

Modelo Eléctrico que Caracteriza la Biompedancia de Células Cancerígenas de Mama MCF-7 ancladas por método Inmunomagnético: *Respuesta en Frecuencia*

Z. Guerrero^{1,2†}, G. Álvarez^{1,3†}, A.L. Piñón^{1,3†}, C.I. Guerrero¹, O. Flores⁴, L.F.E. Huerta^{1,5}, J.G. Silva⁵, G. Gutierrez¹, N.M. Pérez¹, R. Chacón¹, V. Jiménez¹ y C.A. González^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Cd. México

²Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Ingeniería Biomédica, Aguascalientes, México

³Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Dpto. Ingeniería Biomédica, Cd. Juárez, Chihuahua, México

⁴Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN, Dpto. Ing. Eléctrica. Cd. México, México

⁵Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México.

†Autores con igual participación, *Autor de correspondencia: cgonzalezd@ipn.mx

Resumen— La detección oportuna de Células Tumorales Circulantes (CTC) tiene valor clínico durante el tratamiento del cáncer para la prevención de recidivas y procesos metastásicos. Tecnologías actuales para detección de CTC demandan equipo y personal especializado pocas veces disponible en centros de salud de bajos recursos. Se ha propuesto el diseño de un biosensor de CTC accesible basado en mediciones de espectroscopía de bioimpedancia asistida con nanopartículas magnéticas. En este estudio se realiza una primera aproximación a la estimación de la respuesta en frecuencia de la bioimpedancia característica de células cancerígenas de mama ancladas inmunomagnéticamente, se presenta un primer circuito eléctrico equivalente general que permite modelar las observaciones experimentales. Los resultados indican que la respuesta en frecuencia de la bioimpedancia de células cancerígenas de mama ancladas inmunomagnéticamente observada experimentalmente puede ser modelada a través de un circuito equivalente RC serie-paralelo, en el que la resistencia y capacitancia asociada al citoplasma, membrana celular y presencia de nanopartículas magnéticas juegan un papel relevante.

Palabras clave- Bioimpedancia, Cáncer, Nanopartículas.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el carcinoma más común y principal causa de fallecimientos de mujeres en todo el mundo [1]. Dentro del país la mayor tasa de mortalidad se localiza en las regiones de escasos recursos; debido a la falta de oportunidades económicas para su diagnóstico.

Respecto al proceso de diseminación hematógena tumoral, los clones de células cancerosas circulan por el torrente circulatorio hasta que son eliminadas por mecanismos inmunológicos o encuentran un ambiente apropiado para proliferar en algún momento, esto último ocurre cuando la célula tumoral invade tejido del huésped, entra en circulación, evade defensas y termina en órganos blancos donde suele formarse un tumor secundario [2].

Las CTC proceden de epitelio, atraviesan la circulación y colonizan órganos distantes, éstas no están presentes en la

sangre periférica de los individuos sin enfermedad neoplásica [3]. Para su estudio, la mayoría de las tecnologías utilizan el EpCAM, un antígeno de diferenciación que se expresa en las células epiteliales y en casi todos los tumores. Las CTC dependientes de los clones del tumor primario pueden ser detectadas incluso antes que el tumor donde se originan, y algunas veces persisten después de que el tumor se haya extirpado. Es por eso que la determinación de CTC ayudaría a estudiar aspectos fundamentales de los tumores, en lo referente a su diagnóstico, extensión y pronóstico. [4][5][6].

En este sentido, el uso de nanopartículas brinda nuevas posibilidades, tanto de diagnóstico como de tratamiento de diversas enfermedades. En el caso del cáncer, se usan nanopartículas fluorescentes conjugadas a anticuerpos (nanosondas) para marcar las células tumorales (Fig. 1) y el núcleo magnético de las nanopartículas permite la posibilidad de que sean guiadas y focalizadas a un área específica, para cuantificar las células tumorales [7].

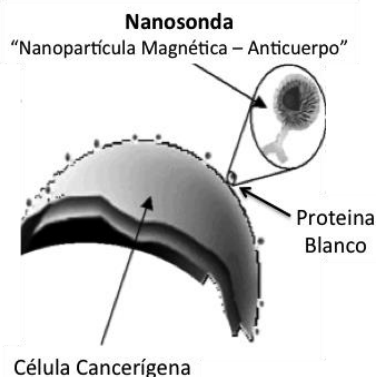


Fig. 1. Representación del concepto de marcado de células cancerígenas con nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos (nanosondas).

La bioimpedancia consiste en la resistencia a la inyección de corriente eléctrica alterna de una intensidad pequeña en el material biológico, para no modificar su estructura interna. A través de la espectroscopía de impedancia eléctrica se pueden

conocer las características eléctricas pasivas de los materiales biológicos[8][9].

Tecnologías para detección de CTC hasta el momento disponibles demandan equipo y personal especializado pocas veces disponible en centros de salud de bajos recursos. El concepto central de dicha investigación es adherir nanopartículas magnéticas en la superficie de células cancerígenas a fin de separarlas y anclarlas por método inmunomagnético en la superficie de un cristal de cuarzo con electrodos de oro embebidos, lo que representa el fundamento base de funcionalidad para el biosensor de CTC propuesto.

En éste estudio células tumorales de la línea MCF-7 fueron marcadas con nanosondas “anticuerpo-nanopartícula magnética” y ancladas por método inmunomagnético, las mediciones de bioimpedancia se realizaron en el rango de los 100Hz a 1MHz. El objetivo central fue proponer un primer circuito eléctrico equivalente general que permita modelar analíticamente la respuesta observada experimentalmente.

II. METODOLOGÍA

Líneas celulares

Se utilizaron células cancerígenas de mama de la línea MCF-7, las cuales fueron incubadas a 37°C y con una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (CO₂). El número de células y viabilidad se evaluaron usando un contador de células automático (Countess model, Invitrogen®).

Nanosonda Nanopartícula-Anticuerpo

Se sintetizaron nanosondas utilizando las nanopartículas magnéticas fluorescentes Nanoscreen MAG/G-ARA (Chemicell, Inc.), con un tamaño promedio de 100 a 200 nm, y el anticuerpo monoclonal anti-humano: CD326 (EpCAM). Se acoplaron a las nanopartículas a través del método de la carbodimida, siguiendo el protocolo descrito en fluid MAG-ARA (Protocol A10. Chemicel, Inc.) [10].

Incubación Células tumorales-Nanosonda

La incubación se realizó en la combinación línea celular MCF-7 con nanosonda EpCAM en 200 µl de solución buffer de fosfato (PBS), en concentraciones celulares de 50, 500 y 5000 c/100µl; por simplicidad para este estudio solo se incluyeron los casos correspondientes a la concentración de 500 c/100µl.

Mediciones de bioimpedancia

Se empleó el analizador de impedancia Agilent 4294A. El sistema se adaptó con un cristal de cuarzo (QSX 301, Biolin Scientific Inc.) de radio r=9mm con electrodos de oro embebidos y dispuestos de tal manera que al colocar una muestra de PBS con células suspendidas, se forma un circuito

cerrado entre ambos electrodos. Las mediciones de bioimpedancia se realizaron por triplicado en el rango de 100Hz - 1MHz a 163 pasos espaciados logarítmicamente.

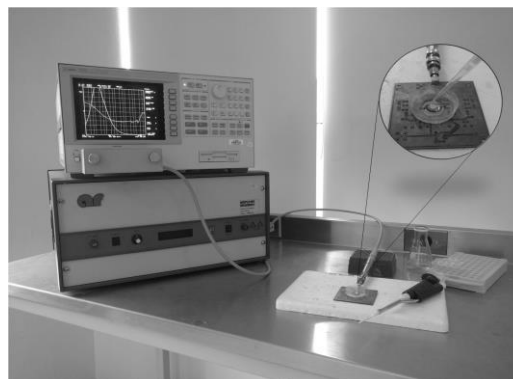


Fig. 2. Analizador de bioimpedancia Agilent 4294A y biosensor basado en electrodos de oro embebidos en cristal de cuarzo.

III. RESULTADOS

Incubación Células tumorales-Nanosonda

La figura 3 muestra el caso representativo del acoplamiento nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” a células cancerígenas de la línea MCF-7 evidenciado a través de la fluorescencia de las nanopartículas empleadas.

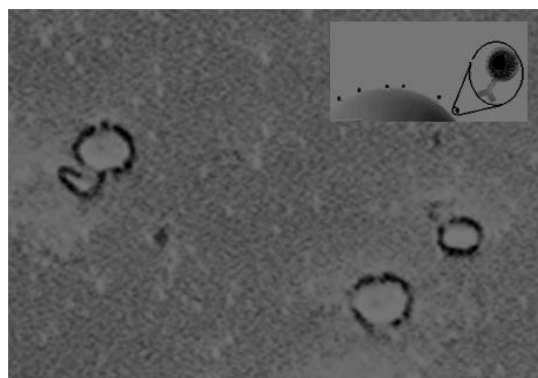


Fig. 3. Inmunofluorescencia de nanosonda “anti-EpCAM - Nanopartícula Magnética” adheridas a membrana de células cancerígenas de la línea MCF-7 (40X).

Modelo eléctrico equivalente

La figura 4 muestra un esquema representativo del sistema empleado para medir la bioimpedancia de células cancerígenas marcadas con nanopartículas magnéticas, de la figura se desglosa el modelo eléctrico equivalente que caracteriza células cancerígenas en suspensión ancladas a la superficie de biosensor a través de método inmunomagnético, el cual se propuso a partir de la base de modelos eléctricos reportados para células en suspensión [11][12], y como aportación original de éste trabajo, la consideración del efecto de elementos asociados a la presencia de nanopartículas con

propiedades magnéticas, capacitancia de electrodos de oro y elementos pasivos parásitos propios del sistema de instrumentación, así;

Considerando: $C_n = jX_n$

$$\begin{aligned} Z_1 &= R_1 + jX_1 \\ Z_2 &= R_2 || jX_2 \\ Z_3 &= R_3 + jX_3 \\ Z_{eq} &= Z_1 || Z_2 + Z_3 \end{aligned}$$

Desarrollando:

$$Z_{eq} = \frac{-(R_2 X_1 X_2) + (R_1 R_2 X_2)}{(R_1 R_2 - X_1 X_2) + (R_2 X_1 + R_1 X_2 + R_2 X_2)} + R_3 + jX_3 \dots (1)$$

Donde Z_1 corresponde a las propiedades celulares: de manera específica, R_1 representa la conductividad del citoplasma y C_1 la capacitancia de la membrana celular. Por otro lado, la parte resistiva de Z_2 se deriva de las propiedades del medio extracelular donde se refleja la presencia de nanopartículas con propiedades magnéticas; y la parte capacitiva es el efecto de los electrodos de oro. Finalmente, Z_3 está en función de las propiedades resistivas y capacitivas parásitas de la instrumentación (véase Fig 4).

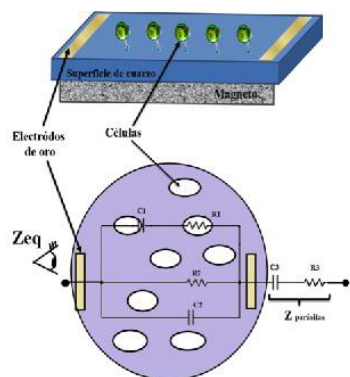


Fig. 4. Esquema representativo de sistema para medir la bioimpedancia de células cancerígenas ancladas magnéticamente y modelo eléctrico equivalente diseñado y propuesto para caracterizar la bioimpedancia del sistema.

Mediciones de bioimpedancia

La figura 5 muestra espectros de bioimpedancia normalizados con respecto al valor máximo (magnitud y fase) de dos condiciones: PBS y PBS+células cancerígenas MCF-7 ancladas por método inmunomagnético. Mediciones de bioimpedancia parecen discriminar células cancerígenas con respecto al medio PBS a bajas frecuencias, los datos se presentan en valores promedio y barras de dispersión (desviación estándar) de tres mediciones. Para el caso de mediciones de bioimpedancia en términos de la fase, una prueba estadística no paramétrica de comparación de medianas para muestras independientes U-MannWhitney indicó diferencias estadísticamente significativas en el rango

inferior a 1KHz ($P < 0.05$), si bien tal observación resulta relevante, se incluyó únicamente para evidenciar el efecto diferenciado de la presencia de células cancerígenas con respecto a su medio basal PBS, por lo que su análisis e interpretación está fuera de los alcances del presente trabajo.

La figura 6 muestra espectros de bioimpedancia normalizados con respecto al valor máximo (magnitud y fase) estimados analíticamente en base al modelo eléctrico equivalente propuesto en (1) para caracterizar la bioimpedancia de células cancerígenas MCF-7 ancladas por método inmunomagnético. Al comparar los resultados obtenidos experimentalmente y simulados se logra observar que ambos espectros de magnitud y fase son cualitativamente coherentes, sin embargo los espectro de magnitud presentan puntos de inflexión desfasados en la frecuencia, los cuales en principio pueden atribuirse a un efecto $(R_2 C_2)^{-1}$ diferenciado en condiciones experimentales con respecto a la propuesta teórica ideal.

IV. DISCUSIÓN

En éste estudio se realizó una primera aproximación a la estimación de la respuesta en frecuencia de la bioimpedancia característica de células cancerígenas de mama de la línea MCF-7 una vez que fueron marcadas con nanosondas “anticuerpo-nanopartícula magnética” y ancladas inmunomagnéticamente a la superficie de un cristal de cuarzo con electrodos de oro embebidos. El modelo eléctrico equivalente que se propone para caracterizar tal sistema corresponde a un arreglo RC serie-paralelo cuya respuesta en frecuencia se observa morfológicamente coherente con la respuesta observada experimentalmente, y en el que la resistencia y capacitancia asociada a las propiedades eléctricas pasivas del citoplasma, membrana celular y cambios de conductividad extracelular ligados a la presencia de nanopartículas magnéticas juegan un papel relevante. Factores $(RC)^{-1}$ analíticamente estimados parecen demandar aún ajustes a fin de coincidir con las frecuencias de los puntos de inflexión observados, tales factores hemos considerado debe ser ponderado en función de las características específicas de todo el sistema y en particular por el efecto asociado a la presencia de nanopartículas magnéticas. Así; el modelo eléctrico que se presenta aún tiene un alcance de caracterización general del sistema biológico en estudio.

Se espera que el circuito eléctrico propuesto permitirá modelar analíticamente condiciones particulares, tales como el efecto de factores asociados a la concentración, tipo de líneas celulares, cambios implícitos en la conductividad extracelular producto de la concentración de óxido de hierro presente en las nanosondas adheridas a la membrana celular, capacitancia de electrodos empleados así como las impedancias parásitas implícitas en la instrumentación. Tal análisis en detalle se ha reservado para un estudio adicional actualmente en desarrollo.

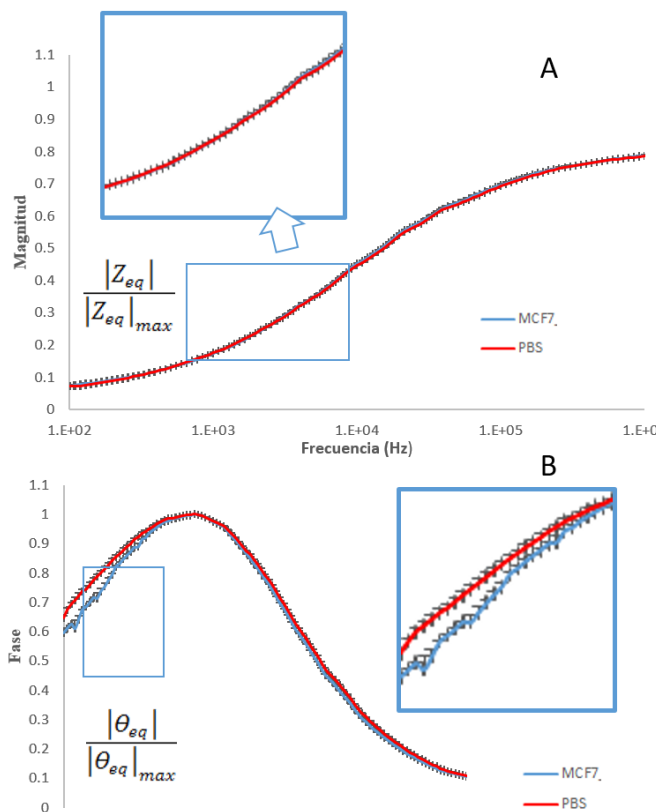


Fig. 5. Respuesta en frecuencia de la bioimpedancia de células cancerígenas de la línea MCF-7 ancladas a la superficie de biosensor a través de método inmunomagnético. A) Magnitud y B) Fase.

V. CONCLUSIÓN

El modelo eléctrico que caracteriza la respuesta en frecuencia de la bioimpedancia característica de células cancerígenas de mama ancladas inmunomagnéticamente corresponde a un arreglo RC serie-paralelo. Los elementos que permiten modelar el circuito eléctrico equivalente son las propiedades eléctricas celulares, del medio extracelular, conductividad de nanopartículas magnéticas, así como la resistividad y capacitancia parásita de la instrumentación. Se requiere investigación analítica y experimental adicional que permitan ponderar el efecto de factores asociados a cambios en la concentración celular y nanosondas adheridas a la membrana celular.

RECONOCIMIENTOS

Estudio realizado con el apoyo de CONACYT CB2012 a través del grant No 180536. Agradecemos a la Academia Mexicana de Ciencias el apoyo otorgado a Zyanya Guerrero, Guillermina Álvarez y Ana Laura Piñón para su estancia en la Escuela Superior de Medicina-Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, a través del programa “Verano Científico 2016”.

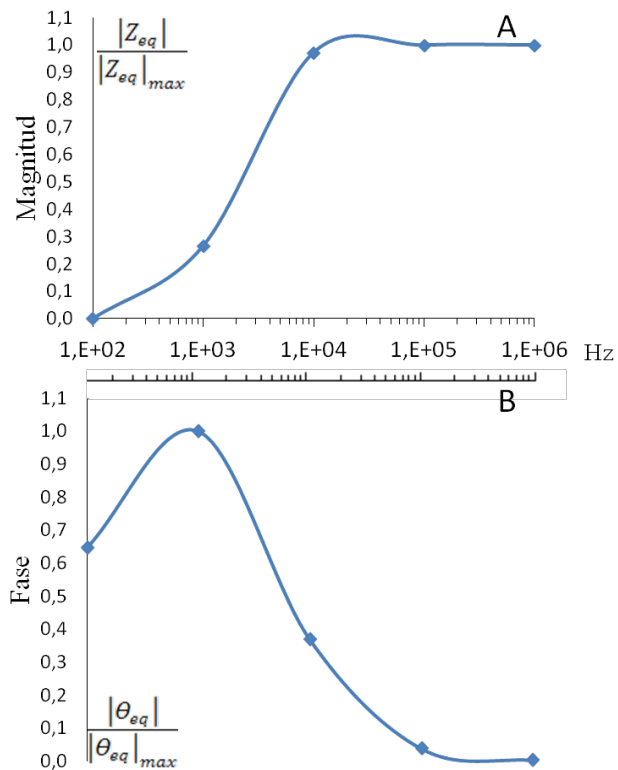


Fig. 6. Respuesta en frecuencia de la impedancia del modelo eléctrico equivalente propuesto para células cancerígenas ancladas a la superficie de biosensor a través de método inmunomagnético. A) Magnitud y B) Fase.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Farlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, GLOBOCAN 2012, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base. Internet. Lyon (France): IARC; 2016.
- [2] Nocholson, GL, Poste G: Tumor implantation and invasion at metastatic sites. *Int Rev Exp Pathol* 25:77, 1983.
- [3] Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the "leukemic phase" of solid cancers. *Trends Mol Med*. 2006; 12(3):130-9.
- [4] Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol*. 2009;181: 1091
- [5] Olivier C, Galante I, San José L, Resel L, De la Orden V, Vidaurreta M, et al. Circulating tumor cells (ctc) in three tumor types of epithelial origin: prostate, breast and colorectal, in patients with and without metastasis. *Eur Urol Suppl*. 2009; 8(4):346.
- [6] American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2015-2016*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2016, pp 31:32.
- [7] G. Hernández et al, "Tratado de medicina farmacéutica (Estilo libro), Ed. Médica panamericana, Madrid, 2011, pp. 136.
- [8] C. Pérez, "Equipo de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica en el margen de 1kHz-1MHz (Estilo tesis)," Univ. Politécnica de Catalunya, Barcelona, España, 2004.
- [9] Peláiz-Barranco, A. Utilidad de la espectroscopia de impedancias para la determinación de la composición corporal en humanos. *Revista Cubana de Física*, 2006.
- [10] CHEMICELL. Disponible en: <http://www.Chemicell.Com>.
- [11] H. P. Schwan, "Electrical properties of tissue and cell suspensions", *Adv Biol Med Phys*, vol. 5, pp. 147-209, Feb. 1957.
- [12] Quiano G, Wang W, Duan W, et al. Bioimpedance analysis for the characterization of breast cancer cells in suspensión. *IEEE Trans. Biom. Eng.* (Vol:59 , Issue: 8), Page(s): 2321 – 2329. 2012.