

## BIOSENSOR DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA BASADO EN BIOIMPEDANCIA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

---

**César A. González<sup>1\*</sup>, Gisela Gutiérrez<sup>1</sup>, Virginia Sánchez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Díaz Mirón, s/n. Col. Casco de Santo Tomas, Ciudad de México, CDMX, C.P. 11300, México.

\*cgonzalezd@ipn.mx

González, C. A., Gutiérrez, G., & Sánchez, V. (2021). Biosensor de Células de Cáncer de Mama basado en Bioimpedancia y Nanopartículas Magnéticas. En E. San Martín-Martínez (Ed.), *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen III* (pp. 101-116). Barcelona, España: Omniascience.

## Resumen

El cáncer de mama (CaMa) es un problema de salud pública a nivel mundial, representa la neoplasia más frecuente en mujeres con una alta tasa de fallecimientos asociados a procesos metastásicos consecuente de un diagnóstico tardío. Detectar de manera temprana Células Tumorales Circulantes (CTC) puede representar la diferencia clínica valuable para el monitoreo de tratamientos, anticipación a recidivas y metástasis. La detección de CTC requiere tecnología y personal entrenado generalmente no disponible en regiones o comunidades de bajos recursos. En este capítulo se presentan los avances del desarrollo de un nuevo biosensor para detección de CTC características de CaMa, cuyo principio de funcionamiento se basa en mediciones de Espectroscopia de Bioimpedancia Eléctrica (EBiE) asistida con nanopartículas magnéticas (NpM) acopladas a un anticuerpo (Ab) monoclonal que reconoce proteínas de superficie. Se presenta la evaluación de tres proteínas: EpCAM, Muc1 y Her-2, en tres líneas celulares de CaMa: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, como posibles objetivos de nanosondas “Nanopartícula Magnética-Anticuerpo” (NpM-Ab). También se evalúa un dispositivo microfluídico que permite separar y anclar por técnica inmunomagnética células cancerígenas marcadas con un bioconjugado NpM-Ab, así como su detección por medio de EBiE. Los resultados muestran factibilidad técnica de identificar bajas concentraciones de células cancerígenas en solución.

**Palabras clave:** Biosensor, células cancerígenas, cáncer de mama, bioimpedancia, nanopartículas.

## 1. Introducción

En la actualidad, el cáncer de mama (CaMa) es considerado un problema de salud pública a nivel mundial, representa la neoplasia más frecuente en mujeres, con una alta tasa de fallecimientos asociados a procesos metastásicos consecuentes de un diagnóstico tardío de la enfermedad. Detectar de manera temprana Células TumORAles Circulantes (CTC) podría representar una oportunidad en la disminución de la alta mortalidad de éste padecimiento, pues permitiría al clínico monitorear la efectividad del tratamiento oncológico, anticiparse a la aparición de recidivas y prevenir metástasis. La detección de CTC requiere de tecnologías y personal de la salud con un alto grado de especialización y entrenamiento, los cuales en la mayoría de las veces no se encuentran disponibles en las regiones o comunidades de bajos recursos económicos. Se ha documentado en la literatura que durante el desarrollo del proceso metastásico, existe un incremento gradual de CTC, y su monitoreo podría representar un indicador de progresión o diseminación de la patología, coadyuvar en el pronóstico y modular el tratamiento [1, 2, 3]. La metástasis es la principal causa de morbimortalidad relacionada con el CaMa, algunos estudios muestran que el 30 % de las mujeres con CaMa primario albergan micro-metástasis en médula ósea y aproximadamente la mitad de pacientes con neoplasias localizadas y tratadas con resección quirúrgica tienen una posibilidad alta de sufrir recidiva, la cual intenta reducirse sometiendo a la paciente a un tratamiento oncológico (quimioterapia, radioterapia y otros) que no muchas veces es efectivo debido a que no se conoce detalladamente el estado de las CTC en el cuerpo [4, 5, 6, 7].

Las CTC son células cancerosas que se originan de tumores sólidos primarios/metastásicos y se encuentran en tránsito por el sistema circulatorio. La detección y caracterización de CTC nos permite tener un control del tratamiento oncológico del paciente con CaMa y definir si es efectivo. El conteo de las CTC está relacionado con pronóstico y supervivencia [8, 9]. La importancia del monitoreo de CTC se puede dimensionar en el hecho de que algunos grupos de investigación han definido a la muestra de sangre del paciente oncológico como “biopsia líquida en tiempo real” [10]. Sin embargo, el aislamiento de CTC es un desafío debido a su extrema rareza, hay aproximadamente entre 1 y 10 CTC por cada  $10^9$  del total de células sanguíneas [8, 9, 11].

El método ideal para la detección de CTC debe ser altamente sensible, reproducible y fácil de implementar en un entorno clínico. En la mayoría de los métodos existentes, se lleva a cabo una primera etapa de enriquecimiento para aumentar la sensibilidad del ensayo. Después se continúa con una etapa de detección que idealmente protegerá la integridad de las CTC [12]. Este es un proceso

bastante complicado, por lo que se precisa la búsqueda de nuevos métodos tecnológicos que nos permitan disuadir estos inconvenientes y poder tener tecnologías de alta calidad a un bajo costo y con fácil acceso [7, 11, 12].

En 2011, Hengyi Xu y su grupo demostraron la posibilidad de separar por técnicas inmunomagnéticas CTC de sangre total [13]. En 2007, Arun Han probó la viabilidad técnica de separar y diferenciar células tumorales mediante el análisis de las propiedades eléctricas características de células cancerígenas respecto a células normales. [14]. El grupo de investigadores que reporta el presente capítulo ha propuesto detectar CTC mediante el uso de Espectroscopia de Bioimpedancia Eléctrica (EBiE) asistida con nanopartículas magnéticas (NpM), las cuales son acopladas con anticuerpos (Ab) monoclonales dirigidos a antígenos en la superficie de la membrana celular [15]. El fundamento es unir nanosondas “Nanopartícula Magnética-Anticuerpo” (NpM-Ab) en la membrana de CTC, la separación y anclaje por técnica inmunomagnética en un arreglo de micro electrodos de superficie, para posteriormente realizar mediciones de EBiE como técnica de detección.

En este capítulo se presentan los avances del desarrollo de un nuevo biosensor de CTC cuyo principio de funcionamiento se basa en mediciones de EBiE, primero se describe la identificación y caracterización de la expresión génica de tres proteínas: molécula de adhesión epitelial (EpCAM), mucina 1 (Muc1) y receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2), en tres líneas celulares de CaMa (MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3) como posibles objetivos de nanosondas NpM-Ab, después se constata la presencia de la proteína blanco en las líneas celulares evaluadas por técnica de Citometría de Flujo (FACs), por último se presenta un primer ensayo de acoplamiento célula-nanosonda en las tres líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, aislamiento inmunomagnético de las mismas, así como medición por bioimpedancia eléctrica multifrecuencia. Los resultados sustentan la factibilidad de detectar células cancerígenas separadas por técnicas inmunomagnéticas, tal aproximación representa los fundamentos de funcionamiento de un posible biosensor de CTC para CaMa con fundamento en mediciones de EBiE asistidas con NpM.

## **2. Metodología**

### **2.1. Líneas celulares de CaMa**

Tres líneas comerciales de células de CaMa: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-RB-3 fueron incubadas en placas de cultivo de 100 mm las cuales se mantuvieron en las siguientes condiciones: 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

Las características y proporciones del medio de cultivo que se empleó fueron: Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM-F12) al 94 %. Penicilina/estreptomicina/amfotericina B (Invitrogen, U.S.A.) al 1 %. Suero Fetal Bovino (Invitrogen, U.S.A.) al 5 %. El monitoreo morfológico se realizó con el apoyo de un microscopio de contraste NIKON Eclipse TS100 equipado con una cámara digital Lumenera Scientific Infinity 1. Se realizaron cultivos independientes para cada línea celular, obteniendo tres replicas biológicas de cada cultivo.

## **2.2. Evaluación de la expresión relativa por RT-qPCR**

El análisis de la expresión se realizó por triplicado a partir de tres líneas celulares de CaMa: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, en ellas se evaluó la expresión relativa de genes: EpCAM, Muc1, y Her-2. Para evaluar la expresión génica, primero se realizó extracción de RNA con el método de trizol y posteriormente se cuantificó mediante espectrofotometría, enseguida el RNA se trató con DNasa (RQ1 RNase-free DNase Promega) para eliminar la contaminación del DNA genómico. Posteriormente se realizó la síntesis de DNA complementario utilizando el kit Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen), siguiendo las instrucciones señaladas por el fabricante. Para llevar a cabo la amplificación y su monitoreo se utilizó el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión 1.1, utilizando el Kit SYBR Green PCR Master Mix. (Applied Biosystems). El procedimiento para determinar la expresión relativa se basó en el método de doble delta Ct ( $\Delta\Delta CT$ ) con la fórmula aritmética  $2^{\Delta\Delta CT}$  [16], el análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01.

## **2.3. Citometría de flujo FACs**

El principio de citometría de flujo se basa en el registro tanto de excitación de un fluorocromo (acoplado a proteína) a cierta longitud de onda, así como el de emisión a una frecuencia dada. Esta técnica se utilizó para verificar la densidad de las diferentes proteínas de superficie de membrana: EpCAM, MUC-1, y HER-2, cuyos RNA mensajeros previamente habían sido cuantificados por RT-qPCR. Para ello, se utilizaron 3 anticuerpos monoclonales acoplados con diferentes fluorocromos dirigidos hacia dichas proteínas. Se realizaron 3 experimentos independientes para cada línea celular: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, donde fueron utilizadas un total de  $1 \times 10^6$  células/tubo con los 3 anticuerpos monoclonales conjugados: ficoeritrina (PE) anti-human CD227 (MUC-1, Biologend), alofocianina (APC, Biologend) anti-human CD326 (EpCAM

Biolegend), Brilliant Violet 421 anti-human CD340(HER-2) de Biolegend, todos previamente incubados durante 30 minutos en oscuridad. Posterior a esto se retiró el exceso de anticuerpo no acoplado con buffer de fosfatos (PBS) y se bloquearon las uniones inespecíficas con proteína sérica bovina (PBA) al 1 %, finalmente las células fueron fijadas con formaldehído al 1 % para su análisis en el equipo FACS Aria III.

#### **2.4. Funcionalización de nanosondas NpM-Ab**

En base a la cuantificación de las proteínas realizada con la citometría de flujo, se construyó un bioconjugado para cada línea celular con base a la proteína de superficie de membrana predominante observada. Por lo tanto, se generaron tres nanosondas resultantes de la unión de nanopartículas de ferrita-cobalto de 400 nm (nanoscreen MAG-ARA, Chemicell) con cada anticuerpo monoclonal como se menciona a continuación: EpCAM (CD326, Biolegend) para la línea MCF-7, MUC-1 (CD227 Biolegend) para la línea MDA-MB-231 y HER-2 (CD340 Biolegend) para la línea SK-BR-3. Para la bioconjugación de nanosondas se utilizó el método de carbodiimida, donde ésta reacciona con los grupos carboxilo-terminal de las nanopartículas y produce que, por un lado, se vuelvan altamente reactivos a los productos intermedios de O-asilourea, y por otro lado, también puedan crear enlaces covalentes con los grupos amino presentes en la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales, lo que resulta en la formación de una estable nanosonda NpM-Ab. (Protocolo A-10, Chemicell).

#### **2.5. Adaptación de sistema microfluídico e interfaz eléctrico-iónica para aislamiento y medición de células cancerígenas por EBiE**

El diseño a bloques del sistema consta de cuatro módulos: 1.- Bomba de infusión microfluídica; 2.- Interfaz eléctrico-iónica; 3.-Módulo Sciospec™; y 4.- La computadora personal (PC). La Bomba de infusión microfluídica tiene adaptada una jeringa de insulina (1 mL), la cual realiza la infusión controlada de los analitos hacia la cámara del módulo interfaz eléctrico-iónica por medio de un tubo-capilar. La interfaz eléctrico-iónica representa el punto principal del experimento, ya que es donde se realiza el aislamiento de células cancerígenas y medición de bioimpedancia a través de electrodos de oro. El módulo Sciospec™ es el instrumento que nos permite la interacción con los electrodos de la Interfaz, es decir

inyecta la diferencia de potencial y a la vez mide la corriente para estimar la impedancia del sistema. El módulo de la PC nos permite programar el instrumento Sciospec™ y almacenamiento de los datos.

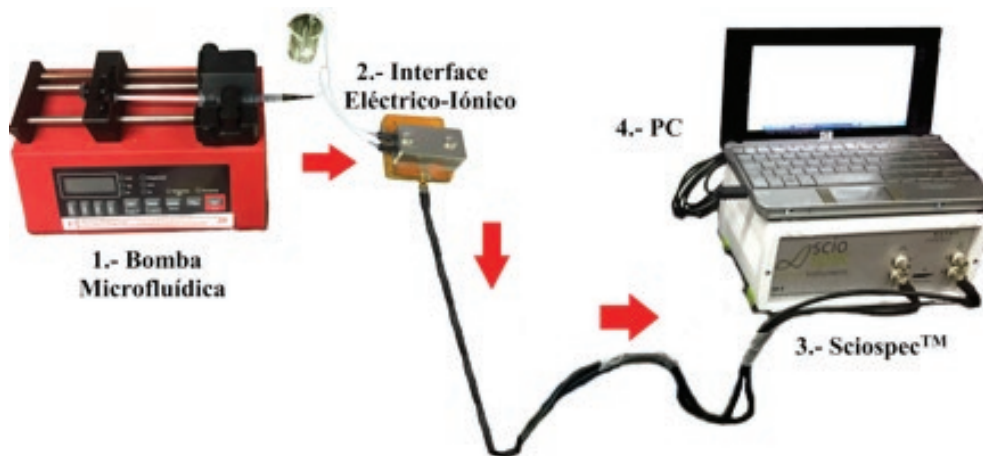


Figura 1. Esquema de la apariencia física de los módulos del sistema microfluidico e interfaz eléctrico-iónica para aislamiento y medición de células cancerígenas por EbiE.

Para el efecto se empleó un dispositivo microfluidico QFM 401™, que consiste fundamentalmente en una cámara hermética en la que se puede disponer de micro-electrodos de oro embebidos en un cristal de cuarzo, a través de dichos electrodos se realizaron mediciones de bioimpedancia multifrecuencia. Se adaptaron dos microtubos-capilares, uno a la entrada y otro a la salida microfluidica del QFM 401™. Se adaptó una base para disponer un imán de neodimio en la parte inferior de la cámara donde está el cuarzo y los electrodos para que así este lograra mantener las nanopartículas ferromagnéticas adheridas a células cancerígenas (aislamiento inmunomagnético). El módulo de lectura de impedancia trae consigo el software Sciospec™, el cual permitió la comunicación con la PC a través de un puerto USB, lo cual proporcionó la opción de hacer un protocolo de medición, logrando con esto un mapeo en 126 frecuencias logarítmicamente espaciadas en un rango de 100 Hz a 1 MHz. Las mediciones se realizaron por triplicado. La técnica demanda la identificación de marcadores moleculares para promover una reacción antígeno-anticuerpo, la cual, provoca que se adhieran las células cancerígenas a las nanopartículas dentro del bioconjugado y con esto lograr el aislamiento inmunomagnético, es decir, poder atrapar las células ancladas a las nanopartículas con el imán en la cámara del dispositivo microfluidico y a así medir su impedancia. [17, 18].

## 2.6. Diseño del experimento de evaluación y mediciones EBiE

Las tres líneas celulares fueron cuantificadas y llevadas por separado a una muestra con una concentración final de 50,000 células, las cuales fueron incubadas con la dosis correspondiente de bioconjugado de acuerdo a su proteína de superficie predominante, posteriormente se realizaron diluciones para obtener 3 muestras por triplicado con diferente concentración de células: 5000, 500, y 50 en 500  $\mu$ L de PBS. Con el objetivo de evidenciar cambios en la bioimpedancia eléctrica como una función del aislamiento y anclaje de células cancerígenas en la interfaz eléctrico-iónica, se diseñó un experimento en dos ensayos independientes a fin de generar las siguientes condiciones: A) Células Cancerígenas- infusión y anclaje magnético de células cancerígenas incubadas con nanosondas, y B) Control Negativo - infusión y anclaje magnético de nanosondas sin la presencia de células cancerígenas (Figura 2). Ambas condiciones se infundieron de manera independiente a través de la bomba NE-1002X utilizando jeringas de 1 mL con 500  $\mu$ L de bioconjugado en un tiempo de 15 minutos. Se adquirieron datos en el sistema de medición de impedancia ScioSpec-ISX3. Al terminar la medición entre cada condición se realizó una limpieza del sistema infundiendo 500  $\mu$ L de PBS.

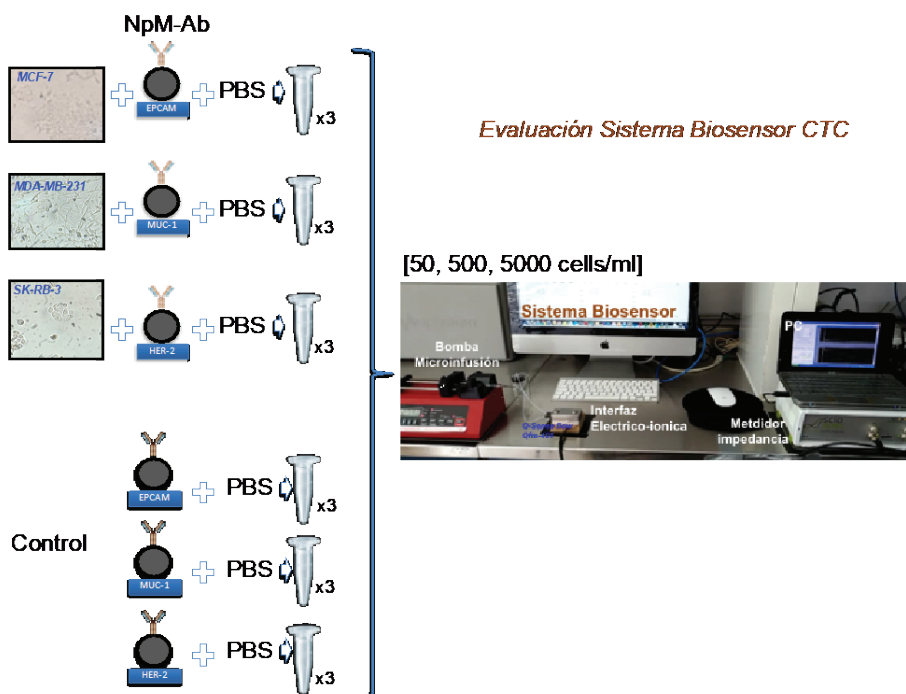


Figura 2. Diseño experimental de evaluación y mediciones EBiE.



### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. *Expresión diferenciada RT-qPCR y FACs*

Células viables y estructuras morfológicas diferenciadas en las tres líneas celulares MCF-7, MDA-231 y SK-RB-3 se pueden observar en la Figura 3. Los resultados de RT-qPCR permitieron dilucidar un esquema representativo de la expresión génica de Her-2, EpCAM y Muc1, en las tres líneas celulares evaluadas. Se observó un nivel de expresión de Her-2 de 1.33, 1.05 y 4.18 en SK-BR-3, MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente. Con respecto a EpCAM se detectaron valores de expresión de 1.08, 0.97 y 532.82 para SK-BR-3, MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente. En relación a Muc1 los valores de expresión detectados fueron 1.12, 5.20 y 74.35 en SK-BR-3, MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente. En el mismo esquema se presentan los hallazgos por FACs en el gráfico correspondiente a la intensidad media de fluorescencia para cada proteína de superficie en cada una de las tres líneas celulares, observando un predominio de la proteína HER-2 en la línea celular SK-RB-3, EpCAM en MCF-7, y finalmente la proteína MUC-1 en la línea celular MDA-MB-231.

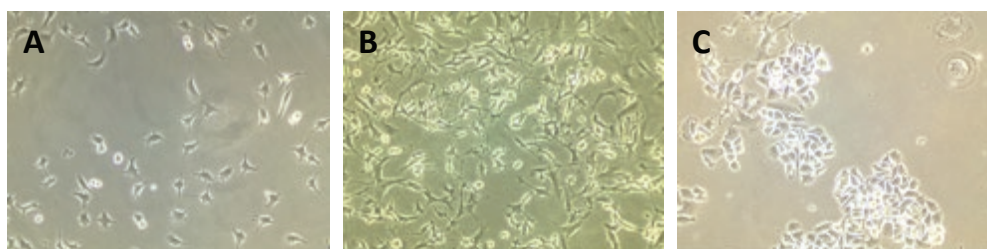


Figura 3. Líneas celulares de CaMa: A) MCF-7, B) MDA-231 y C) SK-RB-3. (Aumento 10X).

De la Figura 4, es posible caracterizar patrones de expresión génica y proteica bien diferenciadas en las tres líneas celulares, tales hallazgos son coherentes con estrategias y técnicas actualmente en desarrollo para detectar CTC de origen epitelial en función de sus biomarcadores y proteínas de superficie predominantes según el estadio del CaMa. En principio predomina EpCAM en la línea celular de MCF-7, MUC-1 en MDA-MB-231 y HER-2 en SK-RB-3, tal patrón se explica atendiendo a las características de cada línea celular que mapean o representan un estadio diferente en el CaMa, MCF-7 representa el estadio más temprano, MDA-MB-231 un intermedio y SK-RB-3 el más tardío, entre más avanzado el

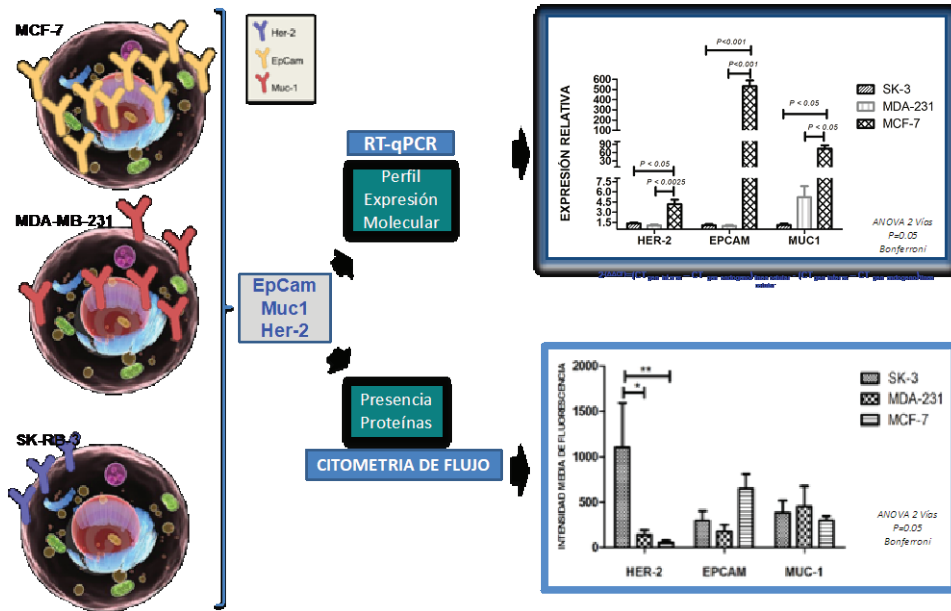


Figura 4. Expresión génica y proteica de Her-2, EpCAM y Muc1 en líneas celulares de CaMa.

estadio disminuye la producción de proteínas relacionadas con receptores de adhesión celular características de origen epitelial como lo es EpCAM, lo que es compatible con un proceso de transición epitelio-mesénquimal que da origen a metástasis, tales observaciones coinciden con lo reportado por otros autores y nuestro grupo [19, 20, 21].

En la Figura 5, se observa los diferentes espectros de impedancia medidos en las tres líneas celulares evaluadas, y se comparan con los espectros de impedancia medidos en ausencia de células cancerígenas. Los gráficos muestran los espectros de bioimpedancia en magnitud y fase respectivamente, para una concentración de 50 células/500  $\mu$ L. El espectro de magnitud muestra sensibilidad significativa a bajas frecuencias para discriminar la presencia de células cancerígenas respecto a la condición en la que solo se infundió el bioconjugado. Las concentraciones a 500 y 5000 células/500  $\mu$ L no mostraron sensibilidad, por simplicidad tales resultados no se muestran. La Figura 6 muestra un zoom de los espectros de la magnitud de impedancia para el caso de células SK-BR-3 a una concentración de 50 células/500  $\mu$ L para evidenciar la sensibilidad del sistema en la detección de células cancerígenas a bajas concentraciones [21].

Es evidente que a bajas concentraciones celulares y por tanto de nanopartículas con propiedades magnéticas (50 células/500  $\mu\text{L}$ ), es posible la identificación de células tumorales a través de mediciones de bioimpedancia ya que permiten discriminar entre la ausencia y presencia de las mismas, sin embargo a mayores concentraciones no se presenta sensibilidad suficiente para discriminar entre la presencia de células cancerígenas (gráficos no mostrados), tal comportamiento estimamos se explica porque a mayores concentraciones de nanopartículas magnéticas emerge el

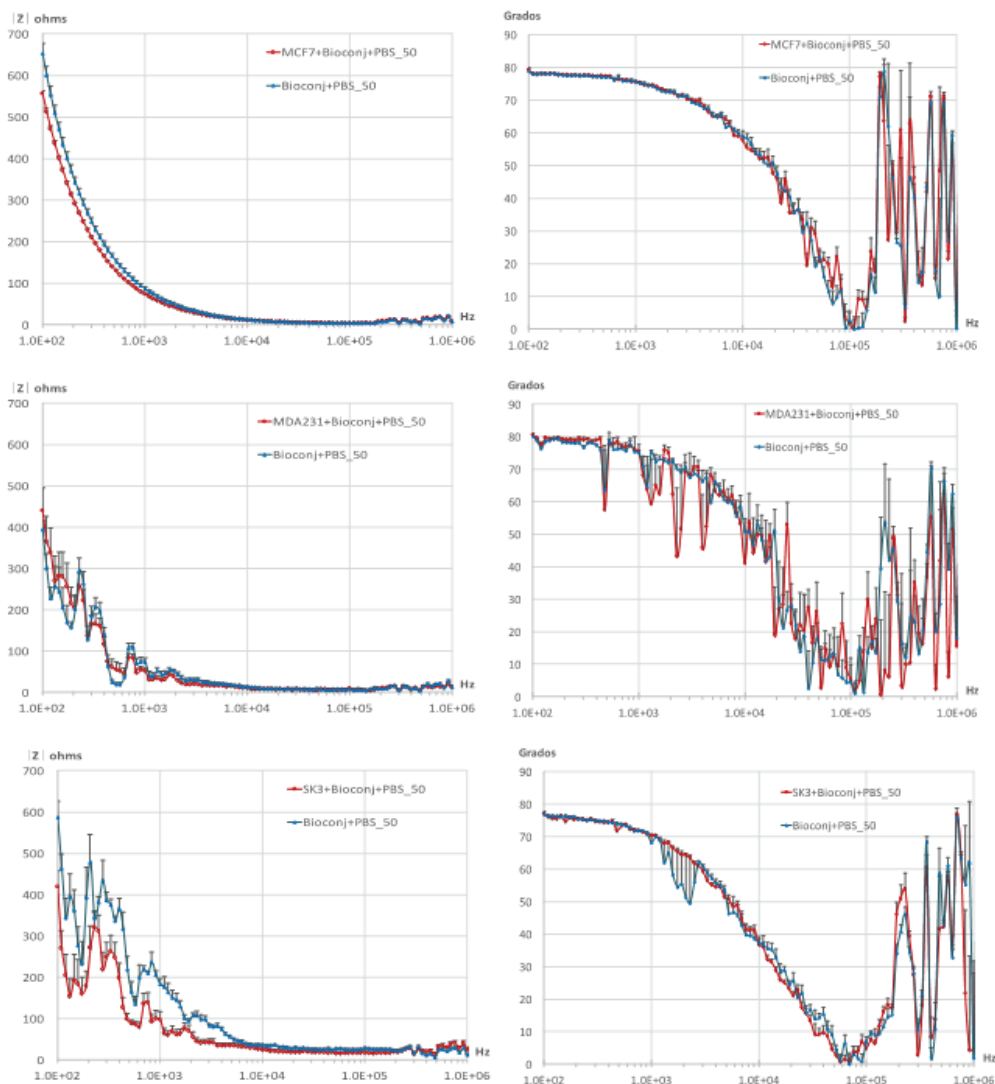


Figura 5. Mediciones de bioimpedancia en las líneas celulares cancerígenas MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3.

efecto de percolación, es decir el medio se satura con óxido de hierro y por tanto se vuelve muy conductivo, tal incremento de conductividad volumétrica predomina sobre el efecto de alta impedancia de las células cancerígenas. La teoría del efecto de percolación indica que en el sistema las propiedades conductivas del analito siguen las leyes de la potencia, es decir: donde,  $\rho$  es la concentración del material conductor, en este caso las nanopartículas magnéticas,  $\rho_c$  representa su concentración en el umbral de percolación y  $t$  un exponencial crítico asociado a la conductividad [22], lo cual en resumen nos dice que si saturamos de alguna manera el sistema con NpM llegará un punto en el cual estas se conviertan en conductor. Así, los hallazgos nos permiten inferir que la técnica planteada tiene viabilidad técnica para detectar pequeñas concentraciones de células cancerígenas aisladas por técnica inmunomagnética, y que la limitación expresa es que las concentraciones de NpM empleadas no excedan el límite de percolación.

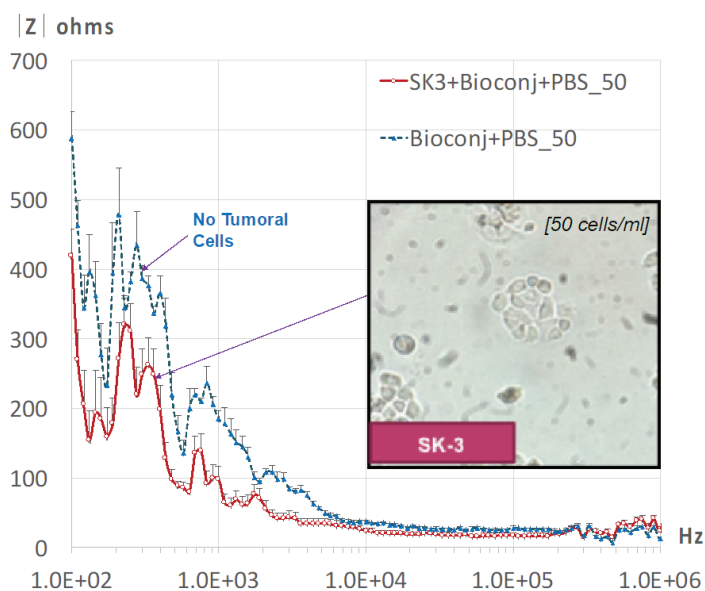


Figura. 6. Zoom del espectro de la magnitud de impedancia de células SK-BR-3 (50 células/500  $\mu$ L).

Un análisis de componentes principales para los datos de bioimpedancia en magnitud ( $z$ ), fase y pendientes ( $m$ ) de los espectros observados [23], permitió además identificar frecuencias específicas que mejor sensibilidad tienen para detectar y diferenciar células cancerígenas de las tres líneas evaluadas. Una representación tridimensional de componentes principales permite observar la posibilidad de clasificar el estadio de CaMa que representan los diferentes tipos de células cancerígenas a bajas concentraciones (Figura 7) [23].

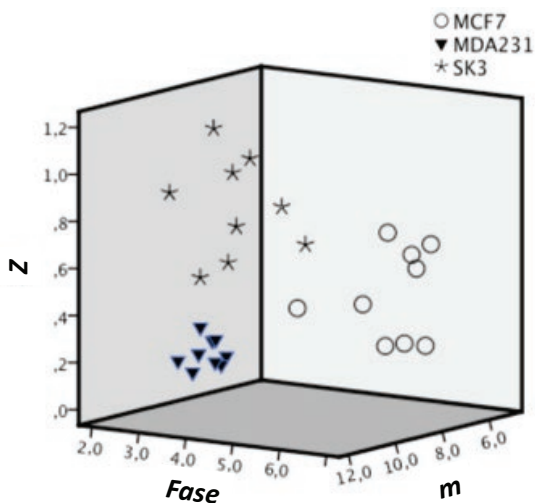


Figura. 7. Representación tridimensional de componentes principales para detección y clasificación de diferentes tipos de células de CaMa a bajas concentraciones.

#### 4. Conclusiones

Los resultados muestran la factibilidad técnica de identificar bajas concentraciones de células cancerígenas acopladas a nanopartículas con propiedades magnéticas dirigidas a proteínas de superficie de membrana celular. La implementación de un pequeño sistema como biosensor para el aislamiento y detección de células cancerígenas de mama a través del empleo de un dispositivo microfluídico y mediciones de EBiE asistida con nanopartículas magnéticas resultó factible a bajas concentraciones celulares y nanopartículas magnéticas. Mediciones de la magnitud de la bioimpedancia a bajas frecuencias parecen ofrecer la mejor sensibilidad del sistema. Los resultados indican que la detección de CTC a través de la técnica propuesta es viable y permiten sustentar el principio de funcionamiento de un biosensor para detección de CTC basado en mediciones EBIE asistida con nanotecnología.

#### Agradecimientos

Desarrollo tecnológico apoyado por CONACYT a través del proyecto CB2012-180536. La técnica de detección de células cancerígenas a través de mediciones de bioimpedancia eléctrica está sustentada en solicitud de patente: González CA 2017 MX/a/2017/010319.

## Bibliografía

1. Ebeed, S. A., Abd El-Moneim, N. A., Saad, A., Zaher, E. R. E., Yassin, O. G., & Khamis, S. A. (2012). Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in female breast cancer patients. *Alexandria Journal of Medicine*, 48, 197-206.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.02.005>
2. Morán Mendoza, E., Rodríguez Gallegos, J., Lara Lozano, M., Piña Leyva, C., Thompson Bonilla, M. R., Rosas Sandoval, G. et al. (2014). Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. *Rev Esp Méd Quir*, 19, 45-51.
3. Giuliano, M., Giordano, A., Jackson, S., De Giorgi, U., Mego, M., Cohen, E. N. et al. (2014). Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Research*, 16, 440.  
<https://doi.org/10.1186/s13058-014-0440-8>
4. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal Clinicians*, 61(2), 69-90.  
<https://doi.org/10.3322/caac.20107>
5. IARC (2012). *Cancertoday. GLOBOCAN* [base de datos y estadística del cáncer en el mundo]. Francia. [Fecha de acceso 20 de Junio del 2020].  
<https://gco.iarc.fr/today/home>
6. López-Carrillo, L., Torres-Sánchez, L., Blanco-Muñoz, J., Hernández-Ramírez, R. U., Knaul, F. M. (2014). Utilización correcta de las técnicas de detección de cáncer de mama en las mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, 56(5), 538-546.  
<https://doi.org/10.21149/spm.v56i5.7711>
7. Sua, L. F., Silva, N. M., Vidaurreta, M., Maestro, M. L., Fernández, S. R., Veganzones, S. et al. (2011). Detección inmunomagnética de células tumorales circulantes en cáncer de mama metastásico: nuevas tecnologías'. *Revista Colombiana de Cancerología*, 15(2), 104-109.  
[https://doi.org/10.1016/S0123-9015\(11\)70073-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9015(11)70073-7)
8. Markou, A., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2011). Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer by a Liquid Bead Array Hybridization Assay. *Clinical Chemistry*, 57, 3421-3430.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.154328>
9. Sua, L. F., Silva, N. M., Vidaurreta, M., Maestro, M. L., Fernández, S. R., Veganzones, S. (2011). Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales. *Rev Lab Clin.*, 4, 163-169.  
<https://doi.org/10.1016/j.labcli.2010.11.007>

10. Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2013). Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry*, 59, 110–118.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>
11. Adams, D. L., Stefansson, S., Haudenschild, C., Martin, S. S., Charpentier, M., Chumsri, S. et al. (2015). Cytometric Characterization of Circulating Tumor Cells Captured by Microfiltration and Their Correlation to the CellSearchVR CTC Test. *Cytometry Part A*, 87A, 137-144.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22613>
12. Gerges, N., Rak, J., & Jabado, N. (2010). New technologies for the detection of circulation tumor cells. *British Medical Bulletin*, 94, 49-64.  
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldq011>
13. Xu, H., Aguilar, Z. P., Yang, L., Kuang, M., Duan, H., Xiong, H. et al. (2011). Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood. *Biomaterials*, 32(36), 9758–9765, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.076>
14. Han, A., Yang, L., & Frazier, A. B. (2007). Quantification of the Heterogeneity in Breast Cancer Cell Lines Using Whole-Cell Impedance Spectroscopy. *Clin Cancer Res*, 13(1), 139-143.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1346>
15. Silva, J. G., Cárdenas, R. A., Quiróz, A., Sánchez, V., Lozano, L. M., Pérez, N. M. et al. (2014). Impedance Spectroscopy assisted by Magnetic Nanoparticles as Potential Biosensor Principle of Breast Cancer Cells in Suspension?. *Physiological Measurement*, México.  
<https://doi.org/10.1088/0967-3334/35/6/931>
16. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods*, 25, 402-408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
17. Huerta-Núñez, L. F. E., Villanueva-Lopez, G. C., Morales-Guadarrama, A., Soto, S., López, J., Silva, J. G. et al. (2016). Assessment of the systemic distribution of a bioconjugated anti-Her2 magnetic nanoparticle in a breast cancer model by means of magnetic resonance imaging. *Journal of Nanoparticle Research*, 18, 284.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-016-3594-8>
18. Chemicell. *Covalent Coupling Procedure on fluidMAG-ARA by Carbodiimide Method*. Chemicell GmbH • Coupling Protocol • fluidM G-ARA 1.1.
19. Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Yusuf A. Hannun, Y. A. et al. (2004). EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer Research*, 64, 5818-5824.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0754>

20. Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T. M., Krahn, T. et al. (2012). Circulating tumour cells escape from EpCAM based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12, 178.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-178>
21. Huerta-Nuñez, L. F. E., Gutierrez-Iglesias, G., Martinez-Cuazitl A., Mata-Miranda, M. M., Alvarez-Jiménez, V. D., Sánchez-Monroy, V. et al. (2019). A biosensor capable of identifying low quantities of breast cancer cells by electrical impedance spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42776-9>
22. Concha, A., Quijada, R., Soto, R., Rica, S., Pilleux, M. E. (2002). Percolación eléctrica en matrices 2-D y 3-D de materiales compuestos aislantes con una fase conductora. *CONAMET/SAM – Simposio Materia*, 747-752.
23. González-Díaz, C. A., & Golberg, A. (2020). Sensitivity analysis of electrical bioimpedance patterns of breast cancer cells labeled with magnetic nanoparticles: forming the foundation for a biosensor of circulating tumor. *Physiol Meas.*, 41(6), 064001.  
<https://doi.org/10.1088/1361-6579/ab9377>