

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

**PROGRAMA DE DESARROLLO CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO PARA LA SOCIEDAD**

**“Evaluación de la viabilidad técnica de un microdispositivo
para detección de células cancerígenas mediante
espectroscopia de bioimpedancia y estimación del sector
social susceptible a beneficiarse.”**

PROTOCOLO

Que presenta

Omar Flores López

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN DESARROLLO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

PARA LA SOCIEDAD

Directores de tesis: Dr. José Víctor Calderón Salinas
 Dr. César Antonio González Díaz

Resumen

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en México y en el mundo. La detección de células cancerígenas en circulación representa una alternativa en la prevención de la diseminación del cáncer, así como en el seguimiento y evolución de dicha enfermedad. Este trabajo propone el desarrollo y caracterización de un micro-dispositivo detector de células cancerígenas basado en mediciones de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) asistida con nanopartículas con el fin de evaluar su viabilidad técnica, así como una estimación del sector social susceptible a beneficiarse con este dispositivo y de la demanda de dispositivos de diagnóstico para el Cáncer de Mama en México.

Introducción

Uno de los 3 tipos de cáncer mayormente diagnosticados entre mujeres en 2010 fue el cáncer de mama, de pulmón y de colon. Actualmente no existe una tecnología portátil, mínimamente invasiva y con requerimientos de operación de mínima especialización susceptible de emplearse en la detección de células cancerígenas en muestras de sangre. Este trabajo propone el desarrollo y caracterización de un microdispositivo detector de células cancerígenas basado en mediciones de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) asistida con nanopartículas de óxido de hierro. El concepto consiste en la funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro con anticuerpos monoclonales que reconocen y se anclan en proteínas de superficie que se expresan de manera selectiva en células cancerígenas, arrastrar magnéticamente el compuesto nanopartículas-células cancerígenas a un arreglo de microelectrodos y estimar su bioimpedancia característica a través de EIE como fundamento de biosensor de células cancerígenas. Se fabricará un microdispositivo y se realizará su caracterización de bioimpedancia con el sistema en el que interaccionan microelectrodos-nanopartículas-células cancerígenas e instrumentación electrónica de acoplamiento para mediciones con un sistema analizador de impedancias. Adicionalmente se hará una evaluación del sector social susceptible de beneficiarse de este dispositivo y a su vez de los dispositivos médicos que hoy día se usan en el diagnóstico del Cáncer de Mama.

2.- Planteamiento del Problema.

El tratamiento del cáncer, y en particular el cáncer mama (CaMa) depende de factores asociados a la localización y grado de diseminación del tumor así como a las características histológicas e inmunológicas del mismo. En la mayoría de los casos la resección quirúrgica resulta efectiva para el tratamiento local mientras que la terapia adyuvante permite reducir el riesgo de recidivas, no obstante; muchas pacientes tienen reincidencias en sitios distantes como resultado de la propagación del tumor que no es detectado en el momento del tratamiento inicial. La identificación de micrometástasis ocultas en pacientes con CaMa localizado podría tener un papel importante en el establecimiento del pronóstico, las decisiones de tratamiento y el seguimiento de la eficacia del tratamiento adyuvante.

El desarrollo de dispositivos de diagnóstico para el cáncer de mama que resulten una tecnología portátil, mínimamente invasiva y con requerimientos de operación de mínima especialización contribuirá a aumentar la accesibilidad al diagnóstico del cáncer de mama y con ello disminuir la tasa de mortalidad de esta enfermedad. La Tabla 1 muestra algunos países desarrollados cuya tasa de incidencia de este tipo de cáncer es alta como en el caso de Estados Unidos que presentó en 2012, 92.9 casos por cada mil habitantes, pero su porcentaje de mortalidad fue de 18.87 %. En los países en vías de desarrollo en porcentaje de mortalidad con esta enfermedad es más alto como el caso de México que presentó una tasa de incidencia de 35.4 incidencias por cada mil habitantes pero su porcentaje de mortalidad fue más alto.

País	Número de incidencias	Incidencia (por 100,000 habitantes)	Número de defunciones	Defunciones (por 100,000 habitantes)	% Mortalidad
Mexico	20444	35.4	5680	9.7	27.78%
USA	232714	92.9	43909	14.9	18.87%
Canada	23420	79.8	4924	13.9	21.02%
Francia	48763	89.7	11933	16.4	24.47%
Chile	4081	34.8	1455	11.5	35.65%
Brazil	67316	59.5	16412	14.3	24.38%
Guatemala	626	11.9	260	5	41.53%
Cuba	4433	50.4	1614	16.5	36.41%
Costa Rica	1145	45.4	363	14	31.70%

Tabla 1. Incidencia de Cáncer de Mama por país y porcentaje de mortalidad 2012.

Fuente : Organización Mundial de la Salud, 2012.

La viabilidad técnica de marcar de manera selectiva células cancerígenas de mama con nanopartículas ferromagnéticas bioconjugadas con el anticuerpo monoclonal antic-erbB-2 ha sido estudiada [1] y [2]. Las nanopartículas magnéticas acopladas a anticuerpos u otros ligandos proveen una versátil herramienta tanto para el aislamiento y marcaje de células blanco o componentes celulares como proteínas y otras biomoléculas. En éste trabajo se propone desarrollar un microdispositivo para medir la impedancia de las células entre microelectodos, con el fin de evaluar la potencial aplicación de anticuerpos específicos contra marcadores de células de carcinoma de mama que estén acoplados a nanopartículas magnética para la posterior recuperación magnética, las cuales puedan detectarse con micro electodos mediante mediciones de EIE.

Justificación

Se tiene gran interés en la detección de Células Tumorales Circulantes (CTC) debido a que el CaMa es actualmente la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo, con una incidencia estimada de 1.4 millones de casos nuevos y una mortalidad de 458,000 muertes en 2008 [3]. En el 2008, el CaMa en el Continente Americano tuvo una incidencia 320,000 casos nuevos y una mortalidad de 82,000 casos. En México es la segunda causa de muerte en mujeres de 30-54 años de edad, después del cáncer cervico-uterino, los datos sugieren que solo entre el 5-10% de todos los casos en México se detecta en etapas tempranas en comparación con el 50% en Estados Unidos [4].

La mortalidad en 1998 fue 3,380 casos y en 2010 fue de 5,044 mujeres, lo que implica que hay 13 defunciones por día, es decir; se estima que tan solo en México sucede una muerte por ésta patología cada dos horas [5]. Se estima que la condición de tratamiento ideal del CaMa para disminuir la mortalidad que se presenta requiere un seguimiento de las pacientes con exámenes de sangre regulares para la detección de CTC y determinar si es necesario un tratamiento adicional, tal condición demanda la generación de un biosensor de células cancerígenas en sangre, el cual se ha propuesto en este trabajo que podría ser efectivo a partir de mediciones de EIE.

Protocolo de Investigación

Este proyecto propone trabajar con sistemas para la medición de impedancia con electrodos miniaturizados (microelectrodos), estos son usados en la biotecnología, ingeniería de la medicina y en biomedicina para la caracterización de objetos biológicos por medio de sus propiedades eléctricas y electroquímicas. El gran impacto tecnológico que ofrecen los electrodos a nivel micrométrico, es la caracterización a nivel celular y molecular de diferentes materiales biológicos [6]. Aprovechando esta escala los microelectrodos pueden ser utilizados en diferentes ramas de la medicina para la caracterización de tejidos, por ejemplo en los métodos de tratamiento y de diagnóstico mínimamente invasivos [7], aparatos implantables como marcapasos o desfibriladores [8] o para la caracterización de células in-vitro [9]. Otra de las ventajas que ofrecen los microelectrodos es que pueden ser usados para la implementación de soluciones médicas portátiles y de bajo costo [10]. Esta característica en específico abre la posibilidad de brindar atención médica por medio de métodos económicos de diagnóstico tanto en las zonas rurales como a las personas con menos recursos.

El trabajo propone mediciones de bioimpedancia las cuales requieren de una medición rápida y precisa. Particularmente, en el caso de reacciones biológicas se cuenta solamente con unos pocos milisegundos para adquirir la información necesaria, como consecuencia la medición de dichas reacciones no sería posible con algunos equipos de laboratorio que requieren de varios minutos para realizar mediciones en el rango entre mHz y MHz. En estos casos, un barrido de frecuencia no es el método adecuado, por esta razón los métodos rápidos basados en la medición en el dominio del tiempo resultan ser más apropiados.

Objetivos General

Diseñar y Caracterizar la interacción de un sistema microelectrodos-nanopartículas con células cancerígenas en base a sus propiedades eléctricas compuestas dependientes de frecuencia, así como el efecto en mediciones de la bioimpedancia característica y estimar el segmento de la población susceptible a beneficiarse en México.

Objetivos Específicos

Estimación de la bioimpedancia característica de un sistema microelectrodos-nanopartículas de óxido de hierro-células cancerígenas.

Diseño y generación de microelectrodos a través del depósito de películas delgadas de oro al alto vacío "Sputtering" en sustrato de vidrio.

Diseño y caracterización de microcanales a través de la técnica de litografía.

Adecuación de instrumentación electrónica de acoplamiento microelectrodos-sistema analizador de impedancias.

Estimación experimental de la impedancia característica de células cancerígenas marcadas con bioconjugados nanopartículas-anticuerpo a través de micro-dispositivo.

Definir el mercado potencial para este dispositivo médico, identificando el tamaño del mercado de los dispositivos actuales.

Definir y analizar las características de los agentes que intervienen en los canales de distribución de equipos médicos de diagnóstico de Cáncer de Mama en el sector salud en México.

Realizar un análisis de los dispositivos médicos de diagnóstico existentes para Cáncer Mama a través del portal de compras del gobierno "Compranet" y la información del histórico de las Licitaciones electrónicas.

Alcances

Investigar y explicar los mecanismos de interacción de microdispositivo, nanopartículas y células tumorales, de tal forma que el conocimiento generado en su conjunto estime la viabilidad de la aplicación de tales nanocompuestos y un microdispositivo en el diseño de biosensores de células tumorales basados en mediciones impedancimétricas y estimar el segmento de población susceptible a beneficiarse.

Metodología

Diseño de microdispositivo utilizando la técnica de fotolitografía y deposición de películas.

Se diseñaran varias posibles configuraciones y geometrías de microelectrodos acorde a las necesidades de la aplicación como el tamaño de las células a medir, los flujos mínimos en el sistema y la respuesta de la medición. Se propone el método de depósito de películas delgadas de oro al alto vacío "Sputtering" en sustrato de vidrio, el cual se realizará en colaboración con el Centro de Nanociencias y Micro-Nanotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Una vez que los micro electrodos y micro canales sean fabricados se procederá a la caracterización eléctrica de los mismos por medidas impedimétricas.

Medición de espectroscopia de impedancia con microelectrodos.

Se adaptará instrumentación electrónica que cumpla con los requerimientos del sistema de microelectrodos diseñados. Se diseñara y adaptara la configuración del acoplamiento de impedancias más apropiada. Se determinará el método más sensitivo y por lo tanto el más apropiado para realizar cada tipo de medición. Para lograr esta meta se realizaran mediciones de prueba con el sistema en configuración 2 y 4 electrodos, además de que se utilizaran los métodos de medición en el dominio del tiempo y en el dominio de la frecuencia.

Caracterización experimental de sistema de micro-electrodos.

Se realizará una caracterización experimental de la bioimpedancia característica de la interacción microdispositivo -nanopartículas-células cancerígenas a través de la medición experimental de la impedancia características de células cancerígenas marcadas con bioconjugados Nanopartículas-Anticuerpo y empleando microdispositivo compuesto por microelectrodos acoplados a un sistema analizador de impedancias.

Estudio del sector de la población susceptible a beneficiarse.

El análisis de los dispositivos médicos de diagnostico existentes para Cáncer Mama se realizará a través de la información obtenida del portal de compras del gobierno "Compranet". Se hará una búsqueda de la información del histórico de las Licitaciones electrónicas haciendo una búsqueda por hospital, por institución pública y por estado.

Referencias

- [1] Silva J.G., Maldonado J., Tapia J.S., Herrera N. E., Polo S. M., Martínez S.G. y González C.A. "Selective Targeting of Breast Cancer Cells MCF-7 by Ferromagnetic Nanoparticles". Proceedings of the V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011, IFMBE Proceedings 33, www.springerlink.com
- [2] Silva J.G., Sánchez V., Polo S. M., and González C.A. "Expression of c-erbB-2 in Breast Cancer Cell Lines as Experimental Receptor of Magnetic Nanoparticles". Proceedings of the IEEE/EMBS 35th Annual International Conference. Osaka, Japan, July 2013.
- [3] Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* 2007 Vol. 220: 82–101.
- [4] Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev Immunology*. 8, Jan 2008. 59-73.
- [5] Gómez Dantés Héctor, Lewis Sarah, Torres Sánchez Luisa y López Carrillo Lizbeth. El cáncer de mama en América Latina y el Caribe: Morbilidad, mortalidad y carga de la enfermedad. *Tómalo a pecho*, "Fundación Mexicana para la Salud A.C." Versión preliminar 1. Enero, 2009. www.tomateloapecho.org.mx (última visita Junio 2013).
- [6] Yang L. Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes., *Talanta* 2008; 74(5):1621-9
- [7] Zheng S, Liu M, Tai YC., Micro coulter counters with platinum black electroplated electrodes for human blood cell sensing., *Biomed Microdevices* 2008;10(2):221-31
- [8] Asphanini F, Zhang M., Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection., *Analyst* 2007; 132(9):835-41.
- [9] Jang LS, Wang MH., Microfluidic device for cell capture and impedance measurement., *Biomed Microdevices* 2007; 9(5):737-43.
- [10] Owino I, Omowunmi A, Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring., *Electroanalysis* 2005; 23:2101:13