

# **Diseño de un sistema de medición de impedancia eléctrica para caracterización de líneas celulares de cáncer de mama**

**Angélica María Acosta Villamil**

**Trabajo dirigido**

**Director de tesis: Fredy Giovanni Mesa Rodríguez, PhD.**

**Codirectora: Sandra Rocío Ramírez Clavijo, PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA  
BOGOTÁ D.C.  
2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer Dios y a mis padres por estar siempre presentes, y por el apoyo que me han brindado, es por ellos que me he formado como la persona que soy, y he logrado cumplir mis metas. Asimismo, agradezco a mi familia, que, a pesar de todo, siempre tendieron su mano para ayudarme.

Por otro lado, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi Director de Tesis, Fredy Giovanni Mesa, y a mi Codirectora Sandra Rocío Ramírez, por darme la oportunidad de participar en su investigación, por confiar en mí, y por brindarme sus conocimientos y su tiempo para hacer posible el desarrollo del presente trabajo y permitirme conocer y disfrutar el mundo de la investigación. Esto no hubiera sido posible sin contar con un equipo de investigación (GCBM) dedicado y eficiente, a quienes agradezco su colaboración y asesoría.

También quiero agradecer a Hernán, auxiliar de laboratorio del programa de Ingeniería Biomédica en la Universidad del Rosario, por brindarme su apoyo con la elaboración del sistema de láseres para realizar las mediciones de fotoimpedancia. Por último, expreso mi agradecimiento a todos los asistentes de los laboratorios de ciencias naturales de la Universidad del Rosario.

## Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
3.1. Cáncer .....	4
3.1.1. Cáncer de mama.....	4
3.2. Características fisiológicas y morfológicas de las células.....	5
3.2.1. Ciclo celular .....	6
3.2.2. Relación entre el ciclo celular y el cáncer.....	12
3.3. Líneas celulares – importancia y características .....	12
3.3.1. MCF-7.....	13
3.3.2. BT-474 .....	13
3.3.3. MDA-MB-468 .....	14
3.4. Linfocitos.....	14
3.5. Características eléctricas de las células.....	15
3.6. Sensores para medir impedancia / capacitancia .....	16
3.7. Programación gráfica - LABVIEW .....	18
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
4.1. Cultivo celular .....	19
4.1.1. Limpieza y desinfección de lugar y materiales de trabajo.....	19
4.1.2. Descongelamiento .....	19
4.1.3. Pase celular .....	19
4.1.4. Cambio de medio.....	19
4.1.5. Congelamiento.....	20
4.1.6. Conteo de células - Cámara de Neubauer .....	20
4.1.7. Curva de proliferación .....	21
4.1.8. Preparación de medio .....	21
4.1.9. Preparación de PBS.....	21
4.1.10. Protocolo Ficoll (Separación de Linfocitos).....	21
4.2. Tinción de gram .....	21
4.3. Mediciones de impedancia, capacitancia y fotoimpedancia en función de la frecuencia (BT-474, MCF-7, Linfocitos, MDA-MB-468, Medio) .....	21

4.3.1.	Limpieza y desinfección de equipo de trabajo .....	23
4.3.2.	Calibración LCR .....	23
4.3.3.	Ajuste de parámetros, toma de datos .....	23
4.4.	Fabricación de electrodo .....	24
4.4.1.	Limpieza de sustrato (Vidrio) .....	24
4.4.2.	Deposición de oro .....	25
4.5.	Modificación de programa para mediciones en tiempo real - LABVIEW .....	26
4.6.	Limpieza y desinfección .....	26
4.7.	Montaje .....	26
4.8.	Mediciones de capacitancia en tiempo real .....	29
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
5.1.	Curvas $C_p$ , $R_p$ , $Z$ y $\theta$ en función de la Frecuencia (BT-474, Linfocitos MDA-MB-468, MCF-7) .....	30
5.2.	Curvas de Transconductancia (BT-474, Linfocitos, MDA-MB-468, MCF-7) .....	32
5.3.	Programa LABVIEW – Mediciones en tiempo real .....	35
5.4.	Curvas capacitancia en tiempo real (BT-474, Linfocitos MDA-MB-468, MCF-7) .....	37
5.5.	Curvas de fotoimpedancia (ausencia de irradiación, Rojo, Verde, Azul, UV) MCF-7 ..	40
5.5.1.	$Z$ .....	41
5.5.2.	$\text{Thd}$ .....	41
5.5.3.	$C_p$ .....	42
5.5.4.	$R_p$ .....	43
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Parámetros interfaz. ....	<b>27</b>
<b>Tabla 2:</b> Valores de frecuencia obtenidos a partir de la transconductancia capacitiva. ....	<b>33</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018, en todo el mundo, todos los cánceres, mujeres entre 15 y 64 años. ....	1
<b>Figura 2:</b> Seno humano. Conductos galactóforos y glándulas mamarias. ....	5
<b>Figura 3:</b> Ciclo celular. Imagen de autoría propia. ....	6
<b>Figura 4:</b> Profase. Imagen de autoría propia. ....	7
<b>Figura 5:</b> Prometáfase. Imagen de autoría propia. ....	7
<b>Figura 6:</b> Metafase I. Imagen de autoría propia. ....	7
<b>Figura 7:</b> Metafase II. Imagen de autoría propia. ....	8
<b>Figura 8:</b> Anafase. Imagen de autoría propia. ....	8
<b>Figura 9:</b> Telofase. Imagen de autoría propia. ....	8
<b>Figura 10:</b> Ciclo celular □ Puntos de control. Imagen de autoría propia. ....	10
<b>Figura 11:</b> Cdk inactiva. Imagen de autoría propia. ....	11
<b>Figura 12:</b> Cdk unida a ciclina está activa, y fosforila proteínas objetivo. Imagen de autoría propia. ....	11
<b>Figura 13:</b> Circuito equivalente de la membrana celular. Imagen de autoría propia. ....	17
<b>Figura 14:</b> Cámara de Neubauer. Foto tomada durante el proceso de conteo de una línea celular. ....	20
<b>Figura 15:</b> Vista bajo microscopio de un cuadrante de cámara de Neubauer (con células). Foto tomada durante el proceso de conteo de una línea celular. ....	20
<b>Figura 16:</b> Celda con electrodos cilíndricos concéntricos. Foto tomada durante el proceso de medición de impedancia de BT-474. ....	22
<b>Figura 17:</b> Montaje medidas de impedancia. Foto tomada durante la toma de mediciones de fotoimpedancia. ....	22
<b>Figura 18:</b> Montaje medidas de fotoimpedancia - láseres. Foto tomada durante la toma de mediciones de fotoimpedancia. ....	23
<b>Figura 19:</b> Alconox. Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio). ....	24
<b>Figura 20:</b> Ultrasonido. Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio). ...	24
<b>Figura 21:</b> Cámara de vacío para almacenar sustratos limpios. Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio). ....	25
<b>Figura 22:</b> Máquina de evaporación de oro. Foto tomada durante el proceso de deposición de oro sobre el sustrato vidrio. ....	25
<b>Figura 23:</b> Interfaz de toma de datos en tiempo real. ....	26
<b>Figura 24:</b> Electrodo IDA. ....	27
<b>Figura 25:</b> Electrodo IDA visualizado en microscopio invertido. Foto tomada durante el proceso de limpieza del electrodo. ....	28

<b>Figura 26:</b> Montaje de electrodo IDA para toma de datos en tiempo real. Foto tomada durante el proceso de montaje del experimento de medición de capacitancia en tiempo real. ....	<b>28</b>
<b>Figura 27:</b> Montaje completo para toma de datos en tiempo real. Foto tomada durante el proceso de toma de datos en tiempo real. ....	<b>29</b>
<b>Figura 28:</b> <b>a)</b> Capacitancia vs. Frecuencia (Líneas celulares y linfocitos). <b>b)</b> $R_p$ vs. Frecuencia (Líneas celulares y linfocitos). ....	<b>30</b>
<b>Figura 29:</b> <b>a)</b> Curvas de impedancia eléctrica en función de la frecuencia (Líneas celulares y linfocitos). <b>b)</b> Ángulo de desfase típica para linfocitos. ....	<b>31</b>
<b>Figura 30:</b> Transconductancia (Líneas celulares y linfocitos). ....	<b>33</b>
<b>Figura 31:</b> $\tau$ (Líneas celulares y linfocitos). ....	<b>34</b>
<b>Figura 32:</b> <b>(a)</b> Circuito eléctrico equivalente para sensor con 2 electrodos en contacto con solución celular; <b>(b)</b> Modelo gráfico de interacción eléctrica entre 2 electrodos cilíndricos y la solución celular. ....	<b>35</b>
<b>Figura 33:</b> Interfaz de toma de datos en tiempo real, ejemplo de toma de primer dato de MCF-7. ....	<b>36</b>
<b>Figura 34:</b> Interfaz de toma de datos en tiempo real, ejemplo de finalización de toma de datos de linfocitos.....	<b>37</b>
<b>Figura 35:</b> Mediciones de capacitancia en tiempo real de las 3 líneas celulares y linfocitos [48 horas]. ....	<b>37</b>
<b>Figura 36:</b> Células MCF-7 sobre electrodo IDA - Confluencia alta. ....	<b>38</b>
<b>Figura 37:</b> Mediciones de capacitancia en tiempo real de las 3 líneas celulares y linfocitos [24 horas]. ....	<b>38</b>
<b>Figura 38:</b> Modelo cualitativo de comportamiento de la capacitancia en tiempo real.....	<b>39</b>
<b>Figura 39:</b> Modelo gráfico de comportamiento de la capacitancia en tiempo real.....	<b>40</b>
<b>Figura 40:</b> Impedancia vs. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz. ....	<b>41</b>
<b>Figura 41:</b> Fase vs. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz. ....	<b>41</b>
<b>Figura 42:</b> Capacitancia vs. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz. ....	<b>42</b>
<b>Figura 43:</b> Resistencia en paralelo vs. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz. ....	<b>43</b>

## Índice de ecuaciones

<b>Ecuación 1:</b> Impedancia en DC. ....	<b>16</b>
<b>Ecuación 2:</b> Impedancia compleja (en AC). ....	<b>16</b>
<b>Ecuación 3:</b> Energía almacenada en forma de carga en cualquier instante de tiempo. ....	<b>16</b>
<b>Ecuación 4:</b> Señal de voltaje alterno .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 5:</b> Frecuencia angular .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 6:</b> Corriente AC .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 7:</b> Impedancia eléctrica .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 8:</b> Capacitancia eléctrica .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 9:</b> Impedancia debida a propiedades capacitivas .....	<b>32</b>
<b>Ecuación 10:</b> Modelo matemático.....	<b>39</b>

## Índice de anexos

<b>Anexo 1:</b> Protocolo de descongelamiento. ....	<b>50</b>
<b>Anexo 2:</b> Protocolo de congelamiento. ....	<b>50</b>
<b>Anexo 3:</b> Protocolo de pase celular .....	<b>51</b>
<b>Anexo 4:</b> Protocolo de tinción de gram .....	<b>51</b>
<b>Anexo 5:</b> Protocolo de deposición de oro .....	<b>52</b>
<b>Anexo 6:</b> Protocolo de limpieza de sustratos (vidrio) .....	<b>52</b>
<b>Anexo 7:</b> Protocolo de conteo celular .....	<b>53</b>
<b>Anexo 8:</b> Protocolo de ficoll .....	<b>54</b>
<b>Anexo 9:</b> Protocolo de cambio de medio .....	<b>54</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las enfermedades que más muertes causa a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el que más muertes femeninas ocasiona. [1]

Generalmente, cuando el cáncer de mama es detectado en una etapa temprana, puede ser tratado o erradicado del cuerpo, de lo contrario, hay una probabilidad baja de eliminarlo, ya que las células cancerosas pueden alcanzar el sistema linfático o el torrente sanguíneo, y llegan a otras regiones del cuerpo. [2] [3]

Existen distintos métodos para diagnosticar los diferentes tipos de cáncer. Adicionalmente, existen métodos de apoyo al diagnóstico que se basan en mediciones de la impedancia eléctrica para distinguir células cancerosas. [4]

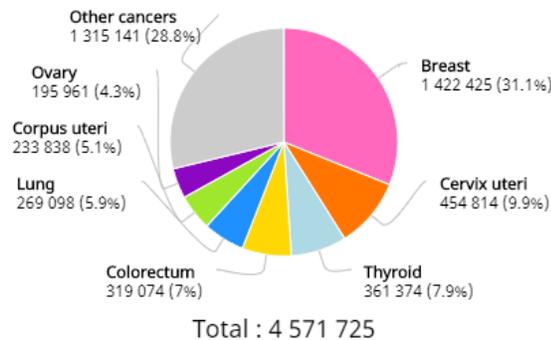
Todas las células tienen características eléctricas que pueden ser medidas por medio de sensores eléctricos que permiten medir impedancia o capacitancia eléctrica, pero las células cancerosas, al tener una actividad metabólica y de proliferación aumentada, presentan una actividad eléctrica distinta a la de las células no patológicas, lo que permite distinguirlas. [5]

Este trabajo busca a caracterizar células de cáncer de mama para aportar a las investigaciones de métodos de apoyo al diagnóstico del cáncer por medio de mediciones de las propiedades eléctricas de las células.

## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad que afecta a gran parte de la población mundial, y no discrimina género, edad, raza, etc.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, siendo una de cada seis muertes ocasionada por esta enfermedad, resaltando que la detección en una fase avanzada y la falta de diagnóstico son problemas muy frecuentes. [1]



**Figura 1:** Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018, en todo el mundo, todos los cánceres, mujeres entre 15 y 64 años. [6]

En la Figura 1, emitida por IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), se puede apreciar que el cáncer de mama fue el que más incidencia tuvo en mujeres en el año 2018, lo que lo convierte en un problema de salud pública. [6]

La detección del cáncer de mama se vuelve entonces crucial para curarlo a quienes lo padecen y las mediciones de las propiedades eléctricas de las células pueden ser un gran método de apoyo al diagnóstico.

Motivados por este hecho de encontrar señales eléctricas diferenciadas de las células, la Universidad del Rosario junto con los grupos de Nanotech y ciencias básicas médicas comenzaron a desarrollar una investigación para encontrar este tipo de respuestas.

El presente trabajo busca caracterizar eléctricamente tres líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468), y linfocitos, por medio de mediciones de capacitancia eléctrica, para poder distinguir las células cancerosas de las normales, y determinar qué diferencias presentan.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1 General:** Diseñar un sistema de medición de capacitancia en tiempo real, en el que las células sean capaces de proliferar mientras se realiza la medición.

### **2.2 Específicos:**

**2.2.1** Determinar el pico de frecuencia en la cual las líneas celulares MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 y los linfocitos presentan mayor sensibilidad a la señal de voltaje alterno que se les aplica.

**2.2.2** Diseñar una interfaz de adquisición de datos en LABVIEW que permita tomar datos de capacitancia en tiempo real.

**2.2.3** Caracterizar eléctricamente las líneas celulares MCF-7, BT-474 y MDA-MB-468 y los linfocitos por medio de medidas de capacitancia en tiempo real.

**2.2.4** Realizar mediciones de fotoimpedancia [ $C_p$ - $R_p$ ,  $Z$ - $\theta$ ] para la línea celular MCF7 con la incidencia de 4 haces de luz con diferentes longitudes de onda (onda [632nm], verde [530nm], azul [405nm], ultravioleta [390nm]).

### **3. MARCO TEÓRICO**

Teniendo en cuenta los numerales anteriores, en esta sección se hace una descripción de los conceptos teóricos de interés para el presente trabajo.

#### **3.1. Cáncer**

El cáncer es una enfermedad con distintas variantes, la cual se basa en el crecimiento y proliferación excesiva e incontrolada de células anormales o mutadas (cancerosas) en alguna región del cuerpo. Estos comportamientos anormales ocasionan daño en los tejidos aledaños, e incluso a varias regiones del cuerpo si las células anormales alcanzan el sistema linfático o el torrente sanguíneo. [7]

El cáncer se puede desarrollar en personas de todas las edades, sin embargo, la probabilidad de desarrollar un cáncer aumenta junto con la edad. [8]

Existen distintos factores que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer, entre las cuales se distinguen la exposición a distintos tipos de radiación (como la ultravioleta o ionizante), a contaminantes (como el humo del tabaco y gases presentes en el ambiente), entre otros. [9]

Todos estos factores pueden generar fallas en el control del ciclo celular, donde pueden aparecer mutaciones en el material genético de las células, las cuales pueden ser transferidas a las células hijas, desencadenando así una proliferación de células cancerosas. [10]

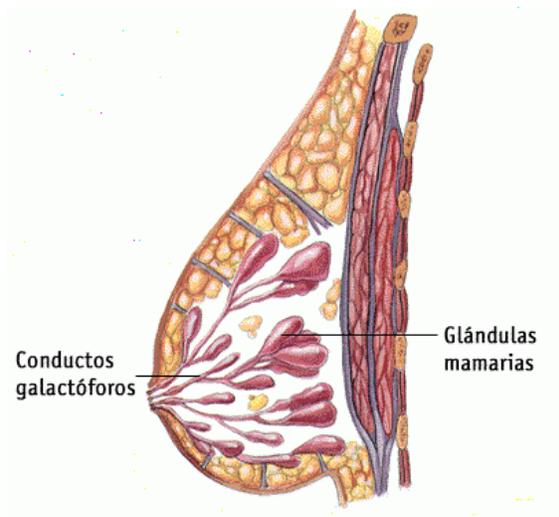
El cáncer puede originarse en distintas partes del cuerpo, entre las cuales está el seno, catalogando la enfermedad específicamente como cáncer de seno o de mama. [9]

##### **3.1.1. Cáncer de mama**

El cáncer de mama puede nacer en diferentes partes del seno. Normalmente inicia en los conductos galactóforos (llevan la leche hacia el pezón) o en las glándulas mamarias (producen la leche) como se observa en la Figura 2, sin embargo, aunque es poco común, también puede iniciar en otros lugares del seno. [11]

Un gran peligro que representa radica en que se puede propagar rápidamente cuando las células cancerosas llegan al torrente sanguíneo o al sistema linfático, generando así que alcancen otras zonas del cuerpo, haciendo más difícil controlar la enfermedad. [12]

Puede ser tratado con radiación, quimioterapia, e incluso con la extracción quirúrgica del tumor. [11]



**Figura 2:** Seno humano. Conductos galactóforos y glándulas mamarias.  
 Tomada de: <https://www.saludalia.com/salud-de-la-mujer/cancer-de-mama>

### 3.2. Características fisiológicas y morfológicas de las células

La célula es la unidad anatómica funcional más pequeña en el cuerpo humano, siendo capaz de existir de forma independiente. Adicionalmente, se considera la unidad genética de los seres vivos, ya que toda célula se origina de otra que existió previamente. [13]

En cuanto a su anatomía y fisiología, la célula tiene una estructura compleja, compuesta por distintos elementos; algunos de ellos, hacen parte del proceso proliferación celular, por ejemplo, la membrana celular, el núcleo, los centrosomas, entre otros. [14]

El proceso de proliferación de las células es altamente regulado, dada su importancia. Es un proceso necesario en el cuerpo en distintas ocasiones, por ejemplo, para reemplazar células que han muerto, y una vez suplida la necesidad, se detiene. Cuando no se responde al mecanismo de retroalimentación del ciclo celular, las células siguen proliferando, y se generan masas de tejido, llamadas tumores. Estos pueden ser benignos, o malignos. Los tumores benignos no dañan ni alteran significativamente los tejidos aledaños, y generalmente se pueden remover fácil y definitivamente del cuerpo. Por otro lado, los tumores malignos, si pueden hacer daño a tejidos aledaños y otras partes del cuerpo, y si son removidos, hay una alta probabilidad de que vuelvan a crecer.

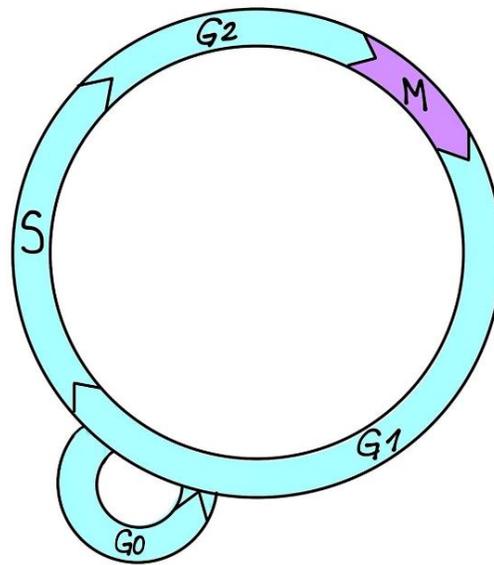
Las células que forman los tumores malignos son células anormales, y se caracterizan por proliferar de forma descontrolada, y en algunas ocasiones logran separarse del tumor, y llegar al torrente sanguíneo, o al sistema linfático, generando

metástasis, en la cual se afectan otros tejidos y/o órganos del cuerpo, originando problemas graves en la salud, e incluso la muerte.

### 3.2.1. Ciclo celular

El ciclo celular se describe como una serie de eventos que ejecuta la célula, los cuales permiten su crecimiento y división en dos células hijas, esto se conoce como ciclo celular. El ciclo celular es elemental ya que, durante el mismo, se generan células nuevas, y se debe asegurar que no presenten ninguna mutación o error.

Está compuesto por dos fases principales, la interfase y la mitosis.



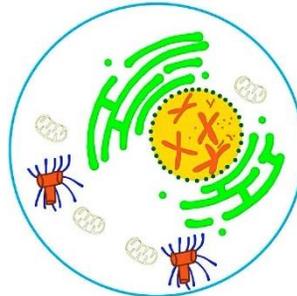
**Figura 3:** Ciclo celular. *Imagen de autoría propia.*

**Interfase:** Periodo de crecimiento celular

- **G1:** Se obtiene la energía (ATP) necesaria para el proceso de división, la célula aumenta en tamaño, y se duplican los organelos citoplasmáticos.
- **G0:** Es un estado de reposo, en el que la célula puede reparar daños generados en G1. En esta fase la célula no está preparada para la división, centra toda su atención en la reparación de los daños. Algunas células pueden quedar permanente en este estado, y otras logran salir para continuar con el proceso de división celular.
- **S:** Se lleva a cabo la síntesis del ADN y la duplicación de los centriolos.
- **G2:** Preparación para llevar a cabo la mitosis, en este punto la célula ya contiene el doble de ADN, listo para sintetizar proteínas necesarias para el momento de la división.

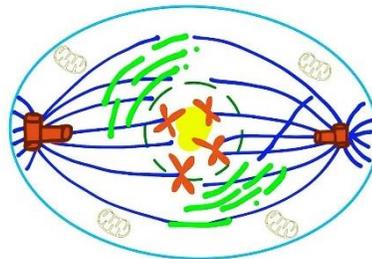
**Mitosis:** Periodo de división celular.

- **Profase:** El ADN se compacta, los cromosomas se hacen visibles.



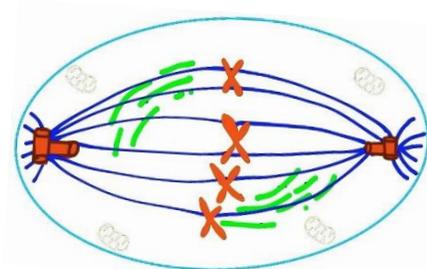
**Figura 4:** Profase. *Imagen de autoría propia.*

- **Prometafase:** Microtúbulos se extienden por el espacio del núcleo.

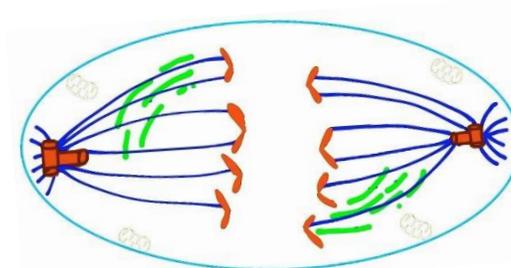


**Figura 5:** Prometafase. *Imagen de autoría propia.*

- **Metafase:** Los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula, y se separan.

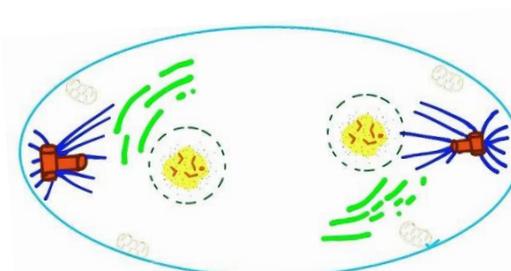


**Figura 6:** Metafase I. *Imagen de autoría propia.*



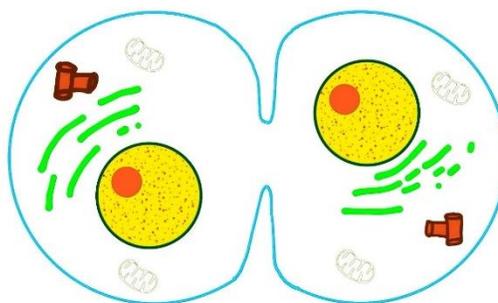
**Figura 7:** Metafase II. *Imagen de autoría propia.*

- **Anafase:** Los cromosomas se organizan en los polos de la célula, y se distribuye a la mitad la información genética.



**Figura 8:** Anafase. *Imagen de autoría propia.*

- **Telofase:** Se descondensan los cromosomas y se divide el citoplasma y la membrana.



**Figura 9:** Telofase. *Imagen de autoría propia.*

- **Citocinesis:** Proceso simultáneo a la telofase, en el que se genera un anillo contráctil de actina, separando el contenido de las dos células hijas.

[15] [16]

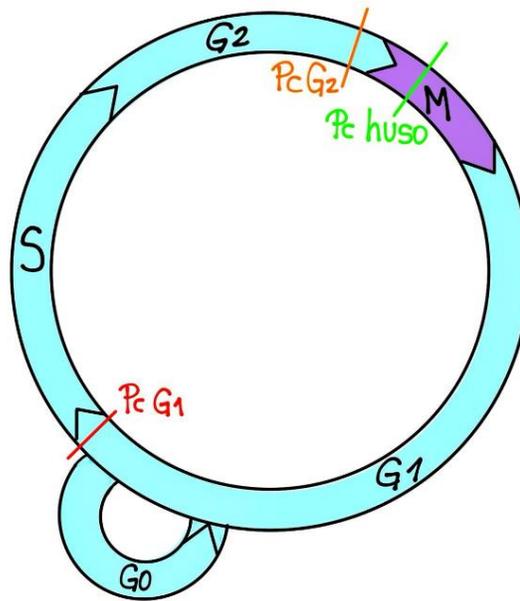
La falta de control en el ciclo celular generalmente se relaciona con cambios o alteraciones que presentan los reguladores del ciclo celular.

Las células normales ejecutan el ciclo celular de forma ordenada, es decir, etapa por etapa, y tienen mecanismos de control, que permiten decidir si se realiza la división celular, al asegurarse que las condiciones internas y externas de la célula son óptimas para realizarla. Por otro lado, las células cancerosas pueden pasar de una fase a otra en desorden.

Los puntos de control más importantes del ciclo celular son:

- **Punto de control G1 (transición G1/S):** En este punto de control, la célula decide si debe dividirse o no. La decisión que se tome en este punto es irreversible. Los criterios que emplea para la toma de la decisión son el tamaño de la célula, la cantidad de nutrientes y de factores de crecimiento, y que no haya daño en el ADN. Si la célula no pasa el punto de control G1, puede entrar a G0 para reparar mejorar las condiciones y así poder continuar con el ciclo, sin embargo, hay células que nunca salen del estado G0, ya que les es imposible reparar los daños.
- **Punto de control G2 (transición G2/M):** En este punto de control, la célula comprueba que no existan daños en el ADN y que haya sido totalmente copiado en la fase S. En caso de que se presenten errores, la célula puede permanecer un tiempo en este punto de control, para corregir los errores. Si los errores no se pueden corregir, la célula se dirige a apoptosis, con el fin de garantizar que no se transfieran los errores, daños o mutaciones a las células hijas, factor determinante para impedir la formación del cáncer.
- **Punto de control del huso (transición metafase/anafase):** En este punto de control la célula revisa que en la etapa de metafase se haya realizado correcta y completamente el acople de los cromosomas al huso acromático, es decir, que estén unidos a los microtúbulos del huso correctamente. En caso de que se encuentre algún error, se detiene la mitosis, hasta que todo esté en orden.

[17]



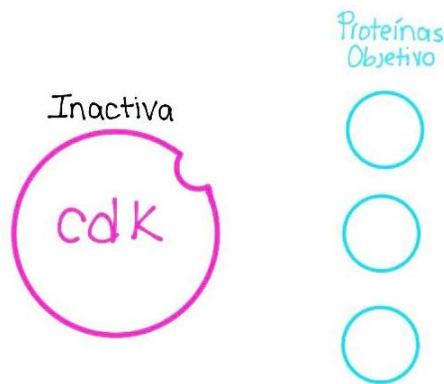
**Figura 10:** Ciclo celular □ Puntos de control. *Imagen de autoría propia.*

El mecanismo de funcionamiento de los puntos de control del ciclo celular es controlado por reguladores que responden a señales que recibe la célula, tanto internas (daño en ADN) como externas (moleculares). Los reguladores generan sucesos importantes como lo es la replicación del ADN. Asimismo, se aseguran de que el ciclo celular se lleve a cabo de forma ordenada. Los reguladores más importantes del ciclo celular son:

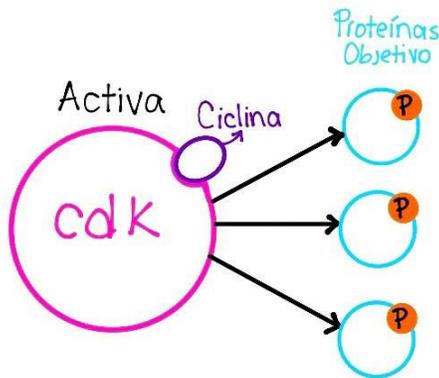
- **Proteínas ciclinas:** Las ciclinas fomentan los eventos que se llevan a cabo en las fases del ciclo celular. Existen cuatro tipos de ciclinas elementales:
  - Ciclinas de G1
  - Ciclinas de G1/S
  - Ciclinas de S
  - Ciclinas de M

Cada una de estas ciclinas aparece en distintas cantidades a lo largo del ciclo celular, aumentando en la fase en que son necesarias, por ejemplo, la ciclina G1/S, que alcanza su máxima cantidad en la transición de G1 a S.

- **Enzimas Cdk (cinasas dependientes de ciclina):** Son enzimas que son activadas al unirse con las ciclinas, es decir, sólo funcionan al estar junto a una ciclina, adicionalmente, la ciclina las direcciona a ciertas proteínas. Estas enzimas fosforilan proteínas objetivo específicas ubicadas dentro de la célula, haciéndolas más o menos activas, dependiendo de la necesidad.



**Figura 11:** Cdk inactiva. *Imagen de autoría propia.*



**Figura 12:** Cdk unida a ciclina está activa, y fosforila proteínas objetivo. *Imagen de autoría propia.*

- **Complejo enzimático APC/C:** Es un complejo que hace que las ciclinas M se deshagan desde la anafase, proceso que fuerza a la célula a salir de la mitosis. Asimismo, posibilita la separación de las cromátidas hermanas en la anafase, ya que degrada las proteínas que las mantienen unidas. Este complejo enzimático marca las proteínas objetivo con una Ub (ubiquitina), generando que estas sean degradadas por el proteasoma.

Todos los reguladores responden a distintas señales, las cuales pueden ser negativas (ej: daño de ADN) o positivas (ej: factor de crecimiento), generando un aumento o disminución en la actividad de los reguladores.

Un ejemplo clave, es el de p53, el guardián del genoma. Esta proteína es un supresor tumoral, que aparece a lo largo de todo el ciclo celular, para garantizar que en caso de que se presente algún daño en el ADN, este no sea transmitido a células hijas. Esto lo logra desempeñando 3 funciones principales, detener el ciclo celular en G1, activar la reparación del ADN, y finalmente, en caso de que el daño sea irremediable, inducir la muerte celular.

[18] [19]

### 3.2.2. Relación entre ciclo celular y cáncer

Al momento de referirse al ciclo celular en el cáncer, este toma un papel protagónico, ya que es el conjunto de eventos que permiten la proliferación celular, y el mecanismo de funcionamiento básico del cáncer es la proliferación celular descontrolada.

Cuando ocurren errores en el ciclo celular, se puede desencadenar un cáncer. Muchos de estos errores están relacionados al mal funcionamiento de los reguladores del ciclo celular. [20]

Las células cancerosas se caracterizan porque pueden proliferar en distintas condiciones, incluso si tienen factores de crecimiento negativos. Un ejemplo característico de este comportamiento en un cultivo celular es que incluso si la confluencia en un sustrato es muy alta, las células cancerosas siguen proliferando sin importar la falta de espacio o falta de factores de crecimiento o nutrientes.

Adicionalmente, las células cancerosas tardan mucho más en envejecer que las células normales, lo que da cabida a una mayor cantidad de divisiones en la vida de la célula.

La aparición de mutaciones o de daños en el ADN, que no son corregidos por los procesos regulatorios del ciclo celular, y son transmitidos a las células hijas contribuyen a la formación de un cáncer. Entre las mutaciones más comunes se encuentran las mutaciones en los reguladores del ciclo celular, donde los positivos se sobreexpresan, y los inhibidores o negativos se inactivan.

[21]

### 3.3. Líneas celulares – importancia y características

Por su alta tasa de mortalidad, el cáncer es una enfermedad muy estudiada a nivel mundial, y existen distintos métodos que permiten estudiar el comportamiento y características de las células cancerosas. Uno de ellos, es llevando a cabo cultivos celulares con **líneas celulares**, que permiten mantener vivas por generaciones líneas celulares provenientes de un individuo vivo.

Inicialmente se mantenían en un medio con cloruro de sodio, potasio, calcio y magnesio, y posteriormente la adición de suero fetal bovino, permitió profundizar en investigaciones relacionadas con cultivos de células de animales vertebrados. [22]

Las líneas celulares son generaciones de células mantenidas en cultivos in-vitro, provenientes de una biopsia. Son elementales en la investigación de las ciencias naturales, ya que por medio de cultivos celulares se pueden analizar procesos bioquímicos o moleculares de las células de una forma más sencilla, generando una ampliación en los conocimientos que se tienen de distintas patologías o enfermedades, y facilitando nuevos estudios y pruebas de tratamientos. En el campo de la oncología, han adquirido gran importancia, ya que han permitido estudiar a profundidad las células tumorales, desde sus comportamientos, hasta sus características, con la gran ventaja de que pueden ser preservadas por mucho tiempo. Por estas razones, las líneas celulares de células cancerosas han ayudado a lograr avances muy significativos en

diagnóstico, tratamiento, y caracterización de distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. [23]

Las líneas celulares de cáncer de mama son muy estudiadas, debido a que el cáncer de mama afecta a miles de personas en el mundo cada año. Son de gran importancia para la investigación, ya que aportan una ventaja al tener distintos perfiles moleculares, permiten tener un modelo in-vitro de distintos tipos de cáncer.

Existen diversos tipos, por ejemplo, en este proyecto se emplearon las líneas celulares MCF-7, BT-474 y MDA-MB468.

- 3.3.1. MCF-7:** Línea celular cultivada y aislada por la Fundación de Cáncer de Michigan, proveniente de una mujer de 69 años que padecía un adenocarcinoma de mama, obtenida en 1973, es comúnmente empleada en investigaciones sobre cáncer de mama. Normalmente se emplea en investigaciones con experimentos de células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógeno (ER) y varios sub-clones.

Son células sensibles al estrógeno (E2), y dependen del mismo para proliferar, por lo tanto, la privación de este genera respuestas que indican que no hay, o que escasean mecanismos de crecimiento adaptativos. Por otra parte, la línea celular MCF-7 expresa ambos receptores para estrógenos ERs (ERa, y ERb), que los activa la hormona denominada 17b-estradiol o estrógeno. [24]

Es capaz de procesar el estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplásmicos, y de formar cúpulas. Su crecimiento puede ser inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa).

Al referirse a la expresión de antígenos, las células MCF-7 pertenecen al tipo de sangre O, y expresan el antígeno del tipo Rh+.

Asimismo, expresan el receptor de estrógeno, el oncogén WNT7B, y las proteínas BP-2, BP-4, BP-5, que son proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP).

[25]

Se caracterizan por presentar una forma irregular, y una morfología similar a la del epitelio mamario diferenciado. Crecen en forma de monocapa, y son adherentes, es decir, se adhieren al sustrato en que son cultivadas, en el caso del presente trabajo, vidrio, oro y acrílico. Se incuban a una temperatura de 37°C, y con 5% de CO<sub>2</sub>. Su almacenamiento puede ser en neveras de -80°C, pero si va a ser por largos periodos de tiempo, se recomienda almacenar en tanque de nitrógeno líquido (-180°C). [26] [27]

- 3.3.2. BT-474:** Línea celular aislada por E. Lasfargues y W.G. Coutinho a partir de un carcinoma ductal de mama sólido e invasivo en 1978, se caracteriza por tener bajos niveles de HER1 (Proteína que se encuentra en la superficie de algunas células a la cual se une el factor de crecimiento epidérmico y hace que las células se multipliquen), pero sobreexpresan HER2(Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano, proteína producto de un protooncogén específico, un gen que tiene el potencial de producir cáncer). Adicionalmente, esta línea celular forma

parches de células adherentes con un lento crecimiento. Al igual que MCF-7, la línea BT-474 expresa ambos ERs. [28] [29]

Las células BT-474 carecen de ciertos cromosomas (N11, N13 y N22), adicionalmente, el cromosoma N7 es propenso a una aparición desmesurada en varios cariotipos. [30]

Se caracterizan por presentar una forma piramidal, y una morfología similar a la del epitelio mamario diferenciado. Crecen en forma de monocapa y son adherentes, al igual que MCF-7. Se incuban a una temperatura de 37°C, y con 5% de CO<sub>2</sub>. Son de lento crecimiento. Su almacenamiento puede ser en neveras de -80°C, pero si va a ser por largos periodos de tiempo, se recomienda almacenar en tanque de nitrógeno líquido (-180°C). [31]

**3.3.3. MDA-MB-468:** Línea celular cultivada y aislada por R. Cailleau en 1977, proveniente de una mujer de 51 años que padecía un adenocarcinoma de mama metastásico. Es comúnmente empleada en investigaciones sobre cáncer de mama.

Las células MDA-MB-468 pertenecen al tipo de sangre AB, y expresan los antígenos HLA Aw23, Aw30, B27, Bw35, Cw2, Cw4.

Asimismo, expresa los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y transformante alfa (TGF alfa).

Se caracterizan por presentar una forma circular y un tamaño pequeño, adicionalmente, presentan una morfología similar a la del epitelio mamario diferenciado. Crecen en forma de monocapa, y son adherentes al igual que las líneas celulares descritas anteriormente. Se incuban a una temperatura de 37°C, y con 5% de CO<sub>2</sub>. Su almacenamiento puede ser en neveras de -80°C, pero si va a ser por largos periodos de tiempo, se recomienda almacenar en tanque de nitrógeno líquido (-180°C). [32] [33]

### 3.4. Linfocitos

Los linfocitos son parte esencial del sistema inmune. Forman parte del grupo de los glóbulos blancos. Su función principal es proteger el cuerpo de agentes extraños.

Existen dos clasificaciones principales de los linfocitos:

- **Grandes**
  - NK (Natural killer): Representan del 5 al 10% de los linfocitos presentes en la sangre. Son citotóxicos, y pueden inducir la apoptosis en las células. [34]
- **Pequeños**
  - **B:** Detectan y destruyen cuerpos extraños por medio de la secreción de anticuerpos o inmunoglobulinas de membrana. [35]
  - **T:** Se dividen en:

- **T Colaboradores:** Secretan citoquinas para estimular la producción de anticuerpos en los linfocitos B, y la eliminación de microorganismos extracelulares a través de los macrófagos.
- **T citolíticos:** Son linfocitos citotóxicos encargados de eliminar virus y bacterias al interior de las células. [36]

En general el tiempo de vida de los linfocitos en el cuerpo humano es corto (hasta 120 días), y en cultivo celular, es de aproximadamente 5 días a partir del momento en que son extraídos de una muestra de sangre. Adicionalmente, los linfocitos al ser cultivados no crecen de forma adherente, al contrario, crecen en suspensión. [37]

[38] [39]

### 3.5. Características eléctricas de las células.

La membrana celular es una barrera permeable selectiva cerrada que separa a la célula del medio en el que se encuentra, y controla el flujo de información y contenido químico. En su mayoría, está conformada por lípidos, proteínas y glúcidos. Regula el paso de iones entre el interior y el exterior de la célula, los cuales tienen distintas concentraciones iónicas y de carga, generando así un gradiente de concentración y un campo eléctrico, los cuales dan origen a diversas corrientes eléctricas que atraviesan la membrana, y a una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula, llamado potencial de membrana. [40]

El potencial de membrana puede variar dependiendo de distintos elementos presentes en la membrana, tales como las proteínas que conforman los canales iónicos, que son los que le brindan a la membrana celular una de sus principales características: la permeabilidad selectiva.

Esto permite hacer una caracterización eléctrica de las células, que permite diferenciarlas entre sí.

Por ejemplo, en un estudio realizado en Corea del Sur, por Jun Ho Song, Sun-Mi Lee y Kyung-Hwa Yoo, se fabricaron 2 tipos de sensores de impedancia (2D y 3D).

Se encontró que existe una alta probabilidad de que los sensores celulares de impedancia puedan discriminar entre las hMSC que se diferenciaban en osteoblastos o adipocitos en tiempo real en ambos sistemas de cultivo (2D y 3D), y se determinó que los sensores distinguen los linajes de osteoblastos y adipocitos, ya que exhiben propiedades dieléctricas distintas, lo que permite el monitoreo de la diferenciación de hMSC en tiempo real. [41]

En el cuerpo humano hay gran diversidad de células con funciones y propiedades eléctricas distintas y características, y cuando cumplen la misma función y son agrupadas, se generan tejidos. Estos tejidos tienen diferentes propiedades eléctricas en función de la frecuencia. Cuando un campo eléctrico ejerce una acción sobre un tejido, se produce una polarización que depende de las características que tengan las estructuras que lo componen.

Estos comportamientos eléctricos que se presentan en la célula, se pueden denominar equivalentes a los observados en circuitos eléctricos convencionales formados por componentes eléctricos básicos, pues se rigen por las mismas leyes físicas. [42]

En el caso de las células cancerosas, las propiedades eléctricas de la membrana difieren de las demás células del tejido en el que éstas se encuentran. Estas alteraciones en el potencial eléctrico de la membrana en células cancerosas, permiten diferenciarlas de las células normales.

### 3.6. Sensores para captación de impedancia o capacitancia.

La impedancia eléctrica de un sistema es la oposición que generan al paso de la corriente los distintos elementos que compongan el sistema, por ejemplo, para un circuito RC, la oposición es generada tanto por R, como por C.

Cuando se aplican voltajes directos (DC) a un sistema la impedancia va a tener el mismo valor de la resistencia eléctrica del mismo como lo evidencia la ecuación 1, ya que la impedancia cambia en función de la frecuencia de variación de la entrada, y un voltaje DC es un valor constante.

$$Z = R \quad (1)$$

Por otra parte, si se aplican voltajes alternos o variables (AC), la impedancia empieza a tomar valores diferentes, dependiendo de la frecuencia en que esté la señal de entrada al sistema, y las fases que está presente (adelanto o atraso de la corriente respecto al voltaje).

El comportamiento que presenta cuando el sistema es estimulado con una entrada AC se puede modelar por medio de la ecuación 2:

$$Z = R + jX \quad (2)$$

Donde R es la resistencia que presenta el sistema y X la reactancia. [43] [44]

La capacitancia es la capacidad que poseen algunos elementos de almacenar energía en forma de carga eléctrica, a partir de un voltaje que reciben. La energía se almacena de forma ascendente, y se puede expresar con la ecuación 3.

$$q_c(t) = C v_c(t) \quad (3)$$

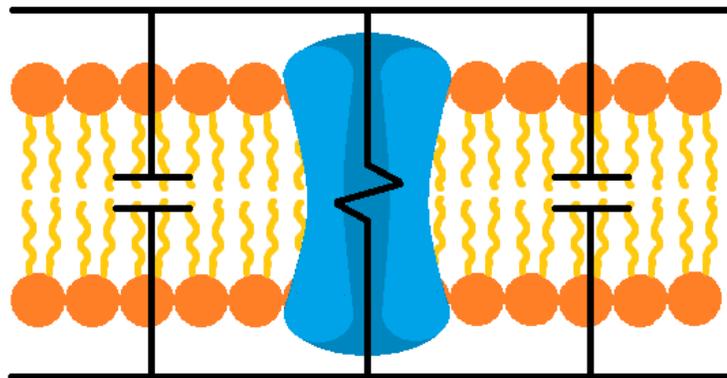
Donde  $q_c(t)$  es la carga almacenada en el tiempo, C es la capacitancia, y  $v_c(t)$  es el voltaje de la capacitancia en el tiempo. [45]

Para detectar la actividad eléctrica de cualquier tejido biológico, se emplean electrodos, que son transductores entre la corriente eléctrica del dispositivo de medición y la corriente iónica del tejido en estudio. Se caracterizan por tener baja impedancia de entrada, para evitar la aparición de voltajes parásito.

Al ser colocados en contacto con algún tejido, se genera una interfaz electrodo-electrolito, causando una polarización, que no es más que una disposición de cargas moleculares en las células. Para medir la impedancia o capacitancia de un tejido biológico, se inyecta una corriente eléctrica por medio de unos electrodos, y a través de otros dos electrodos se mide una caída de potencial, dando como resultado una medición de la impedancia o capacitancia. [46]

En el caso de las células, las mediciones de impedancia y capacitancia son de gran importancia, ya que permiten caracterizar las propiedades eléctricas de las mismas, permitiendo así controlar su estado, y diferenciar unas de otras, por ejemplo, permite identificar células cancerígenas, ya que estas tienen ciertas características eléctricas específicas. Existen 2 métodos estándar para medir la impedancia o capacitancia en las células empleando 4 electrodos (2 para inducción de corriente, y 2 para detección de voltaje). Uso de microelectrodos para la medición de la impedancia de una sola célula o mediante la medición de las suspensiones celulares, es decir, un grupo de células dentro de un medio de cultivo.

El comportamiento eléctrico de las células puede ser modelado por medio de componentes eléctricos. Por ejemplo, el modelo eléctrico equivalente de la membrana celular se representa por medio de resistencias y condensadores en paralelo, siendo los canales proteicos y los fosfolípidos respectivamente, ya que estos presentan comportamientos eléctricos equivalentes.



**Figura 13:** Circuito equivalente de la membrana celular. *Imagen de autoría propia.*

De esta forma, se pueden emplear métodos matemáticos de análisis, representar gráficamente distintos comportamientos, en el caso de las características eléctricas de las células, posibilitan analizar detalladamente el comportamiento eléctrico de las células.

Para realizar la medidas de impedancia y capacitancia eléctrica, se usó un sistema de electrodos cilíndricos de diámetro concéntrico  $D$ , separados una distancia  $L$ . Uno de

los electrodos funciona como electrodo de censado y el otro funciona como punto común o tierra de la seña.

### **3.7. Programación gráfica – LABVIEW**

La programación gráfica permite al programador tener una interacción más amigable y directa con la interfaz de programación.

LABVIEW (Laboratory Virtual Engineering Workbench) es uno de los principales softwares basados en programación gráfica. Permite realizar acciones de programación a partir de símbolos gráficos, y así crear diversas interfaces gráficas (GUI) para distintas aplicaciones. Va principalmente dirigido al control de equipos electrónicos relacionados a la instrumentación virtual, es decir, a dispositivos que incorporen hardware y software, y a la automatización de gran variedad de procesos.

[47]

Las interfaces gráficas (GUI) son una herramienta que permite a un usuario interactuar con un programa de forma didáctica y sencilla. [48]

## **4. METODOLOGÍA**

A continuación, se presentan todas las actividades que se llevaron a cabo para el correcto desarrollo del presente trabajo.

### **4.1. Cultivo Celular**

Para llevar a cabo todos los experimentos necesarios para desarrollar este trabajo de grado, inicialmente se colocaron en cultivo tres líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, BT-474, y MDA-MB468. Las células fueron mantenidas en cultivo celular durante aproximadamente 2 meses consecutivos, dentro de los cuales se realizaron varios procedimientos a las células, los cuales serán explicados detalladamente a continuación. Adicional a las 3 líneas celulares, se tuvieron en cultivo celular linfocitos extraídos de muestras de donantes voluntarios, los cuales fueron mantenidos en cultivo 6 días consecutivos, ya que los linfocitos extraídos de una muestra de sangre no viven más de ese tiempo en cultivo celular. Los linfocitos fueron empleados para comparar los resultados obtenidos con las células cancerígenas a células no patológicas.

#### **4.1.1. Limpieza y desinfección de lugar y materiales de trabajo**

Cada vez que se iba a llevar a cabo algún procedimiento en el cuarto de cultivo celular, se limpió (con etanol al 70%) y desinfectó (con UV) toda el área de trabajo (mesones y cabina de flujo laminar), asimismo, cada uno de los materiales empleados en cada procedimiento.

#### **4.1.2. Descongelamiento de viales de líneas celulares cancerosas**

Para iniciar el cultivo celular, se descongelaron viales de MCF-7, BT-474 y MDA-MBD468, los cuales se encontraban almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El protocolo se puede observar en el anexo 1.

#### **4.1.3. Pase celular**

El pase celular consiste en transferir las células de un frasco de cultivo a otro de mayor tamaño, o a dos nuevos frascos, con el fin de reducir la confluencia, y continuar la proliferación.

Se realizó cada vez que las células llegaban a un valor de confluencia igual o superior al 80% en los frascos de cultivo. Por la alta tasa de proliferación de las células, fue necesario hacerlo varias veces.

El protocolo se puede observar en el anexo 3.

#### **4.1.4. Cambio de medio**

El cambio de medio consiste en cambiar el medio de cultivo presente en el frasco de cultivo donde se encuentran las células, para mantenerlas con la cantidad de nutrientes y factores de crecimiento necesarios para que puedan proliferar.

Se realizó cada vez que las células metabolizaban la mayoría de los componentes presentes en el medio (indicado por el color amarillo del medio). Por la alta actividad metabólica fue necesario hacerlo frecuentemente.

El protocolo se puede observar en el anexo 9.

#### 4.1.5. Congelamiento

Se congelaron viales de BT-474, MCF-7 y MDA-MBD468.

El protocolo se puede observar en el anexo 2.

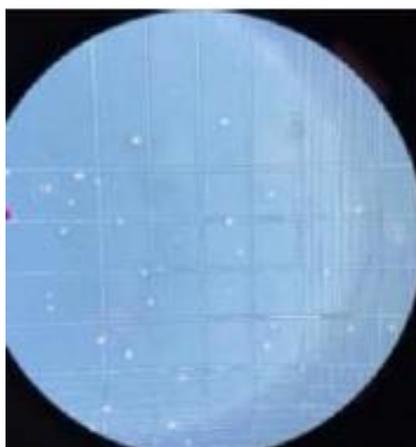
#### 4.1.6. Conteo de células – Cámara de Neubauer

Para realizar el conteo de las células, se deben desprender del frasco de cultivo con ayuda de la tripsina, y colocarlas en una solución de medio de cultivo (1 mL). Finalmente se adicionan 90  $\mu\text{L}$  de azul tripán a 10  $\mu\text{L}$  de esta solución, y se lleva a la cámara de Neubauer.

Este procedimiento se realizó de conteo de células cada vez que se iba a montar un experimento, para realizar los respectivos cálculos de la cantidad de células necesarias para cada uno.



**Figura 14:** Cámara de Neubauer. *Foto tomada durante el proceso de conteo de una línea celular.*



**Figura 15:** Vista bajo microscopio de un cuadrante de cámara de Neubauer (con células). *Foto tomada durante el proceso de conteo de una línea celular.*

El protocolo se puede observar en el anexo 7.

#### **4.1.7. Curva de proliferación**

Para el caso de las líneas celular MDA-MBD468 se realizó una curva de proliferación, en la cual se busca determinar la cantidad de células ideal para introducir en cada pozo de las placas de cultivo celular, y llevar a cabo todos los experimentos necesarios para el trabajo.

#### **4.1.8. Preparación de medio**

Se prepararon dos tipos de medio, suficiente para emplear en cada uno de los experimentos realizados. Para linfocitos, se preparó medio PBMax, y para las 3 líneas celulares cancerosas se preparó DMEM.

#### **4.1.9. Preparación de PBS**

Se preparó PBS suficiente para emplear en cada uno de los experimentos realizados.

#### **4.1.10. Protocolo ficoll (separación de Linfocitos)**

Se llevó a cabo el procedimiento de ficol para la separación de linfocitos cada vez que se tomó una muestra de sangre en el Hospital San José. El protocolo se puede observar en el anexo 8.

#### **4.2. Tinción de gram**

Es un tipo de tinción diferencial que permite visualizar bacterias. Se realizó al medio de un frasco de cultivo con MCF-7, porque se observaban muchos detritos, lo que podía ser un indicador de contaminación del medio.

Una vez realizada la tinción, se determinó que los detritos no eran bacterias, sino precipitado del medio.

El protocolo se puede observar en el anexo 4.

#### **4.3. Mediciones de impedancia, capacitancia y fotoimpedancia en función de la frecuencia (BT-474, MCF-7, LINFOCITOS, MDA-MB-468, MEDIO)**

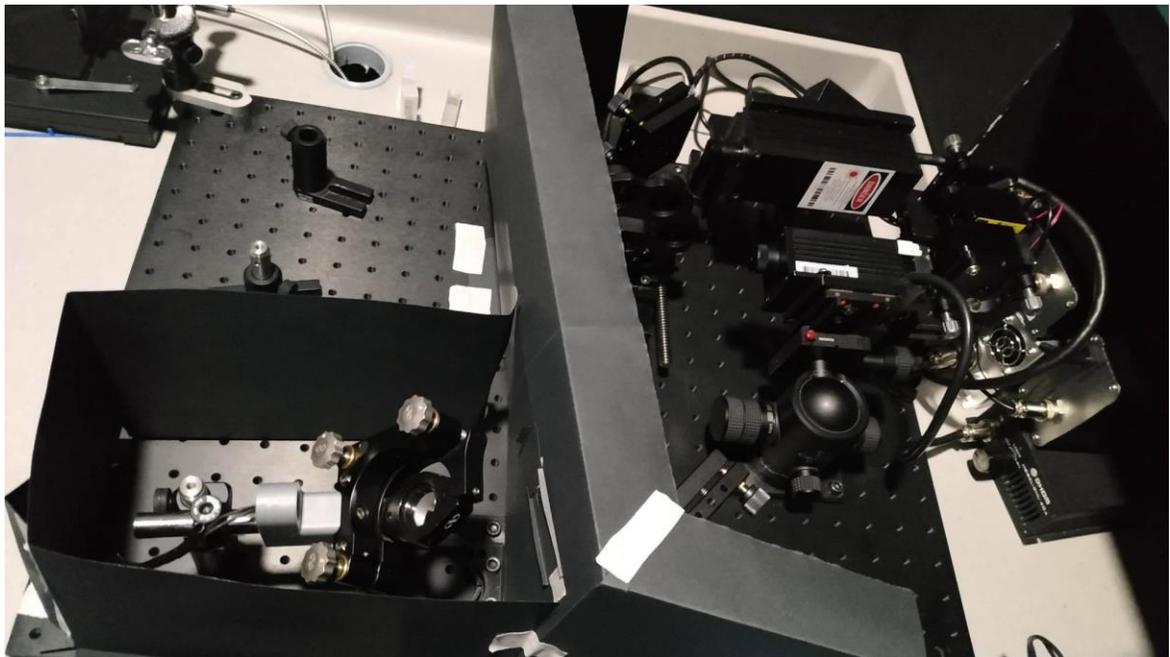
Se realizaron mediciones de impedancia y capacitancia para las tres líneas celulares y los linfocitos. También se realizaron medidas de impedancia y capacitancia para las sustancias como el medio, para eliminar la repuesta que este presenta de los resultados obtenidos con las células, y así obtener valores más reales de la respuesta presentada por las células en estudio.

Adicionalmente, se realizaron mediciones de  $C_p$ ,  $R_p$ ,  $Z$  y  $Thd$  a la línea celular MCF-7 al ser expuesta a distintos haces de luz con diferentes longitudes de onda (fotoimpedancia). Estas mediciones fueron realizadas con el fin de determinar si existe alguna diferencia en la respuesta de las células al cambiar la longitud de onda del haz de luz que incide sobre ellas. Sin embargo, la cantidad de células disponibles no permitió realizar las mediciones con todas las células en estudio, por lo tanto, se realizaron sólo con MCF-7.

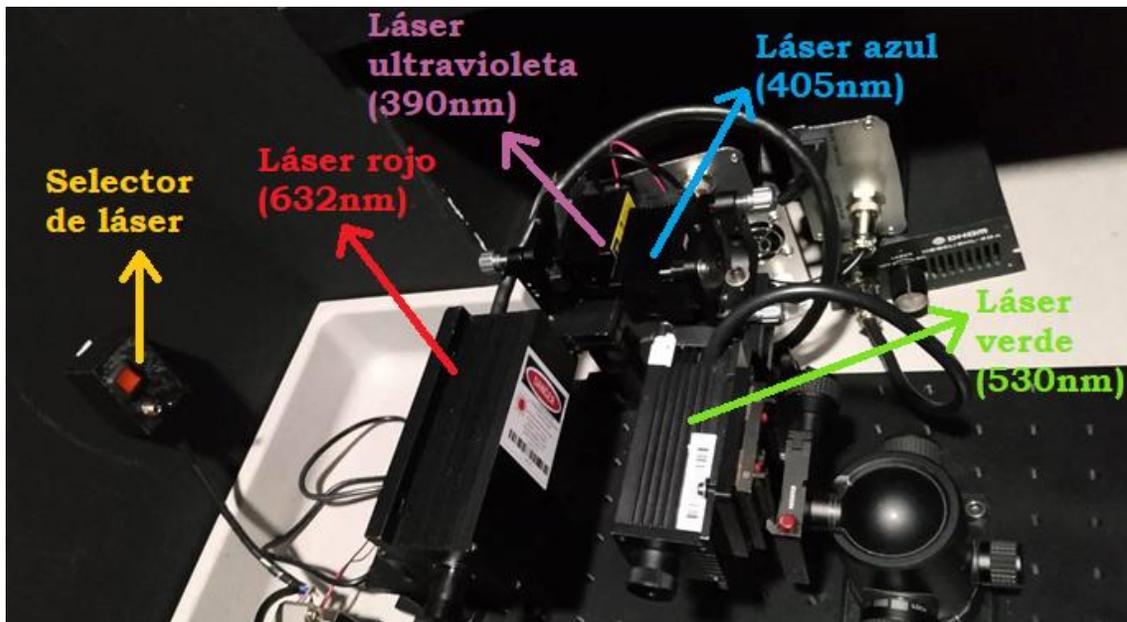
El equipo empleado para las mediciones fue el **AGILENT Keysight E4980AL Precision LCR Meter**, junto con un computador y una interfaz diseñada en LABVIEW que permite obtener los datos de una forma más sencilla y directa, y una celda cilíndrica formada por 2 electrodos de diámetro concéntrico, donde uno censa y el otro es un punto de referencia de la señal.



**Figura 16:** Celda con electrodos cilíndricos concéntricos. Foto tomada durante el proceso de medición de impedancia de BT-474



**Figura 17:** Montaje medidas de fotoimpedancia. Foto tomada durante la toma de mediciones de fotoimpedancia.



**Figura 18:** Montaje medidas de fotoimpedancia - láseres. Foto tomada durante la toma de mediciones de fotoimpedancia.

#### **4.3.1. Limpieza y desinfección de equipo de trabajo**

Todos los materiales empleados en las mediciones de impedancia y capacitancia (celdas y terminales del LCR) fueron limpiados y desinfectados con isopropanol (100%) cada vez que se realizaba una nueva medida, ya que el equipo de medición tiene una alta sensibilidad, y cualquier partícula indeseada puede alterar las mediciones. Adicionalmente, se preparó un espacio limpio y desinfectado sobre el cual se manipulan todos los elementos necesarios para las tomas de datos.

#### **4.3.2. Calibración LCR**

El equipo fue calibrado cada vez que se iba a realizar una medición por medio de correcciones de circuito abierto, de corto circuito, y de circuito abierto con carga, es decir, con la celda colocada entre los dos terminales del LCR, para asegurar mayor veracidad en los datos obtenidos.

#### **4.3.3. Ajuste de parámetros, toma de datos**

Para todas las mediciones tomadas, se configuró el voltaje BIAS en 0 voltios y el voltaje level o de nivel en 0.1 voltios (100mV). Una vez digitados todos los parámetros en la interfaz se procedió a medir capacitancia y resistencia y impedancia y fase para cada uno de los de las muestras.

#### 4.4. Fabricación de electrodo

Se fabricó un electrodo de oro sobre un sustrato de vidrio para poder captar la señal eléctrica de las células.

- 4.4.1. Limpieza de sustrato (vidrio):** Inicialmente se hizo una limpieza profunda del sustrato (vidrio) con ayuda de un jabón especial (alconox), agua destilada y ultrasonido. Una vez limpios los sustratos, se introdujeron en cámara de vacío para evitar el contacto con cualquier partícula.



**Figura 19:** Alconox. Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio).



**Figura 20:** Ultrasonido. Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio).



**Figura 21:** Cámara de vacío para almacenar sustratos limpios. *Foto tomada durante el proceso de limpieza de sustratos (vidrio).*

El protocolo se puede observar en el anexo 6.

- 4.4.2. Deposición de oro:** Se depositó oro sobre el sustrato de vidrio por medio de una máquina de evaporación de oro fabricada en la Universidad Nacional de Colombia por el grupo de investigación de materiales nanoestructurados.



**Figura 22:** Máquina de evaporación de oro. *Foto tomada durante el proceso de deposición de oro sobre el sustrato vidrio.*

El protocolo se puede observar en el anexo 5.

#### 4.5. Modificación programa para mediciones en tiempo real – LABVIEW

Finalmente se realizó la modificación de un programa previamente diseñado para tomar datos de impedancia y capacitancia de una muestra en una frecuencia determinada. La modificación realizada permite tomar los datos de una muestra en tiempo real por un periodo de tiempo determinado este tiempo puede ser elegido. Para el presente estudio se fijó en dos días y medio. El programa registra un dato cada 30 minutos y al finalizar guardar los datos en un archivo de Excel junto con la hora y fecha en que fue tomado cada. Adicionalmente la modificación permite visualizar en pantalla el comportamiento de la capacitancia en tiempo real.

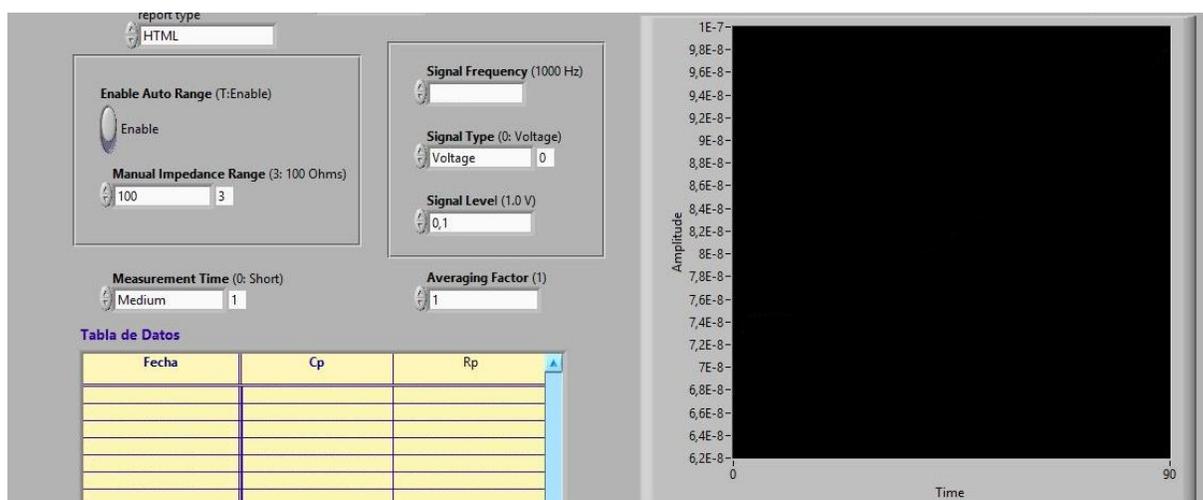


Figura 23: Interfaz de toma de datos en tiempo real.

#### 4.6. Limpieza y desinfección

Antes de realizar cada uno de los montajes para medir la actividad eléctrica de las células en tiempo real, se realizó una limpieza y desinfección de cada uno de los materiales de trabajo.

Inicialmente se llevaron todos los materiales a la cabina de flujo laminar, posteriormente se hace un lavado con etanol al 70% del electrodo y de la manguera, frotando suavemente el guante sobre ellos para desprender todas las células o residuos que hayan quedado en la superficie.

Luego se colocan en una caja de Petri estéril, y se llevan a ultravioleta durante 40 minutos.

Adicionalmente, se desinfectan los terminales del LCR con isopropanol al 100 %.

#### 4.7. Montaje

El electrodo IDA (ver Figuras 24 y 25) fue adaptado al equipo de medición LCR por medio de un socket de USB previamente esterilizado en un autoclave. Adicionalmente, el montaje fue fijado a una caja Petri estéril.

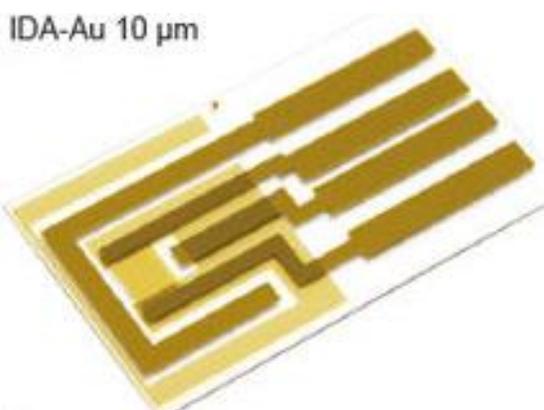
Para cada medición, se adicionaron 15.000 células diluidas en 450uL de medio en un trozo de manguera de silicona adherida al electrodo, como se puede observar en la Figura 27.

Una vez introducido el volumen en el pozo, se lleva a la incubadora con temperatura = 37°C y 5% de  $CO_2$ , se sacan los terminales del electrodo por un lado de la incubadora, y se conecta al equipo de LCR como se puede observar en la Figura 27.

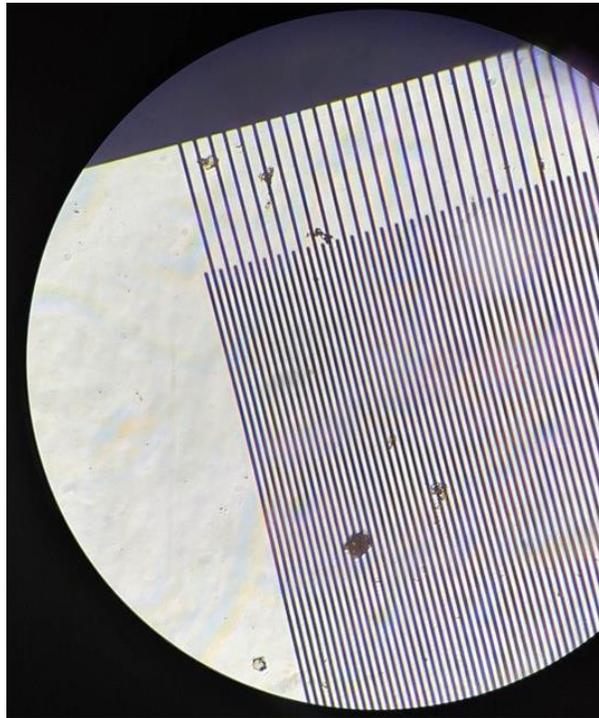
Una vez realizado este procedimiento, se fijan los parámetros en la interfaz que se pueden observar en la Tabla 1.

Células	Frecuencia (Hz)	V-level (V)	Tipo de medición	Nombre archivo
MCF-7	4000	0,1	Cp-Rp	MCF-7_Cp_3D.xls
BT-474	3050	0,1	Cp-Rp	BT-474_Cp_3D.xls
MDA-MB-468	65000	0,1	Cp-Rp	MDA-MB-468_Cp_3D.xls
LINFOCITOS	8550	0,1	Cp-Rp	LINFOCITOS_Cp_3D.xls

**Tabla 1:** Parámetros interfaz.



**Figura 24:** Electrodo IDA. Tomada de: <https://www.als-japan.com/1379.html>.



**Figura 25:** Electrodo IDA visualizado en microscopio invertido. Foto tomada durante el proceso de limpieza del electrodo.



**Figura 26:** Montaje de electrodo IDA para toma de datos en tiempo real. *Foto tomada durante el proceso de montaje del experimento de medición de capacitancia en tiempo real.*

#### 4.8. Mediciones de capacitancia en tiempo real

Una vez modificado el programa, cada una de las líneas celulares fue cultivada sobre un electrodo de oro en un sustrato de vidrio, junto con un pozo hecho con un trozo de cilindro de silicona para permitir la contención de la solución celular.

Las mediciones en tiempo real fueron realizadas con un electrodo Inter-digitado comercial IDA de 10 $\mu$ m de espacio de separación entre terminales. Todos los montajes fueron realizados en una cabina de flujo laminar.



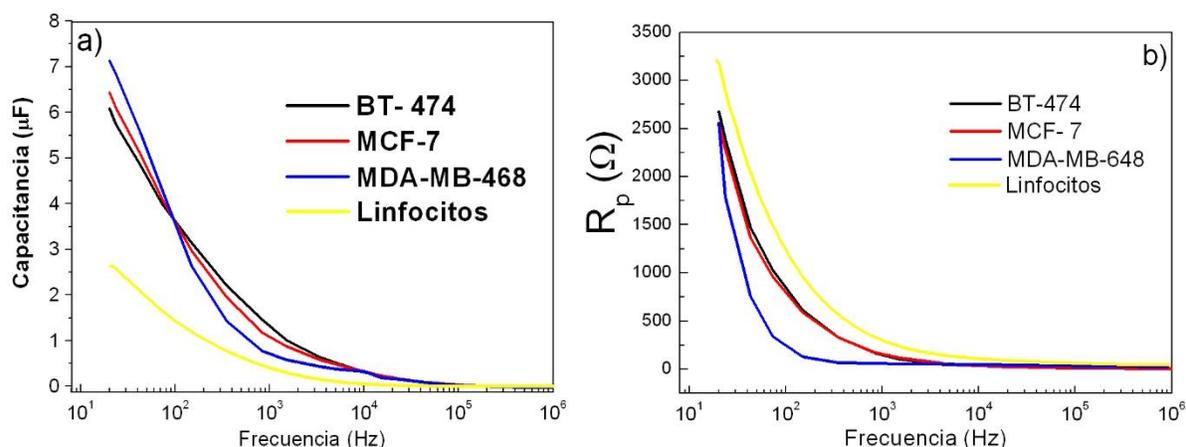
**Figura 27:** Montaje completo para toma de datos en tiempo real. *Foto tomada durante el proceso de toma de datos en tiempo real.*

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 28 se representa como modelo eléctrico el circuito equivalente del montaje, a cada extremo se tienen los electrodos simbolizados como un capacitor y una resistencia en serie, de igual forma cada célula adherida al electrodo se simboliza con un capacitor y resistencia pero en esta ocasión en paralelo (1), a medida que las células siguen adhiriéndose al electrodo van aumentando los símbolos eléctricos (2), posteriormente cuando hay una alta confluencia (3) se suman los símbolos que representan las células y se muestran como un capacitor y resistencia equivalentes (4), este se muestra gráficamente al final de la imagen.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los diferentes experimentos que se realizaron con las células de BT-474, MCF-7, MDA-MB-468 y linfocitos. A partir de un sistema de adquisición de datos e interfaz computarizada por LabView, se pudieron medir los valores de  $C_p$ ,  $R_p$ ,  $Z$  y  $\theta$  respectivamente.

### 5.1. Curvas $C_p$ , $R_p$ , $Z$ y $\theta$ en función de la Frecuencia (BT-474, LINFOCITOS MDA-MB-468, MCF-7)



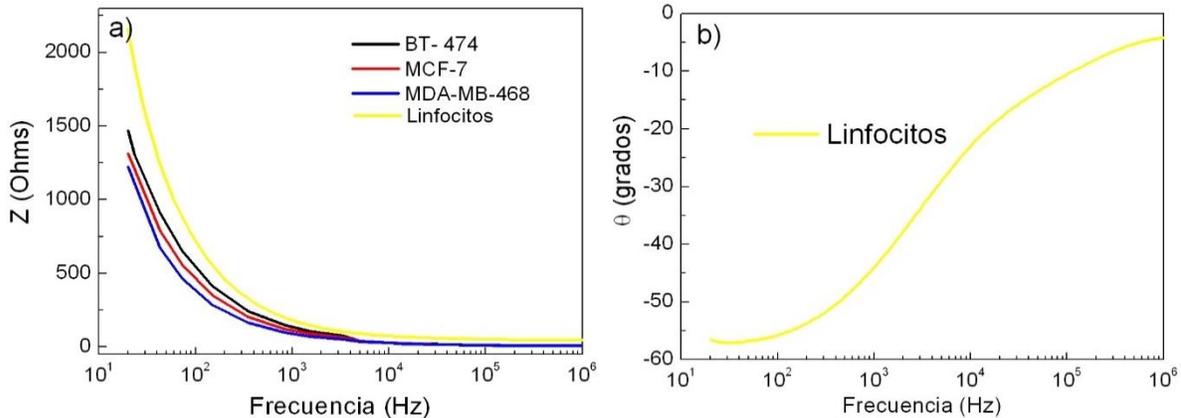
**Figura 28:** a) Capacitancia v.s. Frecuencia (Líneas celulares y linfocitos). b)  $R_p$  v.s. Frecuencia (Líneas celulares y linfocitos).

En la figura 28 se observa que el comportamiento de la capacitancia y resistencia eléctrica de las 3 líneas celulares y de los linfocitos (células de control). Este resultado muestra que para valores de bajas frecuencias, tanto la capacitancia como la resistencia no son constantes para ninguna de las líneas celulares, y decrecen con el incremento de la frecuencia. Básicamente, altos valores de capacitancia y bajos valores de resistencia dan lugar a un mejor acople eléctrico entre las células y el electrodo. Como el sistema presenta interfaz electrodo/solución celular, y por otra parte, la solución (volumen con células); hay que tener en cuenta que una de las capas

de la interfaz presenta una alta capacitancia en serie con una capa de baja capacitancia. A medida que existe el incremento de la frecuencia, la alta capacitancia (valores de frecuencia > 150Hz) genera un corto circuito dando una transición de alta capacitancia a baja, la cual corresponde a la suma en serie de la interfaz con la capacitancia del volumen de la solución. Esto es conocido como relajación de Maxwell-Wagner. Este comportamiento es típico de la interacción de electrodos metálicos en contacto con medios de cultivo celular.

Adicionalmente, en la figura 28a se muestra que las líneas celulares BT-747, MCF-7 y MDA-MB-468, presentan mayores valores de capacitancia, indicando que la acumulación de carga es mucho mayor comparada con las células de control (linfocitos), capacitancia que está muy relacionada con el perfil molecular dado por cada línea celular. Sin embargo, para los linfocitos, los resultados muestran que la alta resistencia a bajas frecuencias está dada por su baja capacidad de acumulación de cargas y la dinámica de dispersión que está en función de la transferencia de carga electrodo/células, ilustrada en la figura 28b.

La impedancia tiene un papel importante en la capacidad del transductor para detectar señales bioeléctricas. Cuando se mide la impedancia, los elementos que describen la interfaz con los electrodos y el volumen de la solución medio de cultivo/células pueden ser equivalentes a tener  $C_p$  y  $R_p$  dependientes de la frecuencia, por esa razón la medida de estas variables. En la figura 29 se presentan curvas de impedancia  $Z$  y de fase  $\phi$  en función de la frecuencia.



**Figura 29: a)** Curvas de impedancia eléctrica en función de la frecuencia (Líneas celulares y linfocitos). **b)** ángulo de desfase típica para linfocitos.

De los resultados obtenidos en la Figura 29, se puede resaltar que para todos los casos su impedancia eléctrica decrece con la frecuencia. Esta impedancia indica que la modulación de la carga para el modelo de circuito eléctrico planteado se reduce en cada una de la interfaces (capacitores de doble capa y el volumen de la solución); esta modulación de carga está establecida cuando hay altos valores de  $C_p$  y altas resistencia  $R_p$ , observados en las gráficas.

Estos resultados confirman que al realizar medidas de impedancia se establece una mayor resolución en comparación con la característica I-V (DC). Es de resaltar que, en las mediciones la señal alterna de voltaje es de baja amplitud (100mV) donde esta cumple la forma de

$$V_{AC} = V_o \exp(j\omega t) \quad (4)$$

Donde  $V_t$  fue el voltaje en el tiempo obtenido,  $V_o$  la amplitud de la señal (100mV) y  $\omega$  la frecuencia angular. Esta última definida por

$$f = \frac{\omega}{2\pi} \quad (5)$$

Sin embargo, en la curva de la figura 29b, la respuesta de corriente en el tiempo ( $I_t$ ) fue desfasada un ángulo ( $\theta$ ) y tiene una amplitud  $I_o$ . Este desfase mostrado en la figura, para cada línea celular y de control, genera la presencia de elementos que almacenan energía como las capacitancias mostradas anteriormente en la Figura 28a. Esta corriente se ha relacionado como

$$I_{AC} = I_o \exp(j\omega t + \theta) \quad (6)$$

Determinando que para la ley de Ohm la impedancia medida puede expresarse a través de la siguiente relación

$$Z = \frac{V_{AC}}{I_{AC}} Z_o \exp(j\theta) = Z(\cos \theta + j \operatorname{sen} \theta) \quad (7)$$

Teniendo en cuenta que a partir de cantidades eléctricas la capacitancia está dada por

$$C = \frac{\int I_{AC} dt}{V_{AC}} = \frac{I_{AC}}{j\omega V_{AC}} \quad (8)$$

De aquí se obtuvo que la impedancia debida a propiedades capacitivas fue

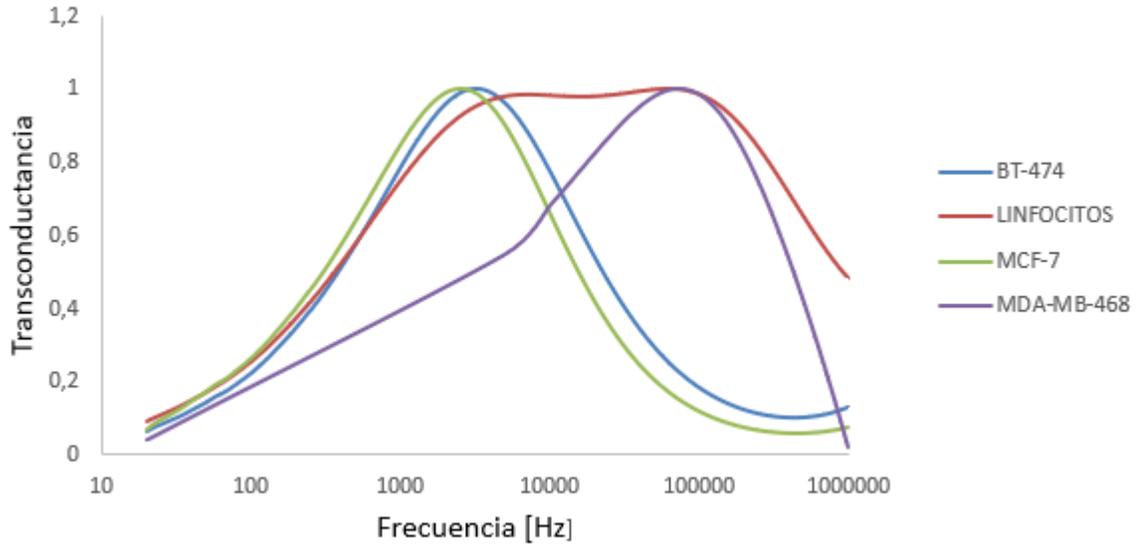
$$Z = \frac{1}{j\omega C} = \frac{1}{j2\pi f C} \text{ (ohms)} \quad (9)$$

Estos resultados confirman que, si la capacitancia es baja, la respuesta en corriente AC es pequeña y difícil de medir. Sin embargo, en nuestras medidas obtenidas, a altas frecuencias la impedancia se reduce (ver Figura.29), resultando en un incremento de la corriente y fácil de medir. Por lo tanto, los rangos obtenidos de capacitancias de las líneas celulares BT-747, MCF-7 y MDA-MB-468 y linfocitos se encontraron en el orden de los  $\mu\text{F}$  ( $10^{-6}$  F).

## 5.2. Curvas de Transconductancia (BT-474, LINFOCITOS, MDA-MB-468, MCF-7)

Los resultados de impedancia obtenidos en función de la frecuencia presentaron un decaimiento con una tendencia asintótica. Sin embargo, no es fácil encontrar

diferencias rápidamente de las diferentes líneas celulares. Por tanto, con los datos obtenidos de capacitancia para las 3 líneas celulares y los linfocitos, se transformó la señal en forma de distribución. Para ello realizo diagramas de transconductancia capacitiva en cada una de las líneas celulares y de control, con el fin de identificar el pico de frecuencia resonante en que presentaban mayor sensibilidad a la señal de voltaje alterno que fue aplicado. En la figura 30 se muestran curvas de  $2\pi fC$  (normalizada) en función de la frecuencia aplicada.



**Figura 30:** Transconductancia (Líneas celulares y linfocitos).

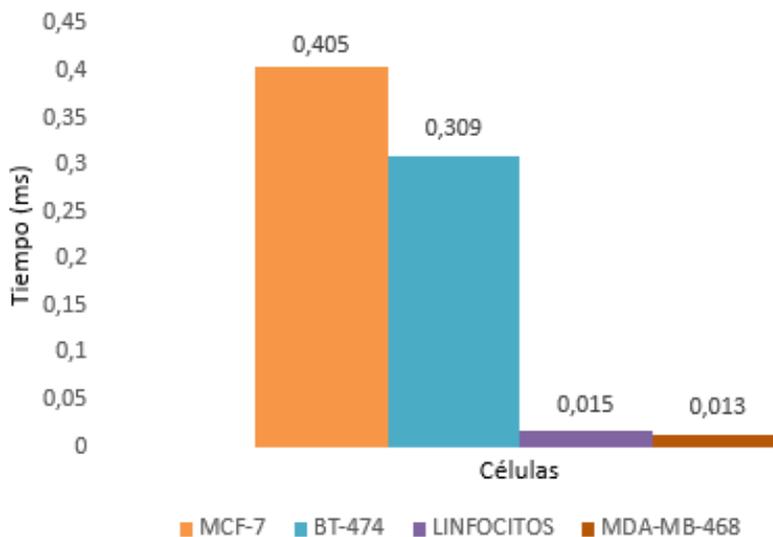
Los resultados de la figura 30 muestran que tanto las líneas celulares como los linfocitos tienen una frecuencia de resonancia diferente. Esto indica que la modulación tanto de iones pesados a bajas frecuencias como de iones livianos en altas frecuencias, para todos los casos es diferente. En la tabla 2 se presentan las frecuencias encontradas a partir de curvas de transconductancia capacitiva.

	<b>BT-474</b>	<b>LINFOCITOS</b>	<b>MCF-7</b>	<b>MDA-MB-468</b>
<b>FRECUENCIA (Hz)</b>	3.233	7.277 Y 63.350	2.466	65.000

**Tabla 2:** Valores de frecuencia obtenidos a partir de la transconductancia capacitiva.

Una vez conocida este valor de frecuencia, fue posible encontrar el tiempo que tarda en encontrar la frecuencia adecuada para entrar en resonancia, tiempo conocido como

tao ( $\tau$ ). Dicho tiempo fue obtenido a partir de la relación  $\tau = 1/f$ . Valores de tao son presentados en la Figura 31.



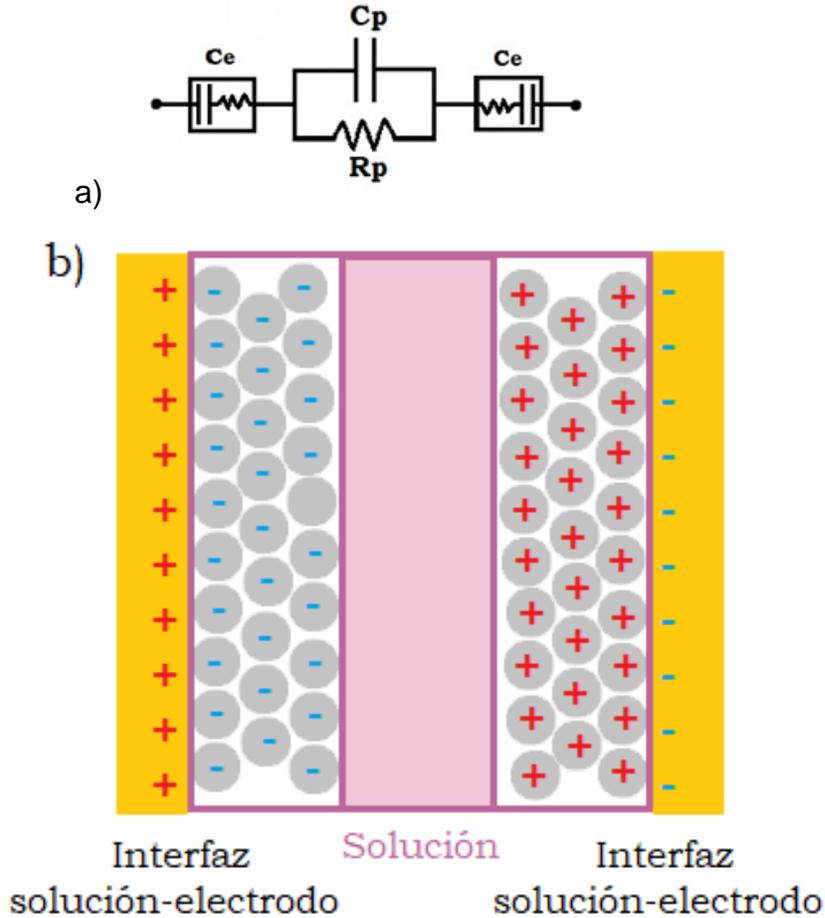
**Figura 31:** Tao (Líneas celulares y linfocitos).

También se puede observar, que, para los linfocitos, se presentan dos picos de frecuencia (uno más alto que el otro), comportamiento que difiere completamente de las 3 líneas celulares cancerosas. Esto está asociado a que ellos tienen una dinámica de transferencia de carga menor y a su perfil molecular.

Estas diferencias que presentan las 3 líneas celulares y los linfocitos pueden deberse a que todas presentan un perfil molecular distinto, por lo tanto, los componentes presentes en su membrana celular generan distintos potenciales de membrana, lo que da como resultado características eléctricas diferentes. Esto resulta de gran utilidad al momento de caracterizar o diferenciar las células en estudio, ya que se puede ver que todas presentan una respuesta diferente a la señal de voltaje que les fue aplicada.

Para interpretar todos los resultados obtenidos en las mediciones de  $C_p$ ,  $R_p$ ,  $Z$  y  $Thd$ , se planteó un modelo gráfico y uno eléctrico, partiendo de que cuando la solución celular se encuentra en contacto con los electrodos, dan lugar a una interfaz de doble capa en la región electrolito/electrodo. En la región de interfaz puede ser descrita a través del circuito presentado en la Figura 32. Se puede observar que hay un condensador de doble capa ( $C_e$ ) en serie con una resistencia de contacto ( $R_e$ ), que contribuyen a la transferencia de carga en dicha interfaz. También se puede observar que en el volumen del sistema (que contiene la solución celular), puede ser descrito por la acumulación de capacitores en paralelo ( $C_p$ ) junto con su respectiva resistencia

celular ( $R_p$ ). Adicionalmente, se presentan en estos resultados que el camino eléctrico desde las células hasta el electrodo de referencia tiene una baja impedancia y es llamada  $Z$ . Este modelo propuesto en este trabajo ha sido basado en sistemas análogos para células descritos en la literatura. [49]



**Figura 32: (a)** Circuito eléctrico equivalente para sensor con 2 electrodos en contacto con solución celular; **(b)** Modelo gráfico de interacción eléctrica entre 2 electrodos cilíndricos y la solución celular.

### 5.3. Programa LABVIEW – Mediciones en tiempo real

Para poder realizar mediciones en tiempo real de las características eléctricas (capacitancia/impedancia) de las 3 líneas celulares y los linfocitos, se adaptó una interfaz en LABVIEW, que permitiera tomar mediciones de capacitancia en tiempo real



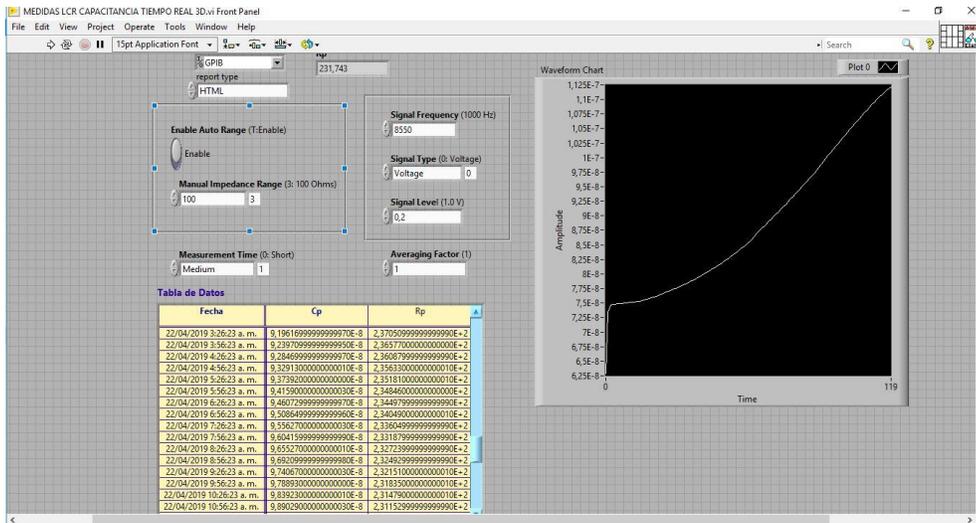


Figura 34: Interfaz de toma de datos en tiempo real, ejemplo de finalización de toma de datos de linfocitos.

#### 5.4. Curvas capacitancia en tiempo real (BT-474, LINFOCITOS MDA-MB-468, MCF-7)

Se realizaron mediciones de capacitancia en tiempo real durante 48 horas de las 3 líneas celulares y los linfocitos, a través de un sistema compuesto por un electrodo, un equipo de medición LCR, un computador, y una incubadora, la cual fue crucial durante los procesos de medición, ya que permite tener las células en las condiciones que necesitan para vivir y proliferar (Temperatura = 37°C, CO<sub>2</sub> = 5%).

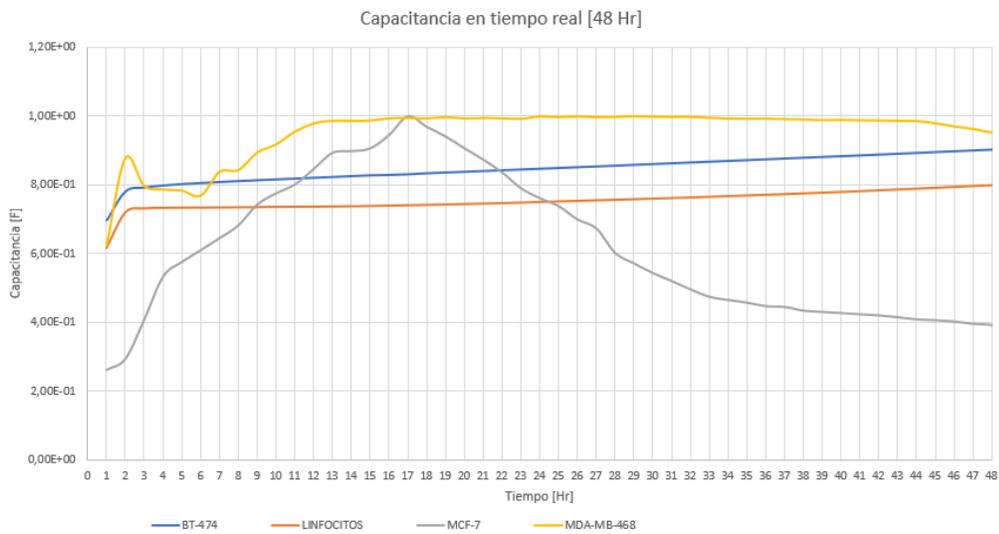
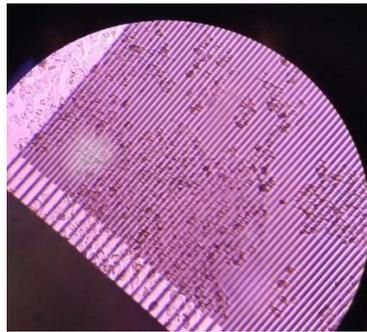


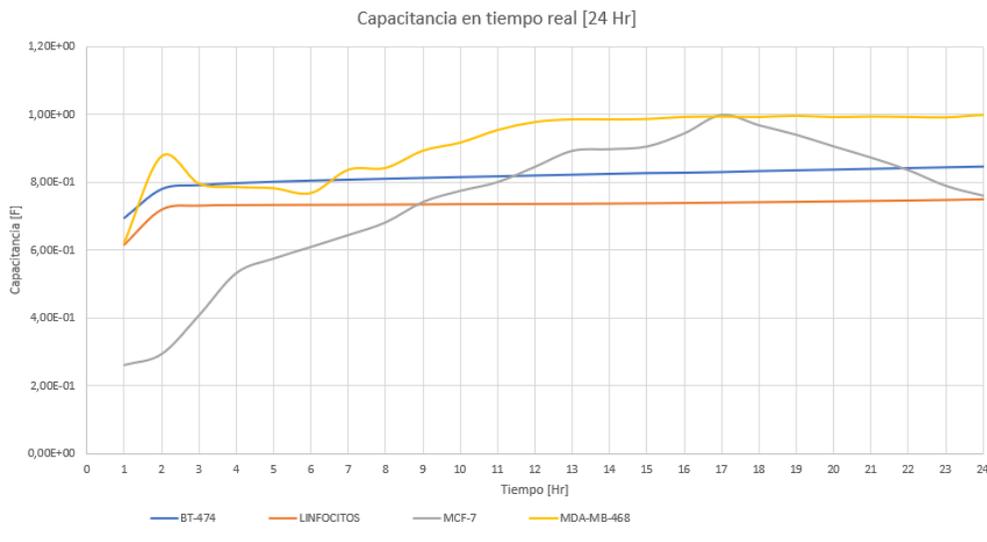
Figura 35: Mediciones de capacitancia en tiempo real de las 3 líneas celulares y linfocitos [48 horas].

En la figura 30 se puede observar que en las primeras horas todas las células en estudio presentan un comportamiento creciente pronunciado. Sin embargo, es más alta la pendiente en MDA-MB-468 y en MCF-7, por lo tanto, se presume que estas células se adhirieron más rápido al sustrato (vidrio y electrodo) que las demás.

Adicionalmente, la línea celular MCF-7 presentó un comportamiento atípico, con respecto a BT-474, MDA-MB-468 y los linfocitos. Se presume que cerca de las 17 horas de incubación, las células MCF-7 alcanzaron una confluencia muy alta sobre el electrodo, y se saturó la señal. Para comprobar esto, se observó el montaje en un microscopio invertido al final de la medición, y se observó una confluencia alta.



**Figura 36:** Células MCF-7 sobre electrodo IDA - Confluencia alta.



**Figura 37:** Mediciones de capacitancia en tiempo real de las 3 líneas celulares y linfocitos [24 horas].

Con el fin de encontrar un posible modelo matemático a partir de la Figura 37, donde se observa la capacitancia en tiempo real de las 4 líneas celulares en estudio; en este caso, las poblaciones pueden crecer de manera exponencial por un tiempo, pero

finalmente se ven limitadas por la disponibilidad de recursos, por esto se trae a consideración el modelo de crecimiento logístico de Verhulst, donde se establece que, a mayor población, P, menor tasa de crecimiento. Al inicio el crecimiento exponencial puede ocurrir durante un tiempo, si hay pocos individuos y muchos recursos, pero cuando el número de individuos es lo suficientemente grande, los recursos empiezan a agotarse, lo que desacelera la tasa de crecimiento.

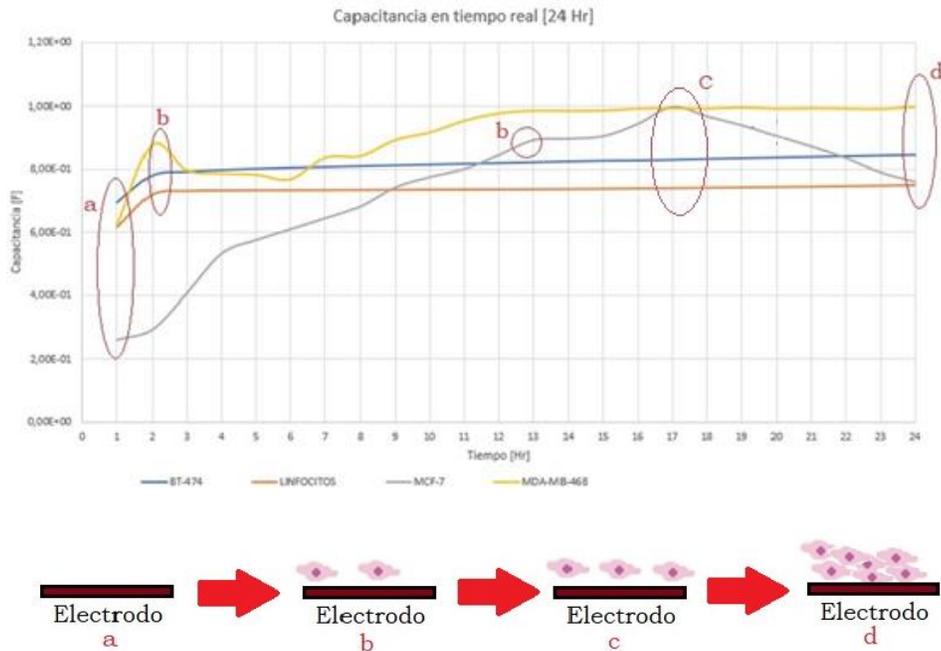
El parámetro “r” representa, en la función logística, la tasa instantánea de crecimiento poblacional. A diferencia de la función exponencial, el parámetro “r” en la función logística no es constante. Mientras mayor sea el valor del parámetro “r” el crecimiento de la población será más rápido y a su vez se acercará más rápido a la capacidad de carga o saturación (k).

P<sub>0</sub> representa la población inicial en el sistema; en este caso 15.000 células. Si P<sub>0</sub> < k la población crece, hasta verse afectada por los diversos factores del medio ambiente, y alcanza una planicie, el nivel de saturación o capacidad de carga (k).

A medida que P aumenta los nutrientes proporcionados por el medio disminuyen proporcionalmente.

Con base en lo anterior se plantea la siguiente ecuación como modelo matemático

$$P(t) = \frac{kP_0e^{rt}}{k + P_0(e^{rt} - 1)} \quad (10)$$

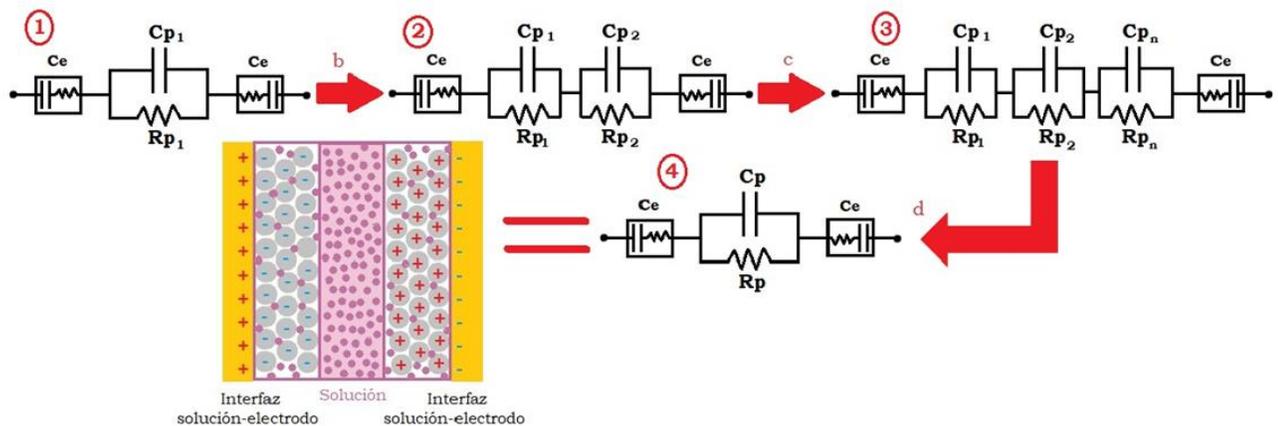


**Figura 38:** Modelo cualitativo de comportamiento de la capacitancia en tiempo real.

En la figura 38 se relacionan con las letras “a”, “b”, “c” y “d” los momentos principales que se presentan durante la medición en tiempo real mostrada en la gráfica, el punto “a” es el momento inicial; tan pronto se coloca la solución celular en el montaje y aun las células se encuentran en suspensión. En el punto “b” las células empiezan a adherirse

al fondo del sustrato y entran en contacto con el electrodo, luego en el “d” se toma como el punto final de la medición donde las células abarcan una gran parte de la superficie del electrodo. Cabe resaltar que se comprobó el tiempo de adhesión al sustrato en el microscopio, y dio un estimado de 2 horas para todas las líneas.

En la línea celular MCF-7 se presenta un comportamiento atípico en el cual se podría pensar que hay una gran confluencia, por consiguiente, no habría suficiente superficie de contacto con el electrodo. Por otro lado, también se pudieron haber agotado los nutrientes proporcionados por el medio, generando una disminución en la actividad metabólica, resultando así en una disminución de la capacitancia.



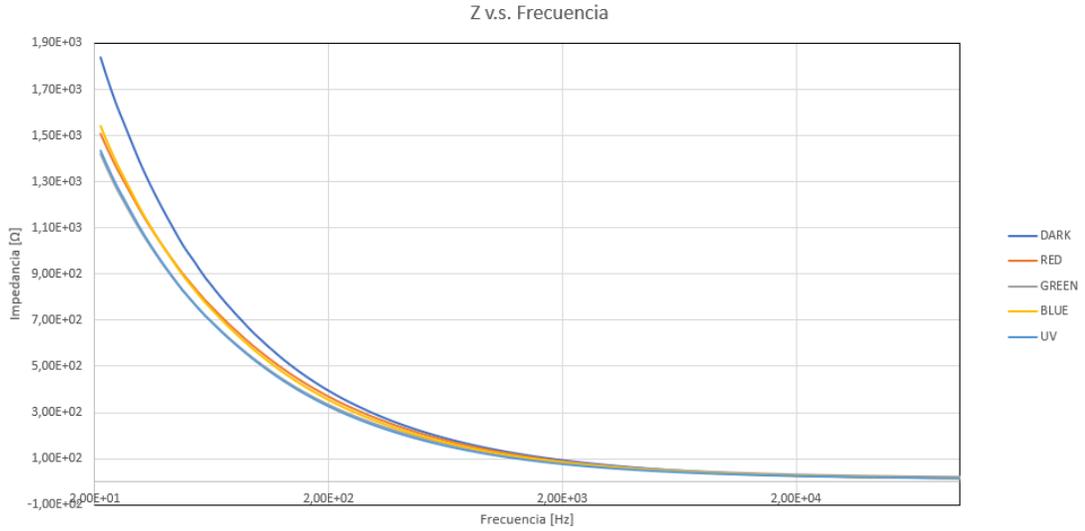
**Figura 39:** Modelo gráfico de comportamiento de la capacitancia en tiempo real.

En la Figura 39 se plantea el modelo que explica el comportamiento de la capacitancia en tiempo real, donde se ve una relación directa entre el valor de la capacitancia y la cantidad de células en contacto con el electrodo.

### 5.5. Curvas de fotoimpedancia (Ausencia de irradiación, Rojo, Verde, Azul, UV) MCF-7

Para poder estimular las células en estudio con 4 láseres de distintas longitudes de onda (Rojo = 632nm, Verde = 530nm, Azul = 405nm, Ultravioleta = 390nm), se empleó un montaje que permite seleccionar el láser deseado, el cual incide directamente sobre la solución presente en la celda cilíndrica. Se realizaron mediciones de fotoimpedancia [ $C_p$ - $R_p$ ,  $Z$ - $\theta$ ] para la línea celular MCF-7 con la incidencia de 4 haces de luz con diferentes longitudes de onda (rojo, verde, azul, ultravioleta) para determinar el efecto que generan en el comportamiento de las características eléctricas de las células. Las mediciones fueron realizadas con 15.000 células en 200uL.

### 5.5.1. Z

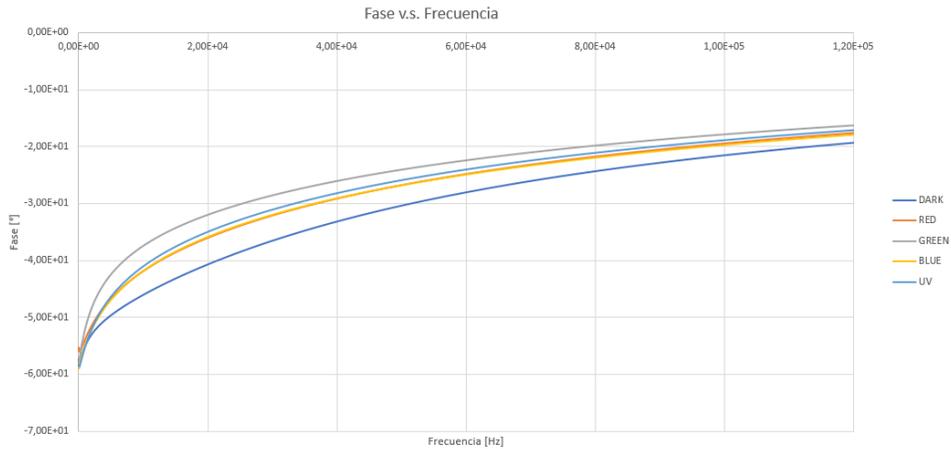


**Figura 40:** Impedancia v.s. frecuencia MCF-7 con incidencia de luz.

En la Figura 40 se observa que las mediciones tomadas en ausencia de irradiación presentan los valores más altos de impedancia, mientras que los valores una vez excitados con los haces de luz de diferentes longitudes de onda, presentan valores inferiores, siendo los más bajos para UV y verde. Estas diferencias se acentúan más en las frecuencias más bajas (20 Hz - 1000 Hz).

Esto podría ser indicio de que la incidencia de los haces de luz sobre las células afecta su actividad eléctrica, y metabólica, llevándolas a una posible muerte.

### 5.5.2. Thd

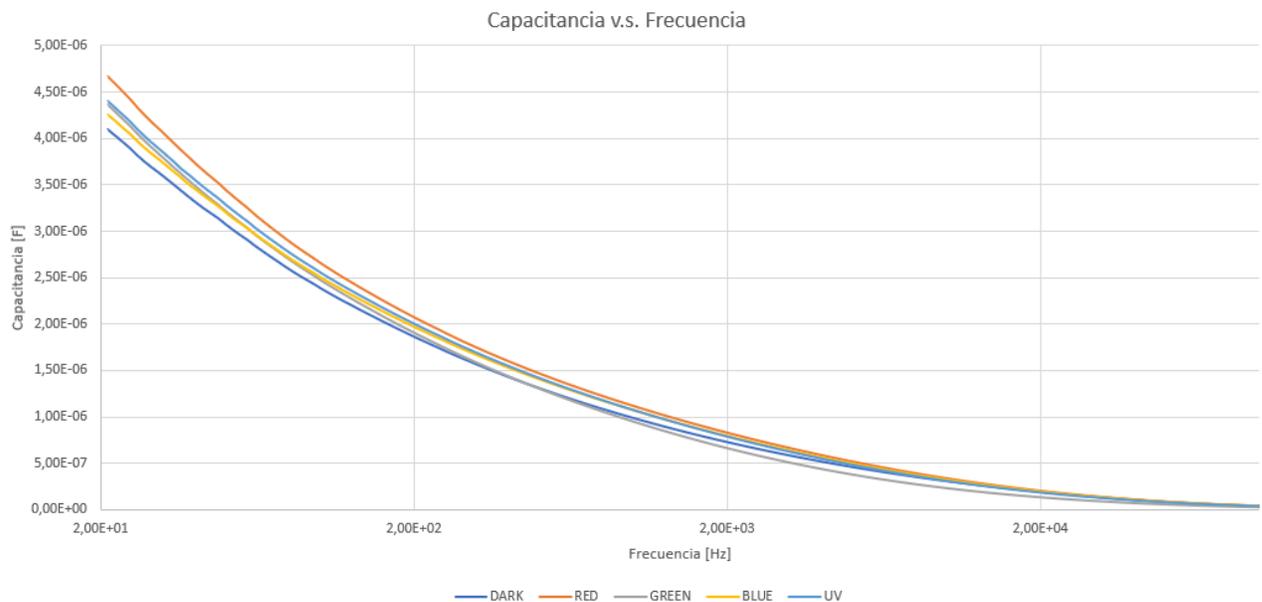


**Figura 41:** Fase v.s. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz.

En la Figura 41 se puede apreciar que las mediciones tomadas en ausencia de irradiación presentan los valores más bajos de fase, y los valores una vez excitados con los haces de luz de diferentes longitudes de onda, presentan valores superiores, siendo los más altos para el láser color verde, lo que era de esperarse, ya que el comportamiento de la fase es opuesto al de la impedancia en modelos de Condensador-Resistencia.

Estas diferencias se acentúan más en las frecuencias más bajas (20 Hz - 1000 Hz), sin embargo, se aprecian mejor que las diferencias presentadas en las mediciones de impedancia.

### 5.5.3. Cp



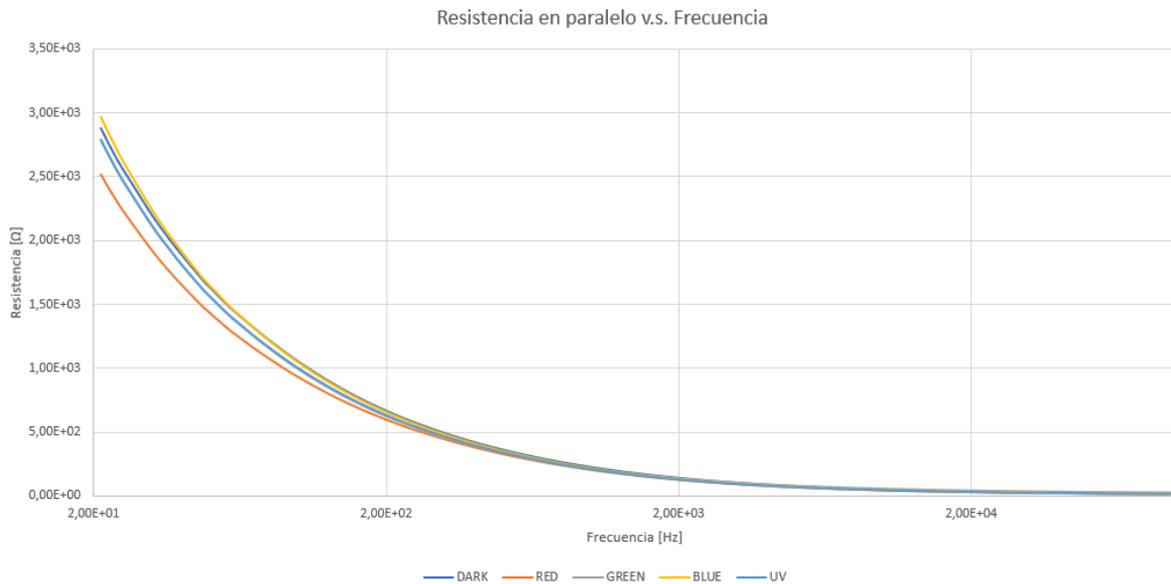
**Figura 42:** Capacitancia v.s. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz.

En la Figura 42 se puede observar que las mediciones tomadas en ausencia de irradiación, contrario a los resultados de Z, la ausencia de irradiación presenta los valores más bajos de capacitancia, y los valores una vez excitados con los haces de luz de diferentes longitudes de onda, presentan valores superiores. Estas diferencias se acentúan más en las frecuencias más bajas (20 Hz - 100 Hz).

Adicionalmente, se puede observar que para valores de bajas frecuencias, tanto la capacitancia como la resistencia no son constantes, y decrecen con el incremento de la frecuencia.

Esto puede ser empleado como referencia al momento de caracterizar las células, y buscar diferencias entre el comportamiento frente a la incidencia de los distintos láseres, ya que en estos valores de bajas frecuencias se pueden apreciar claramente.

#### 5.5.4. Rp



**Figura 43:** Resistencia en paralelo v.s. Frecuencia MCF-7 con incidencia de luz.

En la Figura 43 se evidencia que las mediciones tomadas en ausencia de irradiación y con la incidencia de los cuatro haces de luz de diferentes longitudes de onda, presentan valores muy cercanos, sin embargo, presentan pequeñas diferencias, fáciles de identificar en las frecuencias más bajas (20 Hz - 100 Hz).

Todos los resultados presentados de las mediciones realizadas al incidir los 4 láseres sobre las células MCF-7, dan un indicio de que, al recibir la incidencia de los haces de luz, este altera sus características eléctricas, lo que puede relacionarse con un cambio en su actividad metabólica, o su muerte.

## **6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS**

Se recomienda continuar con mediciones de impedancia y fase en tiempo real, de las líneas celulares y linfocitos, y así poder determinar las diferencias que presentan las células cancerosas de las normales.

Adicionalmente, se recomienda realizar mediciones de fotoimpedancia para todas las células, para determinar cómo se ven afectadas las células (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 y linfocitos) con la incidencia de los diferentes haces de luz, a partir de eso, establecer si hay diferencias entre las respuestas de líneas celulares cancerosas y los linfocitos.

## 7. CONCLUSIONES

- Se logró crear un sistema de medición de capacitancia en tiempo real en el que líneas celulares MCF-7, MDA-MB-468 y BT-474 mostraron características eléctricas diferentes, permitiendo hacer una caracterización de todas las células.
- Se observaron diferencias en los valores de capacitancia de las líneas celulares con respecto a los linfocitos, sin embargo, se determinó que en frecuencias altas no es viable realizar la caracterización de las células, ya que presentan comportamientos muy similares.
- Se determinó que el aumento de la cantidad de células en contacto con el electrodo está directamente relacionado con el aumento de la capacitancia, lo cual evidencia que se podría medir proliferación celular con el sistema diseñado.
- El sistema diseñado permitió registrar la actividad eléctrica diferencial de las células en un entorno normal de cultivo celular.
- Los 4 láseres generan alteraciones en las características eléctricas de las células MCF-7, de manera específica para cada una de las longitudes de onda.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la salud, «WHO,» [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Último acceso: 18 Abril 2019].
- [2] WHO, «Organización Mundial de la Salud,» 3 Febrero 2017. [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs>. [Último acceso: 22 Abril 2019].
- [3] A. C. Society, «American Cancer Society,» [En línea]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/tratamiento-del-cancer-del-seno-segun-su-etapa/tratamiento-del-cancer-de-seno-en-etapa-iv-avanzado.html>. [Último acceso: 23 Abril 2019].
- [4] Tyna A Hope and Siân E Iles, «Technology review: The use of electrical impedance scanning in,» *Breast Cancer Research*, pp. 69 - 74, 13 Noviemvre 2003.
- [5] Adam B. Nover, Shami Jagtap, Waqas Anjum, Hakki Yegingil, Wan Y. Shih, «Modern Breast Cancer Detection: A Technological Review,» *International Journal of Biomedical Imaging*, pp. 1 - 14, 2009.
- [6] «International Agency for Research on Cancer,» [En línea]. Available: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=3&ages\\_group%5B%5D=12&nb\\_items=7&group](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=3&ages_group%5B%5D=12&nb_items=7&group). [Último acceso: 29 Abril 2019].
- [7] Susanne Nussbaumer , Pascal Bonnabrya, Jean-Luc Veuthey , Sandrine Fleury-Souverain, «Analysis of anticancer drugs: A review,» *ELSEVIER*, pp. 2266 - 2289, 2011.
- [8] J. Easley, «Motivations for cancer history disclosure among young adult,» *Journal of Cancer Survivorship*, 2019.
- [9] Instituto Nacional del Cáncer, Manual de enfermería oncológica, Buenos Aires, Argentina, 2014.
- [10] Lic. Silvia Aibar. Lic. Constanza Celano. Lic. María Concepción Chambi. Lic. Silvina Estrada. Dra. Natalia Gandur. Lic. Patricia Gange. Lic. Carlos González. Lic. Olinda González. Lic. Gladys Grance. Lic. Marta Junin. Lic. Nelson Kohen. Lic. José Molina. , Manual de enfermería oncológica, Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional del Cáncer.
- [11] Rupen Shah, Kelly Rosso, S David Nathanson, «Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer,» *World Journal of Clinical Oncology*, pp. 283-298, 10 Agosto 2014.
- [12] Marcus Vinicius Rozo RODRIGUES, Valdir TERCIONI-JUNIOR, Luiz Roberto LOPES,, «BREAST CANCER METASTASIS IN THE STOMACH: WHEN THE,» *ABCD Arq Bras Cir Dig*, pp. 86-89, 2016.

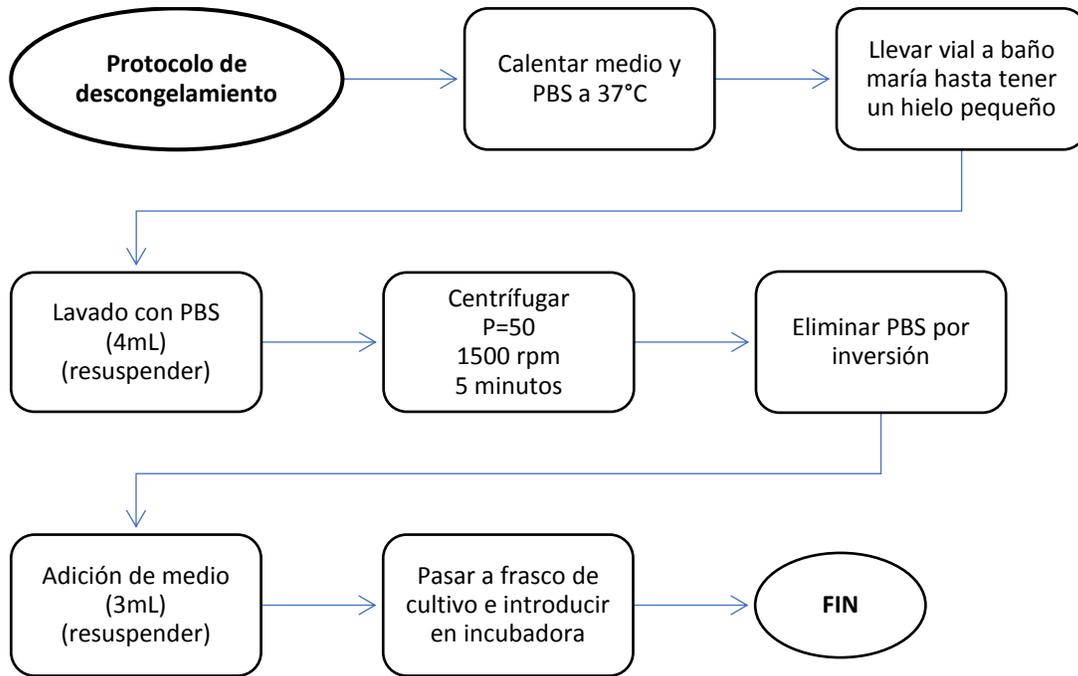
- [13] Diana María Cárdenas Caro IPB, M Sc., «La Célula como unidad funcional,» *Departamento de Biología - UFPS*, vol. Unidad I, pp. 1 - 11.
- [14] Sara Margarita Garza Aguilar, Víctor Allan Sánchez Camargo, Silvia Karina Godínez Palma y Aurora Lara Núñez, «AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR EN PLANTAS,» vol. 2, nº 32, pp. 39 - 47, 2014.
- [15] Leonardo David Lomanto Díaz, Óscar Leonel Ortiz Cala, César Orlando Bretón Pinto, Álvaro Iván Gómez Lizcano, Viviana Matilde Mesa Cornejo, «El ciclo celular,» *MedUNAB*, vol. 6, pp. 21-29, Mayo de 2003.
- [16] Bruce Alberts, Dennis Bray, Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Introducción a la biología celular*, 2 edición ed., Madrid España: editorial medica panamericana (traducción), 2004.
- [17] Neil A. Campbell, Jane B. Reece, *Biología*, Madrid, España: Editorial médica panamericana (traducción), 2005, p. Capítulo 12.
- [18] Michael H. Ross, Wojciech Pawlina, *Histología*, Madrid, España: Editorial médica panamericana (traducción), 2006.
- [19] Benjamin A. Pierce, *Genética: Un enfoque conceptual*, Madrid, España: Editorial médica panamericana (traducción), 2009, p. Capítulo 2.
- [20] Rebeca López Marure, «LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y EL CÁNCER,» *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, vol. 6, nº 1, pp. 40 - 44, 2003.
- [21] Lourdes Rodríguez Fragoso, Efrén Hernández Baltasar, Jorge A Reyes Esparza, «El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer,» *Bioteología Aplicada*, vol. 21, nº 2, pp. 60 - 69, 2004.
- [22] Marta Miguel Castro, Elena Herrero Martínez, «Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares,» *Escuela de Gestión Sanitaria*, Enero de 2019.
- [23] Pitot, Henry C., *Fundamentos de Oncología*, vol. 5, Barcelona España: REVERTÉ S.A., 1981, p. 169.
- [24] EE, Sweeney; , Mcdaniel RE; , Maximov PY; , Fan P; , Craig, «Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress Despite Limitations.,» pp. 143-163, Febrero 2012.
- [25] MCF7 (ATCC® HTB-22™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#characteristics>. [Último acceso: 18 Enero 2019].
- [26] Dr.Eckener-Straße, «MCF-7,» CLS Product Information, Germany.
- [27] M. (. HTB-22™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available:

- <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#generalinformation>. [Último acceso: 18 Enero 2019].
- [28] H. J. van Slooten, B. A. Bonsing, A. J. Hiller, G. T. Colbern, J. H. van Dierendonck, C. J. Cornelisse, and H. S. Smith, «Outgrowth of BT-474 human breast cancer cells in immune-deficient mice: a new in vivo model for hormone-dependent breast cancer.,» *British Journal of Cancer*, pp. 22-30, 1995.
- [29] Dr.Eckener-Straße, CLS Product Information, Germany.
- [30] B.-4. (. HTB-20™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-20.aspx#characteristics>. [Último acceso: 24 Enero 2019].
- [31] B.-4. (. HTB-20™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-20.aspx#generalinformation>. [Último acceso: 23 Enero 2019].
- [32] MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-132.aspx#generalinformation>. [Último acceso: 15 Marzo 2019].
- [33] MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), «ATCC, Credible leads to Incredible™,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-132.aspx#characteristics>. [Último acceso: 15 Marzo 2019].
- [34] Brandan, Nora; Aquino Esperanza, José; Aispuru, Gualberto; , «CÉLULAS CITOTÓXICAS NATURALES,» *Cátedra de Bioquímica – Facultad de Medicina - UNNE*.
- [35] Dra. N. Brandan, Dra. Ma. Fernanda Aguirre Ojea, Dr. Alberto Luponio, Aquino Esperanza José A., «Linfocitos B,» *CATEDRA DE BIOQUIMICA - FACULTAD DE MEDICINA - UNNE*.
- [36] Brandan, Nora; Luponio, Alberto; González, Juan José; González Roibón, Nilda; Klinzuk, Sofía, «Linfocitos T,» *Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica*.
- [37] Citogenética, «IBIAN TECHNOLOGIES,» [En línea]. Available: <https://www.ibiantech.com/citogenetica/>. [Último acceso: 25 Marzo 2019].
- [38] A. Arnaiz-Villena, J. R. Regueiro, Carlos López Larrea, Inmunología, Madrid, España: Editorial Complutense, 1995, p. Sección 2.3.
- [39] V. K. Bozhenko, A. V. Ivanov, T. M. Kulinich, V. P. Smirnov, A. M. Shishkin, and V. A. Solodky, «Comparison of Biological Effects of  $\gamma$ -Radiation of Low and Ultra-High Dose Rate on Lymphocytes and Cultured Human Malignant Lymphoma Cells,» *NCBI*, vol. 166, nº 6, pp. 785-787, Abril 2019.
- [40] Bruce Alberts, Dennis Bray, Introducción a la biología celular, Madrid España: editorial médica panamericana, 2004.
- [41] Jun Ho Song, a Sun-Mi Leeb and Kyung-Hwa Yoo , Label-free and real-time monitoring of human mesenchymal stem cell differentiation in 2D and 3D cell culture systems using impedance cell sensors, The Royal Society of Chemistry, Agosto de 2018.

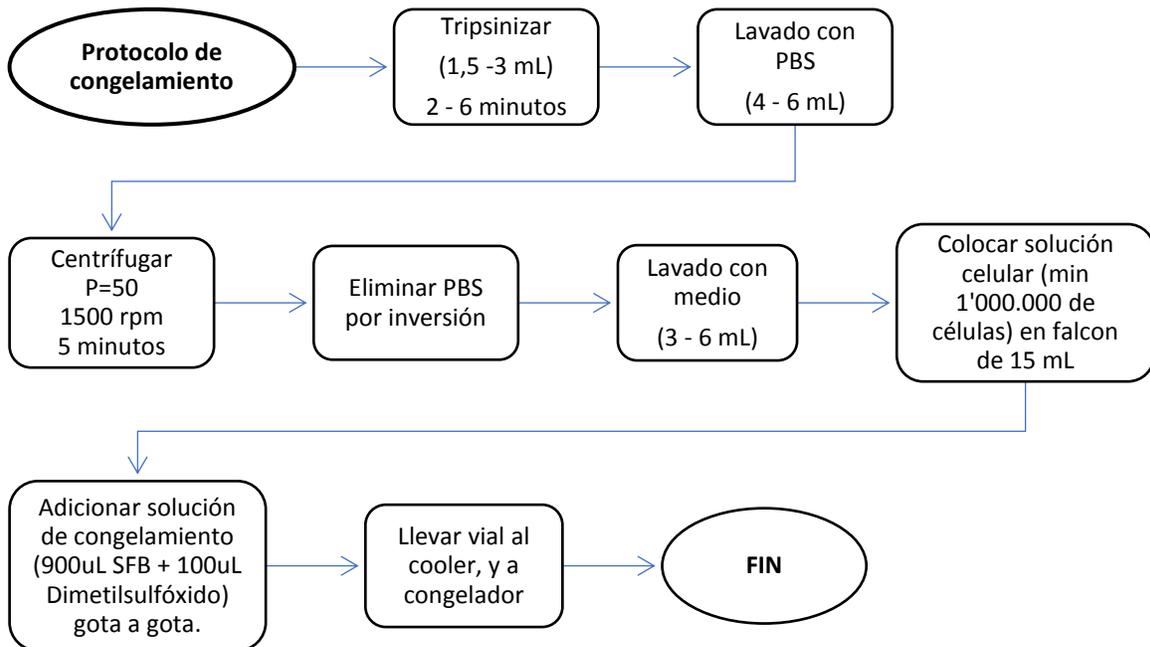
- [42] W. Buño, A. Araque, Características de los componentes celulares del tejido nervioso (Tema 4: Propiedades eléctricas de las membranas de las células excitables), Madrid, España, 2007.
- [43] José Miguel Miranda Pantoja, José Luis Sebastián, Manuel Sierra, José Margineda, «Revisión de conceptos fundamentales,» de *Ingeniería de microondas: técnicas experimentales*, Madrid, España, Prentice Hall, 2002, p. Capítulo 2.
- [44] Félix Redondo Quintela, Roberto C. Redondo Melchor, «Leyes de kirchhoff,» de *Redes Eléctricas de Kirchhoff. Teoría de Circuitos*, Salamanca, España, STS EDICIONES, 2016, p. Capítulo 2.
- [45] A. J. S. Gómez, «CAPACITANCIA E INDUCTANCIA,» *Universidad de los Andes*, pp. 125 - 129.
- [46] Alvaro Tucci Reali, Instrumentación Biomédica, 2007.
- [47] José Rafael Lajara Vizcaíno, José Pelegrí Sebastián, LabVIEW: Entorno gráfico de programación, Barcelona: Marcombo, 2011.
- [48] Esteban Leyva Cortés, José Ignacio Prieto Tinoco, M.a de los Ángeles Sampalo de la Torre, M.a Luisa Garzón Villar, Sistemas y Aplicaciones Informáticas, España: Editorial MAD, 2006, p. Secciones 1 y 2.
- [49] Medeiros, M. C. R., Mestre, A. L. G., Inácio, P. M. C., Santos, J. M. L., Araujo, I. M., Bragança, J., ... Gomes, H. L., «Performance assessment of polymer based electrodes for in vitro electrophysiological sensing: the role of the electrode impedance.,» *Organic sensors and Bioelectronics IX*, 2016.
- [50] Organización Mundial de la salud, «WHO,» [En línea]. Available: <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index4.html>. [Último acceso: 18 Enero 2019].

## ANEXOS

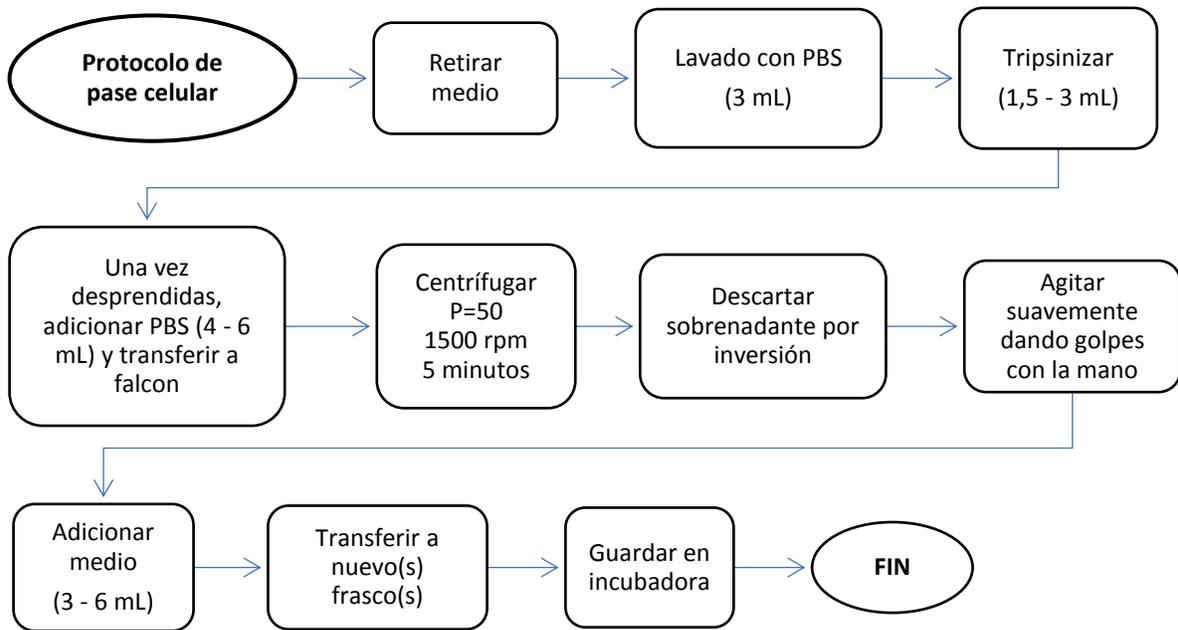
### Anexo 1: Protocolo de descongelamiento.



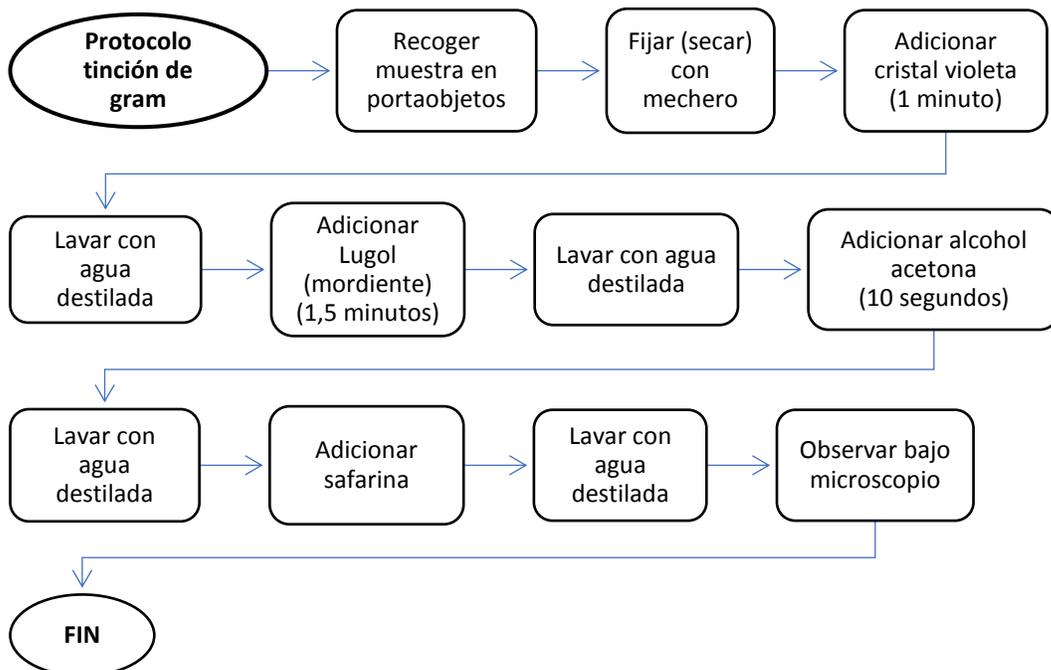
### Anexo 2: Protocolo de congelamiento.



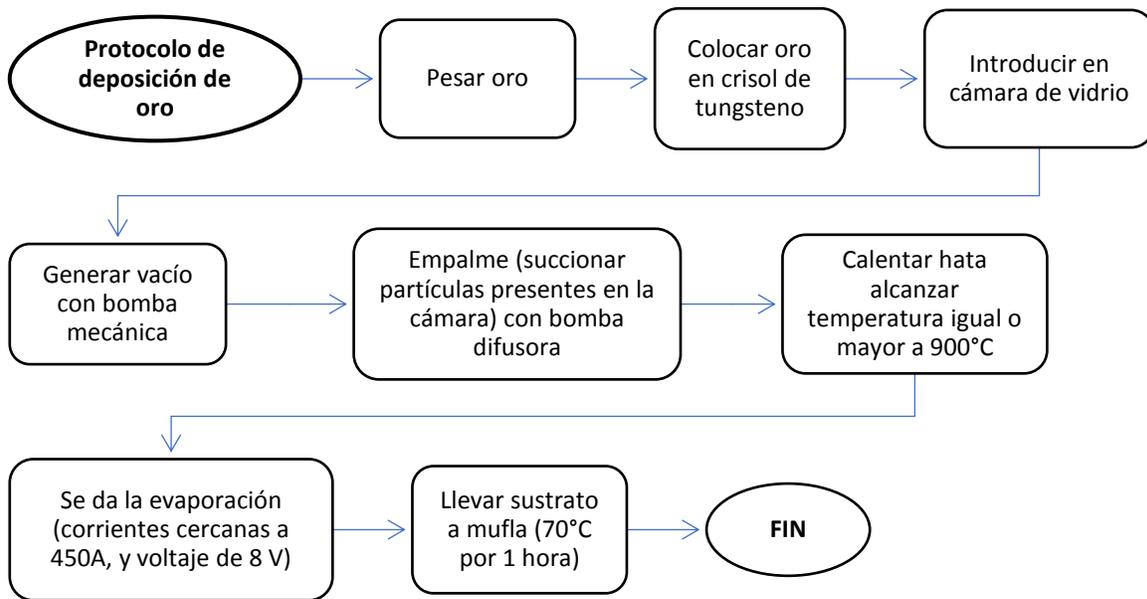
### Anexo 3: Protocolo de pase celular.



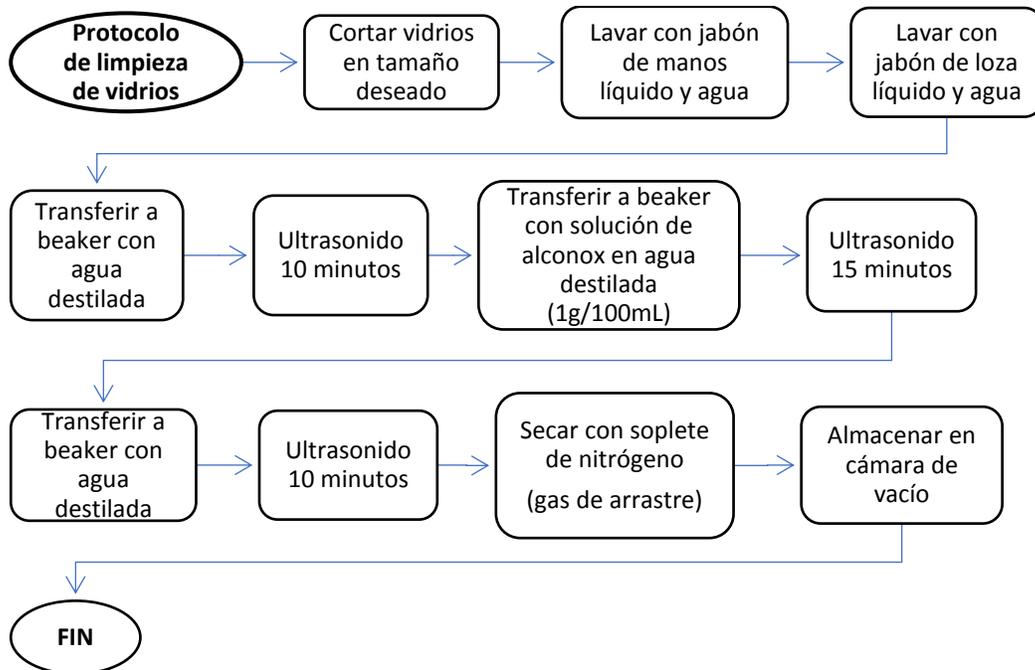
### Anexo 4: Protocolo de tinción de gran.



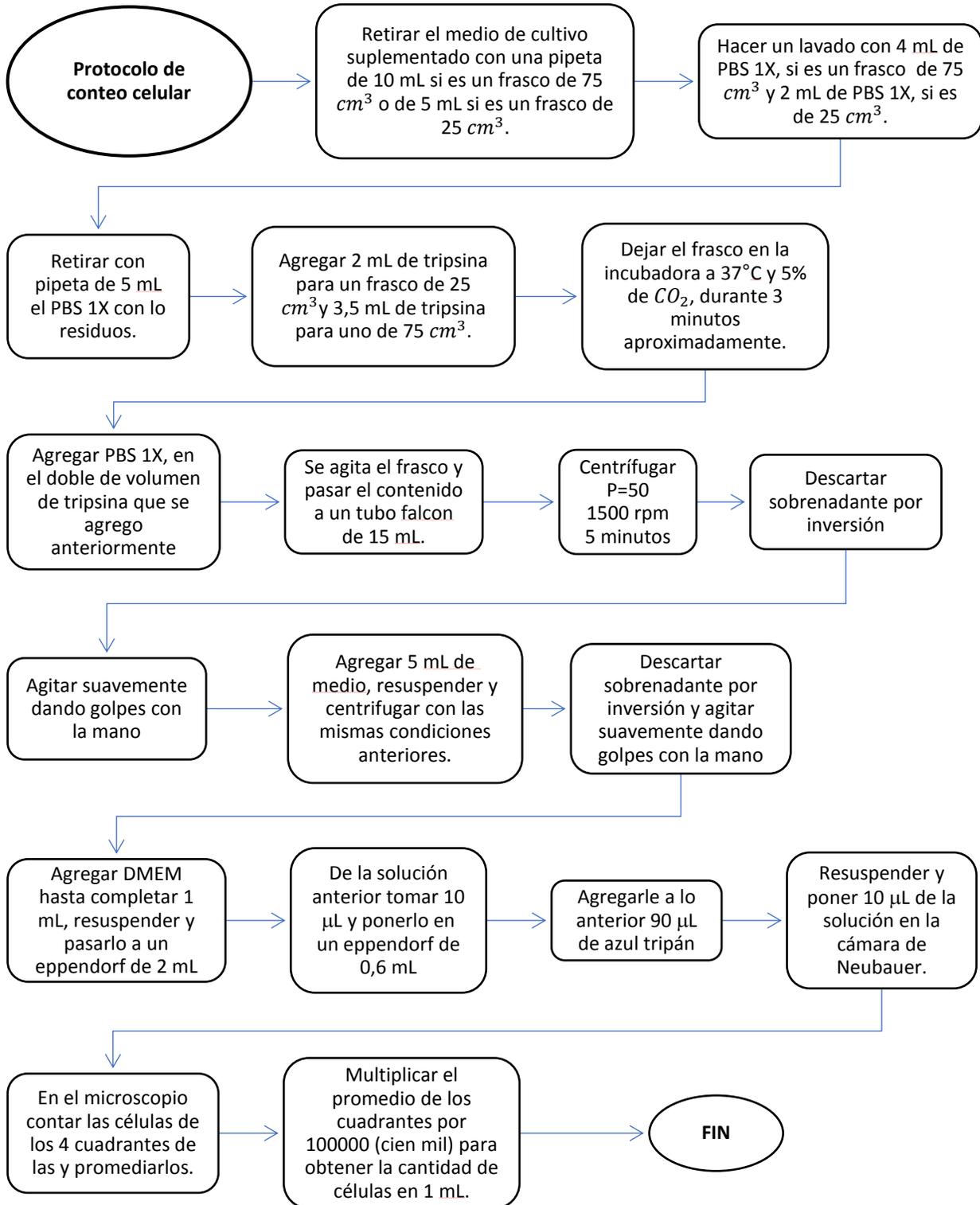
### Anexo 5: Protocolo de deposición de oro.



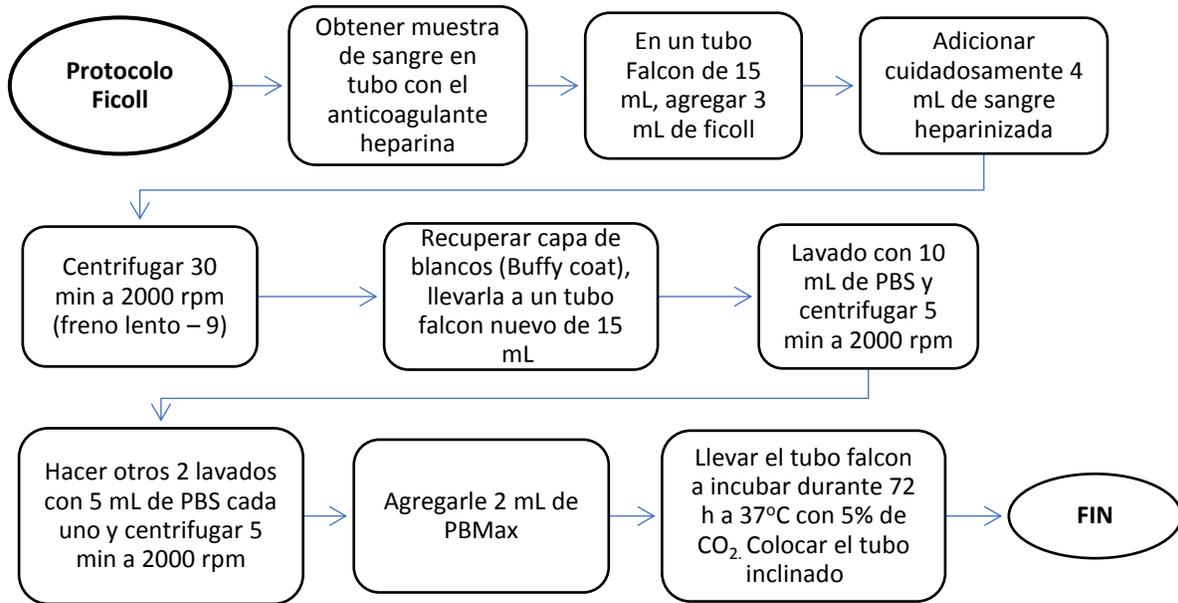
### Anexo 6: Protocolo de limpieza de vidrios (sustrato).



## Anexo 7: Protocolo de conteo celular – Cámara de Neubauer.



### Anexo 8: Protocolo de ficoll.



### Anexo 9: Protocolo de cambio de medio.

