

Evaluación del efecto de moduladores de canales iónicos sobre la conductividad y permitividad en células con cáncer de seno

Daniel Felipe Guzmán Pérez

Trabajo Dirigido

Tutor

Sandra Rocío Ramírez Clavijo, PhD



**Universidad del
Rosario**



**ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022**

Resumen

El tamoxifeno es un inhibidor de canales iónicos, el cual debido a sus propiedades puede ser usado como tratamiento adjunto contra el cáncer, ya que bloquea el paso de iones de la membrana celular haciendo que la capacidad de la célula de relacionarse con su entorno disminuya. Esto se puede explicar al plantear la membrana celular como un dieléctrico capacitivo el cual al perder su capacidad de intercambiar iones va disminuyendo su capacitancia e impedancia, haciendo la célula más vulnerable a su entorno. Para poder caracterizar estos cambios en las propiedades eléctricas se hizo uso de la espectroscopia de impedancia eléctrica, una técnica que permite determinar el comportamiento de la membrana celular y sus cambios. En el presente trabajo se busca comparar el efecto de diferentes dosis de tamoxifeno en dos líneas celulares distintas MCF7 (proveniente de tumores de mama humano con receptores de progesterona, estrógeno y glucocorticoides positivos, mencionada en aproximadamente 25.000 publicaciones científicas con el cáncer de seno) y 3T3 (fibroblastos de embrión de ratón blanco albino utilizada por su morfología ideal para establecerla como grupo de control) en sus propiedades eléctricas y en su viabilidad celular. Al aumentar las concentraciones de tamoxifeno la permitividad y conductividad de la membrana celular debido a que se inhibe el flujo de iones. Disminuyendo así su capacitancia y aumentando su impedancia de manera proporcional.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	2
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Cáncer de seno.....	7
1.1.1. Epidemiología mundial y en Colombia.....	7
1.1.2. Carcinogénesis del cáncer de seno.....	8
1.1.3. Tipos de cáncer de seno y tratamientos.....	8
1.1.4 Terapía con tamoxifeno.....	9
1.2 Moduladores de canal iónicos.....	9
1.3 Espectroscopia de impedancia eléctrica	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. General.....	14
2.2. Específicos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Cultivo celular	14
3.1.1. Descongelamiento.....	15
3.1.2. Pase celular.....	15
3.1.3. Cambio de medio.....	15
3.1.4. Congelamiento celular.....	15
3.1.5. Conteo celular	16
3.2. Mediciones en bioimpedancia.....	17
3.3. Ensayos de citotoxicidad	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Espectroscopia de impedancia eléctrica.....	20
4.2. Ensayos de citotoxicidad.....	31
5. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	35
5.1. Recomendaciones	34
5.2 Trabajos Futuros	34
6. CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	38

ANEXOS.....42

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Cifras de incidencia de cáncer en 2020 en todo el mundo, ambos géneros [8].....	8
3.1. Células 3T3 y MCF7 con una confluencia aproximadamente de 60% vistas desde un microscopio invertido con un aumento 10X.....	15
3.2. Histograma obtenido en el contador de células Scepter 3.0.....	16
3.3. Montaje usado para medir la bioimpedancia celular [41].....	18
3.4: Reducción de resazurina a resofurina(fluorescente), posteriormente a dihidroresorfurina (no fluorescente) por acción metabólica de células viables [42].....	18
4.1. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 6 horas medida en oscuridad.....	21
4.2. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 12 horas medida en oscuridad.....	21
4.3. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 24 horas medida en oscuridad.....	22
4.4. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 36 horas medida en oscuridad.....	22
4.5. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 48 horas medida en oscuridad.....	23
4.6. Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX con tiempo de incubación de 72 horas medida en oscuridad.....	23
4.7. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 6h medida en oscuridad.....	36
4.8. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 12h medida en oscuridad.....	36
4.9. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 24h medida en oscuridad.....	37
4.10. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 36h medida en oscuridad.....	37

4.11. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 48h medida en oscuridad.....	38
4.12. Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 72h medida en oscuridad.....	38
4.13. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 6h medida en oscuridad.....	39
4.14. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 12h medida en oscuridad.....	39
4.15. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 24h medida en oscuridad.....	40
4.16. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de h 36h medida en oscuridad.....	40
4.17. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 48h medida en oscuridad.....	41
4.18. Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 72h medida en oscuridad.....	41
4.19. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 6h.....	42
4.20. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 12h.....	42
4.21. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 24h.....	43
4.22. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 36h.....	43
4.23. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 48h.....	43
4.24. Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 72h.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Distintos moduladores de canales iónicos.....	11
3.1. Distribución de los tratamientos en la placa de cultivo I tratadas durante 6,12 y 24 horas de tamoxifeno.....	19
3.2. Distribución de los tratamientos en la placa de cultivo II tratadas durante 36,48 y 72 horas de tamoxifeno.	19

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de seno

1.1.1. Epidemiología mundial y en Colombia

A nivel mundial el cáncer de seno es el más frecuente entre las mujeres afectando al 11,7% de la población mundial. En el año 2020 se diagnosticaron más de 2 millones de casos nuevos a nivel mundial [1,2]. La incidencia mundial de cáncer de seno es de 67,1 casos nuevos por cada 100.000 mujeres, representando la primera causa de muertes por cáncer en mujeres con una tasa de mortalidad de 18,9 muertes por cada 100.000 en mujeres mayores de 15 años [3]. En Colombia fue la causa más común de defunciones en mujeres con una incidencia ajustada de 44,1/100.000 mujeres y mortalidad de 11,9/100.000 [4]. En el periodo comprendido entre 2019 y 2020 para la población femenina colombiana se reportaron 74.863 casos prevalentes, 7.047 casos nuevos y 3.056 fallecimientos [5]. Con estimaciones para que en el 2030 se alcancen los 11 millones de casos a nivel global [6]. Siendo el género un factor de riesgo principal ya que se calcula que la incidencia en hombres es tan solo del 1% de lo observado en mujeres [7].

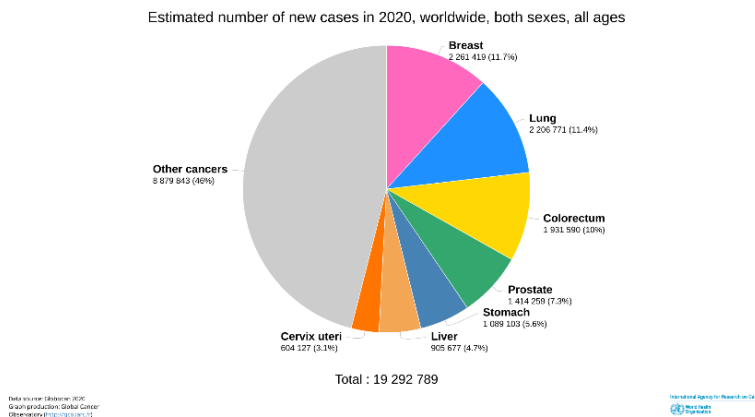


Figura 1.1: Cifras de incidencia de cáncer en 2020 [8].

1.1.2. Carcinogénesis del cáncer de seno

Se define el cáncer como un conjunto de enfermedades en la cual algunas células del cuerpo crecen de manera incontrolable y tienden a esparcirse a otras partes del cuerpo [9], agrupándose en tumores. Esto debido a que se evaden procesos celulares como la apoptosis y aumento de la tasa de división celular; esto puede ocurrir en cualquier célula, tejido u órgano. El cáncer de seno puede ser causado por diversos factores genéticos, en los que destacan las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2;

otros elementos que influyen son los ambientales como un estilo de vida inapropiado y hábitos no saludables (hábito de fumar, consumo de alcohol, etc.) [7].

1.1.3. Tipos de cáncer de seno y tratamientos

Las glándulas mamarias están compuestas en su mayoría por dos tipos de tejidos, glandular y de soporte; la mayoría de los tumores se desarrollan a partir de lesiones fibroquísticas que se transforman en lesiones cancerosas. Estas se clasifican según su ubicación y capacidad de invadir otros tejidos (invasivo y no invasivo). El carcinoma ductal infiltrante y el carcinoma lobular infiltrante son los más comunes [10]. En la actualidad las estrategias con la que se cuenta para el tratamiento son [2]:

- Cirugía: existe dos procedimientos, la cirugía conservadora de mama (BCS por sus siglas en inglés) y la mastectomía. Durante la BCS el tejido tumoral es extraído conservando el tejido mamario sano[11] aunque la mayoría de veces se opta por la mastectomía debido a muchas complicaciones posteriores como la reincidencia, extirpando el seno por completo.
- Quimioterapia: tratamiento basado en fármacos administrados por vía oral o vía intravenosa dependiendo del tipo de tumor. Estos medicamentos pueden ser aplicados antes y después de la cirugía[12]. Aunque tiene numerosos efectos secundarios como lo son sangrados, anemia, pérdida de cabello entre otros síntomas es uno de los tratamientos más efectivos.
- Radioterapia: es el uso de alta dosis de radiación (rayos X o rayos gamma) para destruir células cancerosas y reducir tumores. Empleada para tratar el cáncer de seno de manera local, habitualmente se usa después del tratamiento quirúrgico o de la quimioterapia [2], esto para asegurarse que la probabilidad de que el cáncer reincida sea mínima [13].
- Terapia biológica: Usualmente administrada como terapia neoadyuvante previa a la cirugía o como terapia adyuvante después de la cirugía, mayormente utilizada en pacientes que presentan tumores HER2, ambas contribuyen a disminuir la reincidencia de la enfermedad [1,2].
- Terapia hormonal: Esta terapia consiste en detener o reducir el crecimiento de los tumores que son sensibles a las hormonas [14]; algunos tipos de cáncer de seno son afectados por hormonas como estrógeno y progesterona. Este tratamiento impide que estas hormonas se adhieran a los receptores de estas células. Si las células tumorales contienen receptores de estrógeno, se denomina cáncer receptor de estrógeno positivo (ER positivo por sus siglas en inglés) de igual manera con el cáncer responsivo a la progesterona (PR o PgR positivo). Para referirse a alguno de los dos se les designa como cáncer hormonal responsivo(HR positivo). Se calcula que 67%-80% de mujeres a nivel global con cáncer de seno son ER positivos [15].

1.1.4. Terapia con Tamoxifeno

Uno de los medicamentos más usados en la terapia hormonal es el tamoxifeno, debido a que bloquea receptores de estrógeno, evitando que el estrógeno se conecte con las células cancerosas, por lo que recibe el nombre de modulador selectivo de estrógeno (SERM) [14]. Es usado de diferentes formas como: terapia auxiliar en etapas tempranas del cáncer, estudios mostraron que las mujeres que recibieron terapia auxiliar con tamoxifeno después de haber sido sometidas a cirugía de tumores ER positivo redujeron el riesgo de reincidencia del cáncer, incluyendo cáncer en el otro seno y minimizando la posibilidad de muerte al menos 15 años[16]. El tamoxifeno también es usado para tratar el cáncer de seno metastásico y como terapia experimental para reducir el tamaño de los tumores antes de la cirugía [17].

1.2 Moduladores iónicos

Todas las células eucariotas poseen una membrana que las separa de su medio externo, la cual está compuesta por una doble capa de fosfolípidos con proteínas ubicadas en la periferia o transmembranales. Siendo los lípidos esenciales para garantizar la estructura de esta. Al distribuirse estos en una bicapa, la membrana celular actúa como una interfase dieléctrica y puede considerarse como dos placas de un condensador[18]. Esta tiene como función principal aislar el citoplasma del medio exterior y permitir el paso de iones y moléculas necesarias para la célula, además de contribuir a mantener constantes la temperatura, pH y osmolaridad. Otra función es facilitar la interacción con el medio extracelular [19].

Algunas de las proteínas que integran la membrana celular, forman parte de canales iónicos que tienen diferentes estados conformacionales para permitir el paso selectivo de iones a favor de su gradiente electroquímico. Los cuales se dividen en [20]:

- Estado cerrado o de reposo: El canal no permite el flujo de iones a través de la membrana celular. Esta se encuentra esperando un estímulo para poder activarse.
- Estado abierto: En este estado la membrana se despolariza por la llegada de un estímulo eléctrico: permitiendo la entrada de iones a favor del gradiente electroquímico.
- Estado inactivo: El canal no puede volver a abrirse desde este estado para esto es necesario que pase al estado de reposo.

Estas proteínas están configuradas de forma tal que en el centro disponen de una región hidrofílica que forma el poro del canal. Estos canales iónicos son selectivos y tienen preferencia por un ion en específico (canales de Ca, K, Na o Cl). Estos canales pueden ser clasificados en lo que responden a [20]:

- Estímulos químicos: para ser activado requieren de un ligando extracelular o intracelular. Como los canales de acetilcolina (ACh), L-glutamato (L-Glu), glicina (Gly), etc.
- Estímulos físicos: como voltaje, temperatura, presión, entre otras.
- Polimodales: aquellos que pueden ser activados por distintos estímulos químicos y físicos

Existen fármacos que modulan la actividad de estos canales ejerciendo una acción activadora o inhibidora, causando distintos efectos como prevenir la excitación (anestésicos locales como la Lidocaína), regular la excitabilidad (antiarrítmicos como Propafenona) o prevenir la sobreexcitación del canal (antiepilépticos como la lacosamide y antiespasmódicos como escopolamina) [20]. En el campo de la medicina se han utilizado inhibidores en proyectos de investigación en cáncer con distintos fines como se muestra a continuación:

- Fenitoína para inhibir los canales NaV1.5 (expresados en líneas celulares de cáncer de seno), propiciando la expansión de este para reducir la metástasis, reduciendo la migración e invasión de las células tumores a otros tejidos [21].
- Tamoxifeno para suprimir metástasis tumoral, por inhibición del canal Cl [22].
- Bacopasida II, que actúa sobre el canal acuaporina-1(AQP1) el cual no solo transporta agua sino otros iones y moléculas de las células tumorales de colon[23].

En la tabla 1.1 presentan algunos moduladores iónicos que han sido usados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, identificando el modulador, el tipo y el canal.

Tabla 1.1 Distintos moduladores de canales iónicos

Fármaco	Tipo de modulador	Canal afectado	Usado en
Tamoxifeno	Inhibidor	ClC-5, BK, K+	Mastocitos pulmonares Cáncer de seno[24]–[26]
Fenitoína	Inhibidor	Na _v 1.5	Metástasis cáncer de seno[21,27]
NS-1643	Activador	K _v 11.1	Cáncer de seno [28]
Bufadienólidos (bufalina)	Activador	ClC-3, Cl ⁻	Carcinoma nasofaríngeo Carcinoma hepatocelular [29]
Capsaicina	Activador	Ca	Cáncer de seno [30]

1.3. Espectroscopia de Impedancia Eléctrica

La espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS) es una técnica que permite la caracterización de las propiedades eléctricas de distintos materiales. Usada para estudiar la dinámica de las cargas eléctricas tanto fijas como móviles en un material sólido o líquido. Esta técnica consiste en colocar dos electrodos o celdas en contacto con el material a medir, suministrando un estímulo eléctrico (corriente o voltaje) a la muestra por medio de los electrodos observando la respuesta obtenida [31].

Para analizar la impedancia se parte de que todos los componentes se comportan dependiendo la frecuencia ya que esta se entiende como la capacidad de un circuito para resistir el flujo de una corriente eléctrica a través del tiempo. En la EIS se suministra un voltaje ($V(t)$) con una pequeña amplitud V_a a una frecuencia conocida (f) en Hz como en la ecuación 1. De la misma manera la corriente tiene la misma forma del voltaje de entrada, aunque esta depende de las características del material ya que varía según las impedancias presentes (resistencias, capacitancias e inductancias) causando un desfase φ en la corriente de salida como se expresa en la ecuación 2 [31].

$$V(t) = V_a \sin(2\pi ft) = V_a \sin(\omega t) \quad (1)$$

$$I(t) = I_a \sin(\omega t + \varphi) \quad (2)$$

Teniendo en cuenta esto la impedancia se puede expresar como la relación entre el voltaje y la corriente a través del tiempo como se muestra en la ecuación 3:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = Z_a \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (3)$$

Al usar la relación de Euler el voltaje, la corriente, la impedancia y el desfase se puede representar como se evidencia en las ecuaciones 4 a 7:

$$V(t) = V_a e^{j\omega t} \quad (4)$$

$$I(t) = I_a e^{j\omega t - j\varphi} \quad (5)$$

$$Z = R + jX \quad (6)$$

$$\varphi = \tan^{-1}\left(\frac{X}{R}\right) \quad (7)$$

Para poder realizar el análisis de la impedancia eléctrica es necesario usar diagramas de Bode y de Nyquist. El primero representa gráficamente funciones complejas dependientes de una variable real, como en este caso es la frecuencia. Siendo dos

gráficas donde en una se expresa la magnitud en función de la frecuencia y en la otra se expresa la fase o el ángulo en función de la frecuencia. Usualmente el eje de la frecuencia está en una escala logarítmica para poder verificar el comportamiento en cierto rango de frecuencias, expresando la magnitud de la función en decibeles como se muestra en la ecuación 8:

$$dB = 20 \log(|Z|) \quad (8)$$

Los diagramas de Nyquist son representaciones paramétricas de las funciones, donde se gráfica la parte real y la parte imaginaria de una función, en el eje x y en el eje y respectivamente[31]. También se pueden analizar y representar de manera gráfica los datos haciendo uso de la transconductancia, la cual se entiende como la relación entre los cambios de corriente en la salida, ocasionados por cambios de corriente en la entrada[32].

La EIS también puede ser usada para caracterizar células y tejidos biológicos, esta caracterización es conocida como bioimpedancia. Esto es posible debido a que las propiedades eléctricas de los tejidos varían según su estructura y función. Esta técnica es usada tanto en medicina como en biología debido a su bajo costo, su portabilidad y facilidad de uso [33]. La conducción eléctrica en estos tejidos es debida a los iones que se mueven a través de la membrana celular, la cual posee valores de resistencia y capacitancia debido a que es una bicapa lipídica con canales iónicos. Estas propiedades varían según la frecuencia en que se encuentren, razón la cual se analizan mediante un barrido de frecuencias [34].

A lo largo del tiempo se han logrado avances en el diagnóstico del cáncer de mama por medio de la EIS, los primeros en innovar con esta técnica fueron Fricke y Morse estableciendo que la capacitancia de los tejidos disminuye con la edad [35]. Avanzado estos estudios cada vez más hasta llegar a la conclusión de que los tejidos sanos poseen mayor impedancia que los tejidos cancerosos, esto causado a la alteración del contenido de sales y agua al interior de las células, cambios en la permeabilidad de la membrana y cambios en la densidad de las células [36].

2. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar el efecto de un modulador de canales iónico sobre la permitividad y conductividad en las líneas celulares de cáncer de seno MCF7 y en fibroblastos 3T3.

2.2. Específicos

1. Utilizar un sensor para determinar mediante espectroscopia de impedancia eléctrica características eléctricas en las líneas celulares MCF7 y 3T3.
2. Incubar las líneas celulares MCF7 y 3T3 en presencia de diferentes dosis de un modulador de canal iónico.
3. Contrastar el efecto del tamoxifeno como modulador de canal iónico sobre las características físicas basadas en impedancia y la viabilidad de las líneas celulares MCF7 y 3T3.

3. Materiales y métodos

Para llevar a cabo el desarrollo del proyecto, se mantuvo en cultivo las líneas celulares MCF7 y 3T3 en cultivo durante 4 meses aproximadamente. Los primeros meses se trabajó en la estandarización de los protocolos que fueron utilizados para realizar las mediciones respectivas.

Se realizaron dos ensayos con las células, las cuales fueron incubadas con tamoxifeno a distintas concentraciones. El primero consistió en tomar medidas de bioimpedancia en diferentes intervalos de tiempo. En el segundo ensayo se determinó el porcentaje de viabilidad celular de las dos líneas celulares al ser expuestas a una concentración de resazurina 4.4 μM y a diferentes tiempos de incubación.

Los detalles de los procesos y protocolos utilizados para el cultivo celular, las mediciones de bioimpedancia y los ensayos de citotoxicidad se presentan a continuación.

3.1 Cultivo celular

En este proyecto se utilizaron 2 líneas celulares distintas: MCF7 y 3T3. La primera proviene de tumores de mama humano con receptores de progesterona, estrógeno y glucocorticoides positivos. Esta línea es comúnmente usada en *estudios in vitro* y está mencionada en aproximadamente 25.000 publicaciones científicas relacionadas con el estudio del cáncer de seno [37]. Mientras que la línea celular 3T3 obtenida a partir de fibroblastos de embrión de ratón blanco albino (*Mus musculus*) es utilizada por su morfología de células adherentes lo que facilita su proliferación y por ende su cultivo, establecerla como un grupo de control [38].

Para el cultivo de ambas líneas celulares se utilizó el medio cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés) con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos. También se hizo uso de frascos de cultivo de 25 cm^3 y 75 cm^3 . Para garantizar las condiciones óptimas para que las células sobrevivieran se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 .

Los montajes del experimento se realizaron teniendo en cuenta el nivel de confluencia de las células, entendiéndose esto como el porcentaje del área de la superficie cubierta por células en el frasco de cultivo. Para evaluar este porcentaje de confluencia, se observaron a diario las células mediante el microscopio invertido como se ve en la figura 3.1 donde se observa las células 3T3 con un porcentaje de confluencia de aproximadamente 80% y las células MCF7 con un 60%.

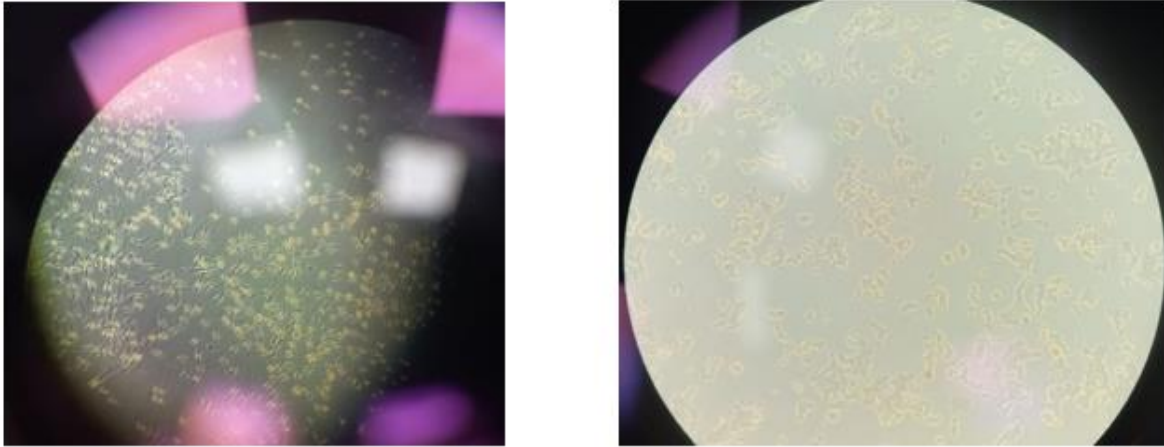


Figura 3.1: Células 3T3 y MCF7 con una confluencia aproximadamente de 60% vistas desde un microscopio invertido con un aumento 10X.

A continuación, se describirá en detalle cada uno de los procedimientos realizados en el cultivo celular.

3.1.1 Descongelamiento

Este proceso se realizó cuando el número de células que se tenía en cultivo era escaso y se necesitaba un gran número para iniciar alguno de los experimentos. También se descongelaron células porque en un momento las células no proliferaron de forma continua, entonces se descongelaron células de pases anteriores. En el anexo 2 se consigna el protocolo utilizado.

3.1.2 Pase celular

Cuando los frascos de cultivo alcanzaban un nivel de confluencia aproximadamente de 80%-100% se realizó este procedimiento para despegar las células del frasco ya sea para utilizarlas en un experimento o cambiarlas a un nuevo frasco. El proceso se muestra detalladamente en el anexo 1.

3.1.3 Cambio de medio

Se realizó el cambio de medio dependiendo del estado de este, ya que si cambiaba de color, era un indicador de que el medio estaba perdiendo nutrientes y propiedades o si tenía un porcentaje de confluencia aproximadamente del 40% al 60%. En el anexo 3 se encuentra el procedimiento utilizado.

3.1.4. Congelamiento celular

Al tener una gran cantidad de células, estas se pueden almacenar congelándolas. Este proceso también es conocido como crio-preservación, las células son llevadas a

bajas temperaturas para disminuir la actividad biológica incluyendo las reacciones bioquímicas que producen la muerte celular.

Las células se congelan en una solución de medio completo (DMEM con suero fetal bovino) con dimetilsulfóxido (DMSO) este último usado para que no se formen cristales de agua que dañen las células, para posteriormente almacenarlas a bajas temperaturas (-180°C). En el anexo 4 se observa el protocolo seguido.

3.1.5. Conteo celular

Para desarrollar los experimentos era necesario tener un número aproximado de células, usualmente para poder contar células se usa la cámara de Neubauer, una herramienta que permite identificar el número de células viables por medio de una tinción con azul tripán. Este al ser un método de conteo que depende mucho del ojo humano, está sujeto a tener un porcentaje de error, lo cual afectaría los resultados de manera significativa; para solucionar esto se utiliza el equipo Scepter 3.0, un equipo contador de células que permite contar células de una forma más precisa [40]. A continuación se describirá el procedimiento que se realizó.

Para realizar el conteo se utilizó el equipo con sus sensores de 40 μm para poder contar el número de células y la densidad celular de la muestra a medir. En la figura 3.2 se observa el histograma que genera el equipo junto a la densidad celular.

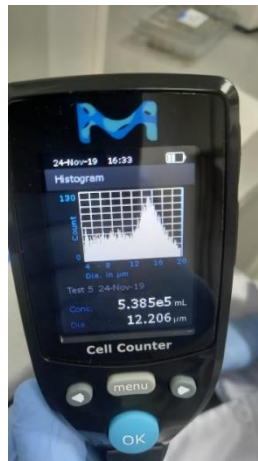


Figura 3.2: Ejemplo de histograma obtenido al usar el contador de células Scepter 3.0.

3.2 Mediciones de bioimpedancia

Para poder tomar las mediciones de bioimpedancia, se prepararon soluciones de ambas líneas celulares (MCF7 y 3T3) expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifeno (10nM, 20nM, 30nM, 40nM y 50nM). Se realizó un montaje usando una placa de 96 pozos, electrodos monopolares de electromiografía DTM-1.50SAF y unas piezas impresas diseñadas a medida para poder garantizar que las mediciones estén aisladas y que puedan ser repetibles y confiables. Al tener el montaje ya ensamblado y con la muestra, se procede a conectar al equipo Keysight E4980AL-LCR; este a su vez este comunicado vía USB a un equipo con software LabVIEW que permite llevar el registro de las medidas tomadas como se puede observar en la figura 3.3.

Para preparar las diferentes concentraciones de tamoxifeno (TMX) para los experimentos se preparó una solución stock de citrato de tamoxifeno en agua destilada a una concentración 100 μ M y a partir de esta solución se prepararon las diferentes concentraciones: 10nM, 20nM, 30nM, 40nM, 50nM. Para garantizar la correcta homogenización de la solución, se resuspendió cada vez que se hacía la disolución a partir de la solución stock.

Posteriormente se prepara cada muestra con DMEM. Seguido a esto las muestras se depositaron en una incubadora shaker que proporcionaba una temperatura de 37°C y un movimiento constante. Todo esto para mantener a las células en condiciones adecuadas y evitar que se decanten y se adhieran a las paredes del frasco. Las muestras fueron incubadas a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 horas; esto para poder mirar el comportamiento del tamoxifeno en las células en distintas concentraciones a través del tiempo.

El equipo Keysight E4980AL-LCR fue configurado para realizar un barrido de frecuencias desde 2 Hz hasta 1MHz con una señal de 0.1V AC; excitando las muestras para tomar datos de impedancia(Z), ángulo de fase (Θ) y los valores en paralelo de capacitancia (Cp) y resistencia (Rp). Para garantizar unas medidas repetibles y fiables se siguieron los siguientes pasos:

1. Los electrodos y las piezas impresas deben ser esterilizados entre cada medición para evitar que cualquier partícula externa introduzca variaciones a las impedancias y capacitancias de cada medida; para esto es necesario limpiar detalladamente las piezas y los electrodos con alcohol isopropílico seguido de etanol, posteriormente se seca con una toalla de papel.
2. Antes de empezar a tomar las mediciones es necesario calibrar el equipo para suprimir la impedancia de las conexiones y los cables. Para esto se toma dos calibraciones en circuito abierto y en circuito cerrado respectivamente, todo esto para poder tener ceros confiables en las mediciones. Para cerciorarse de esto se referencia con la medida de un capacitor cerámico cualquiera.
3. Para tomar las mediciones de bioimpedancia fueron tomadas dos mediciones Zth (ángulo de fase) y Cp-Rp (capacitancia y resistencia en paralelo) en oscuridad.
4. Se repiten los pasos anteriores con cada muestra.



Figura 3.3: Equipo Keysight E4980AL-PCR conectado via USB a un ordenador con un software que permite registrar las mediciones [41].

Posterior a cada medición el software exportó los datos obtenidos en un formato html, cada archivo posee la frecuencia, la impedancia ($CpRp$) y el ángulo de fase (Z_{th}) para que posteriormente se pueda realizar el respectivo análisis de las propiedades eléctricas de las células trabajadas. Este proceso se puede observar detalladamente en el anexo 5.

3.3 Ensayos de citotoxicidad

Para poder evaluar el efecto que tienen el tamoxifeno sobre las líneas celulares trabajadas se realizaron ensayos de citotoxicidad. En este caso se usó el método de resazurina, un método sencillo, no tóxico y útil para monitorear no solo citotoxicidad sino también proliferación celular, demasiado útil para aplicar a ensayos in vitro gracias a su homogeneidad. Al encubarse la resazurina con las células en el medio de cultivo se reduce a resorufina y posteriormente a dihidroresorufina, cambiando su color de un azul no fluorescente a un rosa fluorescente, para posteriormente tornarse incoloro y no fluorescente; causado por el oxígeno consumido en el metabolismo celular, siendo estos cambios de color asociados con la mitocondria de células viables. Midiéndose la citotoxicidad por la diferencia de valores de fluorescencia entre las células tratadas con respecto a las no tratadas o el porcentaje de supervivencia celular. [42].

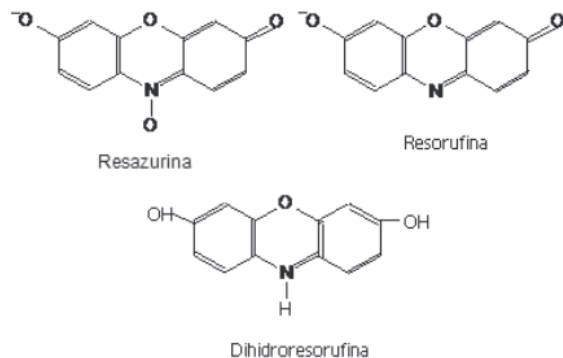


Figura 3.4: Reduccion de resazurina a resofurina(fluorescente), posteriormente a dihidrorosorufina (no fluorescente) por acción metabólica de células viables[42]

Para realizar estos ensayos se usaron 4 microplacas de 96 pozos; distribuidas entre las dos líneas celulares MCF7 y 3T3 respectivamente. Se colocaron 15.000 células por pozo en medio de cultivo, luego se agregaron las soluciones a diferentes concentraciones de tamoxifeno, descartando el medio y añadiendo resazurin 4, 4µM. Incubandolo a tiempos de 4, 6, 24 y 48 horas. Como se muestra en las tablas 3.1 y 3.2 se configuraron las microplacas para que estuvieran de acuerdo con el tiempo de medición donde se encuentra las diferentes concentraciones y el control celular (CS) .

Tabla 3.1: Distribución de los tratamientos en la placa de cultivo I tratadas durante 6,12 y 24 horas de tamoxifeno.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1
A											
B	CS	20	40		CS	20	40	CS	20	40	
		nM	nM			nM	nM		nM	nM	
C	CS	20	40		CS	20	40	CS	20	40	
		nM	nM			nM	nM		nM	nM	
D	CS	20	40		CS	20	40	CS	20	40	
		nM	nM			nM	nM		nM	nM	
E	10	30	50		10 nM	30	50	10	30	50	
	nM	nM	nM			nM	nM	nM	nM	nM	
F	10	30	50		10 nM	30	50	10	30	50	
	nM	nM	nM			nM	nM	nM	nM	nM	
G	10	30	50		10 nM	30	50	10	30	50	
	nM	nM	nM			nM	nM	nM	nM	nM	
H											
	6H			12H			24H				

Tabla 3.2: Distribución de los tratamientos en la placa de cultivo II tratadas durante 36,48 y 72 horas de tamoxifeno.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	
A												
B		CS	20 nM	40 nM		CS	20 nM	40 nM	CS	20 nM	40 nM	
C		CS	20 nM	40 nM		CS	20 nM	40 nM	CS	20 nM	40 nM	
D		CS	20 nM	40 nM		CS	20 nM	40 nM	CS	20 nM	40 nM	
E		10 nM	30 nM	50 nM		10 nM	30 nM	50 nM	10 nM	30 nM	50 nM	
F		10 nM	30 nM	50 nM		10 nM	30 nM	50 nM	10 nM	30 nM	50 nM	
G		10 nM	30 nM	50 nM		10 nM	30 nM	50 nM	10 nM	30 nM	50 nM	
H			36H				48H				72H	

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al incubar las líneas celulares MCF7 y 3T3 con tamoxifeno, para poder caracterizar sus propiedades eléctricas por medio de diagramas de bode, diagramas de Nyquist y curvas de transconductividad comparando las diferentes dosis en distintos tiempos de incubación, cabe destacar que no se muestran diagramas de la línea celular MCF7 ya que al momento de tomar las mediciones se comprometieron los datos; por último, se presentan la evaluación de los ensayos de citotoxicidad usando el método de resazurina.

4.1. Espectroscopia de impedancia eléctrica

Se tomaron mediciones en oscuro para poder observar el comportamiento de las células 3T3 según su tiempo de incubación con el tamoxifeno (TMX), como se puede ver en las figuras 4.1-4.6. El barrido de frecuencias aplicado abarca tres relajaciones α , β y γ

caracterizando una frecuencia de relajación central F en la cual varía la permitividad y resistividad de los tejidos biológicos[18]. En las figuras 4.1-4.6 se puede apreciar el comportamiento esperado de un circuito capacitivo, donde al incrementarse la frecuencia también se incrementa la corriente, con este aumento de corriente la impedancia y disminuyen al aumentarse la concentración de tamoxifeno también se decrecienta esto debido a que el tamoxifeno al ser un inhibidor de canal iónico bloquea el paso de iones, por esto se aprecia que el control celular tiene una impedancia mayor a la de las diferentes concentraciones en la mayoría de los casos como se observa en las figuras 4.1-4.3.

Por otra parte, se puede apreciar que en la fase de los sistemas no se comportan como capacitor puro. De ser el caso el ángulo de fase de las impedancias se comportaría estable en -90° independientemente de la frecuencia. Esto nos permite deducir que no hay un comportamiento de dieléctrico perfecto debido a que el electrolito (células) permite el flujo de cargas de un electrodo a otro. De este modo se interpreta que la variación en la impedancia afecta la capacitancia del medio. Se aprecia que entre menor sea la concentración de tamoxifeno se aprecia menos este efecto debido a que al no permitir el paso de iones por la membrana celular esto afecta su impedancia y su capacitancia.

Mientras que en las figuras 4.2 y 4.3 se muestra un comportamiento esperado en el cual la fase se hace menos negativa es decir que la capacitancia disminuye siendo proporcional a las concentraciones de TMX. En la figura 4.1 se aprecia que a concentración de TMX 10nM tiene un comportamiento logarítmico esto debido a que al exportar los datos en formato HTML algunas veces se altera la escala por lo cual es necesario traerlo a una escala más conveniente, este comportamiento también se puede apreciar en la figura 4.4.

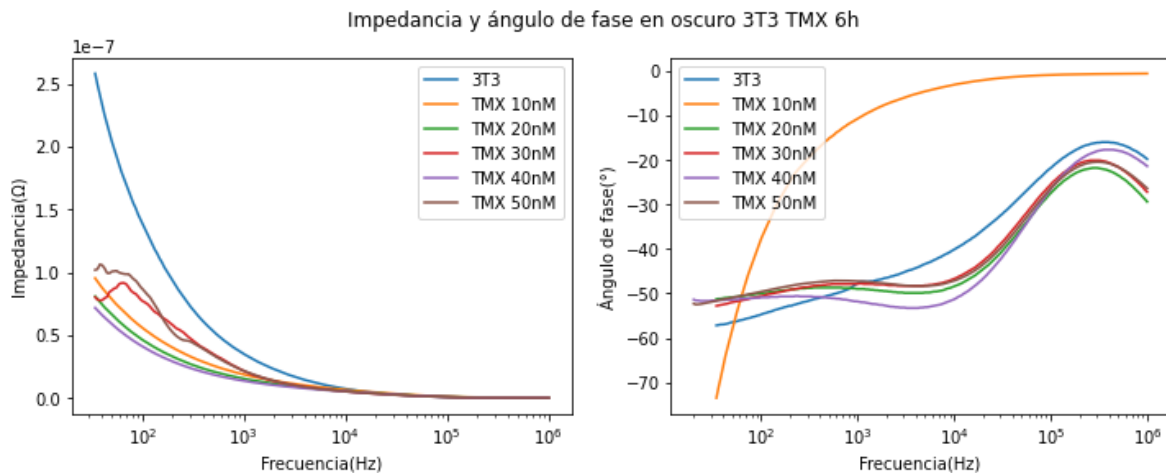


Figura 4.1: Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de TMX con tiempo de incubación de 6 horas medida en oscuridad.

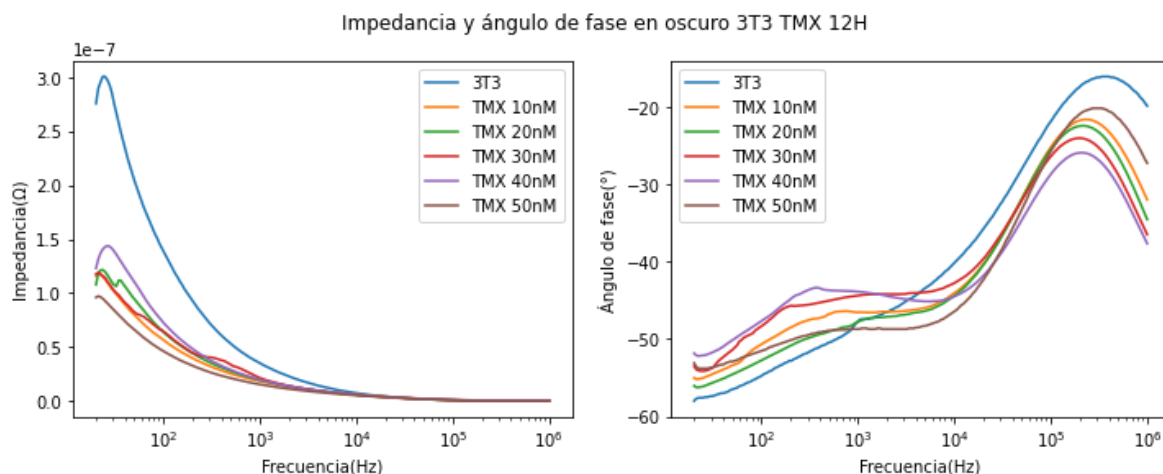
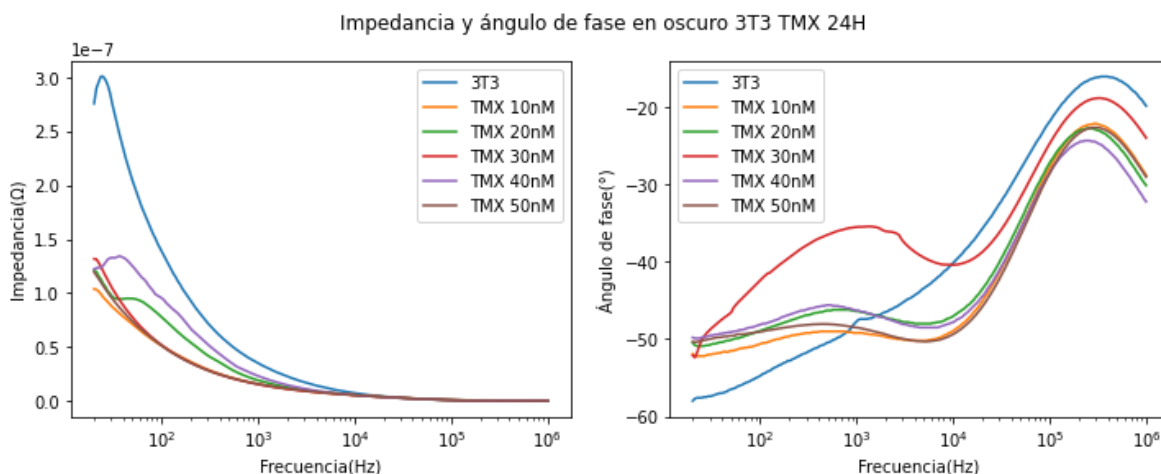


Figura 4.2 Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de



TMX con tiempo de incubación de 12 horas medida en oscuridad.

Figura 4.3: Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de TMX con tiempo de incubación de 24 horas medidas en oscuridad.

Al aumentarse los tiempos de incubación se observa como los comportamientos de la impedancia tienden a comportarse cada vez más logarítmica decreciente como se aprecia en las gráficas 4.4-4.6. En las mismas graficas se aprecia como cada vez la variación en la capacitancia es menor, aunque varían dependiendo en función del tiempo de incubación. Respecto a la línea celular MCF7 se observa su comportamiento en el anexo 6. Donde se aprecia que todos los resultados dieron igual ya que las mediciones fueron mal tomadas.

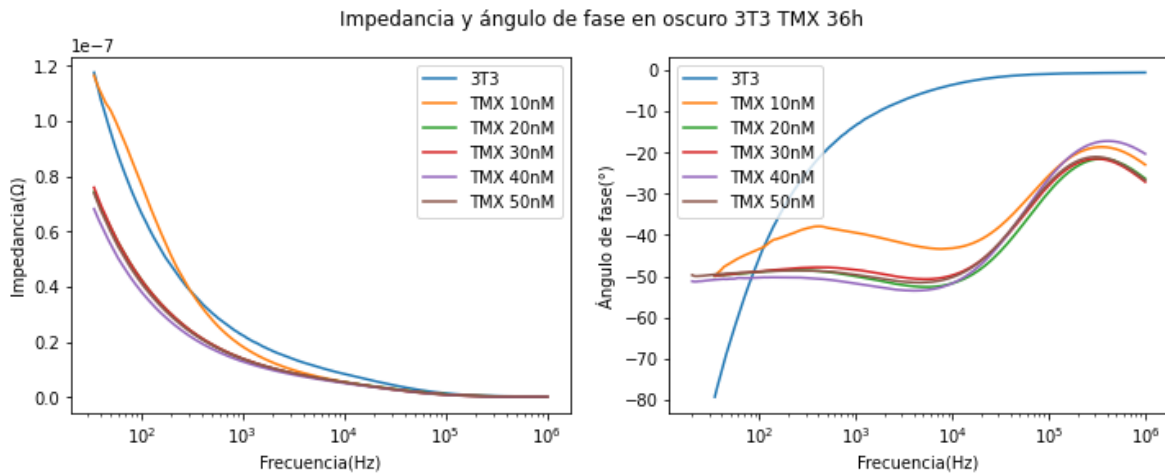


Figura 4.4: Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de TMX con tiempo de incubación de 36 horas medida en oscuridad

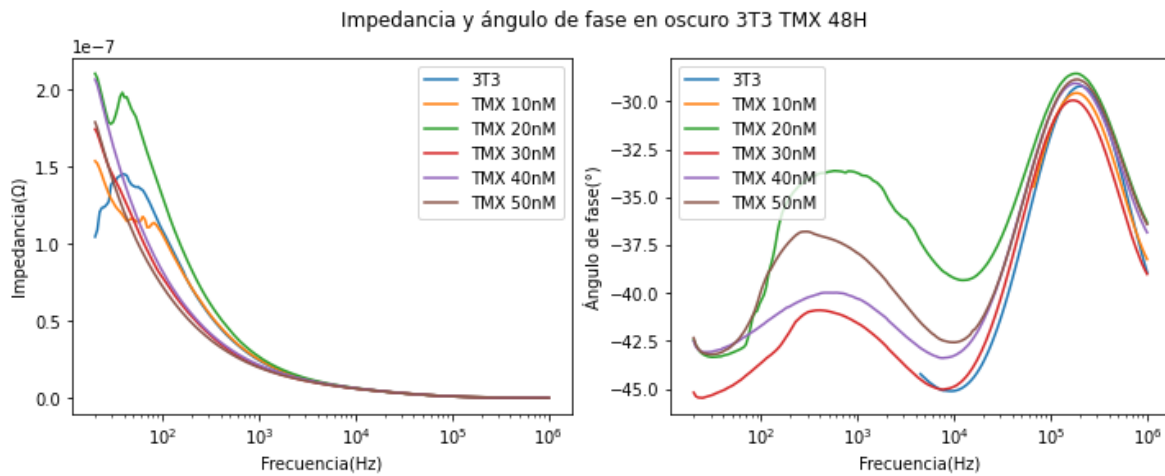


Figura 4.5: Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de TMX con tiempo de incubación de 48 horas medida en oscuridad.

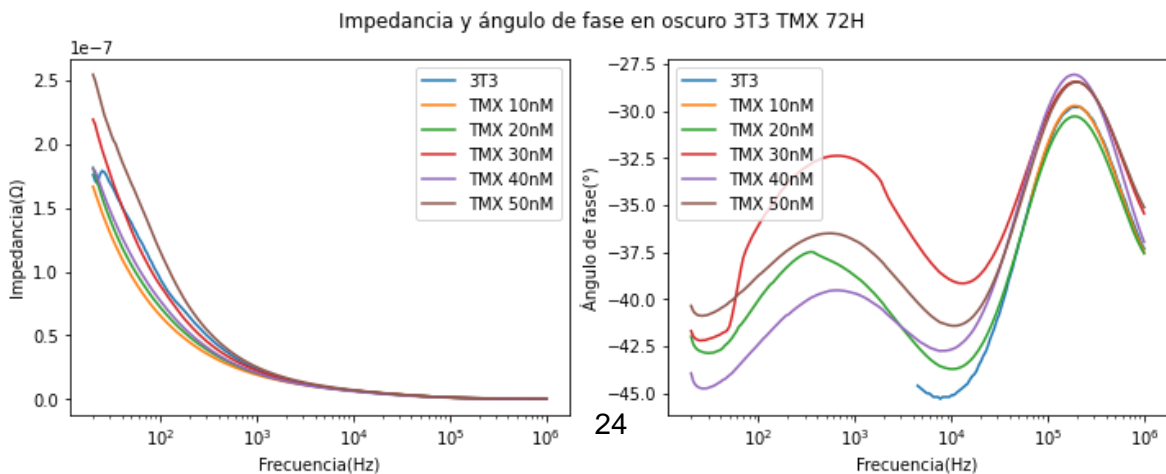


Figura 4.6: Diagrama de Bode de la línea celular 3T3 en función de la concentración de TMX con tiempo de incubación de 72 horas medida en oscuridad.

Para observar el comportamiento de las células se utilizan las curvas de Nyquist. Las cuales muestran el comportamiento paramétrico de la impedancia (parte real) contra la capacitancia (parte imaginaria), en las figuras 4.7-4.12 se puede apreciar que a distintas concentraciones en diferentes tiempos se presenta un comportamiento casi lineal difiriendo de un capacitor ideal; también se puede apreciar que a medida que aumenta la concentración de tamoxifeno y el tiempo de incubación las curvas se vuelven cada vez más lineales esto debido a que la membrana celular va perdiendo su capacitancia porque esta es modulada por transferencia de carga y sus poros se encuentra bloqueados por el tamoxifeno. En el anexo 7 se observa el comportamiento de la línea celular MCF7 la cual no se encuentra reportada en este capítulo debido a que, al tomar las mediciones, el equipo presentó fallo, generando como resultado graficas con ruido.

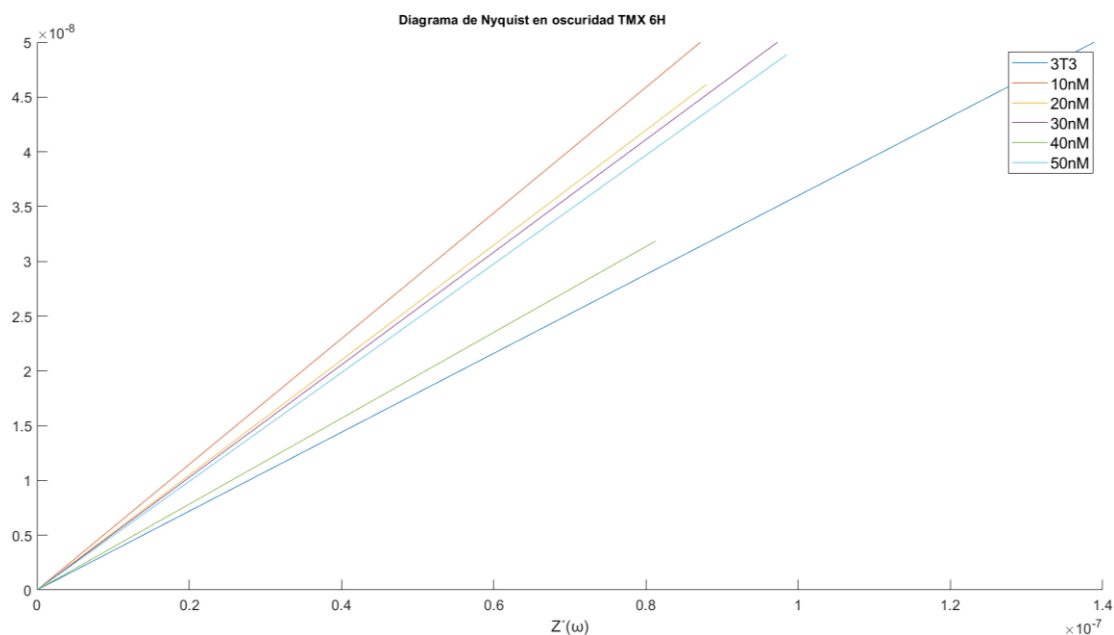


Figura 4.7 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 6h medida en oscuridad

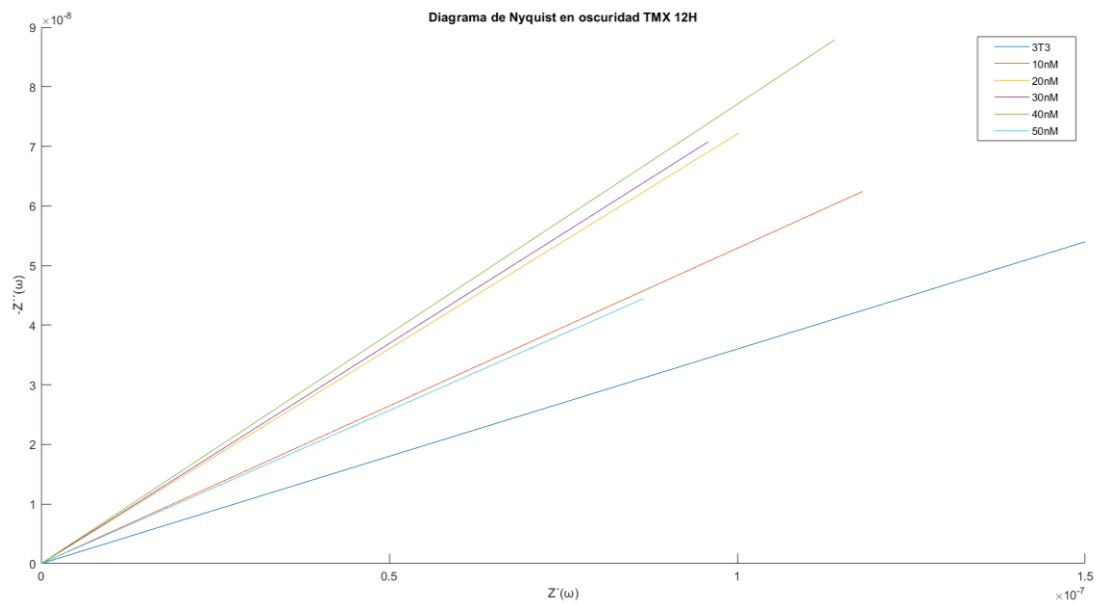


Figura 4.8 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 12h medida en oscuridad.

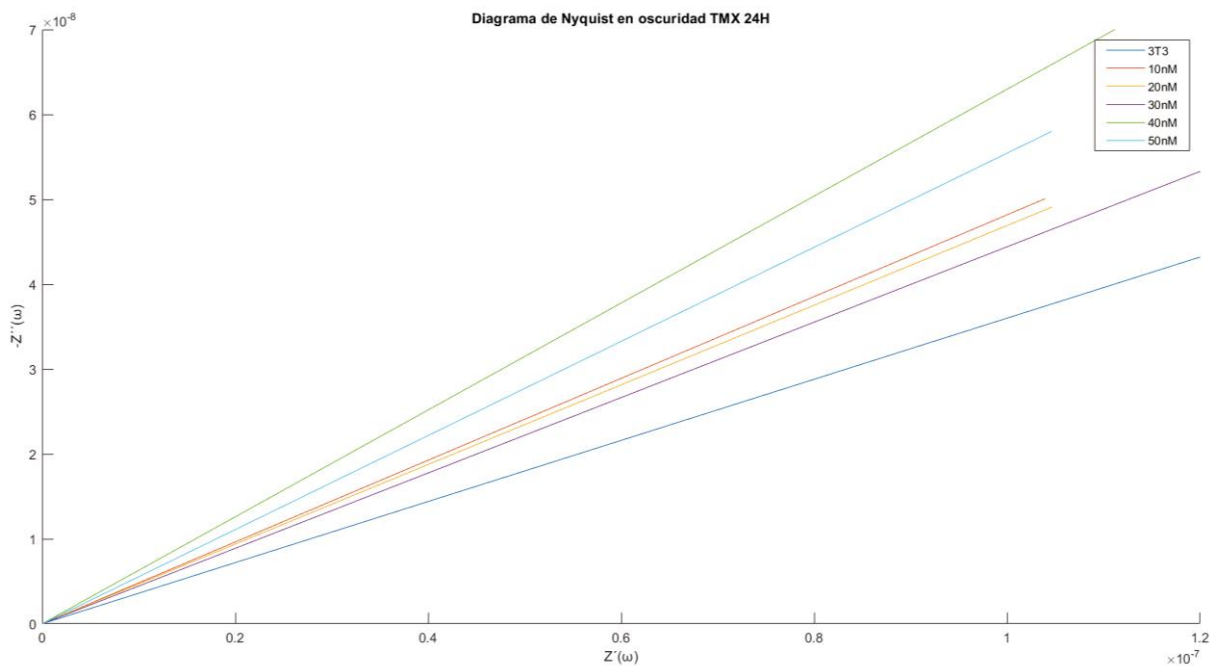


Figura 4.9 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 24h medida en oscuridad.

En las figuras 4.10-4.12 se aprecia como al aumentar los tiempos de incubación las pendientes de las rectas tienden a hacerse más pronunciadas y positivas, lo cual puede ser un indicativo de que al pasar mayor tiempo en presencia del tamoxifeno se hace

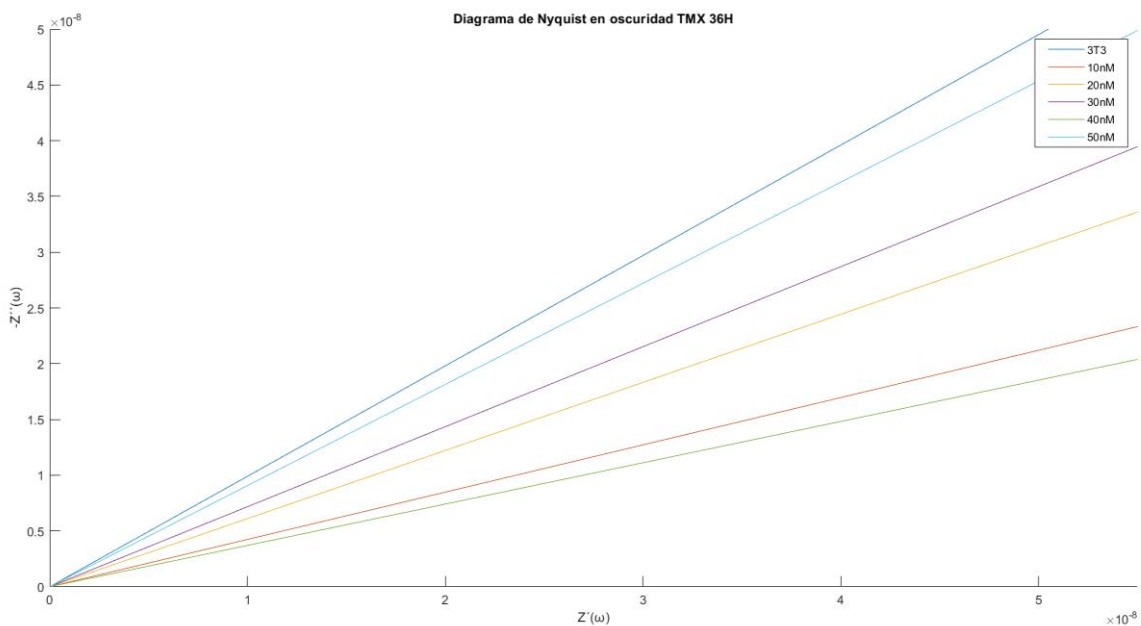


Figura 4.10 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 36h medida en oscuridad

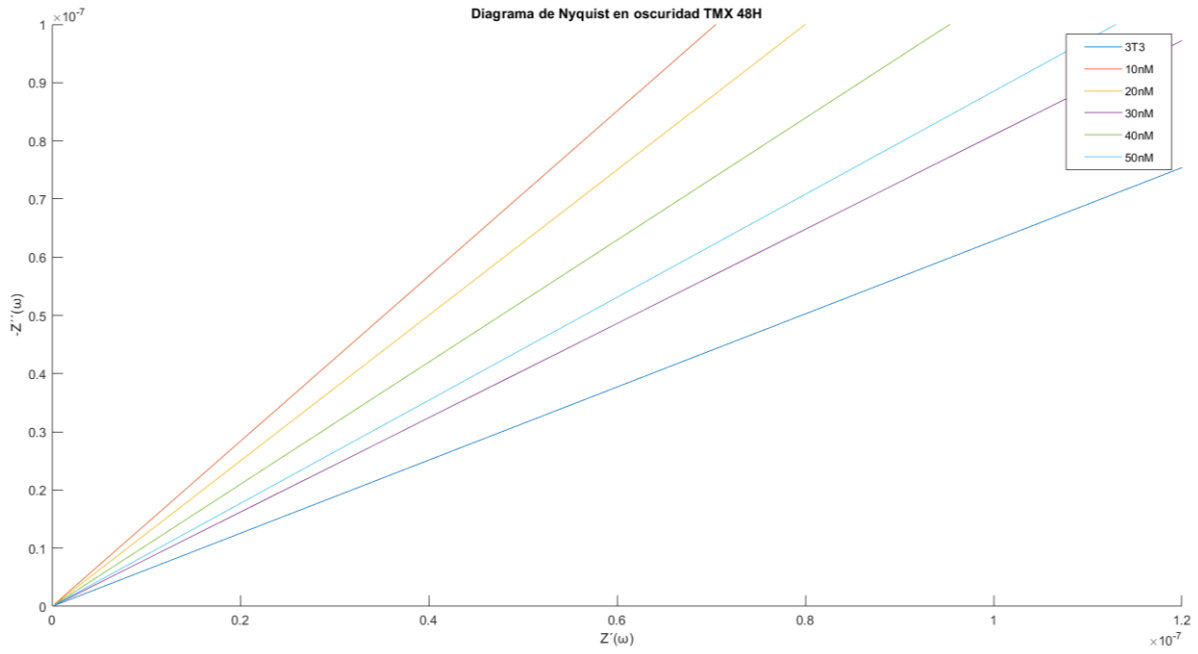


Figura 4.11 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 48h medida en oscuridad.

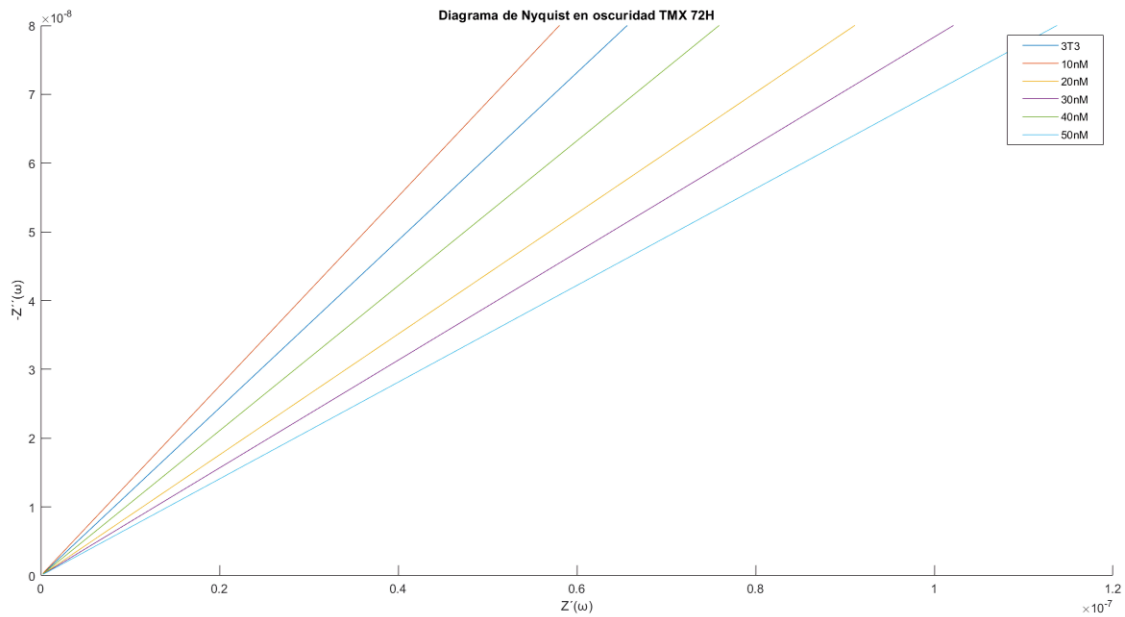


Figura 4.12 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 72h medida en oscuridad.

Para poder evidenciar cambios drásticos entre las diferentes concentraciones de tamoxifeno se hizo uso de las curvas de transconductancia o susceptibilidad eléctrica que nos permite relacionar la corriente de salida y los cambios de voltaje en la entrada. Donde se puede apreciar que también al aumentar las concentraciones de tamoxifeno y el tiempo de incubación esta relación disminuye como se muestra en las figuras 4.13-4.18 al punto que los máximos locales se van perdiendo como se ve en las figuras 4.17-4.18. La transconductancia se entiende como el recíproco de la impedancia, esto muestra que los datos fueron tomados de manera adecuada ya que, al aumentarse las frecuencias de barrido, la transconductancia también crece.

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 6H

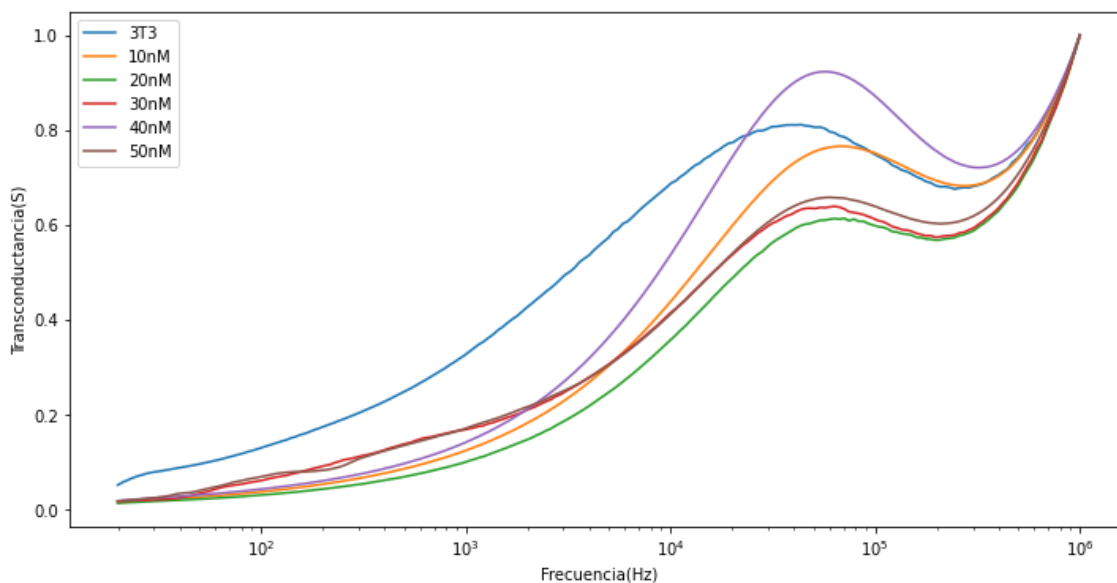


Figura 4.13 Transconductancia de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 6h medida en oscuridad.

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 12H

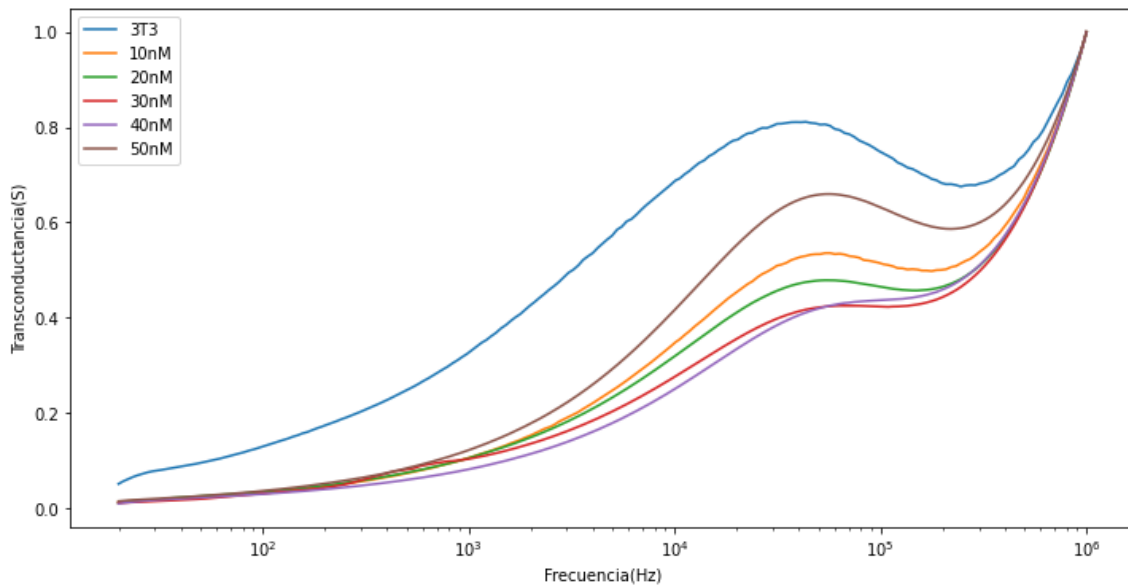


Figura 4.14 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 12h medida en oscuridad.

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 24H

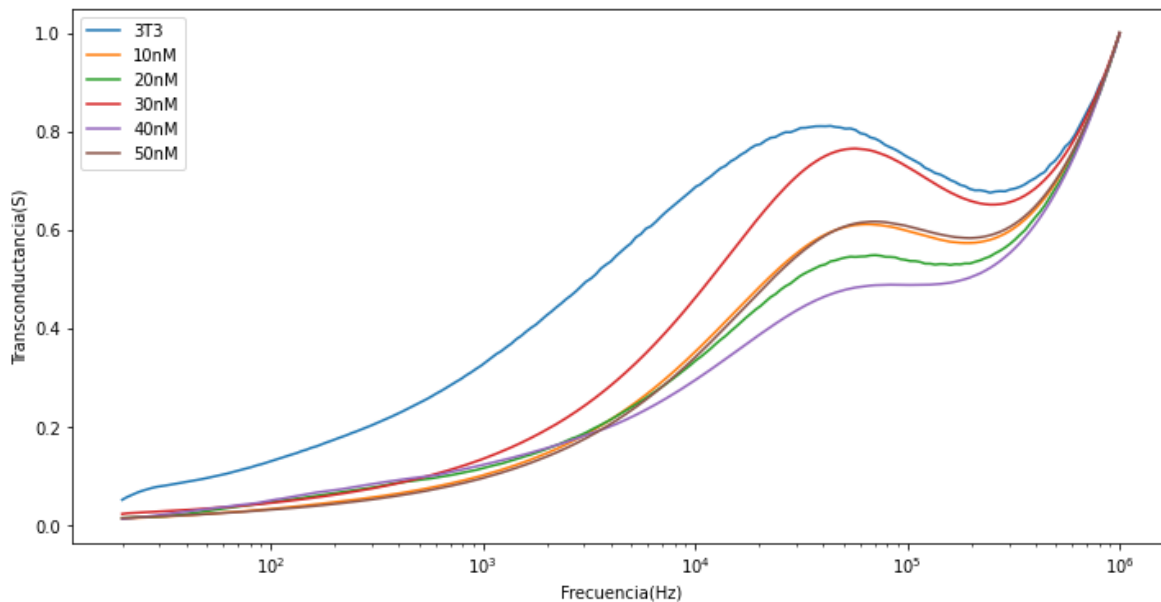


Figura 4.15 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 24h medida en oscuridad.

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 36H

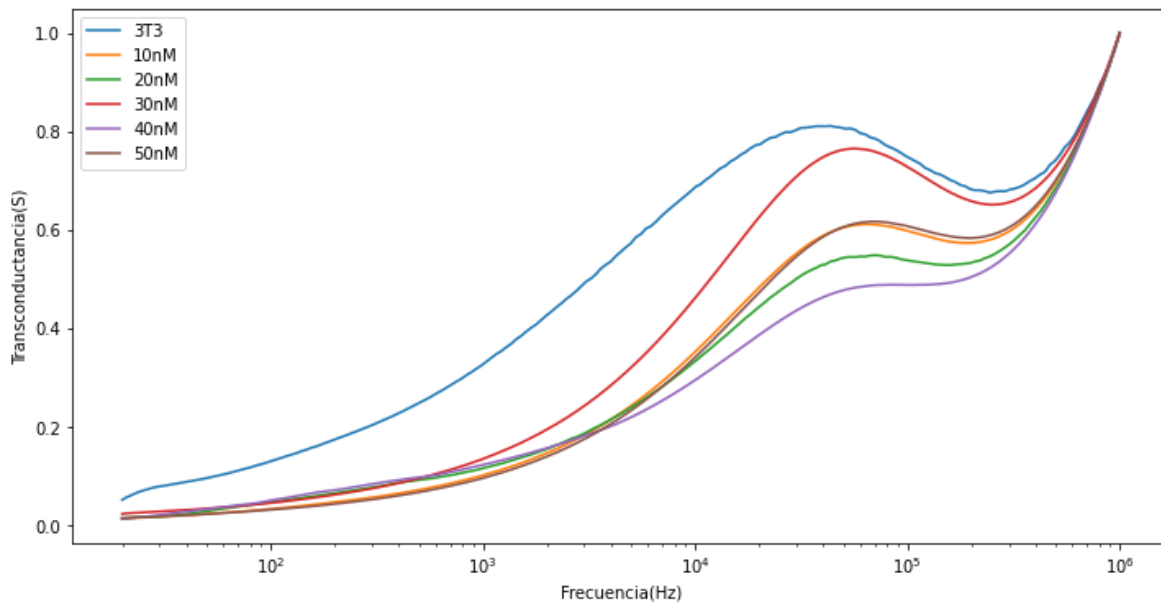


Figura 4.16 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 36h medida en oscuridad

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 48H

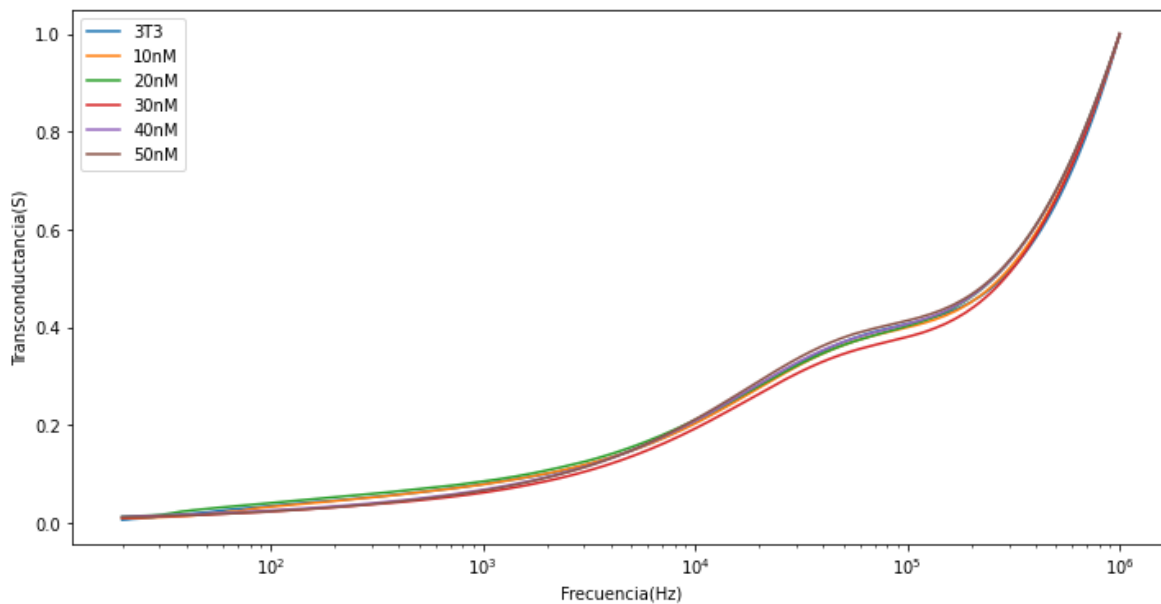


Figura 4.17 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 48h medida en oscuridad.

Transconductancia en oscuro 3T3 TMX 72H

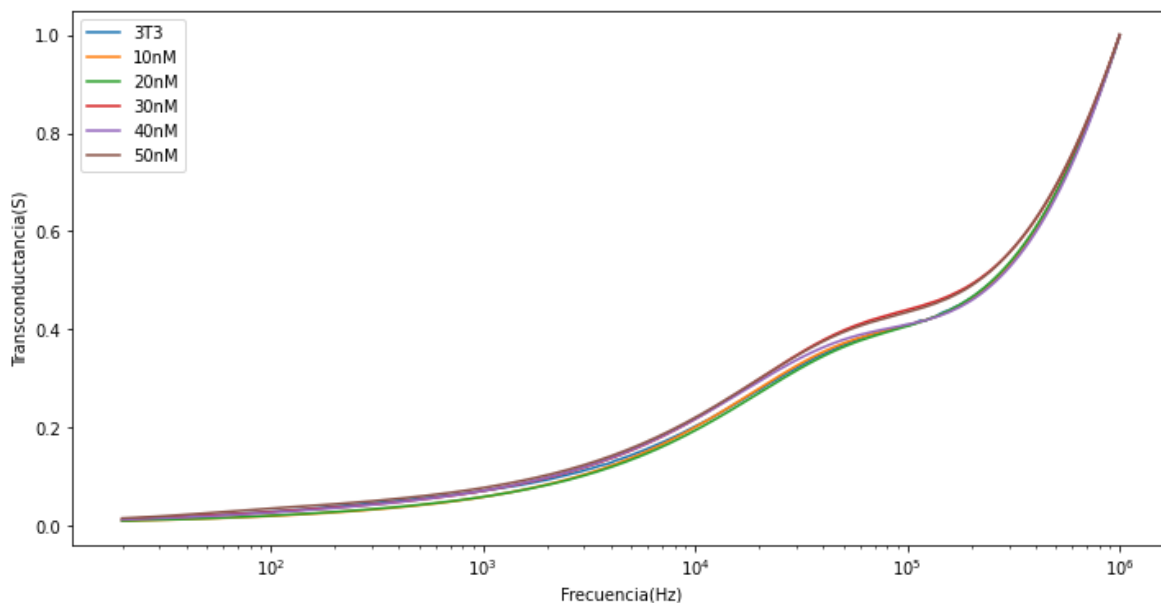


Figura 4.18 Diagrama de Nyquist de la línea celular 3T3 con distintas concentraciones de TMX de 72h medida en oscuridad.

Teniendo en cuenta estos resultados se podría afirmar que las propiedades eléctricas de las células dependen más del tiempo de incubación con el tamoxifeno que de las diferentes concentraciones a las que fueron expuestas. Esto se puede observar detalladamente en las figuras 4.6, 4.12 y 4.18. Donde se puede observar que al exponer la línea celular 3T3 al TMX por 72 horas, sus propiedades eléctricas cambian de una manera muy marcada en comparación a otros tiempos de exposición. Esto puede ser explicado en que al exponer por un tiempo prolongado la membrana celular a un inhibidor iónico (TMX en este caso), sus canales entran en un estado inactivo; el cual cada vez necesita un estímulo mayor para poder despolarizarse y entrar a un estado de reposo.

Es importante resaltar que para obtener unas mediciones más confiables es ideal estimular las células con una señal de corriente, ya que, al poder regular la corriente, se minimiza el riesgo de que las células sean afectadas por dicha señal; esto debido a que las corrientes que maneja la membrana celular son de un orden muy pequeño y al aplicar una señal de voltaje fijo con las variaciones de impedancia se obtiene corrientes nocivas para la misma membrana, exponiendo a la célula a condiciones nada viables incluso llegando a una posible muerte debido a que al pasar estas corrientes por la membrana se averían los canales iónicos afectando la capacidad de la célula de relacionarse con su entorno.

4.2. Ensayos de citotoxicidad

Después de incubar ambas líneas celulares con las diferentes concentraciones de tamoxifeno, se hicieron los ensayos de citotoxicidad, sembrando las células en un

ambiente controlado muy similar al natural a 37°C y 5% de CO₂ para que las líneas celulares estuvieran bajo las condiciones adecuadas de supervivencia.

Posteriormente a el procedimiento reportado en la sección 3.3. Se tomaron mediciones a 4,6, 24 y 48 horas para observar la evolución de la metabolización de la resazurina dependiendo de las diferentes concentraciones de tamoxifeno y como esto afecta el metabolismo celular.

Para finalizar se calcularon los porcentajes de supervivencia celular al excitarse la resorfurina con una longitud de onda de 535nm y una longitud de onda de emisión de 595nm. Se comparan los datos tomando en cuenta cada una de las 6 concentraciones de tamoxifeno trabajadas.

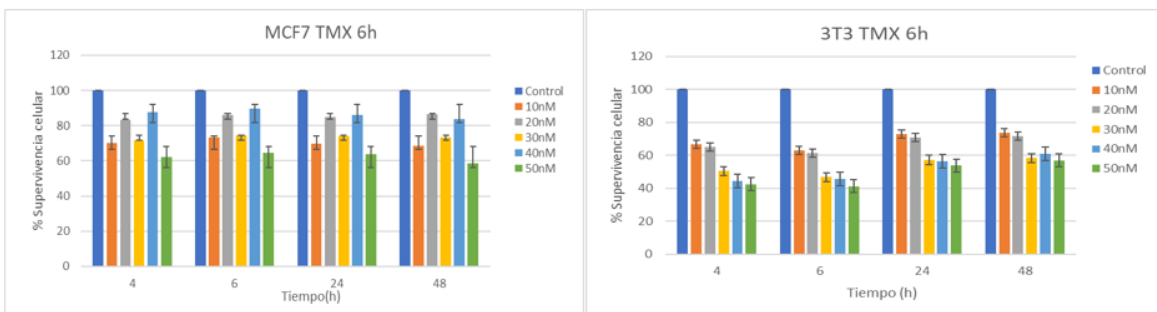


Figura 4.19 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno encubando a 6h.

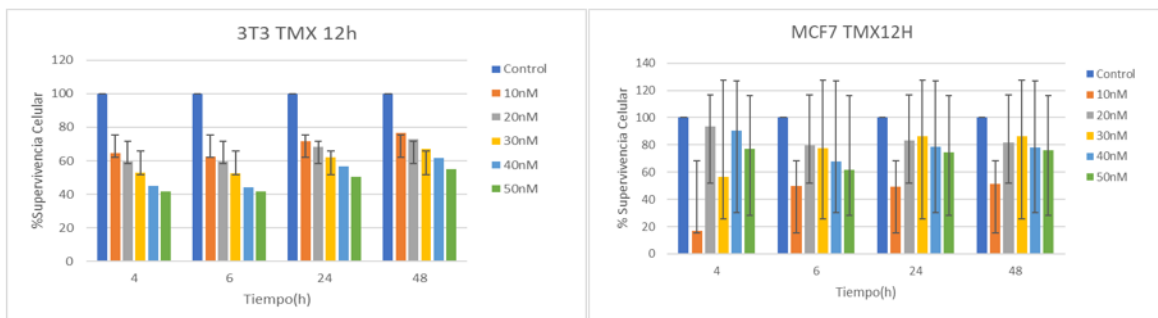


Figura 4.20 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 12h.

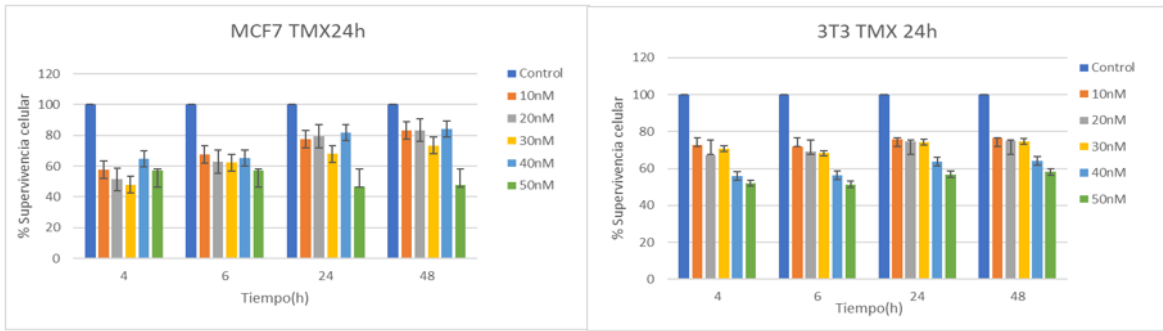


Figura 4.21 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 24h.

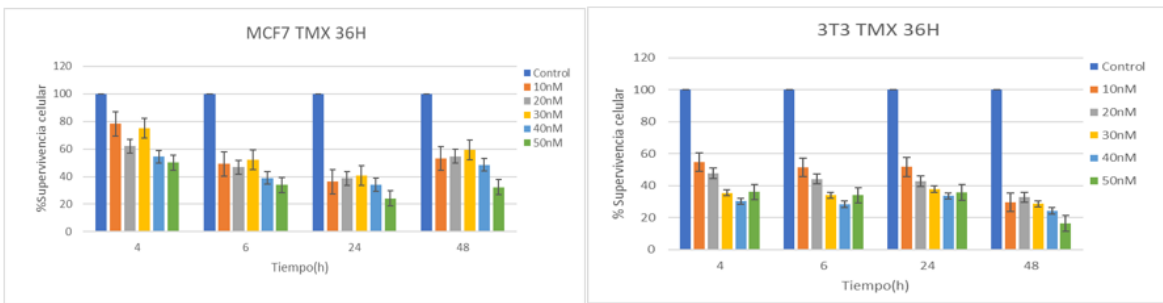


Figura 4.22 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 36h.

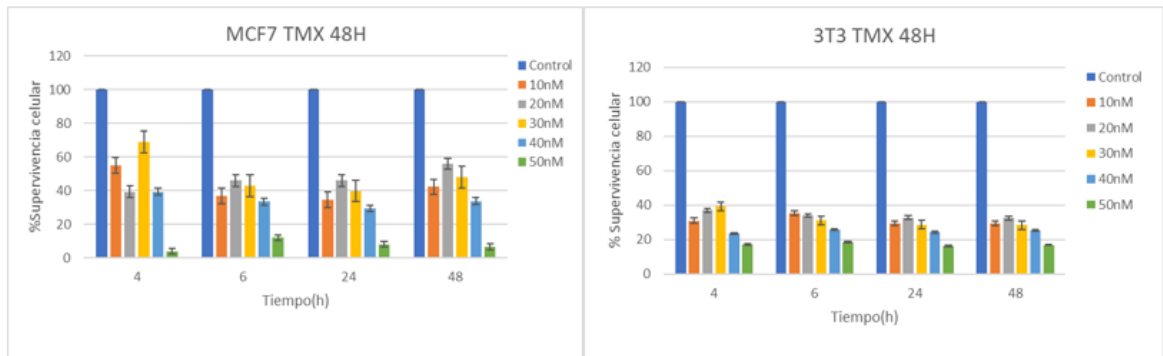


Figura 4.23 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 48h.

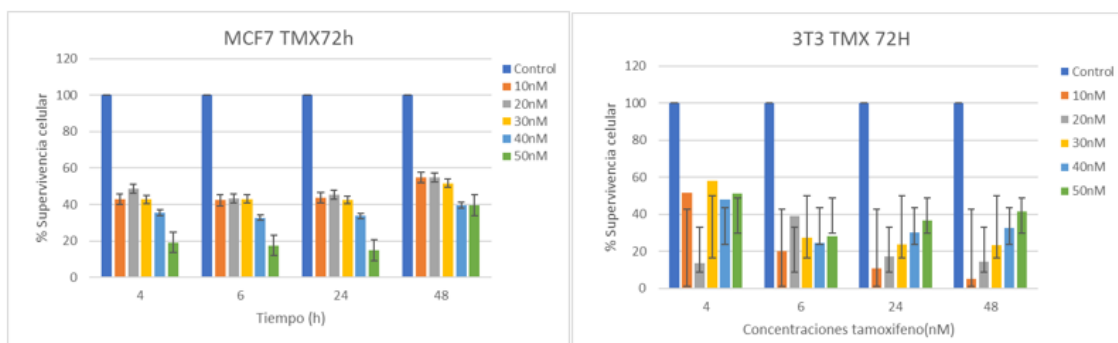


Figura 4.24 Viabilidad celular después del tratamiento con tamoxifeno a 72h.

En las figuras 4.19-4.24 se muestran los resultados del porcentaje de supervivencia celular después de ser incubadas a las cinco concentraciones de tamoxifeno más el control celular sin tratamiento.

Se puede observar que al igual de lo visto en las graficas de Bode, diagramas de Nyquist y curvas de transconductancia anteriormente mostradas, la viabilidad celular estuvo más afectada por el tiempo de incubación con el tamoxifeno que de las diferentes concentraciones. Esta diferencia tan marcada se puede observar entre las figuras 4.21 y 4.22 donde al pasar de un tiempo de incubación de 24 horas a 36 horas los porcentajes de supervivencia celular disminuyen entre un 30% a un 40% aproximadamente. Esto se puede interpretar como que en el rango de tiempo de incubación entre 24 a 36 horas las células redujeron su metabolismo celular considerablemente, siendo este tiempo de incubación adecuado para poder inhibir el funcionamiento de los canales iónicos de una manera óptima.

5. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

5.1 Recomendaciones

Para obtener mejores resultados con este estudio es necesario cambiar el protocolo de mediciones de espectroscopia de impedancia eléctrica ya que al inyectar una señal de voltaje AC no se puede regular la corriente y esto pone en riesgo cualquier muestra biológica que se quiera medir. Se sugiere diseñar una fuente de corriente así se podría trabajar con las muestras biológicas sin alterarlas

Con este protocolo también es necesario cambiar la forma de exportar los datos experimentales de formato HTML a CSV ya que este formato al ser procesado altera los datos y compromete el análisis de estos datos.

Adicionalmente se recomienda adquirir unas sondas de mejor calidad para el equipo de LCR, ya que la calidad de estas sondas afecta la fiabilidad de las medidas debido a diferentes factores como lo son las capacitancias e impedancias parásitas. También se plantea implementar unos electrodos más adecuados para mediciones en muestras biológicas.

5.2 Trabajos futuros

Los resultados hallados contribuyen para realizar ensayos a futuro usando otros moduladores de canales iónicos como activadores. También se busca repetir el experimento con la línea celular MCF7 y poder comparar las propiedades eléctricas de las líneas celulares en presencia de distintos moduladores iónicos.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados se logró evaluar el efecto del tamoxifeno sobre las propiedades eléctricas en las líneas celulares de cáncer de seno y fibroblastos de control. Actuando el tamoxifeno como un inhibidor iónico. Disminuyendo la capacitancia de la membrana celular en función del tiempo de incubación.

Se demostró que, aunque el tamoxifeno inhiba el paso de iones en la membrana de células tumorales también afecta las células sanas por lo cual se debe tener en cuenta la concentración adecuada según las células que vayan a ser tratadas para poder encontrar la dosis adecuada donde las células sanas adyacentes a las células tumorales no se vean afectadas.

Según los resultados se puede concluir, que la efectividad del tamoxifeno como inhibidor iónico en líneas celulares MCF7 y 3T3 dependen en mayor medida del tiempo de incubación que de las diferentes concentraciones con las cuales se incuban.

REFERENCIAS

- [1] B. Fisher *et al.*, “Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 8, pp. 2672–2685, 1998, doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2672.
- [2] A. Stanisławek, “Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review,” pp. 1–31, 2021.
- [3] M. P. Herrera, “Cancer De Mama Y Cuello Uterino Colombia,” *Inst. Nac. Salud*, p. 15, 2018, [Online]. Available: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/CÁNCER DE MAMA Y CUELLO UTERINO_2018.pdf.
- [4] L. F. Rendón-arango, S. Llano-rendón, and I. C. Garcés-palacio, “El cáncer de seno: conocimientos, actitudes y prácticas para la detección temprana en Amalfi, Antioquia,” *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 2019, doi: 10.17533/udea.rfnsp.v37n3a02.
- [5] “CAC: panorama del cáncer de mama en Colombia 2020 - CONSULTORSALUD.” <https://consultorsalud.com/panorama-del-cancer-de-mama-en-colombia-2020/> (accessed Feb. 28, 2022).
- [6] Z. Momenimovahed and H. Salehiniya, “Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world,” *Breast Cancer Targets Ther.*, vol. 11, pp. 151–164, 2019, doi: 10.2147/BCTT.S176070.
- [7] P. E. Miguel-Soca, I. Argüelles González, and M. Peña González, “Factores genéticos en la carcinogénesis mamaria Genetic factors for breast carcinogenesis,” *Rev. Finlay*, vol. 6, no. 4, pp. 23–35, 2016, [Online]. Available: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_.
- [8] “GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC.” <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> (accessed Feb. 28, 2022).
- [9] “What Is Cancer? - National Cancer Institute.” <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed Apr. 19, 2022).
- [10] K. K. S. Ganesh N. Sharma, Rahul Dave, Jyotsana Sanadya, Piush Sharma, “VARIOUS TYPES AND MANAGEMENT OF BREAST CANCER: AN OVERVIEW,” *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 109–126, 2010.
- [11] M. Morrow *et al.*, “Factors predicting the use of breast-conserving therapy in stage I and II breast carcinoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 8, pp. 2254–2262, 2001, doi: 10.1200/JCO.2001.19.8.2254.

- [12] "Mastectomía." <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/cirugia-del-cancer-de-seno/mastectomia.html#:~:text=La mastectomía es una cirugía,la mayor parte del seno.> (accessed Mar. 01, 2022).
- [13] S. C. Joshi, F. A. Khan, I. Pant, and A. Shukla, "Role of radiotherapy in early breast cancer: an overview.," *Int. J. Health Sci. (Qassim)*, vol. 1, no. 2, pp. 259–64, 2007, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475437> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3068638>.
- [14] "Terapia hormonal para el cáncer de seno." <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-hormonal-para-el-cancer-de-seno.html> (accessed Apr. 20, 2022).
- [15] "Hormone Therapy for Breast Cancer Fact Sheet - National Cancer Institute." <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet#:~:text=Adjuvant therapy for early-stage,this use in postmenopausal women.> (accessed Apr. 20, 2022).
- [16] M. Untch and C. Thomssen, "Clinical practice decisions in endocrine therapy," *Cancer Invest.*, vol. 28, no. SUPPL. 1, pp. 4–13, 2010, doi: 10.3109/07357907.2010.501637.
- [17] Y. H. Chia, M. J. Ellis, and C. X. Ma, "Neoadjuvant endocrine therapy in primary breast cancer: Indications and use as a research tool," *Br. J. Cancer*, vol. 103, no. 6, pp. 759–764, 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605845.
- [18] Y. Salazar, "Introducción a la medida de impedancia eléctrica de tejidos biológicos," pp. 29–45, 2004, [Online]. Available: <http://www.tdx.cat/handle/10803/6187>.
- [19] A. Roseto, "Las membranas celulares. Los canales ionico y nefrología molecular," *Arch. argent. pediatr*, vol. 101, no. 4, pp. 320–343, 2003.
- [20] L. Marcetn Puig, "Caracterización de inhibidores de la actividad de canales iónicos sensibles a voltaje," p. 34, 2015.
- [21] M. Yang *et al.*, "Therapeutic potential for phenytoin: Targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 134, no. 2, pp. 603–615, 2012, doi: 10.1007/s10549-012-2102-9.
- [22] F. Lang and C. Stournaras, "Ion channels in cancer: Future perspectives and clinical potential," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1638, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1098/rstb.2013.0108.
- [23] M. L. De Ieso *et al.*, "Combined pharmacological administration of AQP1 ion channel blocker AqB011 and water channel blocker Bacopaside II amplifies inhibition of colon cancer cell migration," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, 2019, doi:

10.1038/s41598-019-49045-9.

- [24] S. M. Duffy, W. J. Lawley, D. Kaur, W. Yang, and P. Bradding, "Inhibition of human mast cell proliferation and survival by tamoxifen in association with ion channel modulation," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 112, no. 5, pp. 965–972, 2003, doi: 10.1016/j.jaci.2003.07.004.
- [25] G. Coiret, A. S. Borowiec, P. Mariot, H. Ouadid-Ahidouch, and F. Matifat, "The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells," *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 3, pp. 843–851, 2007, doi: 10.1124/mol.106.028290.
- [26] M. Abdul, A. Santo, and N. Hoosein, "Activity of potassium channel-blockers in breast cancer," *Anticancer Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 3347–3351, 2003.
- [27] G. Fnu and G. F. Weber, "Alterations of Ion Homeostasis in Cancer Metastasis: Implications for Treatment," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. December, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.765329.
- [28] D. F. Fukushiro-Lopes *et al.*, "Preclinical study of a Kv11.1 potassium channel activator as antineoplastic approach for breast cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 3, pp. 3321–3337, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.22925.
- [29] J. Liu *et al.*, "Discovery of Bufadienolides as a Novel Class of ClC-3 Chloride Channel Activators with Antitumor Activities," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 14, pp. 5734–5743, Jul. 2013, doi: 10.1021/jm400881m.
- [30] C.-C. CHOU, Y.-C. WU, Y.-F. WANG, M.-J. CHOU, S.-J. KUO, and D.-R. CHEN, "Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway," *Oncol. Rep.*, vol. 21, no. 3, pp. 665–671, 2009, doi: doi.org/10.3892/or_00000269.
- [31] F. Mesa, B. A. Paez-Sierra, A. Romero, P. Botero, and S. Ramírez-Clavijo, "Assisted laser impedance spectroscopy to probe breast cancer cells," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 54, no. 7, 2021, doi: 10.1088/1361-6463/abc380.
- [32] anonymous, "Transconductance." (accessed Apr. 16, 2022). [Online]. Available: http://atlas.physics.arizona.edu/~shupe/Physics_Courses/Phys_586_S2015_S2016_S2017/LectureSupplements/Transconductance.pdf
- [33] L. F. E. Huerta-Nuñez *et al.*, "A biosensor capable of identifying low quantities of breast cancer cells by electrical impedance spectroscopy," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42776-9.
- [34] M. Mckubre and R. Eisenberg, "Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, Third Edition impedance spectroscopy, stereology, and singular perturbation theory Electrical Structure of Biological Cells and Tissues:," no. August 2019, 2018.

- [35] H. Fricke, "THE ELECTRIC CAPACITY OF TUMORS OF THE BREAST ' A suspension of biological cells or a biological tissue when placed in a conductivity cell , behaves as though it were a pure resistance in parallel with a pure capacity . This parallel capacity is the capac," pp. 340–376.
- [36] Y. Zou and Z. Guo, "A review of electrical impedance techniques for breast cancer detection," *Med. Eng. Phys.*, vol. 25, no. 2, pp. 79–90, 2003, doi: 10.1016/S1350-4533(02)00194-7.
- [37] A. V. Lee, S. Oesterreich, and N. E. Davidson, "MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 107, no. 7, pp. 1–4, 2015, doi: 10.1093/jnci/djv073.
- [38] "NIH 3T3 Cell Line Origins, Characteristics, Transfection." <http://www.nih3t3.com/> (accessed Apr. 05, 2022).
- [39] "Tripsina -." [https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/t/tripsina/#:~:text=La tripsina se usa en,células se encuentran en suspensión.](https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/t/tripsina/#:~:text=La%20tripsina%20se%20usa%20en,c%C3%A9lulas%20se%20encuentran%20en%20suspensi%C3%B3n.) (accessed Apr. 05, 2022).
- [40] "Scepter™ 3.0 Handheld Cell Counter." <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/scepter-cell-counter> (accessed Apr. 16, 2022).
- [41] "Keysight Technologies E4980AL Precision LCR Meter," Accessed: May 07, 2022. [Online]. Available: www.keysight.com/find/e4980al.
- [42] L. Escobar M and F. A. Aristizábal G, "Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application," *Vitae*, vol. 17, no. 2, pp. 173–180, 2010.