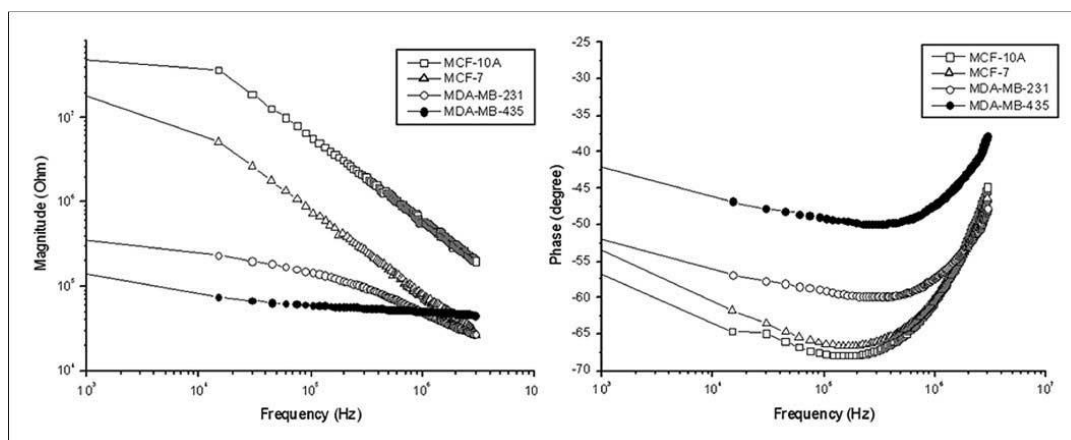


Figura 2. Mediciones de impedancia de MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, yMDA-MB-435 en un rango de frecuencia de 100 Hz a 3,0 MHz [11].

Un estudio reportado por Hengyi Xu y colaboradores en 2011 se muestra la viabilidad de una técnica para realizar la separación de CTC de sangre total fresca por separación inmunomagnética basada en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (OI) usando para esto el anclado de estas con anticuerpos (marcadores) para así lograr una reacción antígeno-anticuerpo (Figura 3). [15].

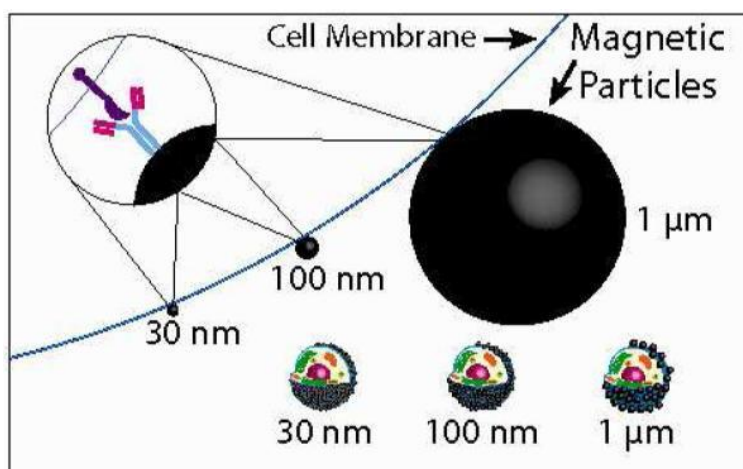


Figura 3. Diagrama esquemático de células marcadas inmunomagnéticamente con partículas de diferentes diámetros. El número de partículas de tamaño nanométrico que se pueden unir a la superficie de la célula es mayor que las partículas de tamaño micro debido a una menor exclusión estérica. [15].

En el 2014 el Doctor César González y sus colaboradores publicaron un estudio en donde se indica una técnica barata y sencilla para un posible biosensor de CTC en sangre total con la viabilidad

para su uso en regiones de pocos recursos. La técnica empleada fue el uso de la medición de la bioimpedancia relativa, asistida por nanopartículas magnéticas ([Figura 4](#) y [Figura 5](#)). Las mediciones registradas representan los cambios de impedancia relativos causados por la retención magnética de una interface de células tumorales frente a una condición homogénea en el intervalo de frecuencias de 10 a 100 KHz, de las cuales los resultados resultaron positivos al poder separar con un imán las células tumorales en suspensión, acopladas a nanopartículas magnéticas y así poder obtener las mediciones de impedancia relativa, las cuales demostraron tener un valor potencial a frecuencias alrededor de 20 KHz [\[16\]](#).

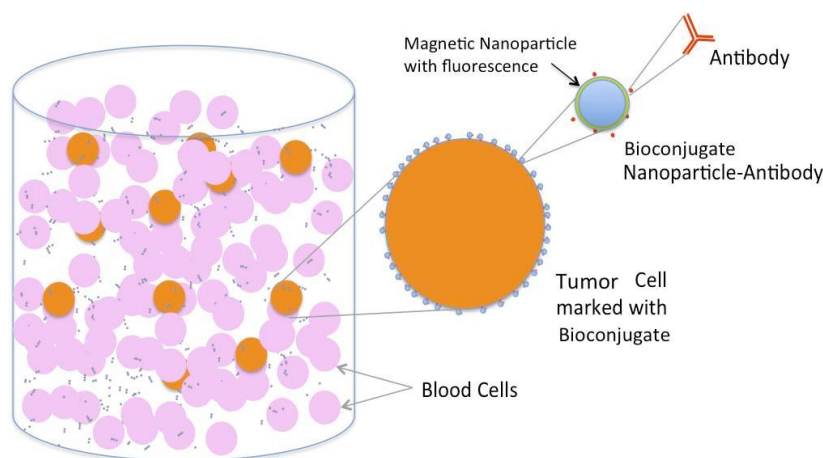


Figura 4. Se Muestra el concepto experimental de células tumorales en suspensión incubadas con bioconjugado "nanopartículas magnéticas-anticuerpo monoclonal". [16].

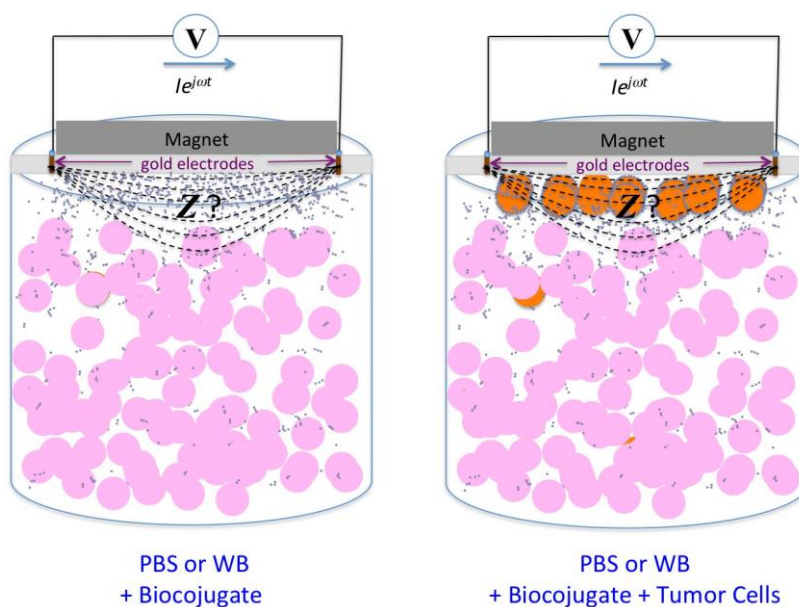


Figura 5. Se Muestra la medición de la bioimpedancia asistida por nanopartículas magnéticas. [16].

Con base en el último experimento mencionado se plantea en este trabajo el desarrollo de una nueva prueba de separación de CTC por medio de la bioimpedancia asistida por nanopartículas magnéticas así como el primer prototipo de biosensor.

CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Justificación

El cáncer es uno de los problemas más importantes mundialmente; en México se ha convertido en la segunda causa de muerte en mujeres entre la tercera y quinta década de la vida. El cáncer invasivo y la metástasis se asocian con la presencia de CTC's; las tecnologías actuales para su detección demandan equipamiento costoso y personal altamente calificado. Las tecnologías emergentes disponibles hasta el momento no han demostrado una potencial utilidad en el campo clínico. Se requiere el diseño de nuevas tecnologías para la detección de CTC's susceptibles para usarse en los sectores de salud con bajos recursos. Nuestro grupo de investigación ha propuesto el fundamento base del diseño de un biosensor de CTC's. La idea central consiste en adherir nanopartículas magnéticas en la superficie de células cancerígenas por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, a fin de separarlas y anclarlas por método inmunomagnético en la superficie de un cristal de cuarzo con electrodos de oro embebidos y realizar a través de las mismas mediciones de EIE para la detección.

El presente trabajo se orienta a realizar una primera aproximación a la técnica planteada y evaluar su potencial utilidad para aislar y detectar células cancerígenas de mama en un sistema microfluídico, para con esto poder hacer un hincapié para la construcción y el diseño de un biosensor sencillo, de fácil uso, y además con la ventaja de que sea accesible para cualquier clase social a un precio mínimo.

Planteamiento del Problema

Actualmente no existen técnicas para aislamiento y detección de células cancerígenas de mama que sean accesibles al sector salud en general, por lo que se pregunta, ¿Será posible aislar y detectar células cancerígenas de mama de manera accesible y con un bajo costo?

Hipótesis

El aislamiento y detección de células cancerígenas de mama es factible a través del empleo de un sistema microfluídico y mediciones de EIE asistida con nanopartículas magnéticas.

Objetivo General del Trabajo

Evaluar la factibilidad técnica de aislar y detectar células cancerígenas de mama a través de un sistema microfluídico y mediciones de EIE asistida con nanopartículas magnéticas.

Objetivos Específicos del Trabajo

- Adaptar un módulo de interface eléctrico-iónico para aislamiento y medición de células cancerígenas de mama por EIE.
- Reconocer y programar un módulo Sciospec™ para realizar mediciones de EIE en dispositivo microfluídico.
- Estandarizar mediciones de EIE en sistema microfluídico.
- Realizar aislamiento inmunomagnético de células cancerígenas de mama en dispositivo microfluídico.
- Realizar mediciones de EIE en células cancerígenas de mama aisladas por técnica inmunomagnética.

CAPÍTULO 3 DISPOSITIVOS Y MATERIAL EMPLEADO

Bomba Microfluídica

La bomba de infusión SyringePump™ (Figura 6) es un dispositivo electromecánico e hidráulico, que puede suministrar un flujo constante o variable, dependiendo de la configuración que se desee (aunque obviamente tenemos limitaciones de flujo). Se pretende utilizar un dispositivo que suministre un flujo constante, que no tenga contacto directo con el fluido como las bombas peristálticas; por medio de la unión de esta bomba y una jeringa de insulina de 100 unidades (1 ml). Esta bomba, utiliza un motor a paso que a su vez está conectado a un tornillo sin fin, anclado a un riel el cual impulsa el émbolo de la jeringa y este pueda avanzar o retroceder. Este equipo puede ser configurado para tener micro y nano litros adaptándose a las necesidades del usuario ya que cuenta con un microcontrolador que realiza el cálculo de la cantidad de fluido que se suministra. El proceso de programado lo iniciamos ingresando el diámetro del embolo de la jeringa, después la cantidad de fluido por unidad de tiempo, teniendo estos dos valores el procesador interno de la maquina calcula las rotaciones del motor que nos genera una salida de fluido constante.



Figura 6. NE-1002X Fuente: SyringePump, 2017

Módulo de Flujo QFM 401™

Los módulos de flujo Q-Sense ([Figura 7](#)) están hechos de aluminio en la estructura, la superficie de contacto con líquidos está hecha de titanio mientras que la parte interna en forma de O están hechos de Viton®. Esta cámara está adaptada para utilizar una micro balanza de cuarzo que ayuda a realizar las mediciones de los tejidos en el interior. Necesita un volumen de aproximadamente 250 μl para entrar y salir del módulo, mientras que el volumen interno de la cámara es aproximadamente de 40 μL . Estos módulos pueden desmontarse completamente, permitiendo una limpieza a fondo de cada uno de los componentes para reducir el riesgo de contaminación en un entorno multiusuario, estas características mejoran la reproducibilidad y la fiabilidad al momento de realizar algún experimento.



Figura 7. Módulo de Flujo Q-Sense. Fuente: Biolinscientific, 2015.

Micro Balanza de Cuarzo

La micro balanza de cristal de cuarzo QCMB, por sus siglas en inglés ([Figura 8](#)), es un dispositivo altamente sensible a las variaciones de masa que ocurren en su superficie de oro, es decir

las propiedades piezoeléctricas de este. Esto se debe a los cambios que experimenta la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo, material piezoeléctrico, al hacerlo su masa. La frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo es dependiente de la masa de lo absorbido en la superficie del material.

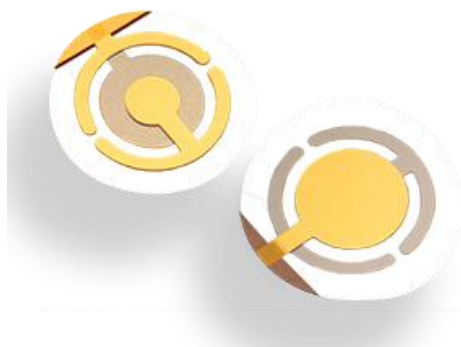


Figura 8. Micro balanza de cristal de cuarzo. Fuente: webshop.inficon.com/es-es/Category/ProductGroup/ThinFilmDeposition?path=Products,

2017

Sciospec ISX3™

Analizador compacto impedancia de un solo canal de alta resolución (precisión <0,1%), BNC-Interface para la medición de 2, 3 y 4 puntos, puerto de extensión para interfaces de aplicación específica, ioport opcional con IOs digitales y sensores de temperatura, la sincronización de hardware es rápida, SMA sincronización de entrada / salida puertos, conexión fácil por vía de alta velocidad USB, Ethernet o Wi-Fi, incluyendo software Sciospec para el análisis de control y de datos basado en PC, la cual incluye interfaz Sciospec-Comque permite un control personalizado de Java, C, LabVIEW, Matlab, etc. Con base en todo lo anterior se eligió por experimentos ya hechos y comprobados su excelente rendimiento y nuevos caminos en la aplicación de la espectroscopía de impedancia eléctrica ([Figura 9](#)).



Figura 9. Sciospec ISX 3. Fuente: sciospec.de, 2017

Implementación de Circuito en PSB

El siguiente diseño fue implementado para lograr la conexión entre el Módulo de flujo y el sistema Sciospec™, conectando los electrodos salientes a una conexión RF SMA ([Figura 10](#)).

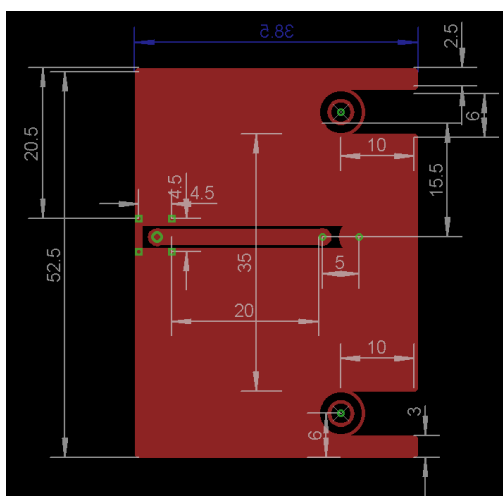


Figura 10. PSB

Materiales adicionales



Figura 11. Conector RF SMA hembra. Fuente: Steren, 2017



Figura 12. Tubo de teflón de alta calidad (microtubo o capilar). Fuente: es.aliexpress.com, 2017



Figura 13. Jeringa de insulina de 100 unidades. Fuente: www.celdual.com, 2017

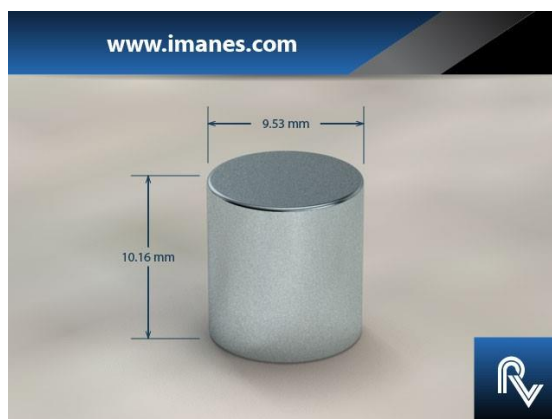


Figura 14. Imán de neodimio redondo 9.53mm x 10.16mm. Fuente: www.ímanes.com, 2017



Figura 15. Nanopartículas ferromagnéticas. Fuente: www.scielo.br, 2017.



Figura 16. Conector RF SMA macho. Fuente: Steren, 2017



Figura 17. Cable coaxial RG58A. Fuente: Steren, 2017

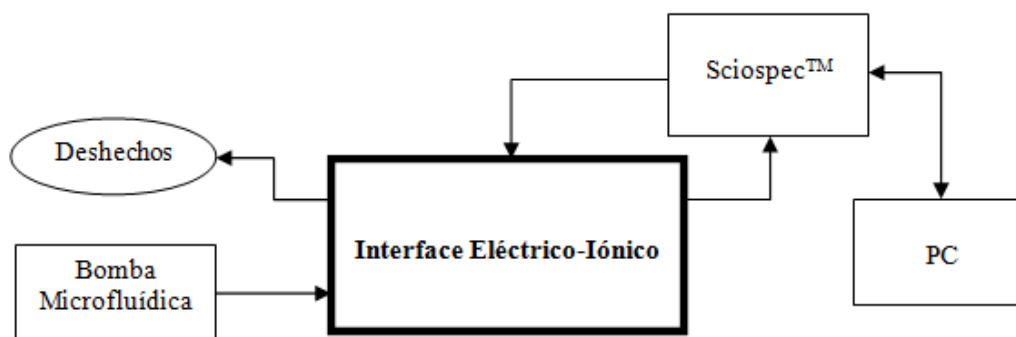


Figura 18. Cable hembra-hembra BNC. Fuente: www.newegg.com, 2017

CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA

Diseño Experimental

Diagrama de bloques del sistema microfluídico para aislamiento y detección de CTC en base a mediciones de EIE.



El diseño del sistema se pensó de tal forma que fuese lo más accesible posible, pequeño y eficiente; este consta de cuatro módulos (Figura 19): 1.- Bomba Microfluídica (Figura 6); 2.- Eléctrico-Iónico; 3.-Módulo Sciospec™; y 4.- La PC. La Bomba de infusión microfluídica se eligió por la capacidad de manejo de velocidad de inyección, además de que las cantidades posibles a controlar eran precisas para el experimento; esta tiene adaptada una jeringa insulina, la cual realiza la infusión controlada de los analitos hacia la cámara del módulo Interfaz Eléctrica-Iónica por medio de un tubo-capilar. La interfaz Eléctrica-Iónica representa el punto principal del experimento, ya que es donde se realiza el aislamiento de células cancerígenas y medición de bioimpedancia a través de electrodos de oro, el cual fue seleccionado con base al experimento de Arum Han [11]. El módulo Sciospec™ es el instrumento especializado que nos permite la interacción con los electrodos de la Interfaz Eléctrica-Iónica, es decir, la que inyecta la diferencia de potencial y a la vez mide la corriente para estimar la

impedancia del sistema. El módulo de la PC nos permite programar el instrumento Sciospec™ mencionado anteriormente, además del almacenamiento de los datos hechos en las lecturas.

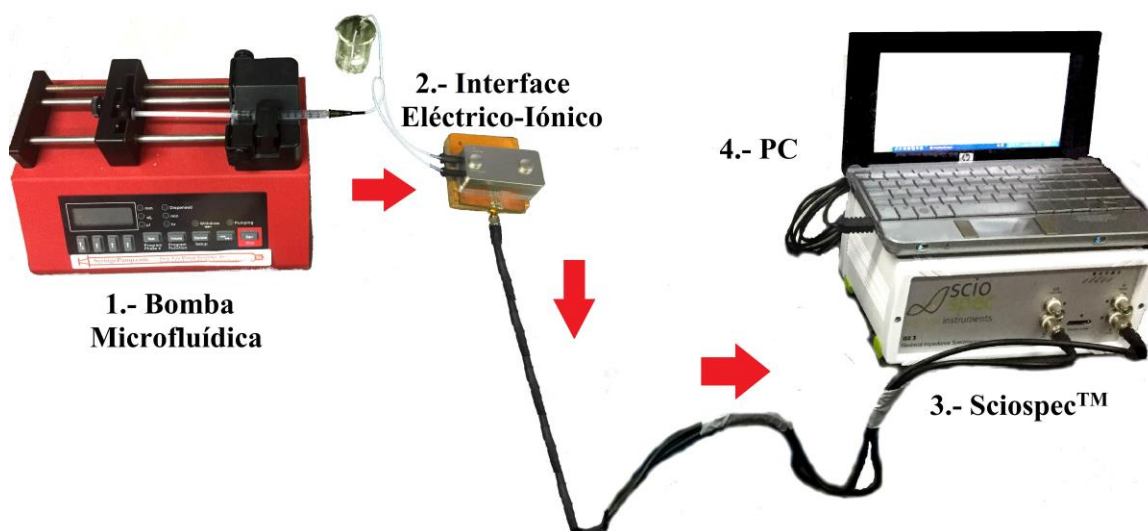


Figura 19. Módulos del Sistema

Metodología de Experimentación

Adaptación de un módulo de interface eléctrico-iónico para aislamiento y medición de células cancerígenas de mama por EIE.

Se empleó el dispositivo microfluídico QFM 401™ ([Figura 7](#)), el cual consiste en una cámara hermética que aloja un cristal de cuarzo con electrodos de oro embebidos ([Figura 8](#)); a través de los cuales se realizaron mediciones de bioimpedancia multifrecuencia con el módulo Sciospec™ ISX 3, con el cual se aplicó la medición de dos electrodos, mencionada anteriormente, dando como resultado una señal con un poco de ruido, ya que los mismos electrodos que inyectan la corriente leen la diferencia de potencial ([Figura 9](#)). Se diseñó una tarjeta PSB ([Figura 10](#)) con el objetivo de

interconectar los electrodos de salida del dispositivo microfluídico QFM 401™ con el dispositivo Sciospec™ para poder realizar las mediciones de impedancia. Se adaptaron dos microtubos-capilares, uno a la entrada y otro a la salida microfluídica del QFM 401™ ([Figura 11](#) y [Figura 12](#)). Al capilar de entrada se le aunó una jeringa de insulina la cual inyectaba la sustancia en cuestión accionada por la bomba microfluídica ([Figura 13](#)). Se adaptó una base de madera para disponer un imán de neodimio ([Figura 14](#)) en la parte inferior de la cámara donde está el cuarzo y los electrodos para que así este lograra mantener las nanopartículas ferromagnéticas ([Figura 15](#)) adheridas a células cancerígenas (aislamiento inmunomagnético). Todos estos aditamentos constituyeron la "Interface Eléctrico-Iónico" ([Figura 20](#)).



Figura 20. Interface Eléctrico-Iónico

Reconocimiento y programación del módulo Sciospec™ para realizar mediciones de EIE en dispositivo microfluídico.

El módulo de lectura de impedancia trae consigo el software Sciospec™, el cual es proporcionado por la misma empresa fabricante del producto, que permitió la comunicación con la PC a través de un puerto USB. Su funcionalización fue un reto, ya que no había mucha información del software, pero con mucha paciencia y experimentación se logró que funcionara. Este proporcionó la opción de hacer un protocolo de medición, logrando con esto un mapeo, es decir, una muestra gráfica, de 126 pasos logarítmicamente espaciados en un rango de frecuencia de 100Hz hasta 1MHz. Las mediciones se realizaron por triplicado. La comunicación entre la Interface Eléctrico-Iónico y el dispositivo Sciospec™ se hizo con la combinación de una conexión SMA macho ([Figura 16](#)) y un cable coaxial ([Figura 17](#)), y dos cables BNC ([Figura 18](#)). Los datos arrojados por este software se extrajeron en tablas de datos con formato Excel, para así analizarlos estadísticamente y graficar los resultados.

Estandarización de mediciones de EIE en sistema microfluídico.

Como lo mencioné en el punto anterior, terminando el acoplamiento de todas las piezas de la Interface Eléctrico-Iónico se prosiguió a hacer pruebas de EIE con Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, que es una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos), agua Milli-Q® (que es una combinación de tecnologías para obtener agua purificada Tipo II y ultrapura Tipo I a partir del agua potable) y nanopartículas, además de pruebas con bioconjugado (nanopartículas + antígeno, más adelante se explicará esto) con cuatro objetivos específicos, el primero, llegar a una estandarización de experimento, el segundo, ver qué tanto variaban las mediciones obtenidas de impedancia, el tercero, poder comprobar que el imán atraía las nanopartículas a los electrodos provocando un cambio en las mediciones, y por último la reproducibilidad del experimento.

Para el primero objetivo se realizaron diversas pruebas del dispositivo, empezando por la colocación óptima de la PSB diseñada y la prueba del funcionamiento del circuito en conjunto con el dispositivo Sciospec™ para así comprobar que en efecto los electrodos de la cámara, donde pasaría el fluido, estaban correctamente conectados con los del dispositivo.

Para el segundo objetivo, se comenzó haciendo con mediciones de aire, es decir, se midió la cámara vacía y se confirmó que había una lectura promedio; en seguida aplicó la misma metodología de estandarización usando PBS y Milli-Q® para hacer un control aproximado del tiempo de relajación de los dos fluidos dentro de la cámara, así como la cantidad necesaria y tiempo de inyección de los fluidos en cuestión. Se comenzó con la infusión de 500µl de la sustancia a medir en un periodo aproximado de doce minutos para que esta pasara primero por el microtubo-capilar de entrada, alcanzase a llenar la cámara del sistema por completo y saliera un poco por el microtubo-capilar de salida (hacia los deshechos). Pasado el proceso de llenado, se procedía a hacer la medición con ayuda del software mencionado anteriormente, el cual no fue fácil entender su funcionamiento, se buscó información en internet, pero se encontraron muy pocas cosas útiles, lo cual nos forzó a experimentar con él y encontrar la forma de hacerlo funcionar; la medición mencionada duraba aproximadamente dos minutos. Por último, se procedía a hacer un lavado del sistema con la inyección de Milli-Q®. En el caso de las nanopartículas y el bioconjugado, se hizo casi el mismo protocolo, lo único que cambió fue el lavado final del sistema, al quitar primero el imán de este para así lograr desanclar las nanopartículas de la cámara.

En el tercer objetivo, se realizaron un variado número de inyecciones de PBS + nanopartículas para encontrar una velocidad de infusión empíricamente óptima y que estuviese en el rango de la bomba seleccionada, ya que se deseaba saber experimentalmente si la fuerza que ejercía

el imán sobre las partículas magnéticas era suficiente, y con esto asegurar que estas quedasen adheridas a él sin que la velocidad del flujo las arrastrase. Por lo tanto, se hicieron diversas mediciones con PBS + nanopartículas, a diferentes velocidades hasta que las mediciones mostraron una estandarización a una velocidad de $20 \left[\frac{\mu L}{min} \right]$. Por último, se realizaron un plus de mediciones para asegurarnos de tener una reproducibilidad real en nuestro experimento y poder realizar el experimento completo con las células de cáncer (bioconjugado), lo cuál se explicará más adelante.

Es necesario aclarar, que a esta investigación se le dio un pequeño enfoque cualitativo, lo cual nos lleva a buscar empírica y experimentalmente algunos valores, entre los mas destacados encontramos la velocidad de infusión, ya que por el momento buscamos que se le de una expansión o diversificación de nuestro trabajo.

Aislamiento inmunomagnético de células cancerígenas de mama en dispositivo microfluídico.

La célula cancerígena de mama usada para este trabajo fue la llamada SK-3, ya que tal línea celular representa una fase avanzada y muy agresiva del CaMa. Elegida esta, se prosiguió con la elaboración del bioconjugado, lo cual se realizó en base al trabajo de la Mtra. en C. Lidia F.E. Huerta Núñez, quien lo elaboró con ayuda del protocolo A-10 CHEMICELL INC, que es un procedimiento de acoplamiento con carbodiimidias para partículas magnéticas. La técnica demanda la identificación de marcadores moleculares para promover una reacción antígeno-anticuerpo, la cual, provoca que se adhieran las células cancerígenas a las nanopartículas dentro del bioconjugado y con esto lograr el aislamiento inmunomagnético, es decir, poder atrapar las células ancladas a las nanopartículas con el imán en la cámara del dispositivo microfluídico y a así medir su impedancia. [[17](#), [18](#)].

Diseño del experimento de evaluación.

Con el objetivo de evidenciar cambios en la bioimpedancia eléctrica como una función del aislamiento y anclaje de células cancerígenas en la interfaz eléctrica-iónica, se diseñó un experimento en dos ensayos independientes a fin de generar las siguientes condiciones: A) SK-3.- infusión y anclaje magnético de células cancerígenas de la línea SK-3 incubadas con nanosondas, y B) Control Negativo. - infusión y anclaje magnético de nanosondas sin la presencia de células cancerígenas. Siguiendo con el enfoque cualitativo que se mencionó antes, se evaluaron tres concentraciones de células cancerígenas a fin de estimar la sensibilidad del sistema (50, 500 y 5000 cels/500 μ l), estas con base a que el protocolo A-10 habla de hacer disoluciones con cantidades de células logarítmicas partiendo de una concentración de 5000. Cada ensayo se realizó por triplicado ([Figura 22](#)).

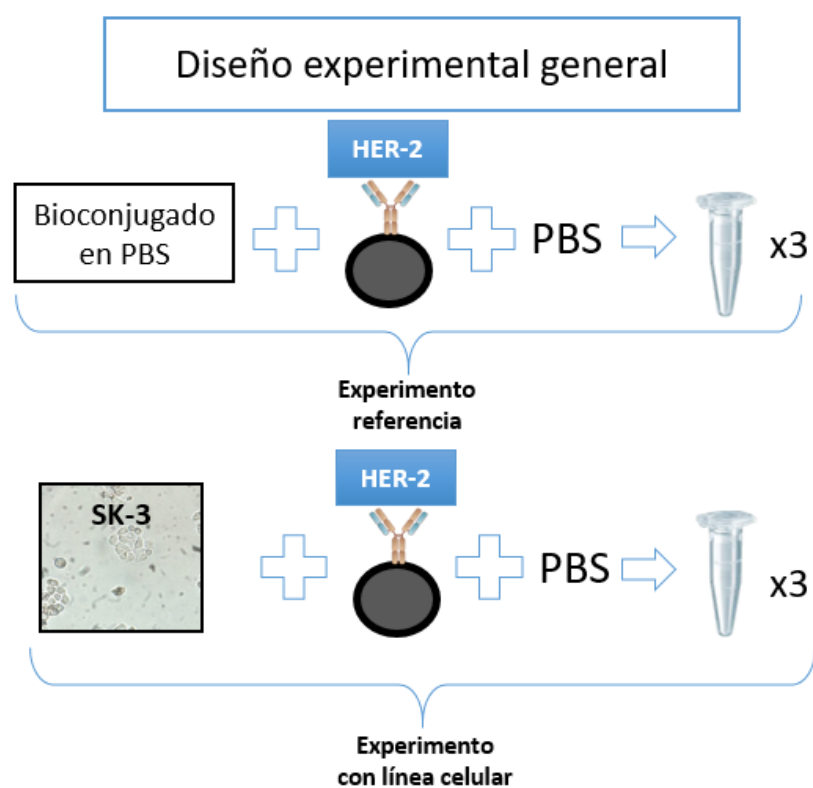


Figura 22. Estructura externa de los experimentos de referencia y final

CAPÍTULO 5 RESULTADOS

Descubrimos que el dispositivo Sciospec™ a través de su interface en la PC es capaz de entregarnos la impedancia en sus dos componentes (una parte real o resistiva y una parte imaginaria o reactancia), separados en dos tablas de valores tomando la frecuencia como función. Como se mencionó anteriormente, se tomaron tres ciclos de medición por cada uno de los 126 pasos hechos en el mapeo de la frecuencia, esto decidido para hacer mediciones múltiples. Con los datos obtenidos se decidió realizar un análisis con el cual se buscaba tanto eliminar la mayor cantidad de ruido, así como la mayor cantidad de puntos de inflexión, haciendo una depuración estadística para así encontrar las dos mejores representaciones de cada concentración. Para esto, se investigó el cómo extraer los datos fueron desde el software, lograr su portabilidad y exportarlos a las plataformas estadísticas.

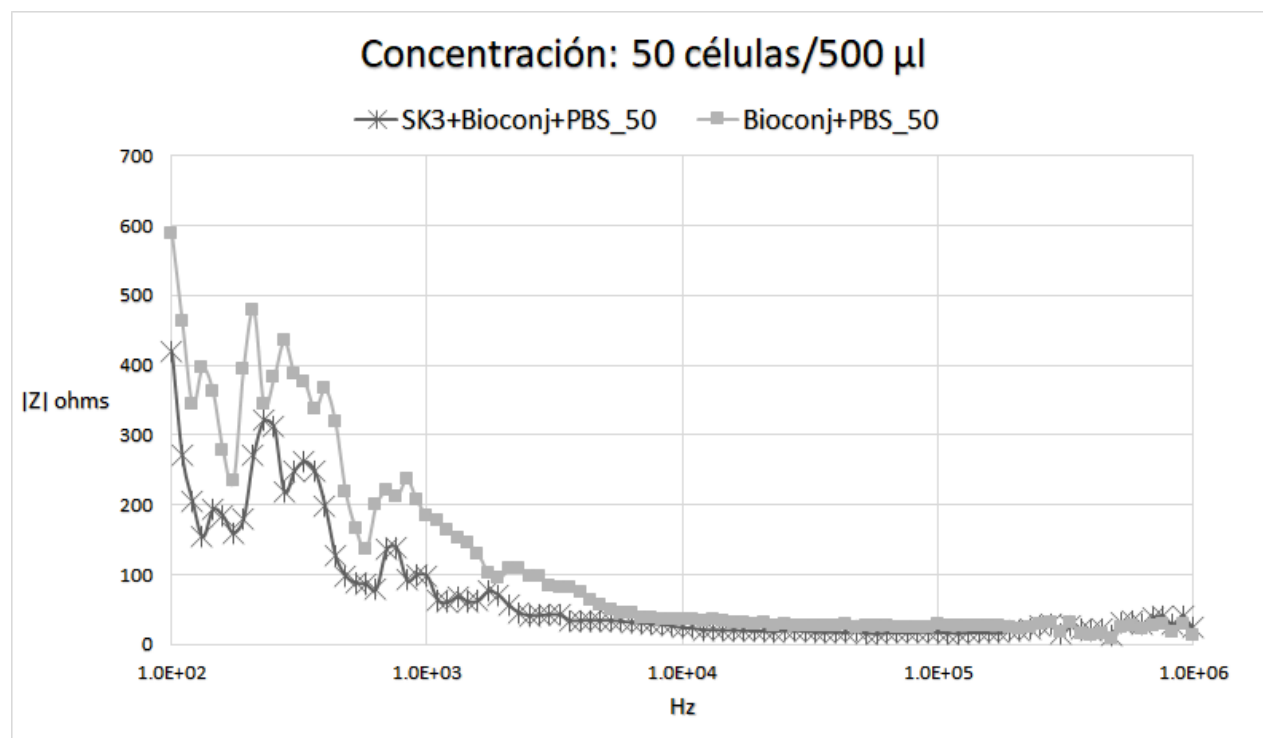


Figura 23. Parte resistiva con concentración de 50 células/50 µl

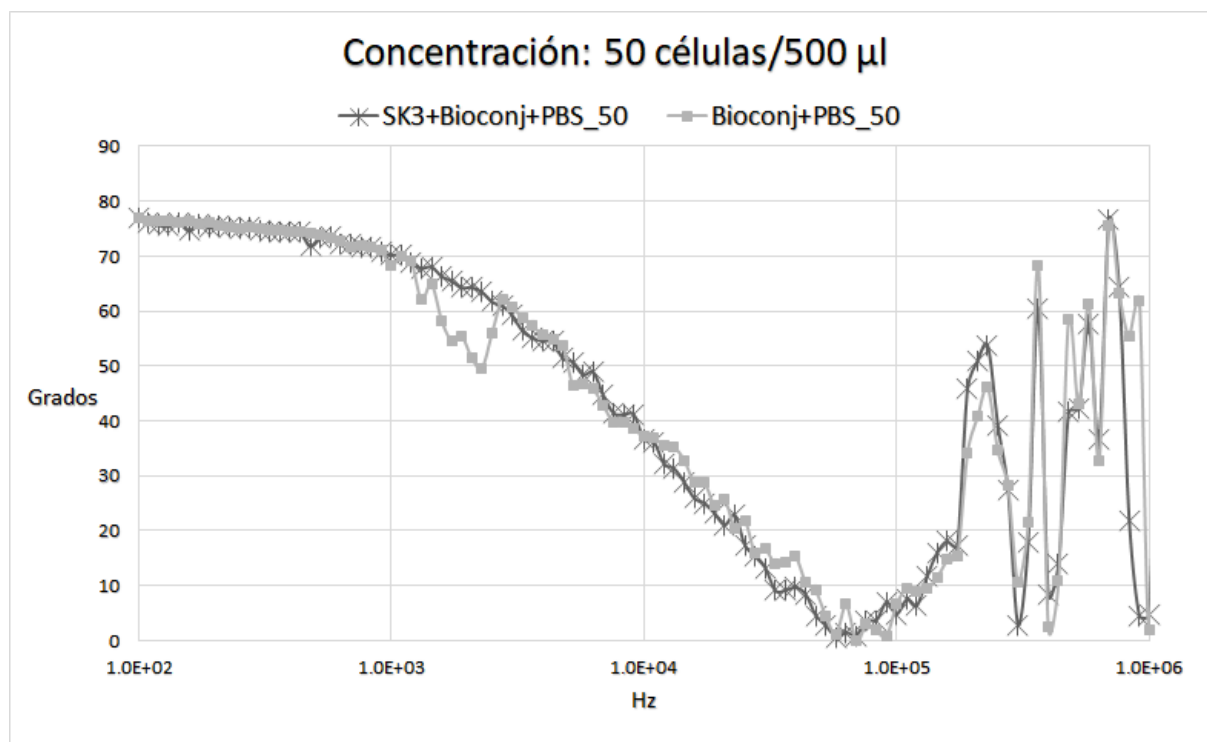


Figura 24. Parte reactiva con concentración de 50 células/500 μ l

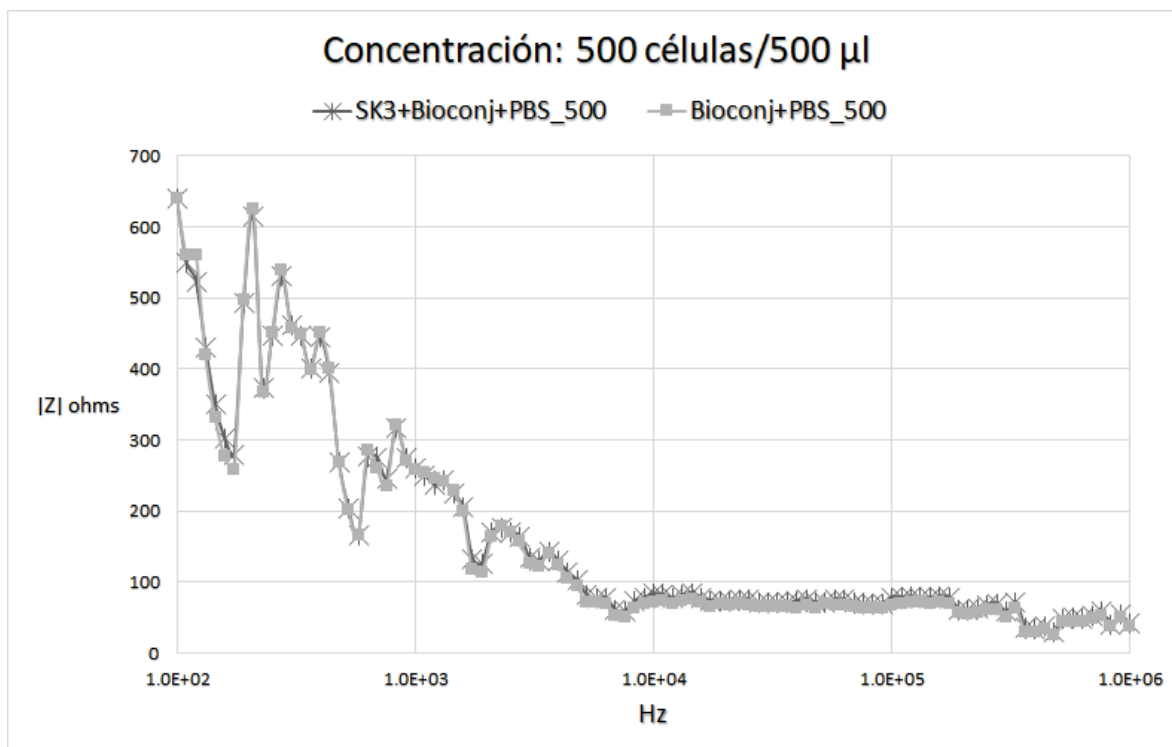


Figura 25. Parte resistiva con concentración 500 células/500 μ l

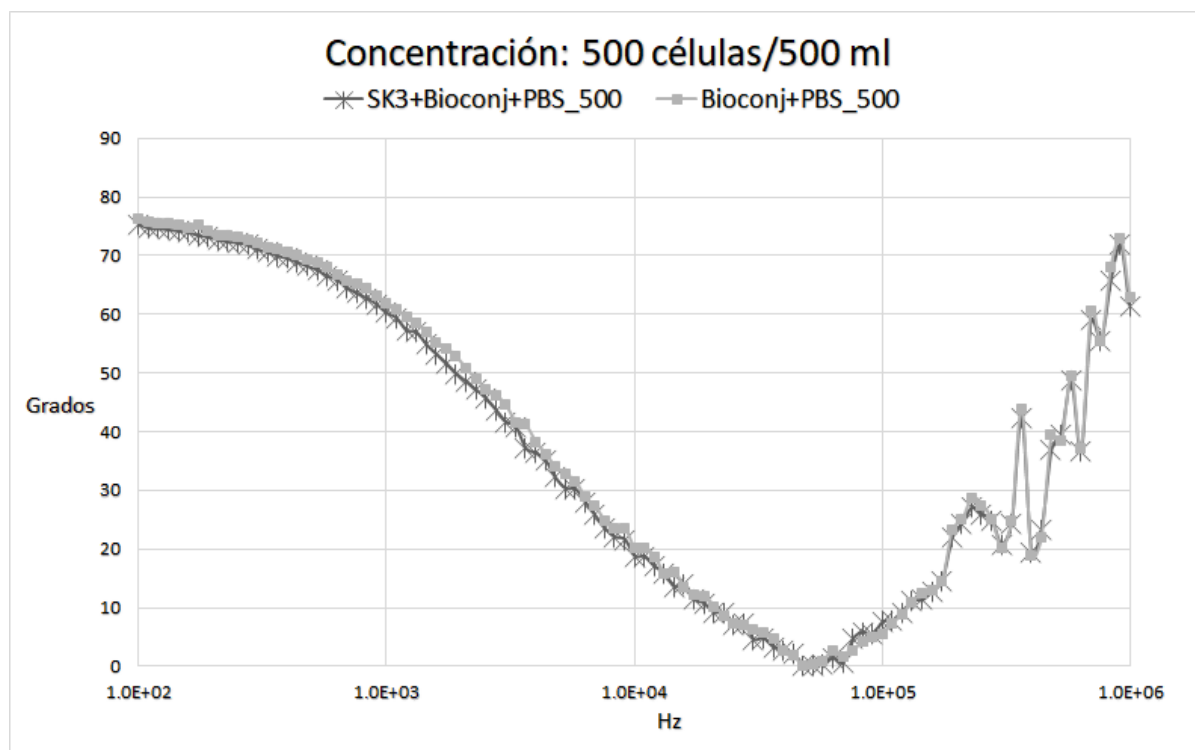


Figura 26. Parte reactiva con concentración de 50 células/500 μ l

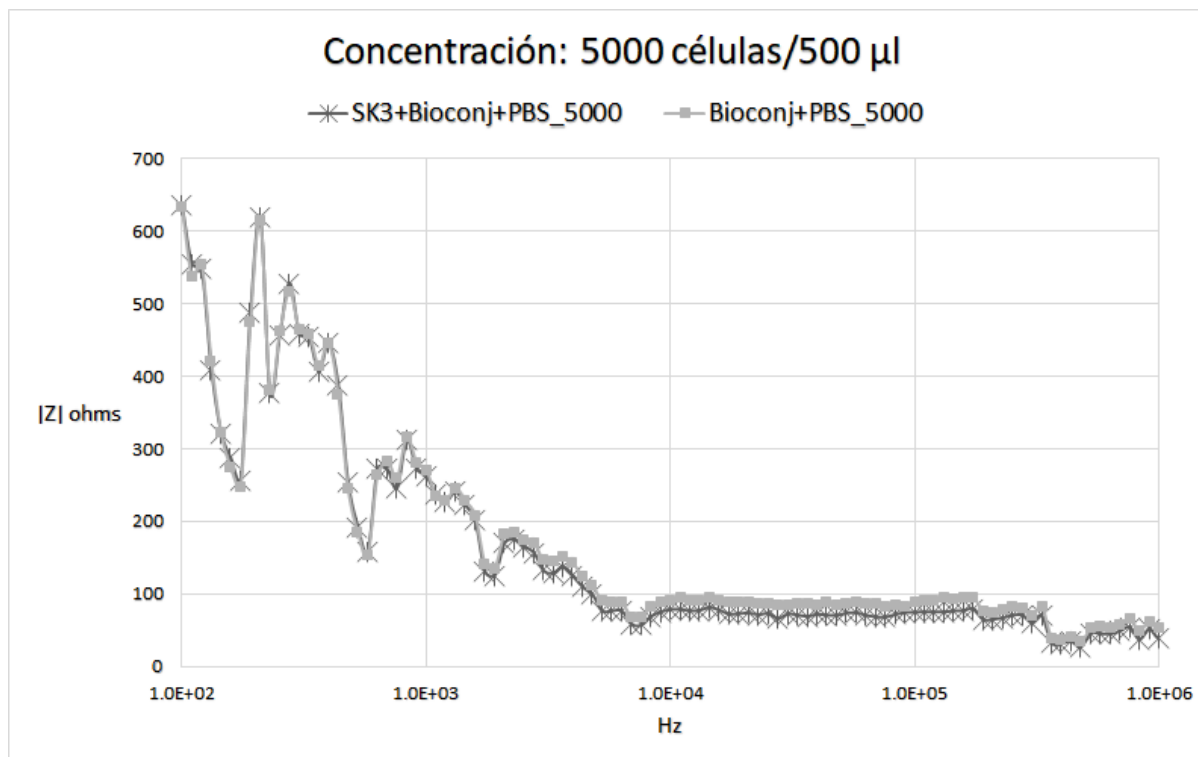


Figura 27. Parte resistiva con concentración 5000 células/500 μ l

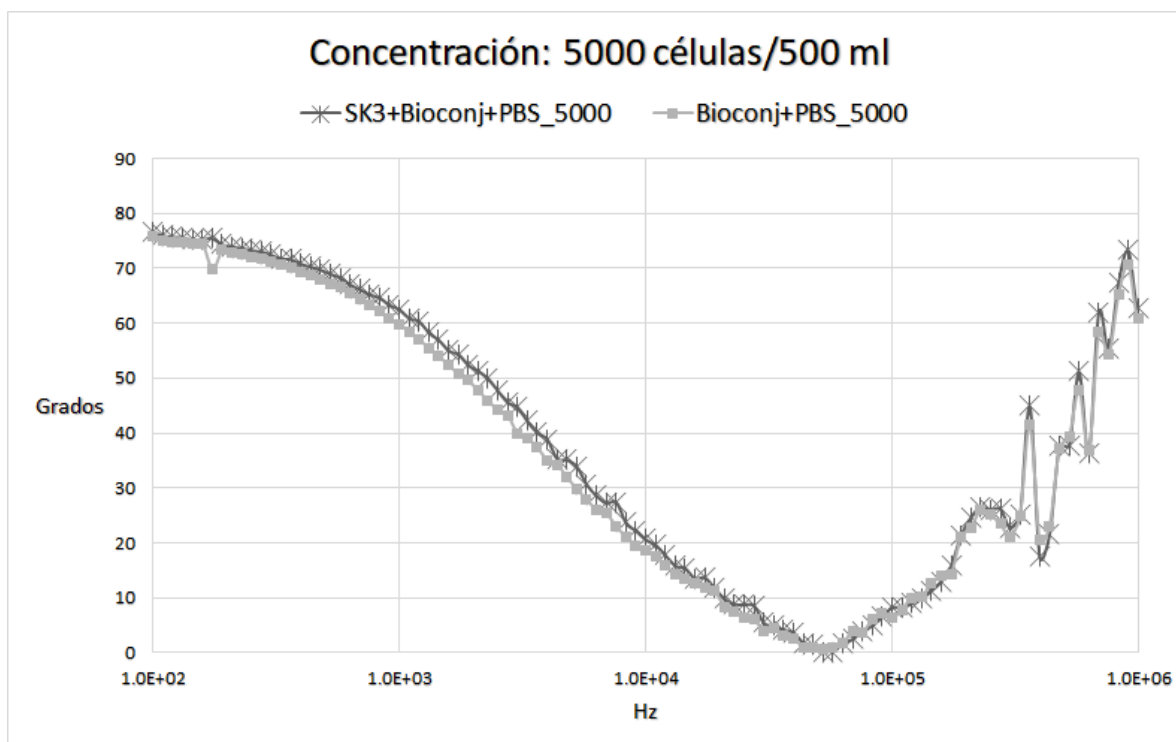


Figura 28. Parte reactiva con concentración 5000 células/500 μ l

Las Figuras 23 a 28 muestran los espectros de bioimpedancia en magnitud y fase respectivamente de las tres concentraciones mencionadas. Gracias a la depuración estadística hecha se logró plasmar y comparar caramente las mediciones obtenidas; a pesar de que aún tenemos presentes algunos puntos de inflexión en las gráficas, se encontró una reproducibilidad clara en las pruebas de 50 células/500 μ l, así como una sensibilidad significativa con respecto a los experimentos referencia (infusión sin células), es decir, en las figuras 23 y 24, sobre todo en la primera (parte resistiva o real) se puede identificar a mayor detalle la diferencia entre las mediciones de los experimentos con la más baja concentración, en donde se observa como es claramente diferenciable la bioimpedancia de la sustancia con las nanopartículas ancladas a las células cancerígena, sobre todo a bajas frecuencias. Las concentraciones de 500 y 5000 células/500 μ l no mostraron poseer una sensibilidad diáfana.

CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN

La observación relevante es que la mayor sensibilidad para discriminar la presencia de células cancerígenas se observó a la menor concentración celular (50 células/500µl), un análisis de tal condición nos orilla a pensar que para las concentraciones de óxido de hierro empleadas a 500 y 5000 células/500µl, el efecto de percolación se hace evidente, *“que es un término asociado a variados problemas de diversas áreas de conocimiento como la activación de conducción en semiconductores, sistemas compuestos aislador-conductor, ruptura dieléctrica, mecánica de fluidos en medios porosos, microemulsiones e incluso el estudio de patrones de crecimiento urbano. [...]”* [11], cuando nuestro sistema se encuentra cerca del límite de percolación, las propiedades conductivas de nuestras nanopartículas siguen las leyes de la potencia, es decir:

$$\sigma(p - p_c)^t$$

donde, p es la concentración del material conductor, en este caso las nanopartículas, p_c es la concentración en el límite de percolación y t es el exponente crítico de la conductividad. Lo cual en resumen nos dice que si saturamos de alguna manera el sistema con nanopartículas llegará un punto en el cual estas se conviertan en conductor, lo cual afectará directamente los resultados, como lo pudimos observar en nuestros resultados. [11]. Por otra parte, los hallazgos nos permiten inferir que la técnica planteada tiene viabilidad para detectar pequeñas concentraciones de células cancerígenas aisladas por técnica inmunomagnética, y que la limitación expresa que las concentraciones de nanopartículas empleadas no excedan el límite de percolación.

Evaluando la potencial utilidad de mediciones de EIE para detectar células cancerígenas de mama por este método propuesto determinamos de muy buena forma un resultado positivo, el cual, cabe

señalar que sólo es posible validar bajo las condiciones experimentales que se definieron para el experimento, no así. Para una validación clínica, lo cual nos lleva a la necesidad de indagar aún más en este procedimiento y la renovación o la mejora del dispositivo usado, siendo posible hacerlo con un presupuesto menor y con esto poder llevarlo a las comunidades más necesitadas.

Evaluando la potencial utilidad de mediciones de EIE para detectar células cancerígenas de mama por este método propuesto determinamos de muy buena forma un resultado positivo, lo cual nos lleva a la necesidad de indagar aún más en este procedimiento y la renovación o la mejora del dispositivo usado, siendo posible hacerlo con un presupuesto menor y con esto poder llevar a las comunidades más necesitadas.

CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN Y TRABAJO A FUTURO

Conclusión

La implementación de un pequeño sistema como biosensor para el aislamiento y detección de células cancerígenas de mama a través del empleo de un dispositivo microfluídico y mediciones de EIE asistida con nanopartículas magnéticas resultó factible a bajas concentraciones celulares y nanopartículas magnéticas. Mediciones de la magnitud de la bioimpedancia a bajas frecuencias parecen ofrecer la mejor sensibilidad del sistema, lo que nos indica que este dispositivo junto con su procedimiento de medición es viable como nueva técnica de detección de CTC.

Trabajo a Futuro

Para optimizar el funcionamiento de este biosensor se pueden hacer muchas mejoras, de las cuales se discutirá en este apartado.

Comenzaré con la mejora del dispositivo de medición de bioimpedancia. Actualmente existen tarjetas integradas como lo son la AD8302, AD4958, AD5933, etc., que se pueden utilizar para este tipo de mediciones, ya que entre sus funciones existe un aparatado para la graduación de impedancia, además de que puede ejecutarse un mapeo de esta en el rango de frecuencia que se utilizó. Estas, consta destacar, que son mucho más simples, pequeñas, con bajo consumo eléctrico y de menor costo que el dispositivo Sciospec™, que, aunque este es demasiado bueno ya que es un instrumento especializado para realizar lecturas de impedancia a dos o cuatro puntos, pienso está sobrado para el proceso para el cual se está utilizando; además las tarjetas mencionadas tienen su propia interfaz para la PC, lo cual nos permite obtener nuestros datos para análisis. También podría diseñarse un

dispositivo de infusión microfluídica con el cual se podría sustituir la jeringa aunada a la bomba de infusión con el fin de ahorrar espacio, tener un control de infusión exacto porque con esta unión no se puede obtener un buen control de la velocidad de inyectado de fluido, energía (alimentación del biosensor), y la disminución de costo, ya que la bomba microfluídica es muy cara.

Igualmente propondría un rediseño para los electrodos que obtienen las señales, cambiarlos por electrodos activos, los cuales consistirían en colocar filtros a la recepción de la señal, para que esta se procese en ese mismo momento y después se manden al sistema donde se leerán. Estos electrodos podrían evitarnos el ruido casi por completo en nuestras señales, como son los de alimentación (60Hz), el de los medios de comunicación entre la señal cruda recibida y el dispositivo de medición (cables, alambres, material conductor, etc.). Así mismo podría integrarse el dispositivo de medición en la misma posición para que lo único que se enviara a la PC fuesen los datos crudos de la medición. También cambiar a un sistema de cuatro electrodos en vez de dos, así se obtendría una señal mucho más clara y evitaríamos la desventaja de la polarización en la interface.

Finalmente, que todo el sistema se reduzca considerablemente de tamaño, pensando en la aplicación de tecnologías MEMS para la integración de un "lab in a chip" y con esto se decremente el costo del dispositivo, aunque hay que aclarar que para que baje el costo tendría que hacerse una producción en masa, además de hacer una selección óptima de los materiales, como los procesos de manufactura para la elaboración de este biosensor. Con el claro objetivo de poder hacer llegar este dispositivo a los lugares más remotos y de menos recursos.

BILIOGRAFÍA

1. Ahmedin Jemal, DVM, PhD et.al., "Global Cancer Statistics". CA: A Cancer Journal Clinicians; 61(2): 69-90, 2011.
2. "Cancertoday", IARC, GLOBOCAN [base de datos y estadísticas del cáncer en el mundo]. France, 2012. [Fecha de acceso 20 de Junio del 2017]. URL disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
3. Felicia Marie Knaul, PhD,et.al. "Utilización correcta de las técnicas de detección de cáncer de mama en las mujeres mexicanas". Salud Pública de México; 56(5): 538-546, Septiembre-Octubre 2014.
4. Luz F. Sua, Nhora M. Silva, Marta Vidaurreta, María L. Maestro Sara R. Fernández, Silvia Veganzones, Virginia de la Orden, José M. Román. "Detección inmunomagnética de células tumorales circulantes en cáncer de mama metastásico: nuevas tecnologías". Revista Colombiana de Cancerología; 15(2): 104-109, 2011.
5. Athina Markou, Areti Strati, Nikos Malamos, Vassilis Georgoulas and Evi S. Lianidou. "Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer by a Liquid Bead Array Hybridization Assay". Clinical Chemistry; 57 (3): 421-430, 2011.
6. Luz Fernanda Sua Villegas, Nhora María Silva Pérez, Marta Vidaurreta Lázaro, María Luisa Maestro de las Casas, Sara Rafael Fernández y Silvia Veganzones de Castro. "Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales." Revista del Laboratorio Clínico; 4(3): 163-169, 2011.

7. Daniel L. Adams, Steingrímur Stefánsson, Christian Haudenschild, Stuart S. Martin, Monica Charpentier, Saranya Chumsri, Massimo Cristofanilli, Cha-Mei Tang, R. Katherine Alpaugh. "Cytometric Characterization of Circulating Tumor Cells Captured by Microfiltration and Their Correlation to the Cell Search VR CTC Test." *Cytometry, Part A* (2015); 87A: 137-144, 2015.
8. Noh Gerges, Janusz, and Nada Jabado. "New technologies for the detection of circulation tumor cells". *British Medical Bulletin*; 94: 49-64, 2010.
9. Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B et. al., "Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells". *Anticancer Res.* 25(3A): 1803-10, May-Jun 2005.
10. Riethdorf S., Fritsche H, Muller V et al., "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the Cell Search system". *ClinCancer Res.*; 13:920-8, 2007.
11. Arum Han, Lily Yang and A. Bruno Frazier. "Quantification of the Heterogeneity in Breast Cancer Cell Lines Using Whole-Cell Impedance Spectroscopy". *ClinCancer Res*; 13(1): 139-43, 2007.
12. Germán Olarte-Echeverri, William Aristizábal-Botero, Gloria Fátima Osorio, Jerónimo Rojas-Díaz. "Espectroscopia de impedancia eléctrica en cáncer invasivo del cuello uterino en mujeres de caldas", *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 61(1): 28-33, Colombia, 2010.

13. *Thushar Kanti Bera. "Bioelectrical Impedance Methods for Noninvasive Health Monitoring: A Review". Journal of Medical Engineering. Vol. 2014, Republic of Korea, June 2014.*
14. *Sverre Grimnes and Orjan Martinsen. "Bioimpedance and bioelectricity basics. Chapter 4: Electrical properties of tissue". Academic Press, Marzo, 2008.*
15. *Hengyi Xu, Zoraida P. Aguilar, Lily Yang, Min Kuang, Hongwei Duan, Yonghua Xiong, Hua Wei and Andrew Wang. "Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood". Biomaterials; 32(36): 9758–9765, 2011.*
16. *Jesús G Silva, Rey A Cárdenas, Alan Quiróz, Virginia Sánchez, Lucila M. Lozano, Nadia M. Pérez, Jaime López, Cleva Villanueva y César González. "Impedance Spectroscopy assisted by Magnetic Nanoparticles as Potential Biosensor Principle of Breast Cancer Cells in Suspension". Physiological Measurement, México, 2014.*
17. *L. F. E. Huerta-Núñez. G. Cleva Villanueva-Lopez. A. Morales-Guadarrama. S. Soto. J. López. J. G. Silva. N. Perez-Vielma. E. Sacristán Marco E. Gudiño-Zayas. C. A. González. "Assessment of the systemic distribution of a bioconjugated anti-Her2 magnetic nanoparticle in a breast cancer model by means of magnetic resonance imaging". Journal of Nanoparticle Research; 18:284, 2016.*
18. *Chemicell, "Covalent Coupling Procedure on fluid MAG-ARA by Carbodiimide Method". Chemicell GmbH • Coupling Protocol • fluidMAG-ARA 1.1.*

19. *Andrés Concha, Raúl Quijada, Rodrigo Soto, Sergio Rica, Mauricio E. Pilleux.*

“Percolación eléctrica en matrices 2-D y 3-D de materiales compuestos aislantes con una fase conductora”. CONAMET/SAM –SIMPOSIO MATERIA; 747-752, 2002.