

Medios Extracelulares Artificiales en la Comprensión de las Propiedades Eléctricas de Células
Cervicales Neoplásicas en Suspensión

Angie Nathalia Pinzón Sarmiento

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora

Sandra Milena Pinto Bohórquez

Doctora en Química

Codirector

David Alejandro Miranda Mercado

Doctor en Química Aplicada

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

Agradecimientos

A mi directora, Sandra Pinto, por su tiempo, paciencia y dedicación para guiarme durante la realización de este proyecto.

A mi codirector, David Miranda, por sus valiosos e innumerables aportes y por tener siempre la mejor actitud para orientarme.

A la profesora Sandra Corzo, por todas sus contribuciones y explicaciones.

A mis padres y mi hermano, por ser mi fuente de motivación e inspiración, por su dedicación, cariño, comprensión y apoyo incondicional. Estoy infinitamente agradecida por tenerlos a mi lado. A ellos les debo todos mis logros.

A mis amigas: Estefani, Dani chiquita y Dani alta, por estar siempre presentes, por darme ánimo cuando lo necesito y por alegrar mis días.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	10
1. Objetivos.....	12
1.1 Objetivo General.....	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Marco de referencia	13
2.1 Cáncer de cuello uterino en cifras.....	13
2.2 Generalidades del CCU.....	13
2.3 Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIE).....	15
2.4 Propiedades eléctricas asociadas al desarrollo de anomalías en CCU.....	20
2.5 Teoría del medio efectivo	20
3. Metodología	21
3.1 Reactivos.....	21
3.2 Preparación del medio extracelular artificial	21
3.3 Ajuste del protocolo de medición potencioestático	22
3.4 Comparación entre la impedancia medida en un sistema tetrapolar y de tres electrodos.....	23
3.5 Medición de espectros de impedancia en tres puntas de células biológicas HeLa	24
3.6 Análisis de datos	24
4. Resultados y discusión.....	25
4.1 Diagramas de radar con valores de impedancia en cuatro puntas	26
4.2 Validación del algoritmo de transformación.....	29
4.2.1 Determinación de la cantidad de células HeLa adheridas a la superficie de medición	29

4.2.2 Análisis de los gráficos de radar de los modelos artificial y biológico de células HeLa medidos en tres puntas	30
4.3 Análisis del comportamiento capacitivo de los modelos artificial y biológico de células HeLa medidas en tres puntas	33
4.4 Relación entre los espectros de capacitancia de PBS y los modelos artificial y biológico de células HeLa.....	36
4.5 Análisis bioquímico de cáncer de cuello uterino y su relación con los cambios en las propiedades eléctricas de células cervicales	38
4.5.1 Cambios en las concentraciones iónicas	38
4.5.2 Alteraciones en la regulación de calcio (Ca^{2+}) celular.....	40
4.5.3 Alteraciones en la regulación de potasio (K^+) celular.....	45
4.5.4 Alteraciones en la regulación de sodio (Na^+) celular.....	50
5. Conclusiones	53
6. Recomendaciones	55
Referencias Bibliográficas	56
Apéndice A	65

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Variaciones en las concentraciones iónicas de los modelos artificiales de estudio.....	38
Tabla 2. Proteínas implicadas en la señalización de Ca^{2+} y su relación con el cáncer cervical....	45
Tabla 3. Proteínas implicadas en la señalización de K^+ y su relación con el cáncer cervical.	49
Tabla 4. Proteínas implicadas en la señalización de Na^+ y su relación con el cáncer cervical.....	52

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Anatomía del cuello uterino.	14
Figura 2. Electrodo serigrafado de oro.	17
Figura 3. Esquema simplificado de un potencióstato con conexión a tres puntas.	18
Figura 4. Esquema de una medición galvanostática en un sistema tetrapolar.	19
Figura 5. Montaje experimental para medir los espectros de impedancia eléctrica.	23
Figura 6. Comparación entre los gráficos de radar del modelo artificial (A) y biológico (B) de la anomalía HSIL.	26
Figura 7. Gráficos de radar del modelo artificial (A) y biológico (B) de células HeLa.	28
Figura 8. Comparación entre los gráficos de radar del M.B. y M.A. de células HeLa.	28
Figura 9. Representación gráfica del área bajo la curva para el modelo artificial M.A. (A) y biológico M.B. (B) de células HeLa.	31
Figura 10. Comparación entre los gráficos de radar del M.B. y M.A. de células HeLa.	31
Figura 11. Comparación entre los espectros de la parte real (A) e imaginaria (B) de la impedancia eléctrica del M.B. y el M.A. de células HeLa.	32
Figura 12. Comparación entre los gráficos de parte real (A) e imaginaria (B) de la capacitancia del M.B. y el M.A. de células HeLa.	34
Figura 13. Diagrama de Nyquist de capacitancia.	35
Figura 14. Comparación entre los gráficos de parte real (A) e imaginaria (B) de la capacitancia de: PBS, M.B. y M.A. de células HeLa.	36
Figura 15. Diagrama de Nyquist de capacitancia para: PBS, M.B. y M.A. de células HeLa.	37

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. Implementación del algoritmo de transformación de los datos de impedancia..... 65

Resumen

Título: Medios Extracelulares Artificiales en la Comprensión de las Propiedades Eléctricas de Células Cervicales Neoplásicas en Suspensión*

Autora: Angie Nathalia Pinzón Sarmiento**

Palabras Clave: Anomalías Bioquímicas, Cáncer Cervical, Espectroscopia de Impedancia Eléctrica, Propiedades Eléctricas.

Descripción: El cáncer de cuello uterino es una enfermedad muy frecuente y causante de un gran número de muertes en mujeres alrededor del mundo; esto hace necesario mejorar los programas de prevención y facilitar el acceso de las mujeres a pruebas de tamizaje confiables para detectar a tiempo la enfermedad. Diversas investigaciones han propuesto la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) como una técnica alternativa de detección, la cual permite analizar alteraciones en el comportamiento eléctrico de las células cervicales que pueden estar relacionadas con el desarrollo del cáncer. En este estudio se empleó la EIE para analizar la respuesta eléctrica de dos medios electrolíticos artificiales que simulan la anomalía cervical HSIL y un modelo de carcinoma cervical HeLa. Para la toma de datos se estableció un protocolo de medición potencioestático con conexión a tres puntas usando electrodos serigrafados de oro y una celda de resina, el cual mostró buena reproducibilidad de las medidas efectuadas. Los espectros de la parte real de la impedancia fueron analizados por medio de gráficos de radar y comparados con los datos de sus respectivos medios biológicos reales. Los resultados obtenidos sugieren una buena correlación entre los modelos biológicos y sus respectivos modelos artificiales, por ende, el análisis de la forma y el área de los espectros de radar de células cervicales en suspensión permite diferenciar anomalías o incluso cáncer cervical.

* Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Sandra Milena Pinto Bohórquez. Doctora en Química. Codirector: David Alejandro Miranda Mercado. Doctor en Química Aplicada.

Abstract

Title: Artificial Extracellular Media in the Understanding of the Electrical Properties of Neoplastic Cervical Cells in Suspension*

Author(s): Angie Nathalia Pinzón Sarmiento**

Key Words: Biochemical Abnormalities, Cervical Cancer, Electrical Impedance Spectroscopy, Electrical Properties.

Description: Cervical cancer is a very frequent disease and causes a large number of deaths in women around the world; this makes it necessary to improve prevention programs and facilitate women's access to reliable screening tests to detect the disease in time. Various investigations have proposed electrical impedance spectroscopy (EIS) as an alternative detection technique, which allows analyzing alterations in the electrical behavior of cervical cells that may be related to the development of cancer. In this study, EIS was used to analyze the electrical response of two artificial electrolyte media that simulate the cervical anomaly HSIL and a model of cervical carcinoma HeLa. For data collection, a potentiostatic measurement protocol was established with a three-point connection using gold screen-printed electrodes and a resin cell, which showed good reproducibility of the measurements made. The spectra of the real part of the impedance were analyzed by means of radar graphs and compared with the data of their respective real biological media. The results obtained suggest a good correlation between the biological models and their respective artificial models, therefore, the analysis of the shape and area of the radar spectra of cervical cells in suspension allows differentiation of abnormalities or even cervical cancer.

* Degree Work

**Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Sandra Milena Pinto Bohórquez. PhD in Chemistry. Codirector: David Alejandro Miranda Mercado. PhD in Applied Chemistry.

Introducción

Actualmente la prueba convencional para detectar anomalías precursoras de cáncer de cuello uterino es la citología cervicouterina y a pesar de que este examen ha logrado disminuir el impacto de la enfermedad, las tasas de incidencia y mortalidad especialmente en países en desarrollo siguen siendo altas debido a problemas logísticos y económicos para implementar programas preventivos. Por esto, se han investigado métodos alternativos que reduzcan los costos de ejecución y presenten una buena sensibilidad, entre ellos la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) (B. Brown, Milnes, Abdul, & Tidy, 2005; Das, Das, & Chatterjee, 2015). Esta técnica permite estudiar alteraciones en las propiedades eléctricas de células cervicales que pueden estar relacionadas con el desarrollo de neoplasias.

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta investigación se propuso la siguiente hipótesis: es posible obtener espectros de impedancia eléctrica de medios extracelulares artificiales que simulen alteraciones en las propiedades eléctricas de células cervicales en suspensión y dichas alteraciones están relacionadas con las anomalías bioquímicas que se presentan durante el proceso de transformación de células normales a células cancerosas. Para validar esta hipótesis, se asumieron los siguientes argumentos. Primero, es posible simular las alteraciones en las propiedades eléctricas de células cervicales a través de medios electrolíticos artificiales (Pinto, 2020). Segundo, las propiedades eléctricas se pueden medir por espectroscopia de impedancia eléctrica (ABDUL, BROWN, MILNES, & TIDY, 2006; Das et al., 2015; D. Miranda, Vargas, & Zamora, 2010). Tercero, el diagrama de radar de la parte real de la impedancia describe las propiedades eléctricas del medio (Pinto, 2020). Cuarto, las anomalías bioquímicas de las células cervicales neoplásicas alteran sus concentraciones iónicas normales de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y Cl^- y con ello sus propiedades

eléctricas (Y. F. Chen & Shen, 2022; Lei et al., 2022; Mijatovic, Dufrasne, & Kiss, 2012; Xia et al., 2023). En esta investigación se seleccionaron medidas con electrodos serigrafiados en tres puntas, en contraste con las medidas de cuatro puntas, en configuración van der Pauw, realizadas por Pinto (Pinto, 2020). Con el objetivo de comparar las medidas de tres y cuatro puntas, se utilizó un algoritmo de transformación, el cual se validó con medidas en PBS y células HeLa. Las alteraciones bioquímicas presentes en lesiones escamosas intraepiteliales de grado alto (HSIL) y el modelo de carcinoma cervical HeLa fueron simuladas con medios extracelulares artificiales obtenidos a partir de soluciones electrolíticas, cuyas propiedades eléctricas fueron representadas por diagramas de radar de la parte real del espectro de impedancia eléctrica. En los diagramas de radar obtenidos se observó que los medios artificiales lograron simular las propiedades eléctricas de células HSIL e HeLa y su respuesta eléctrica fue relacionado con anomalías bioquímicas precursoras de neoplasias en células cervicales. La presentación del trabajo de investigación realizado se distribuye en cinco capítulos. El primer capítulo presenta los objetivos propuestos para el desarrollo de la investigación. El segundo capítulo aborda la revisión conceptual sobre el cáncer de cuello uterino y la espectroscopia de impedancia eléctrica como una posible técnica de detección. También se presenta la relación entre las propiedades eléctricas de las células transformadas y las anomalías bioquímicas precursoras de cáncer. El tercer capítulo describe la metodología implementada para preparar los medios extracelulares artificiales y medir sus espectros de impedancia eléctrica. El cuarto capítulo reporta los gráficos de impedancia eléctrica medidos y el análisis del comportamiento eléctrico observado. También se analizan las anomalías bioquímicas que alteran el equilibrio iónico y producen cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales. Por último, el capítulo quinto presenta las conclusiones obtenidas del estudio.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar medios extracelulares artificiales para describir cambios en las propiedades eléctricas debidas a anomalías bioquímicas precursoras de cáncer de cuello uterino.

1.2 Objetivos Específicos

Preparar medios extracelulares artificiales a partir de soluciones electrolíticas que simulen anomalías bioquímicas de acuerdo con los resultados reportados en la tesis doctoral (Pinto, 2020).

Obtener gráficos de radar de la parte real resistiva de la impedancia eléctrica con las anomalías: HeLa y HSIL.

Describir las propiedades eléctricas observadas en términos de las concentraciones iónicas de los medios extracelulares.

2. Marco de referencia

2.1 Cáncer de cuello uterino en cifras

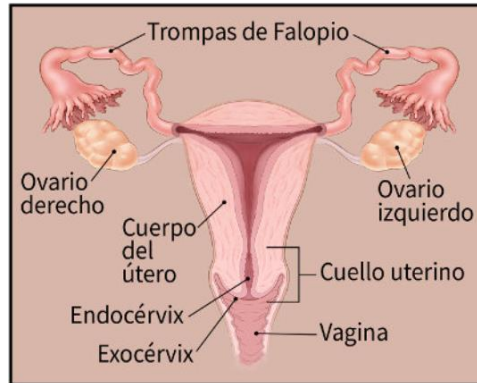
El cáncer de cuello uterino (CCU) es uno de los tipos de cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres en todo el mundo. De acuerdo con el último reporte disponible del Observatorio Mundial de Cáncer, en el año 2020 fue el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres a nivel global y también fue el cuarto con mayor número de defunciones, con un total de 604.127 (6.5 %) y 341.831 (7.7 %) casos, respectivamente. Asimismo, en Colombia se registraron 4.742 (4.2 %) casos nuevos y 2.490 (8.9 %) muertes durante el mismo año (Globocan, 2021) y en el departamento de Santander, las estadísticas más recientes reportaron 130 casos diagnosticados durante el 2019 y en el año 2020 hasta el mes de octubre se notificaron 103 casos (Gobernación de Santander, 2020).

2.2 Generalidades del CCU

El cuello uterino o cérvix es la parte fibromuscular del útero, une el cuerpo del útero con la vagina como se ilustra en la figura 1. Mide aproximadamente 4 cm de largo y 3 cm de diámetro. Se divide en dos regiones: la más cercana al cuerpo del útero es el endocérvix, cubierto de células glandulares y la parte más próxima a la vagina es el ectocérvix o exocérvix, revestido por células escamosas. El punto en el que estos dos tipos de células convergen se conoce como zona de transformación y es allí en donde inician las transformaciones neoplásicas malignas (Prendiville & Sankaranarayanan, 2017).

Figura 1.

Anatomía del cuello uterino.



Nota. Tomado de La Sociedad Americana Contra el Cáncer, 2020.

El cáncer cervical inicia cuando las células que cubren el cuello uterino comienzan a crecer descontroladamente. Los dos tipos más comunes de esta enfermedad son: el adenocarcinoma, que se origina en las células glandulares y el carcinoma de células escamosas, siendo este último el más frecuente (Sociedad Americana Contra el Cáncer, 2020).

Este tipo de cáncer es causado por la infección prolongada con los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Aunque, la mayoría de las infecciones por el VPH son combatidas por el sistema inmune sin necesidad de un tratamiento médico, ciertos factores de riesgo favorecen la persistencia de la infección ocasionando una neoplasia cervical intraepitelial que puede progresar en carcinoma invasivo, entre ellos: tener múltiples parejas sexuales o pareja sexual de alto riesgo, inmunosupresión, tabaquismo e inasistencia a exámenes de detección de lesiones precursoras de cáncer (Stumbar, Stevens, & Feld, 2019).

Actualmente, la prueba de tamizaje para cáncer cervical más empleada es la citología cervicovaginal o prueba de Papanicolaou. La cual consiste en la obtención de una muestra de células cervicales mediante un ligero raspado para su posterior estudio. Las características de las

células analizadas se describen mediante el sistema Bethesda, el cual clasifica las anomalías celulares en las categorías: células escamosas atípicas de significado indeterminado (*ASCUS*), células glandulares atípicas (*AGC*), lesiones escamosas intraepiteliales de grado bajo (*LSIL*), células escamosas atípicas, no se puede descartar HSIL (*ASC-H*), lesiones escamosas intraepiteliales de grado alto (*HSIL*) y adenocarcinoma in situ (*AIS*). Sin embargo, este examen no es muy sensible ya que presenta altos resultados de falsos negativos debido a errores en la recolección de las células y en la preparación de la lámina, por ejemplo, si la lesión no está incluida en la muestra o por la presencia de pocas células anormales. Otra limitación, consiste en que la muestra debe ser examinada al microscopio, con lo cual es posible pasar por alto ciertas anomalías presentes (Amaya & Restrepo, 2005; Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Para mejorar la calidad en las pruebas de tamizaje se han investigado técnicas alternativas que presenten alta sensibilidad, provean resultados más rápidamente y cuya implementación sea viable especialmente en regiones con problemas logísticos y económicos para desarrollar programas preventivos, entre ellos la espectroscopia de impedancia eléctrica (B. H. Brown et al., 2000; B. Brown et al., 2005; Echeverri, Botero, & Gallego, 2015; D. A. Miranda, Corzo, & González-Correa, 2012).

2.3 Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIE)

La espectroscopia de impedancia eléctrica permite analizar las propiedades eléctricas de tejidos biológicos al excitar la muestra con una señal sinusoidal de voltaje, de la forma $v(t) = V \sin(\omega t)$, que varía en el tiempo y tiene una cierta frecuencia angular (ω) de oscilación y medir la respuesta en corriente de la misma, la cual tiene la forma $i(t) = I \sin(\omega t + \phi)$. La impedancia eléctrica (Z), dada por la ecuación (1), es un número complejo que relaciona la amplitud del voltaje (V), la amplitud del flujo de corriente (I) y el desfase entre la corriente y el voltaje (ϕ), para una

excitación sinusoidal a cierta frecuencia angular $\omega = 2\pi f$, donde f es la frecuencia de la señal de excitación; $j = \sqrt{-1}$ es el número imaginario; $R(\omega)$, representa la parte real de la impedancia y $X(\omega)$, la parte imaginaria de la impedancia (Pinto, 2020).

$$Z(\omega) = \frac{V}{I} e^{-j\phi} = R(\omega) + jX(\omega) \quad (1)$$

Además de la impedancia eléctrica, se puede definir la capacitancia compleja C^* en términos de la impedancia, ver ecuación (2).

$$C^*(\omega) = \frac{1}{j\omega Z(\omega)} \quad (2)$$

Las muestras biológicas presentan una impedancia eléctrica que depende de la frecuencia aplicada, por esto al aplicar un campo eléctrico sobre una muestra de células, esta opondrá resistencia al paso de la corriente para mantener la diferencia de potencial requerida variando sus propiedades resistivas y capacitivas en función de la frecuencia aplicada. La respuesta de la bioimpedancia eléctrica varía según los cambios en el estado fisiológico y fisicoquímico de la muestra lo cual permite emplear la EIE para diferenciar entre tejidos normales y lesiones neoplásicas precursoras de cáncer cervical (Das et al., 2015).

Se han identificado tres regiones de dispersión a diferentes rangos de frecuencia y en cada zona el tejido se comporta de manera diferente (Das et al., 2015; Dean, Ramanathan, Machado, & Sundararajan, 2008; Schwan, 1957).

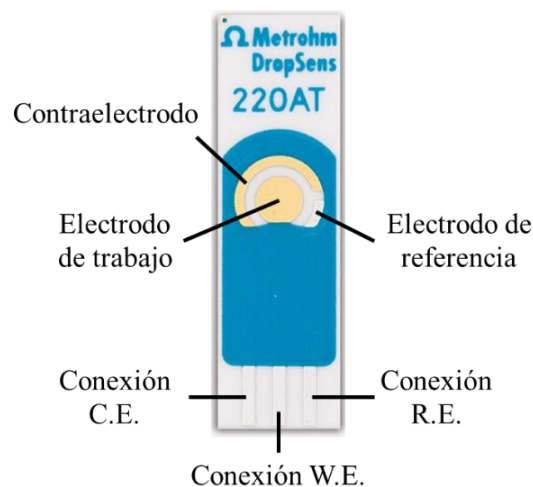
- Dispersión α (bajas frecuencias): Ocurre por interferencias entre tejidos, como membranas. En este rango de frecuencias los valores de impedancia suelen ser mayores debido a que la corriente fluye entre las células sin atravesarlas a causa del comportamiento dieléctrico de las membranas celulares. Por esta razón la región α brinda información del medio extracelular.

- Dispersión β (KHz – MHz): Surge por la polarización de membranas celulares, proteínas y otras macromoléculas orgánicas. A mayores valores de frecuencia la corriente atraviesa las células debido a la menor reactancia de su membrana plasmática, lo que resulta en valores más bajos de impedancia. Esta región brinda información de los medios extracelulares e intracelulares, siendo así la zona de mayor interés en el estudio de las propiedades eléctricas de tejidos biológicos.
- Dispersión γ (altas frecuencias): Se asocia con la polarización de moléculas de agua contenidas en las células.

Existen diferentes configuraciones de los electrodos para medir la impedancia eléctrica, específicamente en este estudio se empleó un potenciostato conectado a un sistema de tres puntas con electrodos serigrafados de oro, los cuales se ilustran en la figura 2.

Figura 2.

Electrodos serigrafados de oro.



El electrodo de trabajo (WE) y el contraelectrodo (CE) son de oro mientras que el electrodo de referencia (RE) y los contactos eléctricos son de plata. Los electrodos serigrafados se construyen mediante la impresión por serigrafía de diferentes tintas (C, Au, Ag, Pt) sobre sustratos

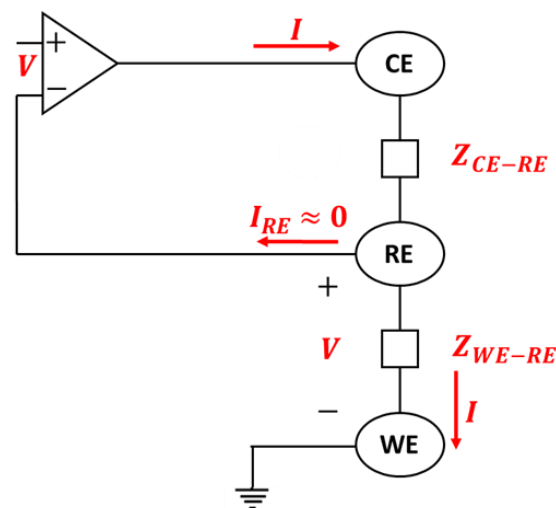
plásticos o cerámicos (Metrohm DropSens, 2022). Las tintas empleadas para imprimir los electrodos determinan la selectividad y sensibilidad del estudio, puesto que es posible modificar su composición mediante la adición de diversas sustancias como enzimas o polímeros con el propósito de funcionalizar el electrodo según el tipo de análisis que se quiera efectuar.

Estos dispositivos permiten realizar diversos tipos de investigaciones electroquímicas en áreas ambientales, clínicas y agroalimentarias. Entre las ventajas de su uso están su bajo costo, alta reproducibilidad y el pequeño volumen de muestra requerido, de solo algunos microlitros (Renedo, Alonso-Lomillo, & Martínez, 2007).

En la figura 3 se muestra un esquema simplificado del potenciostato (modelado como un amplificador operacional) y las conexiones para realizar mediciones de impedancia eléctrica con electrodos de tres puntas.

Figura 3.

Esquema simplificado de un potenciostato con conexión a tres puntas.



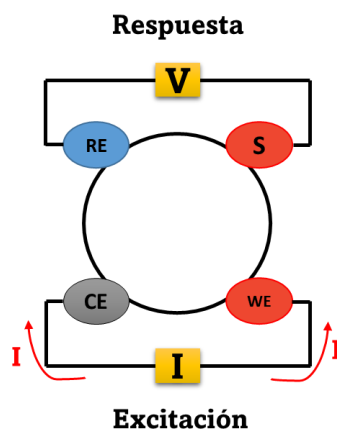
El potenciostato permite ejecutar dos tipos de medidas: potenciostática y galvanostática. La medición potenciostática, consiste en medir la respuesta en corriente de la muestra tras ser

excitada con una diferencia de potencial controlada. Como se observa en el esquema anterior, la corriente fluye entre el contraelectrodo (CE) y el electrodo de trabajo (WE) y se mantiene cercana a cero en el electrodo de referencia (RE). Esto es necesario para garantizar que el potencial del RE se mantenga constante y a partir de este valor conocido controlar el potencial del WE. El CE cierra el circuito y en el WE ocurre la reacción redox de interés y se mide la corriente generada por la muestra (Autolab Application Note EC08, 2011).

Por el contrario, el modo galvanostático consiste en perturbar la muestra al suministrar corriente a través de los electrodos WE y CE y la respuesta en voltaje se mide en los electrodos RE y S (sensor) (Chaparro, Herrera, Meléndez, & Miranda, 2016), como se ilustra a continuación.

Figura 4.

Esquema de una medición galvanostática en un sistema tetrapolar.



Nota. La figura 4 representa otra posible configuración de los electrodos para medir la impedancia eléctrica: la configuración tetrapolar o de cuatro electrodos (geometría de van der Pauw).

Se enfatizan estas dos configuraciones puesto que en el presente estudio se efectuaron las mediciones de la impedancia con el sistema de tres electrodos y los resultados obtenidos serán comparados con los datos reportados en la tesis doctoral (Pinto, 2020). En la cual se empleó un montaje tetrapolar de los electrodos para efectuar todas las medidas.

2.4 Propiedades eléctricas asociadas al desarrollo de anomalías en CCU

El epitelio cervical es un tejido estratificado y altamente estructurado. Este ordenamiento es alterado por el desarrollo de neoplasias lo que a su vez modifica la respuesta de impedancia del tejido. Partiendo de esto, es posible emplear la EIE para diferenciar las células sanas de las células con anomalías ya que la magnitud de la impedancia y su dependencia de la frecuencia son función de la estructura y composición del tejido (B. Brown et al., 2005).

Las células transformadas presentan alteraciones en su potencial y permeabilidad de membrana causando la salida de iones potasio, magnesio y calcio al medio extracelular y la acumulación de sodio y agua dentro de la célula. Este cambio en la composición iónica produce una despolarización (disminución del potencial) de membrana con respecto a las células sanas (Seeger & Wolz, 1990).

El potencial de membrana está relacionado con el control del transporte iónico, la síntesis de proteínas y la producción de energía aeróbica. Por esto, la disminución del potencial conlleva a la afectación de diversas funciones metabólicas con lo cual se favorece el desarrollo del cáncer (Haltiwanger, 2010).

2.5 Teoría del medio efectivo

La teoría del medio efectivo (TME) es un modelo matemático el cual establece que un medio heterogéneo, puede ser modelado como un medio homogéneo equivalente (medio efectivo), el cual macroscópicamente responde a perturbaciones externas de la misma forma que el original (Choy, 2015). En el contexto de esta investigación, la TME se emplea para modelar las propiedades eléctricas de células cervicales complejas a partir de un medio electrolítico homogéneo que simule sus características eléctricas.

3. Metodología

3.1 Reactivos

Para preparar los medios extracelulares se empleó: fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sodio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Todas las soluciones fueron preparadas con agua tipo 1 (18.2 M Ω) obtenida de un equipo Mili-Q.

3.2 Preparación del medio extracelular artificial

Se preparó una solución de Na_2HPO_4 (2.8392 g) y otra de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (2.7598 g) cada una con un volumen final de 100 mL y concentración de 0.2 M. A partir de estas soluciones, se preparó un buffer en proporción ($Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4 \cdot H_2O$): (61/39) para mantener el pH celular en 7.4.

Se garantizó la osmolaridad y homeostasis celular ajustando las concentraciones iónicas de la solución buffer. Para esto se adicionaron las siguientes sales: 0.6066 g de NaCl, 0.0373 g de KCl y 0.0368 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Con esto se obtuvo una concentración final de Na^+ (136 mEq), Ca^{2+} (5 mEq), K^+ (5 mEq) y Cl^- (113.8 mEq) en la solución, la cual presenta las concentraciones iónicas del medio extracelular en condiciones normales.

Posteriormente, se prepararon los modelos artificiales con diferentes concentraciones iónicas que simulan las anomalías HSIL y el modelo de carcinoma cervical HeLa. El medio HeLa se simuló mediante la dilución del medio extracelular normal con agua tipo 1 en un factor de dilución de 1/10 y para el caso de la simulación HSIL, se preparó una solución con pequeños cambios en la concentración de Na^+ y K^+ con respecto al medio extracelular normal.

3.3 Ajuste del protocolo de medición potenciostático

Para establecer el protocolo de medida y analizar la reproducibilidad de la técnica, se realizaron diversas pruebas con soluciones tampón fosfato salino 1X (PBS) variando factores como: el volumen de muestra, el número de posibles usos de un mismo electrodo y el tipo de limpieza de los electrodos. Tras esto, se determinaron las condiciones óptimas para medir las propiedades eléctricas de las soluciones electrolíticas que simulan la alteración HSIL y el modelo celular HeLa.

Se emplearon electrodos serigrafiados de oro (3.4 x 1.0 x 0.05 cm, largo x ancho x alto), adquiridos de Metrohm DropSen. El diámetro del electrodo de trabajo es de 4 mm. Antes de comenzar los experimentos, los electrodos fueron lavados con agua tipo 1 y secados con el aire expulsado por un frasco lavador.

Las mediciones se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT204 conectado a un sistema de tres electrodos y empleando el software NOVA 2.1.5. Previo a iniciar la medida se dejó reposar la muestra sobre el electrodo durante un minuto para establecer el equilibrio termodinámico del sistema. Se ejecutó un protocolo de medición potenciostático con las siguientes especificaciones:

- ✓ Se calculó el potencial de circuito abierto para cada medida
- ✓ Tiempo de estabilización del sistema: 5 segundos
- ✓ Rango decreciente de frecuencias aplicadas: 1 MHz a 1 Hz.
- ✓ Número de frecuencias medidas por espectro: 60
- ✓ Volumen óptimo de muestra: 200 μ L

Adicionalmente, la celda de medición se ubicó dentro de una jaula de Faraday (figura 5, derecha), para proteger la muestra de campos eléctricos externos que pudieran interferir con los experimentos y cada prueba se midió por triplicado.

Figura 5.

Montaje experimental para medir los espectros de impedancia eléctrica.



3.4 Comparación entre la impedancia medida en un sistema tetrapolar y de tres electrodos

Teniendo en cuenta que se espera comparar las medidas de EIE a partir de un sistema de tres electrodos con los datos obtenidos por Pinto mediante un sistema tetrapolar, fue necesario desarrollar un algoritmo que permitiera transformar las medidas de impedancia en tres puntas (Z_{3p}) a valores de impedancia en cuatro puntas (Z_{4p}). Este algoritmo estima una cantidad adimensional compleja (Z_a) a partir de los datos experimentales de Z_{4p} y Z_{3p} para muestras de PBS en un rango de frecuencias aplicadas desde 100 kHz a 0,1 Hz tomando 80 datos por espectro. Los datos de impedancia eléctrica se separaron en sus componentes real e imaginaria y se normalizaron en función de Z_a . Posteriormente, se construyó una función continua $Z_a(\omega)$ por medio de

interpolación spline cúbica que permitiera transformar los datos de Z_{3p} a Z_{4p} medidos en un rango de frecuencias diferente. Para ver detalles del algoritmo dirigirse al Apéndice A.

3.5 Medición de espectros de impedancia en tres puntas de células biológicas HeLa

Para validar el algoritmo de transformación implementado se empleó el protocolo descrito anteriormente para medir células HeLa, un modelo biológico de cáncer de cuello uterino.

Previo a la medición de la impedancia, las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 600 gravedades para separarlas del medio EMEM, el cual puede crear interferencias en la medida. Una vez separadas del medio de cultivo, se realizó el conteo celular con cámara de Neubauer y se determinó una cantidad de $174,6 \times 10^4$ células/mL. Tras esto, las células fueron suspendidas y homogeneizadas en 1mL de PBS con el fin de preservar el estado celular intacto y facilitar el depósito de la muestra en la celda de medición. Se espera que la forma y área del gráfico de radar medido para las células HeLa (modelo biológico: M.B.) coincida con el obtenido para el modelo artificial (M.A.) que simula las alteraciones iónicas de HeLa medido en tres puntas.

3.6 Análisis de datos

Para identificar el tipo de anomalía simulada por los modelos artificiales, primero fue necesario transformar la impedancia medida en tres puntas (Z_{3p}) a valores de impedancia en cuatro puntas (Z_{4p}) haciendo uso del algoritmo propuesto. Con esta información, se elaboraron los gráficos de radar para cada modelo y se compararon con el área y la forma de los gráficos reportados en el estudio doctoral de Pinto, en el cual se midió la impedancia eléctrica de células cervicales extraídas por raspado de Papanicolaou y se empleó una geometría tetrapolar de medida. Las anomalías celulares observadas fueron clasificadas de acuerdo con el sistema Bethesda.

Para la construcción de los gráficos de radar se seleccionaron ocho bandas de frecuencias cuyos bordes poligonales representan la integral de la parte real de la impedancia eléctrica medida en cada intervalo de frecuencias.

4. Resultados y discusión

Se prepararon medios extracelulares artificiales que simulan las alteraciones en las propiedades eléctricas de células cervicales con las anomalías bioquímicas HSIL y el modelo de carcinoma cervical HeLa, empleándose la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica para analizar estas propiedades. El comportamiento eléctrico de la parte real de la impedancia fue estudiando mediante gráficos de radar, los cuales permitieron diferenciar las propiedades eléctricas de los dos medios artificiales.

Se tomaron los datos experimentales reportados por Pinto (Pinto, 2020) para preparar las soluciones electrolíticas correspondientes a los medios extracelulares artificiales para células HSIL y HeLa, cuyas propiedades eléctricas fueron comparadas por medio de diagramas de radar. La comparación de las propiedades eléctricas medidas por Pinto con un montaje de cuatro puntas y las obtenidas en esta investigación con un montaje de tres puntas, se realizó por medio de diagramas de radar, empleando el algoritmo de transformación de medidas de tres a cuatro puntas descrito en la metodología. Dicho algoritmo fue validado con mediciones de PBS y células HeLa realizadas por Pinto para el montaje de cuatro puntas y las obtenidas en este estudio, con tres puntas. Se realizó un análisis de la capacitancia compleja de las células HeLa biológicas y su respectivo medio extracelular artificial medidos en tres puntas y los espectros obtenidos fueron también comparados con los gráficos de capacitancia de la solución PBS. La composición de los

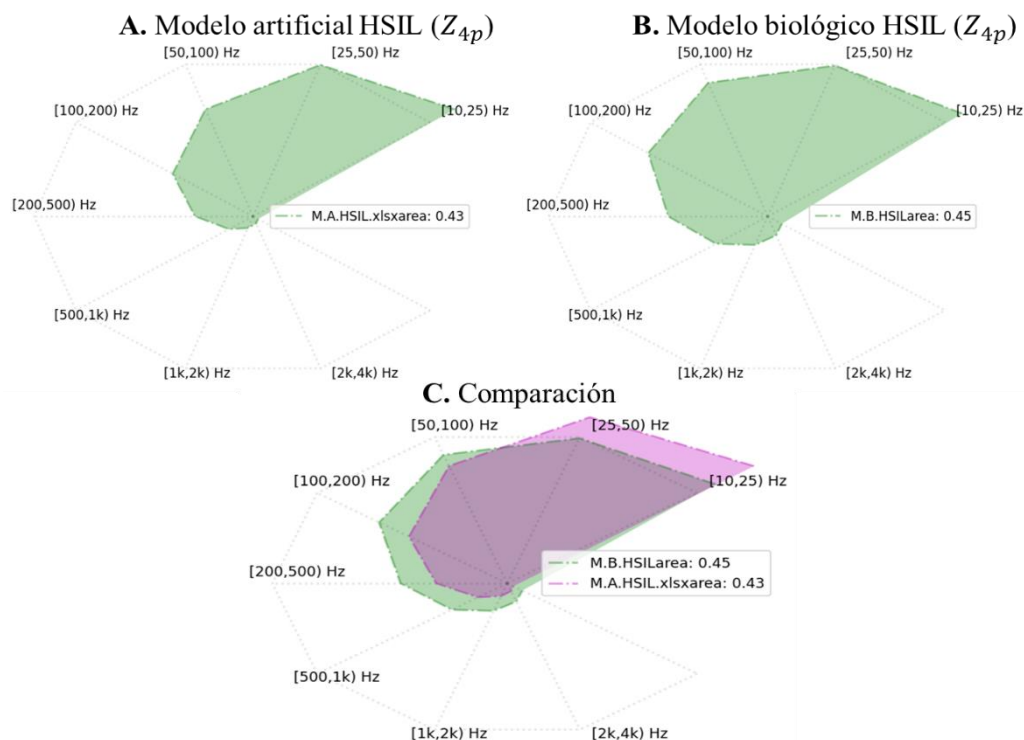
iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ de los medios extracelulares artificiales HeLa y HSIL se relacionó con las propiedades eléctricas alteradas de las células cervicales con anomalías bioquímicas que pudiesen afectar la regulación del equilibrio iónico, favoreciendo la aparición y el desarrollo del cáncer de cuello uterino.

4.1 Diagramas de radar con valores de impedancia en cuatro puntas

Los diagramas de radar presentados en las figuras 6, 7 y 8 corresponden a los datos reportados por Pinto sobre la impedancia eléctrica medida en cuatro puntas para los modelos biológicos de HSIL y HeLa y se comparan con sus respectivos modelos artificiales medidos en tres puntas (Z_{3p}) y transformados a cuatro puntas (Z_{4p}). Este tratamiento de datos es necesario para poder comparar los resultados. Los diagramas de radar del modelo artificial (M.A) y el modelo biológico (M.B) de células HSIL se presentan en la figura 6.

Figura 6.

Comparación entre los gráficos de radar del M.A. (A) y M.B.(B) de la anomalía HSIL



Nota. La figura 6A corresponde al modelo artificial con un área bajo la curva de 0.43 y la gráfica B corresponde al modelo biológico con un área de 0.45. El espectro C muestra la superposición de A y B, en donde el modelo biológico se representa con la curva verde y el modelo artificial con la curva rosada. Las concentraciones iónicas para el M.A. HSIL fueron: Na^+ (137.5 mEq), Ca^{2+} (5.0 mEq), K^+ (3.5 mEq) y Cl^- (113.8 mEq).

En la figura 6 se evidencia que la forma de los dos espectros medidos se asemeja y se presenta una pequeña diferencia en su área; de 0.02. También se observa que la orientación de las gráficas es diferente en algunos intervalos de frecuencia.

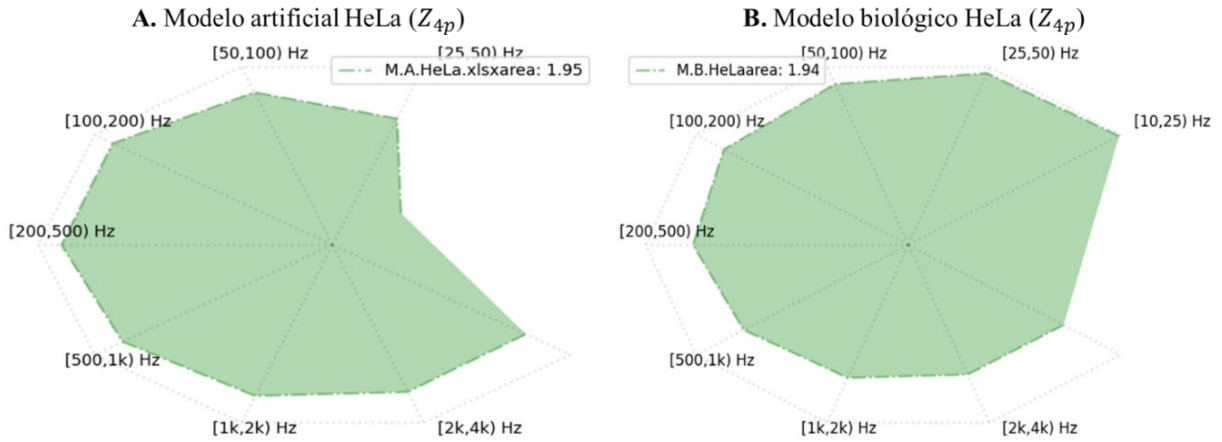
El corrimiento entre los diagramas puede atribuirse a las diferencias en la naturaleza de los medios, debido a que el modelo biológico presenta una gran cantidad de estructuras y mecanismos celulares complejos mientras que el modelo artificial presenta una composición más simple, la cual podría simular las concentraciones iónicas relacionadas con las propiedades eléctricas de las células, pero no describe la totalidad del comportamiento celular.

No obstante, se logró una aproximación satisfactoria al comportamiento eléctrico de la lesión HSIL, reflejada en la misma forma y valores de área muy cercanos del modelo artificial con respecto al real.

También se simularon las propiedades eléctricas de células HeLa. Los espectros de radar para los modelos biológico y artificial se ilustran en la figura 7.

Figura 7.

Gráficos de radar del modelo artificial (A) y biológico (B) de células HeLa

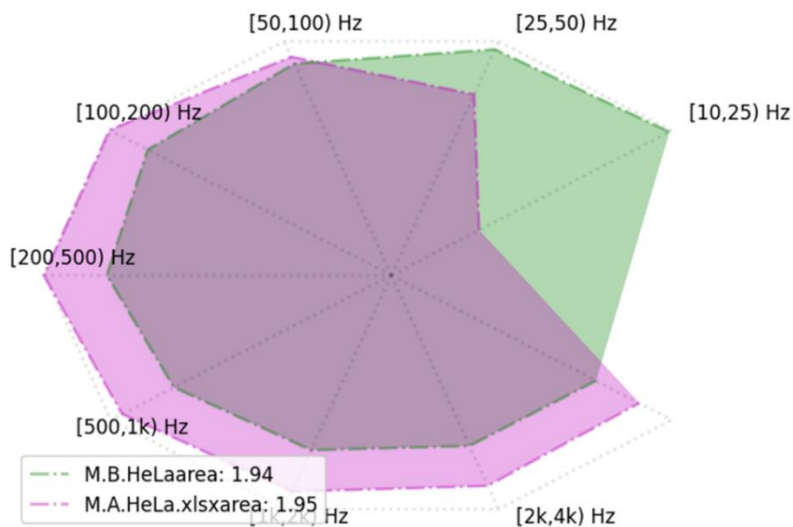


Nota. El área bajo la curva calculada para el modelo artificial HeLa (A) fue 1.95 y el área del modelo biológico (B) fue 1.94.

Los dos modelos presentaron un área muy similar, con una diferencia mínima de 0.01; sin embargo, los espectros difieren en su forma. La figura 8 permite una mejor comparación de los modelos.

Figura 8

Comparación entre los gráficos de radar del M.B. y M.A. de células HeLa.



Nota. El gráfico representa el modelo biológico de células HeLa por medio de la curva verde y el modelo artificial corresponde a la curva rosada. Las concentraciones iónicas para el M.A. HeLa fueron: Na^+ (13.75 mEq), Ca^{2+} (0.5 mEq), K^+ (0.35 mEq) y Cl^- (11.38 mEq).

La figura 8 muestra que las diferencias más significativas en la forma de los espectros se presentan en el intervalo de bajas frecuencias (10 Hz a 25 Hz) en donde se cree que la respuesta eléctrica de las células ocurre por interferencias entre tejidos, como las membranas plasmáticas (Das et al., 2015; Dean et al., 2008; Schwan, 1957). En la zona de frecuencias más altas (50 Hz a 2 kHz) se observa un corrimiento entre los gráficos.

Los gráficos de radar reportados indican que los modelos artificiales HeLa y HSIL lograron una buena aproximación al área de sus respectivos modelos biológicos, esto podría sugerir que es posible representar las propiedades eléctricas de las células a partir de medios electrolíticos teniendo en cuenta la teoría del medio efectivo.

4.2 Validación del algoritmo de transformación

Para validar el algoritmo de transformación y con ello la confiabilidad de los gráficos de radar reportados en la sección 4.1, se propuso comparar los espectros de radar medidos en tres puntas de una muestra biológica de células HeLa contra su respectivo modelo artificial medido igualmente en tres puntas. Si los espectros de estos dos modelos presentan una similitud significativa en su forma y área, esto podría ser un indicativo de que el algoritmo permite hacer comparables los valores de impedancia eléctrica medidos en tres y cuatro puntas.

4.2.1 Determinación de la cantidad de células HeLa adheridas a la superficie de medición

Debido a la disposición espacial de la muestra sobre el electrodo de medición, se espera que el montaje experimental implementado brinde más información sobre el contenido de la muestra que está en contacto directo con la superficie del electrodo; por esto se calculó el posible

número de células HeLa (M.B.) sobre la superficie del WE. Teniendo en cuenta el número de células por mL y asumiendo que la muestra dispuesta sobre el electrodo ocupa un volumen en forma de cilindro se obtiene la expresión (3):

$$\rho \cdot V_{cilindro} = \left(\frac{\# \text{ células}}{\text{mL}} \right) \cdot (\pi r^2 h) = \text{Número de células} \quad (3)$$

En donde: r corresponde al radio del electrodo de trabajo y h es el diámetro promedio de una célula HeLa (17,1 μm) (Borle, 1969). Reemplazando obtenemos un promedio de 375,189 células HeLa sobre la superficie.

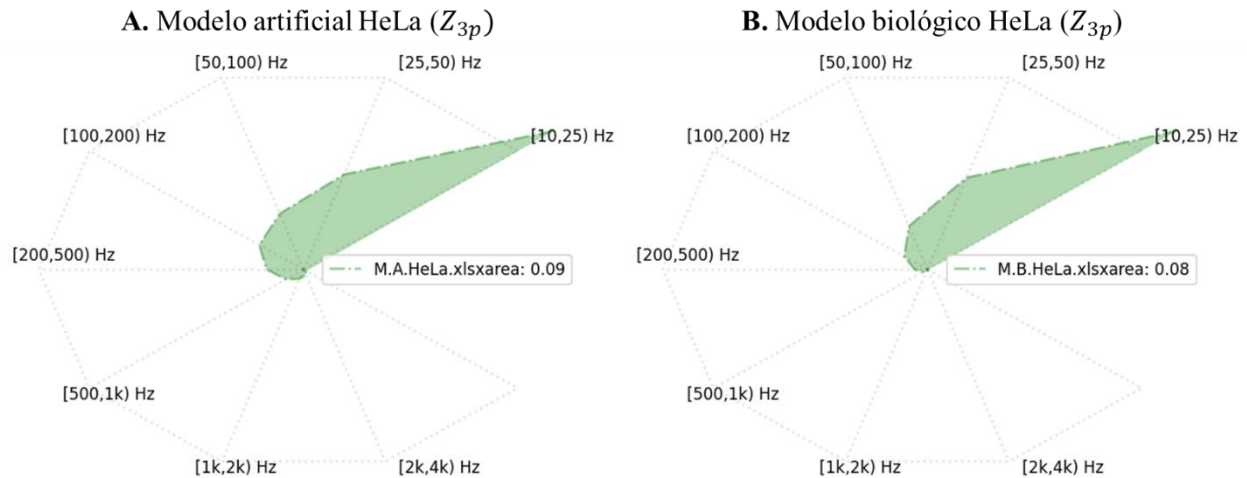
Lo anterior sugiere que parte de la corriente eléctrica que circula entre el WE y el CE, pasa a través de las células cercanas a la superficie del electrodo, haciendo que las propiedades eléctricas de estas influyan en las mediciones realizadas; sin embargo, nótese que la otra parte de la corriente eléctrica fluye por la solución electrolítica, por lo tanto, los espectros de impedancia eléctrica medidos con célula biológicas HeLa contienen tanto información de la solución electrolítica como de dichas células biológicas.

4.2.2 Análisis de los gráficos de radar de los modelos artificial y biológico de células HeLa medidos en tres puntas

Los gráficos de radar obtenidos experimentalmente para el M.B. y el M.A. de HeLa se presentan a continuación.

Figura 9

Representación gráfica del área bajo la curva para el modelo artificial M.A. (A) y biológico M.B. (B) de células HeLa

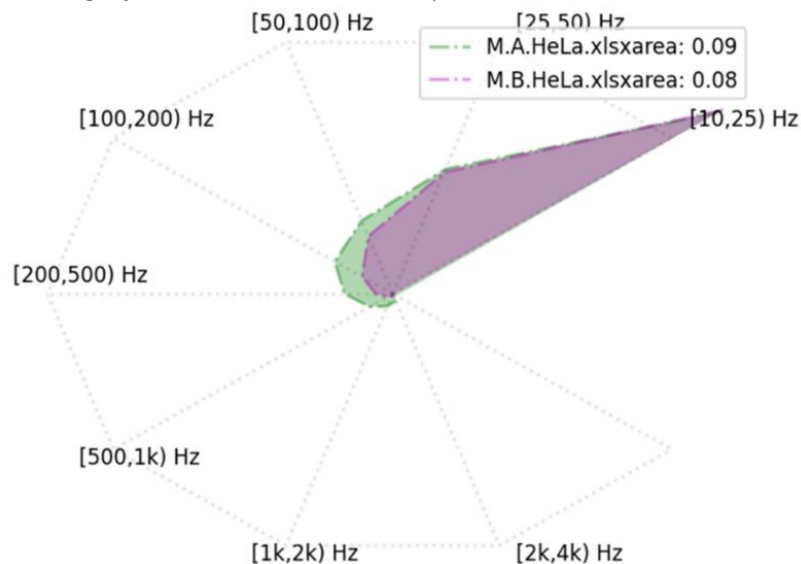


Nota. El área bajo la curva calculada para el modelo artificial (A) fue 0.09 y para el modelo biológico (B) fue 0.08.

La figura 10 ilustra la comparación entre los dos modelos con el fin de analizar el grado de similitud entre el tamaño y la forma del área encerrada en los diferentes intervalos de frecuencias.

Figura 10

Comparación entre los gráficos de radar del M.B. y M.A. de células HeLa.



Nota. El modelo artificial (M.A.) se representa con la curva verde y el modelo biológico (M.B.) con la curva rosada. Las concentraciones iónicas para el M.A. HeLa fueron: Na^+ (13.75 mEq), Ca^{2+} (0.5 mEq), K^+ (0.35 mEq) y Cl^- (11.38 mEq).

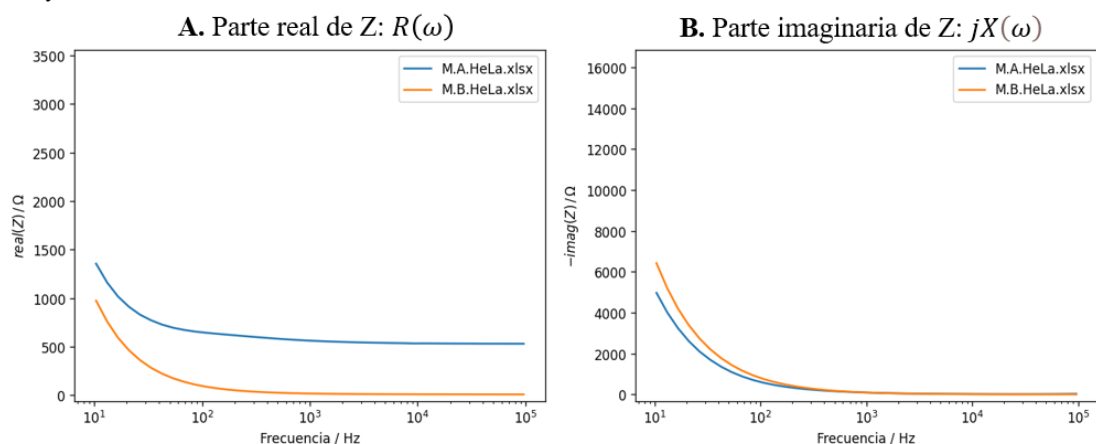
La figura 10 sugiere que los diagramas de radar del M.A. y el M.B. son similares en su forma y los poseen aproximadamente el mismo valor de área, con una leve diferencia de 0,01. También se evidencia una pequeña diferencia en el tamaño para frecuencias altas, en este rango de frecuencias el comportamiento eléctrico se atribuye a la polarización de membranas celulares y otras macromoléculas orgánicas para el caso de las células biológicas (Das et al., 2015; Dean et al., 2008; Schwan, 1957).

La similitud en el área y la forma de los espectros sugiere que el algoritmo logra una conversión confiable de los datos. Y también puede ser un indicativo de que el modelo artificial HeLa preparado presenta una buena aproximación de las propiedades eléctricas de su medio biológico respectivo basándose en la teoría del medio efectivo.

La diferencia entre los modelos HeLa reflejada en el tamaño de los espectros (figura 10) también se evidencia en las curvas de impedancia eléctrica de la figura 11.

Figura 11

Comparación entre los espectros de la parte real (A) e imaginaria (B) de la impedancia eléctrica del M.B. y el M.A. de células HeLa.



En la figura 11A se observa que el modelo artificial (curva azul) presenta la misma forma que el modelo biológico (curva naranja); con un aumento en la parte real de la impedancia del medio artificial con respecto al biológico. Esta diferencia en el comportamiento resistivo puede atribuirse a diversos fenómenos y componentes presentes en las células biológicas que no permiten la simulación artificial exacta del medio extracelular. Adicionalmente, en la figura 11B se muestra que las curvas de los dos modelos presentan aproximadamente la misma tendencia para todo el intervalo de frecuencias analizado, excepto por un leve incremento en el comportamiento resistivo del modelo biológico a bajas frecuencias.

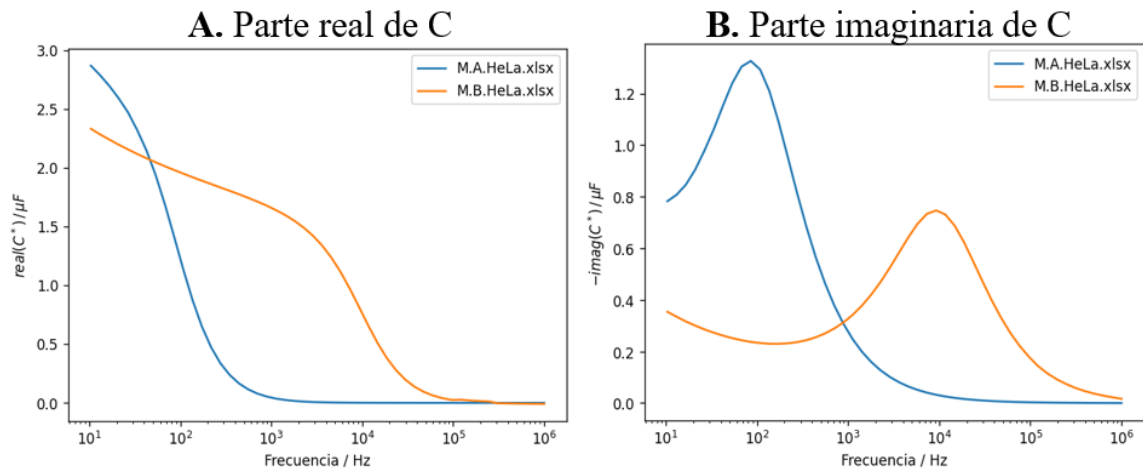
4.3 Análisis del comportamiento capacitivo de los modelos artificial y biológico de células HeLa medidas en tres puntas

A partir del análisis de las propiedades eléctricas de las células HeLa y su modelo extracelular artificial, se encontró que la descripción en términos de impedancia eléctrica, analizada por medio de los diagramas de radar de la figura 10 es similar.

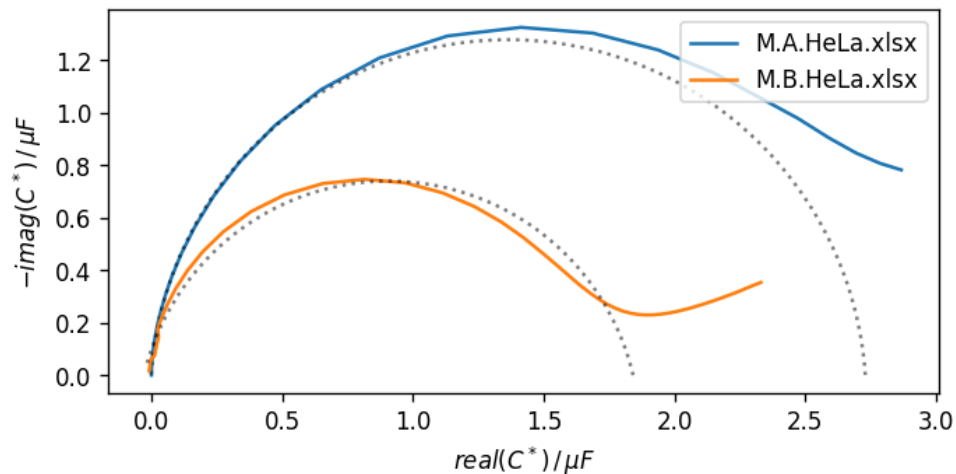
Sin embargo, al hacer un análisis en términos de la capacitancia compleja obtenida por medio de la ecuación (2), se observaron diferencias en el comportamiento eléctrico de los modelos artificial y biológico (ver figuras 12 y 13), las cuales pueden ser causadas porque los modelos de estudio tienen una naturaleza diferente; la composición del medio artificial es más sencilla con respecto a la complejidad de componentes y reacciones bioquímicas que presenta el medio biológico.

Figura 12

Comparación entre los gráficos de parte real (A) e imaginaria (B) de la capacitancia del M.B. y el M.A. de células HeLa



La figura 12A sugiere que el comportamiento capacitivo de los modelos de estudio es diferente. En la parte B se evidencia que las frecuencias de resonancia (características de un sistema) y sus amplitudes son distintas; para el M.A. (curva azul) la máxima dispersión ocurre aproximadamente en 10² Hz y tiene mayor amplitud. Mientras que en el M.B. (curva naranja) el pico de máxima amplitud se presenta en aproximadamente 10⁴ Hz y tiene menor amplitud. Esto se debe a las diferencias en la naturaleza de los medios, ya que, aunque se logre una aproximación cercana al comportamiento eléctrico de un sistema, no es posible simular la totalidad de reacciones bioquímicas y componentes celulares presentes en el material biológico.

Figura 13*Diagrama de Nyquist de capacitancia*

En la figura 13 se observa que tanto el modelo biológico como el artificial de células HeLa presentan la misma forma; sin embargo, el M.A. es más capacitivo que el M.B. especialmente en la región de bajas frecuencias. Esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza de los medios de estudio.

El M.A. es una solución electrolítica con gran cantidad de iones, los cuales pueden sedimentarse con mayor facilidad sobre el electrodo de medición (por atracción electrostática) y formar un capacitor con mayor capacidad de almacenar carga eléctrica según el modelo de la doble capa eléctrica. El cual plantea la formación de un capacitor, donde una placa está representada por las cargas en el electrodo de medición y la otra placa por los iones disueltos en la muestra (Martinsen & Grimnes, 2011).

Por otro lado, la menor capacitancia del M.B. puede ocurrir por la influencia de componentes celulares con propiedades dieléctricas, como las membranas celulares. Esto concuerda con la ecuación (4) para la capacitancia:

$$C = \varepsilon_r \cdot \varepsilon \cdot \left(\frac{A}{d} \right) \quad (4)$$

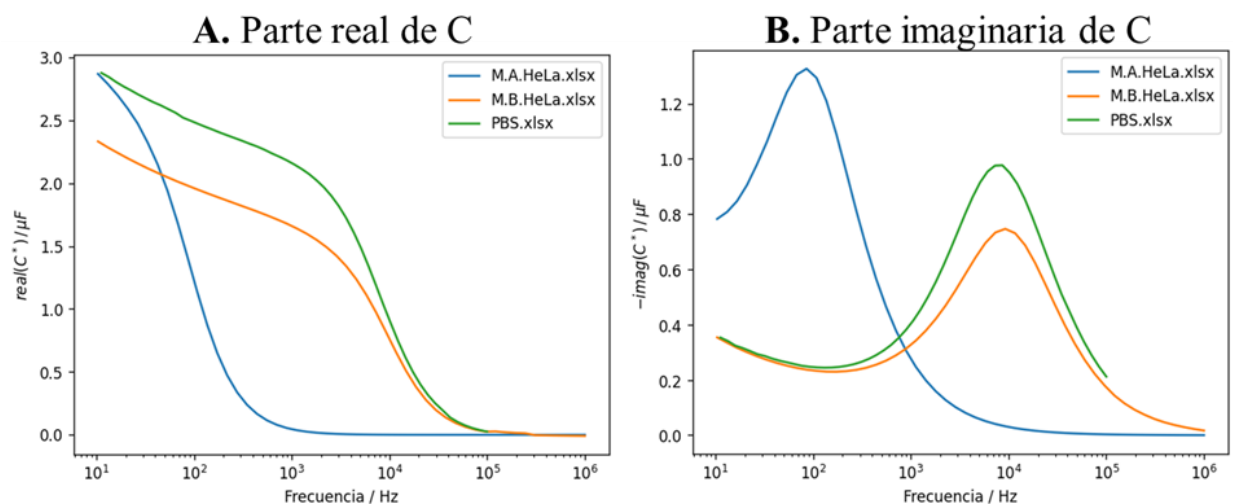
Donde: ε es la permitividad en el vacío, A es el área de las placas, d es la separación entre las placas del capacitor y ε_r es la permitividad del dieléctrico. En consecuencia, C depende de las variaciones en ε_r y d ; si hay algún material en la solución que genere un aumento en la distancia “ d ” la capacitancia disminuirá y dependiendo de la naturaleza del dieléctrico; según la magnitud de ε_r , la capacitancia puede aumentar o disminuir.

4.4 Relación entre los espectros de capacitancia de PBS y los modelos artificial y biológico de células HeLa

Tras realizarse las mediciones de los modelos HeLa, los resultados obtenidos se contrastaron con los espectros del medio PBS, como se ilustra en las figuras 14 y 15.

Figura 14.

Comparación entre los gráficos de parte real (A) e imaginaria (B) de la capacitancia de: PBS, M.B. y M.A. de células HeLa



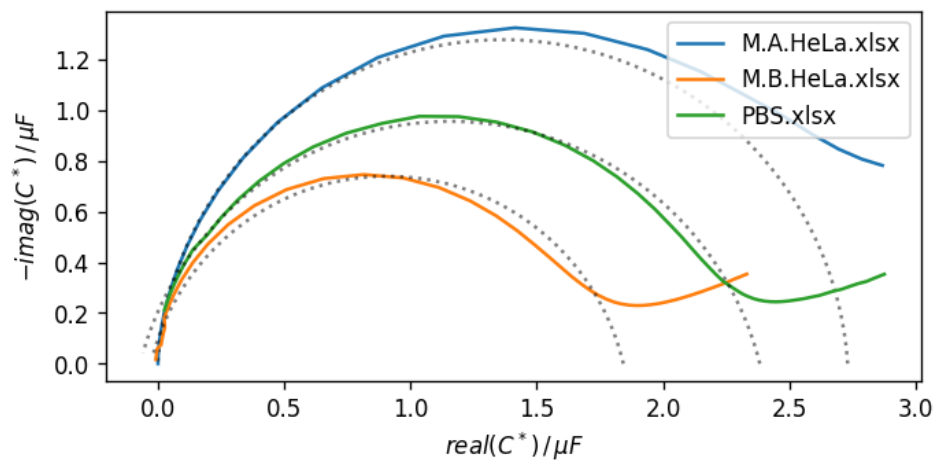
Nota. Las curvas en la figura 14 corresponden al modelo artificial HeLa (curva azul), modelo biológico (curva naranja) y la solución buffer de PBS (curva verde).

La gráfica 14A muestra diferentes comportamientos capacitivos para los tres medios analizados en términos de la parte real. La parte imaginaria (B) sugiere que a mayores valores de frecuencia el modelo biológico HeLa tiende a parecerse más al PBS que al modelo artificial HeLa. Se observa que las frecuencias de resonancia son aproximadamente las mismas para los dos medios; M.B. y PBS, lo cual sugiere que este valor es característico del PBS, ya que las células HeLa del M.B. estaban suspendidas en PBS. Sin embargo, las células biológicas disminuyen la amplitud con respecto al PBS.

Sobre el modelo artificial puede concluirse que las sales que lo conforman (NaCl, KCl y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), adicionales a la solución buffer, generan una frecuencia de resonancia diferente reflejándose en un corrimiento hacia la izquierda en el espectro y aumentando su amplitud.

Figura 15.

Diagrama de Nyquist de capacitancia para: PBS, M.B. y M.A. de células HeLa



En el caso de la figura 15, se observa que el PBS es el medio con mayor capacidad de almacenar carga eléctrica. Se sugiere que la diferencia entre los diámetros ocurre por la composición de los medios analizados. Para el caso del PBS y el M.A. su composición consta de iones en solución, los cuales pueden formar con mayor facilidad una doble capa eléctrica que actúe

como un capacitor (Martinsen & Grimnes, 2011). Así mismo, el medio artificial tiene una mayor cantidad de iones en solución (debido a la presencia de sales) lo cual puede incrementar su respuesta capacitiva con respecto al PBS que solo contiene fosfatos en solución.

Mientras que el M.B. tiene una gran variedad de componentes, como dieléctricos o proteínas que se pueden adherir primero a la superficie de medición y producir un aumento en la resistencia eléctrica del medio de análisis.

4.5 Análisis bioquímico de cáncer de cuello uterino y su relación con los cambios en las propiedades eléctricas de células cervicales

4.5.1 Cambios en las concentraciones iónicas

En la tabla 1 se indican las concentraciones empleadas para preparar los medios extracelulares que simulan condiciones normales, con anomalías HSIL y el medio de carcinoma cervical HeLa.

Tabla 1

Variaciones en las concentraciones iónicas de los modelos artificiales de estudio

[mEq]	Tipo de medio artificial		
	Medio extracelular normal	HeLa	HSIL
Na ⁺	136	13.75	137.5
Ca ²⁺	5.0	0.5	5.0
K ⁺	5.0	0.35	3.5
Cl ⁻	113.8	11.38	113.8

Como se muestra en la tabla 1, el modelo HeLa evidenció una disminución significativa en su concentración iónica con respecto a las concentraciones del medio extracelular normal,

sugiriendo que esta simulación rompe el equilibrio osmolar iónico. Las diferencias fueron: Na^+ (122.25 mEq), Ca^{2+} (4.5 mEq), K^+ (4.65 mEq) y Cl^- (102.42 mEq).

En la simulación HSIL se mantuvo la osmolaridad, pero se presentaron diferencias en las concentraciones de los iones Na^+ y K^+ con respecto al medio extracelular. Estas observaciones podrían sugerir que durante el proceso de transformación maligno de las células cervicales aumenta el desequilibrio iónico debido a la alteración de procesos celulares como la proliferación, la apoptosis, el metabolismo, el potencial de membrana y el funcionamiento normal de diversos canales iónicos con el objetivo de favorecer la supervivencia y migración de células tumorales (Y. F. Chen & Shen, 2022; Lang & Stournaras, 2014; Marchi & Pinton, 2016; Prevarskaya, Skryma, & Shuba, 2010). Esta cascada de perturbaciones bioquímicas genera la ruptura del equilibrio iónico y afecta la homeostasis celular.

A pesar de la existencia de muchos tipos de cáncer definidos por genotipos específicos, la gran cantidad de células cancerosas presentan las mismas características fisiopatológicas que definen su proceso de transformación maligno: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de anticrecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis. (Hanahan & Weinberg, 2000)

Inevitablemente entre los genes afectados durante la transformación maligna aquellos que codifican canales iónicos, bombas e intercambiadores de iones y demás proteínas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis iónica también se verán alterados. (Prevarskaya et al., 2010)

Por tal motivo, se propuso analizar las características de algunas de las proteínas implicadas en la regulación de los niveles de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ y que pudiesen contribuir con los cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales.

4.5.2 Alteraciones en la regulación de calcio (Ca^{2+}) celular

Diversas investigaciones han señalado que los cambios en los niveles de Ca^{2+} son una consecuencia de la actividad anómala de diferentes proteínas asociadas con el cáncer (Marchi & Pinton, 2016; Stewart, Yapa, & Monteith, 2015). Dentro del grupo de proteínas encargadas de mantener la homeostasis de Ca^{2+} y que ejercen un rol patogénico en cáncer de cuello uterino, se encuentran:

Los canales iónicos TRP o canales de potencial receptor transitorio, encargados de regular la entrada de calcio y sodio a la célula en respuesta a varios estímulos según el tipo de canal. Se dividen en varias subfamilias de acuerdo con su homología estructural y algunas de ellas han sido asociadas con el desarrollo del cáncer, como la proteína **TRPV1**, la cual interviene en la apoptosis a través de la señalización de proteínas y estimula la proliferación celular con la liberación de ATP y la activación del purinoceptor 2 (P2Y2). Algunos estudios sugieren que TRPV1 se sobre expresa en tejidos de cáncer de cuello uterino (CCU) comparado con el tejido epitelial normal, además se ha reportado una correlación negativa entre la expresión de TRPV1 y la proteína supresora de tumores PTEN (Fosfatasa y tensina homóloga). (G. H. Han et al., 2021).

Otra subfamilia es la proteína **TRPV6**, la cual es altamente selectiva para el calcio y es muy importante para mantener su homeostasis, la entrada de calcio por este canal depende del equilibrio en las concentraciones de los medios intracelular y extracelular y su expresión y respectivo ARNm son regulados a la baja en células cervicales neoplásicas en la etapa temprana de la enfermedad (Sun et al., 2016). La expresión alterada de los canales iónicos TRPV1 y TRPV6 producen cambios en los niveles de Ca^{2+} normales, como se evidenció en la simulación del medio HeLa, donde su concentración sufrió una disminución significativa.

Continuando con el análisis los canales TRP, la proteína **TRPM7** es permeable al calcio y al magnesio y se ha visto sobre expresado en cáncer cervical, favoreciendo procesos de progresión y metástasis. (Dong et al., 2021) reportó que el bloqueo de este canal inhibe la proliferación celular y favorece la apoptosis, también se encontró que su sobre expresión en células SiHa (derivadas de carcinoma uterino) activa la vía de señalización MAPK; una ruta de transducción de señal encargada de regular funciones celulares con la diferenciación, proliferación y la migración, cuya sobre expresión está relacionada con la carcinogénesis. La permeabilidad de TRPM7 al Ca^{2+} y al Mg^{2+} es importante para la regulación de la homeostasis iónica, ya que estos iones cumplen papeles críticos en muchos procesos celulares.

Otra proteína encargada de regular los niveles de Ca^{2+} , es el **canal activado por liberación de calcio** (CRAC), estos canales iónicos se activan en respuesta a la liberación de calcio del retículo endoplasmático (RE) hacia el citosol, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Este flujo de calcio se conoce como **SOCE** (entrada de calcio operada por almacén) y durante este proceso se activan las proteínas: **STIM** y **Orai1**. STIM se encuentra en la membrana del RE y puede detectar los cambios en los niveles de Ca^{2+} del RE. Cuando las reservas de este ion se agotan, STIM se desplaza a la membrana celular para unirse al canal Orai1, esta interacción genera su apertura permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. (Palty, Raveh, Kaminsky, Meller, & Reuveny, 2012). Se ha visto un sobre expresión de STIM1 y Orai1 (y por lo tanto de la ruta SOCE) en células de cáncer de cuello uterino. También se observó un incremento de la proteína HDAC6; necesaria para que ocurra la ruta SOCE. (Y. T. Chen et al., 2013)

Un estudio desarrollado por (Y. F. Chen et al., 2011) reportó que STIM1 es crucial para la proliferación, migración, supervivencia y angiogénesis de células de cáncer cervical. Observándose que el silenciamiento de STIM1 inhibe la proliferación celular al detener el ciclo

celular en las fases S y G2/M. Además, puede regular la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) promoviendo la angiogénesis. Y se reportó que el silenciamiento de STIM1 produce un aumento en el nivel de la proteína p21 (encargada de promover la detención del ciclo celular en respuesta a varios estímulos) y una disminución de Cdc25C (pone en marcha la mitosis).

Estudios relacionados han encontrado que los inhibidores de SOCE tienen el efecto de bloquear el suministro de sangre al tumor en el cáncer de cuello uterino, el cáncer de próstata y el cáncer de mama. (Lei et al., 2022)

Lo anterior sugiere que el ingreso de Ca^{2+} medido por la ruta CRAC tiene varios intermediarios y todos ellos deben trabajar correctamente y de forma sincronizada para cumplir con su función. Por ejemplo, la sobre expresión de STIM1 implica también un aumento en la actividad de Orail1, ya que la unión de estas dos proteínas es la señal responsable del ingreso de Ca^{2+} al interior de la célula. Se plantea que una sobre activación de la ruta SOCE puede producir una reducción en la concentración de Ca^{2+} extracelular en células de cáncer cervical como se evidenció en el medio HeLa reportado. También se sugiere que los niveles de p21 y Cdc25C están regulados por la homeostasis de Ca^{2+} .

Algunas proteínas transmembrana del retículo endoplasmático (RE) también son cruciales para regular la homeostasis del calcio, por ejemplo: IP3R y RyR se encargan de liberar Ca^{2+} del interior del RE al citosol. **El receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R)** se activa por la unión de IP3. Se reportó que la inactivación de la isoforma IP3R3, al impedir su unión con IP3, se asocia con un mayor riesgo de cáncer cervical. Con lo cual se irrumpe con la vía de señalización de calcio (Yang et al., 2012).

Otros tipos de canales del RE son los **canales de receptores de rianodina (RyR)**, los cuales se expresan en una variedad de células como las cardíacas y musculares y regulan procesos celulares como el metabolismo, la proliferación y la apoptosis. Diversos estudios indican la influencia de este canal con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer como: cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de ovario. Sin embargo, se necesitan más estudios para tener una idea de la relación de RyR con el cáncer cervical (Lei et al., 2022).

Estos tipos de canales iónicos del RE intervienen en la regulación de los niveles de Ca^{2+} citosólico y aunque no se relacionan directamente con la ruta CRAC, la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol mediada por los canales IP3R y RyR puede contribuir a la activación de los canales CRAR permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la ruta SOCE. Este es un claro ejemplo de cómo se interconectan e interfieren entre sí diversos componentes y mecanismos celulares, mostrando que si alguno de ellos falla puede traer repercusiones en muchas otras funciones esenciales para la célula.

Otro componente celular importante en la señalización de calcio es la **bomba SERCA** (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*). Esta proteína transporta Ca^{2+} del citosol al RE para su almacenamiento y es el único mecanismo de captación de calcio en este organelo. Su actividad es elevada durante la diferenciación celular o la carcinogénesis, lo cual implica una alteración en los niveles de Ca^{2+} del RE (Papp et al., 2012). Un estudio sobre la inhibición de la isoforma SERCA2 en células de cáncer cervical reportó la muerte de las células debido al estrés del RE tras perder sus reservas de Ca^{2+} . También se evidenció que el crecimiento y migración de células HeLa es inhibido según el grado de silenciamiento de SERCA2 (Li et al., 2014). Se destaca la importancia de regular los niveles correctos de Ca^{2+} para evitar el estrés celular.

Otra familia de proteínas implicadas en cáncer cervical son las **proteínas S100**, estas se caracterizan por presentar dos sitios de unión a calcio y pueden traducir las fluctuaciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en una respuesta celular, están involucradas en diversos procesos celulares como la proliferación, migración, inflamación y diferenciación. Diversos subtipos de proteínas S100 se han relacionado con diferentes tipos de cáncer y cada uno de ella muestra un perfil de proteína S100 único. (Bresnick, Weber, & Zimmer, 2015). Por ejemplo, la expresión de **S100A11** en cáncer cervical es significativamente mayor con respecto al tejido cervical normal. Se demostró que favorece la proliferación y metástasis y también aumentó la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, implicada en varios procesos celulares como la proliferación celular y la diferenciación. Usualmente esta ruta es activada en cáncer aprovechando la actividad de β -catenina como factor de transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la proliferación y diferenciación celular. (Mantilla C, Suárez-Mellado, Duque-Jaramillo A, 2015; Meng, Sang, & Wang, 2019). Otro estudio desarrollado por (Wang et al., 2015) informó una sobreexpresión de **S100A14** en cáncer cervical, también se encontró un aumento en la proporción de la fase G2/M lo cual favoreció la proliferación celular y la metástasis. El correcto funcionamiento de las proteínas S100A11 y S100A14 está regulado por los niveles intracelulares de Ca^{2+} , por lo tanto, la sobre expresión reportada en cáncer cervical puede estar relacionada con un aumento del Ca^{2+} citosólico lo cual puede acarrear la disminución del Ca^{2+} extracelular como se evidenció en el modelo artificial HeLa.

Finalmente, el **receptor P2X₇**, es un canal iónico presente en la membrana plasmática, activado por la unión de ligandos como el ATP para permitir el ingreso de iones Ca^{2+} en la célula. En células del cérvix sanas, su activación induce la apoptosis a través de la vía mitocondrial dependiente de Ca^{2+} . En cáncer cervical una regulación a la baja en su expresión evita la entrada

de Ca^{2+} necesaria para desencadenar la apoptosis (Feng, Li, Wang, Zhou, & Gorodeski, 2006). Se evidencia que la función mitocondrial también está regulada por los niveles de Ca^{2+} y que las células cancerosas pueden influir en la desregulación de su concentración a su conveniencia para evitar procesos como la apoptosis.

Tras este análisis se concluye que; la homeostasis de calcio se ve alterada en células malignas debido a la expresión anómala de diversas proteínas asociadas con la señalización de Ca^{2+} . La tabla 2 resume algunas de estas proteínas y su papel en el desarrollo de neoplasias cervicales.

Tabla 2

Proteínas implicadas en la señalización de Ca^{2+} y su relación con el cáncer cervical.

Proteína	Expresión	Efectos en cáncer cervical
TRPV1	Incrementa	Favorece la proliferación celular al intervenir en la liberación de ATP
TRPM7	Incrementa	Favorece la progresión y metástasis
Orai1, STIM1	Incrementa	Favorece la proliferación, migración y angiogénesis
SERCA2	Incrementa	Favorece el crecimiento y migración celular
S100A14 y S100A11	Incrementa	Favorece la proliferación y metástasis
P2X₇	Disminuye	Evita la apoptosis

4.5.3 Alteraciones en la regulación de potasio (K^+) celular

Los canales de potasio son proteínas de membrana que permiten el paso selectivo de iones K^+ a favor de su gradiente electroquímico, están implicados en diversas funciones celulares como la transmisión de señales eléctricas, el mantenimiento de la homeostasis celular iónica y la

regulación del potencial de membrana. Alteraciones en su funcionamiento pueden desencadenar o favorecer el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

A continuación, se resumen algunas de las anomalías bioquímicas evidenciadas en los canales de potasio y su influencia en cáncer de cuello uterino.

Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}): son activados por niveles altos de Ca^{2+} citosólico o por despolarización de la membrana, permitiendo el flujo de K^+ a través de la membrana celular y produciendo la hiperpolarización y el cierre de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje para reducir su ingreso a la célula. (Yuan, Leonetti, Pico, Hsiung, & MacKinnon, 2010)

Se ha reportado que la inhibición farmacológica de este canal en líneas celulares de cáncer de ovario A2780 y en células HeLa induce la apoptosis y detiene el ciclo celular en la fase G1, también se evidenció un aumento en el nivel de expresión de la proteína supresora de tumores: p53, conocida también como el guardián del genoma. (X. Han et al., 2007). A partir de eso se sugiere que las células HeLa necesitan la expresión de BK_{Ca} para evitar la apoptosis, lo cual implica una desregulación en los niveles de K^+ tal cual como se reportó en los medios HeLa y HSIL artificiales preparados.

Otro canal iónico de potasio es el **canal de K^+ éter a-go-go**, específicamente, el **canal éter a go-go-1 (Eag1)** muestra una distribución restringida en tejido sano, por esto, su presencia aumentada en células cancerosas llama la atención. Diversos estudios sugieren la presencia de este canal en varios tipos de cáncer como cáncer de pulmón, seno, colon, próstata y cuello uterino. Una investigación desarrollada por (Ortiz et al., 2011) analizó la expresión Eag1 en líneas celulares de cáncer cervical, muestras de citología cervical, biopsias normales y con neoplasias cervicales de grados 1,2 y 3. Los resultados mostraron que Eag1 se encontró en el 67% de las citologías con

LSIL y en el 92% de las muestras con HSIL, pero solo en el 27% de las muestras normales. En las biopsias neoplásicas se encontró que, a mayor grado de la lesión, más amplia es la distribución de la proteína. También se reportó que su inhibición disminuyó la proliferación celular de queratinocitos transfectados con los oncogenes del VPH E6/E7. (Díaz et al., 2009). Este estudio indica que a medida que las células avanzan en el proceso de transformación cancerígeno las alteraciones en su equilibrio iónico de K^+ se van incrementando, como se evidenció en las diferencias de K^+ de los medios HeLa y HSIL.

Otra ruta de transporte iónico ocurre gracias al **cotransportador de K^+ y Cl^- (KCC)**, esta es una de las principales rutas de transporte de K^+ y Cl^- en células epiteliales, su actividad es fundamental para mantener la homeostasis y regular el volumen celular, esta vía es activado por cambios fisiológicos como la disminución del pH intracelular, el aumento de la presión parcial de oxígeno y la hinchazón celular. (Y. F. Chen & Shen, 2022)

Para establecer el efecto de la isoforma KCC1 en cáncer cervical, (Shen et al., 2003) empleó un mutante negativo dominante del gen KCC1 en líneas celulares de cáncer cervical y se evidenció que células mutantes atenuaron su capacidad para regular su volumen y su proliferación fue más lenta en comparación con las células de cáncer de cuello uterino de tipo salvaje. Adicionalmente, las células mutantes mostraron una actividad reducida de la proteína metaloproteínasa de la matriz (MPM) que participa en la degradación de la matriz extracelular. En este caso se plantea un posible mecanismo empleado por las células cancerígenas, el cual consiste en la activación de MPM debido a la necesidad de las células transformadas de romper la membrana basal para proliferar y migrar a tejidos adyacentes y según la investigación de Shen, es posible regular esta proteína a través de KCC1 y con la subsecuente alteración en los niveles de K^+ y Cl^- celulares.

Los canales de K^+ también pueden ser activados por señales eléctricas como los **canales de K^+ dependiente de voltaje (VGKC)**; que son proteínas transmembranales activadas por cambios en el potencial eléctrico de la membrana celular. Las mutaciones en los genes que codifican estos canales pueden causar diversas enfermedades como: epilepsia, arritmias cardíacas y anomalías metabólicas (Xia et al., 2023). De acuerdo con (Liu, Chen, Zhang, & Li, 2019) el canal Kv1.1 es sobre expresado en las muestras de tejido cervical maligno y en líneas celulares de cáncer cervical. Y a partir del análisis de células HeLa modificadas; un cultivo con sobreexpresión y otro con disminución de Kv1.1, se demostró que la inhibición de Kv1.1 suprimió el crecimiento celular y su sobreexpresión mostró un efecto inverso. También se evidenció que el canal Kv1.1 puede regular las vías de señalización Hedgehog (Hhg), Wnt y Notch.

Vemos que la alteración bioquímica de este canal produce la desregulación de la señalización celular y del flujo de iones K^+ a través de la membrana celular, lo cual concuerda con las concentraciones alteradas de K^+ reportadas para los medios artificiales HeLa y HSIL.

Otra subfamilia de los canales VGKC es el **canal de potasio Kv3**, se ha demostrado que está implicado en la migración de células de cáncer cervical al regular los niveles de vimentina y la vía AKT. La vimentina es una proteína estructural del citoesqueleto expresada principalmente en células mesenquimatosas normales; sin embargo, se ha detectado en células cancerosas epiteliales que atraviesan una transición epitelial-mesenquimatosa (TEM). Se confirmó la expresión de Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3, y Kv3.4 en células HeLa. Adicionalmente, el bloqueo de los canales Kv3 inhibió la migración celular (en un 46%) y disminuyó los niveles de vimentina en HeLa. La inhibición de Kv3 también causó la inactivación de la vía de señalización AKT; implicada en la proliferación, migración y metástasis, esta ruta está hiperactivada en diversos tipos de cáncer (Sim, Song, & Lee, 2021). Nuevamente se evidencia la alteración en la concentración

de K^+ celular debido al mal funcionamiento de un canal iónico, lo cual repercute en otras vías de señalización. Esta sucesión de eventos alterados puede ir incrementando la desregulación de K^+ a medida que avanza el grado de malignidad celular como lo indican los medios artificiales preparados para la presente investigación.

Tras este análisis se concluye que las alteraciones en la señalización de potasio desencadenan una gran cantidad de perturbaciones en muchos otros procesos celulares como la comunicación, el transporte, el mantenimiento de su forma y estructura o la regulación del ciclo celular. El conjunto de final de todas las anomalías sufridas por la célula puede favorecer el desarrollo y la progresión del cáncer. Los medios extracelulares artificiales de HeLa y HSIL también sugieren una modificación en su concentración de K^+ con respecto al medio extracelular normal; el contenido de mEq de K^+ en HeLa y HSIL fue de 0.35 y 3.5 respectivamente, los dos disminuyeron con respecto al valor normal de K^+ de 5.0 mEq.

La tabla 3 relaciona algunos de los canales de K^+ y su influencia en el desarrollo de neoplasias cervicales.

Tabla 3

Proteínas implicadas en la señalización de K^+ y su relación con el cáncer cervical.

Canal de K^+	Expresión	Efectos en cáncer cervical
BK_{Ca}	Incrementa	Promueve la proliferación celular y previene la apoptosis Disminuye la expresión de la proteína p53
Eag1	Incrementa	Favorece la proliferación celular
KCC	Incrementa	Favorece la proliferación, migración y la capacidad para regular el volumen celular Se activa la proteína MPM
Kv1.1	Incrementa	Favorece el crecimiento celular, Interfiere en las vías de señalización celular: Hhg, Wnt y Notch
Kv3	Incrementa	Favorece la migración celular al aumentar los niveles de vimentina y la vía AKT

4.5.4 Alteraciones en la regulación de sodio (Na^+) celular

Los canales de sodio dependientes de voltaje se han visto sobre expresados en varios tipos de cáncer. La corriente de Na^+ a través de estos canales mejora la migración, invasión y la metástasis in vivo (Brackenbury, 2012). Enzimas como la bomba de Na^+/K^+ también se sobre expresan en cáncer y se han propuesto inhibidores de su actividad como una terapia contra la enfermedad (Mijatovic et al., 2012). A continuación, se resumen algunas de las proteínas involucradas en mantener la homeostasis de Na^+ y su posible papel en cáncer cervical.

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) son proteínas transmembranales que regulan el flujo de Na^+ y son esenciales para la generación y propagación de potenciales de acción en células musculares y neuronas, presentan una subunidad α asociada a subunidades β auxiliares. (Hernandez-Plata et al., 2012), reportó la expresión funcional de subunidades α (especialmente de **$Na_v1.6$**) en cultivos primarios derivados de biopsias de cáncer de cuello uterino y su contribución a la migración e invasión celular. Las subunidades α : **$Na_v1.2$** , **$Na_v1.4$** y **$Na_v1.7$** también han sido identificadas en cáncer de cuello uterino (Brackenbury, 2012). Un estudio posterior evidenció que las líneas celulares SiHa, CaSki y HeLa no expresan canales Na_v funcionales, ni corrientes de Na^+ dependientes de voltaje; sin embargo, si expresan subunidades β , que podrían intervenir en la proliferación, migración e invasión del cáncer cervical. (Sanchez-Sandoval & Gomora, 2019). Continuando, con el análisis de los canales Na_v , se encontró que la sobre expresión de $Na_v1.6$ aumenta la secreción específica y la actividad de la metaloproteinasa de matriz tipo 2 (MPM-2) en células de cáncer cervical. Esta enzima juega un papel crucial en la invasión y migración tumoral (Lopez-Charcas et al., 2018). Estas investigaciones sugieren que el funcionamiento anormal de los canales Na_v producen alteraciones el flujo de la corriente de Na^+ en la célula, como se evidenció en los medios extracelulares artificiales de HeLa y HSIL. A su vez,

la sobre expresión de esta proteína puede favorecer la activación de otros componentes o mecanismos celulares que refuercen la actividad maligna de la célula, como se evidenció con el aumento de MPM-2.

Otra proteína encargada de regular los niveles de sodio y también de potasio, es la **bomba de Na^+/K^+ , (Na^+/K^+ -ATPasa)**, encargada de transportar iones Na^+ y K^+ en contra de sus gradientes electroquímicos a través de la membrana célula y mantener su gradiente iónico. La expresión de la subunidad $\beta 1$ de esta bomba incrementa en displasias cervicales y cáncer de cuello uterino en comparación con el tejido cervical normal, el aumento en su expresión se correlaciona con la progresión de la displasia de bajo grado a alto grado y su localización también difiere entre tejido normal y tejido maligno (Mijatovic et al., 2012). La alteración en el transporte de Na^+ y K^+ mediado por esta enzima puede causar la desregulación del gradiente electroquímico de la célula, variando las concentraciones iónicas Na^+ y K^+ en los medios extracelular e intracelular, como lo sugieren los medios extracelulares artificiales HeLa y HSIL.

La proteína de canal iónico TRP; **TRPM4**, se activa por un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y con ello permite la entrada de Na^+ , sin permitir el paso de iones Ca^{2+} . El flujo de Na^+ reduce el potencial de membrana y disminuye la señalización de calcio en muchas células diferentes, incluidas células cancerosas. (Borgström, Peinelt, & Stokłosa, 2021). Se reportó que la regulación negativa de TRPM4 en células HeLa ocasiona la reducción en su proliferación celular a través de la degradación de la β -catenina (proteína asociada a la adhesión celular) (Armisen et al., 2011).

Se presume que el aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para la activación del canal implica una desregulación de los niveles de Ca^{2+} extracelular, así mismo, el ingreso de Na^+ al

citosol puede causar alteraciones en su concentración extracelular. Estas variaciones de Na^+ y Ca^{2+} extracelular fueron evidenciadas en el medio HeLa artificial.

La tabla 4 resume algunas de las proteínas encargadas de regular los niveles de Na^+ y su influencia en cáncer cervical.

Tabla 4.

Proteínas implicadas en la señalización de Na^+ y su relación con el cáncer cervical.

Proteína	Expresión	Efectos en cáncer cervical
$\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.7$	Incrementa	Favorece la migración e invasión celular. Aumenta la actividad de la metaloproteínasa de matriz tipo 2
Bomba Na^+/K^+	Incrementa	Su expresión se correlaciona con la progresión de la displasia de bajo grado a alto grado
TRPM4	Incrementa	Favorece la proliferación celular a través de la acumulación de la β –catenina

A partir del análisis realizado se sugiere que la investigación del rol patogénico de diversas proteínas y procesos celulares implicados en cáncer permite mejorar la comprensión de la enfermedad y con ello identificar posibles dianas terapéuticas para desarrollar tratamientos más efectivos, específicos y seguros; con lo cual se espera mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes.

Tras concluir este trabajo de investigación, los resultados obtenidos parecen confirmar la hipótesis inicial planteada:

“Es posible obtener espectros de impedancia eléctrica de medios extracelulares artificiales que simulen alteraciones en las propiedades eléctricas de células cervicales en suspensión y dichas alteraciones están relacionadas con las anomalías bioquímicas que se presentan durante el proceso de transformación de células normales a células cancerosas.”

Esto se sustenta a partir de los espectros de impedancia eléctrica analizados mediante gráficos de radar, los cuales mostraron valores de área y forma similares para los medios extracelulares artificiales y sus respectivos medios biológicos. A pesar de esto, también se observó que al realizar un análisis de su capacitancia compleja se presentaron diferencias, las cuales pueden ser causadas por las distintas naturalezas de los medios.

5. Conclusiones

Se empleó la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) para detectar cambios en el comportamiento eléctrico de medios extracelulares artificiales que simulan las propiedades eléctricas de las células cervicales HeLa y HSIL, aplicando la teoría del medio efectivo; lográndose la distinción del tipo de lesión a partir del análisis de la forma y el área de los gráficos de radar medidos; por lo que, se sugiere la EIE como una prueba de tamizaje alternativa para cáncer de cuello uterino con el propósito de mejorar la calidad de vida de las mujeres.

Las diferencias en las concentraciones iónicas de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ de los medios extracelulares artificiales HeLa y HSIL con respecto al medio extracelular normal sugieren que tanto el equilibrio osmolar como la homeostasis celular se ven afectadas durante el proceso de transformación maligna de las células epiteliales cervicales debido a la cascada de alteraciones bioquímicas que ocurren a nivel celular.

El sistema de medición potencioestático con conexión a tres puntas permitió determinar los espectros de radar de la parte real resistiva de la impedancia eléctrica para un medio biológico de células HeLa y para los medios extracelulares artificiales HeLa y HSIL.

El algoritmo de transformación implementado permitió la conversión acertada de los datos de impedancia eléctrica medidos en tres puntas (Z_{3p}) a un sistema de medición en cuatro puntas (Z_{4p}).

La composición iónica de los medios extracelulares artificiales HeLa y HSIL está relacionada con las propiedades eléctricas de las células cervicales con anomalías bioquímicas, las cuales interfieren con el mantenimiento del equilibrio iónico de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} .

6. Recomendaciones

Cumpliendo con el objetivo de esta investigación, se recomienda, para una próxima: a partir de la técnica de medición potencioestática con electrodos serigrafiados implementada, medir una cantidad significativa de muestras de tejido cervical biológico con las anomalías reportadas en la citología y graficar sus respectivos espectros de radar. Con base en esta información, es posible preparar medios artificiales que simulen el comportamiento eléctrico de una mayor cantidad de lesiones cervicales (teniendo en cuenta la teoría del medio efectivo) y a partir de estos modelos es posible analizar las concentraciones iónicas responsables de las propiedades eléctricas de células cervicales con diferentes grados de neoplasias.

También, a partir de las medidas biológicas es posible analizar el grado de coincidencia entre los gráficos de radar de las pacientes que han sido diagnosticadas con el mismo tipo de lesión cervical. Esto con el propósito de validar la confiabilidad de la técnica.

Referencias Bibliográficas

- ABDUL, S., BROWN, B. H., MILNES, P., & TIDY, J. A. (2006). The use of electrical impedance spectroscopy in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(5), 1823-1832. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00651.x>
- Amaya, J., & Restrepo, S. (2005). Tamizaje para cáncer de cuello uterino: cómo, desde y hasta cuándo. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 56(1), 59-67. <https://doi.org/10.18597/rcog.559>
- Armisen, R., Marcelain, K., Simon, F., Tapia, J. C., Toro, J., Quest, A. F. G., & Stutzin, A. (2011). TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 103-109. <https://doi.org/10.1002/jcp.22310>
- Autolab Application Note EC08. (2011). Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup. *Metrohm Autolab.B.V*, 1-3.
- Borgström, A., Peinelt, C., & Stokłosa, P. (2021). Trpm4 in cancer—a new potential drug target. *Biomolecules*, 11(2), 1-14. <https://doi.org/10.3390/biom11020229>
- Borle, A. B. (1969). Kinetic analyses of calcium movements in HeLa cell cultures. II. Calcium efflux. *The Journal of general physiology*, 53(1), 57-69. <https://doi.org/10.1085/jgp.53.1.57>
- Brackenbury, W. J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels*, 6(5), 352-361. <https://doi.org/10.4161/chan.21910>
- Bresnick, A. R., Weber, D. J., & Zimmer, D. B. (2015). S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(2), 96-109. <https://doi.org/10.1038/nrc3893>
- Brown, B. H., Tidy, J. A., Boston, K., Blackett, A. D., Smallwood, R. H., & Sharp, F. (2000).

Relation between tissue structure and imposed electrical current flow in cervical neoplasia. *Lancet*, 355(9207), 892-895. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)09095-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)09095-9)

Brown, B., Milnes, P., Abdul, S., & Tidy, J. A. (2005). Detection of cervical intraepithelial neoplasia using impedance spectroscopy: a prospective study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(6), 802-806. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2004.00530.x>

Chaparro, C. V, Herrera, L. V, Meléndez, A. M., & Miranda, D. A. (2016). Considerations on electrical impedance measurements of electrolyte solutions in a four-electrode cell. *Journal of Physics: Conference Series*, 687. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/687/1/012101>

Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., ... Shen, M. R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15225-15230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103315108>

Chen, Y. F., & Shen, M. R. (2022). The important role of ion transport system in cervical cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010333>

Chen, Y. T., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Liu, K. Y., Liu, Y. L., Chang, J. Y., ... Shen, M. R. (2013). Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating malignant cell behaviors. *Cancer Research*, 73(14), 4500-4509. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4127>

Choy, T. C. (2015). *Effective Medium Theory: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198705093.001.0001>

Das, L., Das, S., & Chatterjee, J. (2015). Electrical Bioimpedance Analysis: A New Method in

- Cervical Cancer Screening. *Journal of Medical Engineering*, 2015, 1-5.
<https://doi.org/10.1155/2015/636075>
- Dean, D. A., Ramanathan, T., Machado, D., & Sundararajan, R. (2008). Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. *Journal of Electrostatics*, 66(3-4), 165-177.
<https://doi.org/10.1016/j.elstat.2007.11.005>
- Díaz, L., Ceja-Ochoa, I., Restrepo-Angulo, I., Larrea, F., Avila-Chávez, E., García-Becerra, R., ... Camacho, J. (2009). Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human Ether-à-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Research*, 69(8), 3300-3307.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2036>
- Dong, R. F., Zhuang, Y. J., Wang, Y., Zhang, Z. Y., Xu, X. Z., Mao, Y. R., & Yu, J. J. (2021). Tumor suppressor miR-192-5p targets TRPM7 and inhibits proliferation and invasion in cervical cancer. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 37(8), 699-708.
<https://doi.org/10.1002/kjm2.12398>
- Echeverri, G. O., Botero, W. A., & Gallego, P. A. (2015). *EVALUATION OF ELECTRICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS DETECTION*. 14(1), 26-35. <https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.1.3>
- Feng, Y.-H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., & Gorodeski, G. I. (2006). A Truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-length P2X7 Receptor through Hetero-oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17228-17237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602999200>
- Globocan. (2021). CANCER TODAY. Recuperado de https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=170&key=total&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=

0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group

Gobernación de Santander. (2020). El cáncer de mama puede ser detectado tempranamente y tratado de forma efectiva. Recuperado 10 de noviembre de 2021, de <https://www.santander.gov.co/index.php/actualidad/item/5200-el-cancer-de-mama-puede-ser-detectado-tempranamente-y-tratado-de-forma-efectiva>

Haltiwanger, S. (2010). *The Electrical Properties of Cancer Cells*. Recuperado de <http://www.royalrife.com/haltiwanger1.pdf>

Han, G. H., Chay, D. B., Nam, S., Cho, H., Chung, J. Y., & Kim, J. H. (2021). The Combination of Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) and Phosphatase and Tension Homolog (PTEN) is an Effective Prognostic Biomarker in Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Pathology*, 40(3), 214-223. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000677>

Han, X., Wang, F., Yao, W., Xing, H., Weng, D., Song, X., ... Ma, D. (2007). Heat shock proteins and p53 play a critical role in K⁺ channel-mediated tumor cell proliferation and apoptosis. *Apoptosis*, 12(10), 1837-1846. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0101-9>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hernandez-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., ... Gomora, J. C. (2012). Overexpression of Na V1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 130(9), 2013-2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.26210>

Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Significado de los cambios en el cuello uterino Guía para la salud de la mujer*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello->

uterino/significado-cambios-en-cuello-uterino

- Lang, F., & Stournaras, C. (2014). Ion channels in cancer: Future perspectives and clinical potential. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1638), 1-8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0108>
- Lei, J., Deng, F., Ding, H., Fu, M., Xu, T., Ji, B., ... Gao, Q. (2022). Recent Developments on the Roles of Calcium Signals and Potential Therapy Targets in Cervical Cancer. *Cells*, *11*(19), 1-13. <https://doi.org/10.3390/cells11193003>
- Li, W., Ouyang, Z., Zhang, Q., Wang, L., Shen, Y., Wu, X., ... Xu, Q. (2014). SBF-1 exerts strong anticervical cancer effect through inducing endoplasmic reticulum stress-associated cell death via targeting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2. *Cell Death and Disease*, *5*(12), 1-10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.538>
- Liu, L., Chen, Y., Zhang, Q., & Li, C. (2019). Silencing of KCNA1 suppresses the cervical cancer development via mitochondria damage. *Channels*, *13*(1), 321-330. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1648627>
- Lopez-Charcas, O., Espinosa, A. M., Alfaro, A., Herrera-Carrillo, Z., Ramirez-Cordero, B. E., Cortes-Reynosa, P., ... Gomora, J. C. (2018). The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of NaV1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>
- Mantilla C, Suárez-Mellado, Duque-Jaramillo A, N. M. (2015). Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis β -catenin signaling mechanisms and its role in carcinogenesis. *Revista CES Medicina*, *29*(1), 109-128. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a10.pdf>
- Marchi, S., & Pinton, P. (2016). Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Current*

- Opinion in Pharmacology*, 29, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.03.002>
- Martinsen, O., & Grimnes, S. (2011). *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. Academic press.
- Meng, M., Sang, L., & Wang, X. (2019). S100 calcium binding protein a11 (S100a11) promotes the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells, and activates wnt/ β -catenin signaling. *OncoTargets and Therapy*, 12, 8675-8685. <https://doi.org/10.2147/OTT.S225248>
- Metrohm DropSens. (2022). Screen-printed electrodes. Recuperado de https://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
- Mijatovic, T., Dufasne, F., & Kiss, R. (2012). Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 1(1), 91-106. <https://doi.org/10.4155/ppa.12.3>
- Miranda, D. A., Corzo, S. P., & González-Correa, C. A. (2012). Early detection of cervical intraepithelial neoplasia in a heterogeneous group of colombian women using electrical impedance spectroscopy and the Miranda-López algorithm. *Journal of Physics: Conference Series*, 407(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/407/1/012010>
- Miranda, D., Vargas, E. J., & Zamora, C. J. (2010). Impeditividad eléctrica en la detección temprana del cáncer cervical. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 42, 212-219. Recuperado de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/1676/2065>
- Ortiz, C. S., Montante-Montes, D., Saqui-Salces, M., Hinojosa, L. M., Gamboa-Dominguez, A., Hernández-Gallegos, E., ... Camacho, J. (2011). Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncology Reports*, 26(6), 1377-1383. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1441>
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., & Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, 149(2), 425-438.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.055>

Papp, B., Brouland, J. P., Arbabian, A., Gélébart, P., Kovács, T., Bobe, R., ... Apáti, Á. (2012).

Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules*, 2(1), 165-186. <https://doi.org/10.3390/biom2010165>

Pinto, S. M. (2020). *Estudio de Anomalías Bioquímicas Asociadas a Cáncer de Cuello Uterino que se Pueden Detectar por Espectroscopia de Impedancia Eléctrica*. Universidad Industrial de Santander.

Prendiville, W., & Sankaranarayanan, R. (2017). COLPOSCOPY AND TREATMENT OF CERVICAL PRECANCER. En *International Agency for Research on Cancer*.

Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer.

Trends in Molecular Medicine, 16(3), 107-121.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>

Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202-219.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.050>

Sanchez-Sandoval, A. L., & Gomora, J. C. (2019). Contribution of voltage-gated sodium channel β -subunits to cervical cancer cells metastatic behavior. *Cancer Cell International*, 19(1), 1-

13. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0757-6>

Schwan, H. P. (1957). Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions: Mechanisms and Models. En *Advances in biological and medical physics* (Vol. 5, pp. 147-209).

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0>

Seeger, P. G., & Wolz, S. (1990). *Successful Biological Control of Cancer: By Combat Against the Causes*. Neuwieder Verlagsgesellschaft mbH.

- Shen, M. R., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Hsu, Y. M., Chiu, W. T., Tang, M. J., ... Ellory, J. C. (2003). KCl cotransport is an important modulator of human cervical cancer growth and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39941-39950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308232200>
- Sim, H. J., Song, M. S., & Lee, S. Y. (2021). Kv3 channels contribute to cancer cell migration via vimentin regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 551, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.019>
- Sociedad Americana Contra el Cáncer. (2020). ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)? Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(10), 2502-2511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.016>
- Stumbar, S. E., Stevens, M., & Feld, Z. (2019). Cervical Cancer and Its Precursors: A Preventative Approach to Screening, Diagnosis, and Management. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 46(1), 117-134. <https://doi.org/10.1016/J.POP.2018.10.011>
- Sun, F., Xiao, L., Jang, X. X., Xiong, Y., Li, Q., Yue, X. jing, ... Yu, Y. H. (2016). TRPV6 is a prognostic marker in early-stage cervical squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, 37(12), 15743-15751. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5368-4>
- Wang, X., Yang, J., Qian, J., Liu, Z., Chen, H., & Cui, Z. (2015). S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 5(4), 1484-1495.
- Xia, C., Liu, C., Ren, S., Cai, Y., Zhang, Q., & Xia, C. (2023). Potassium channels , tumorigenesis

and targeted drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162(April), 114673.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114673>

Yang, Y. C., Chang, T. Y., Chen, T. C., Chang, S. C., Chen, W. F., Chan, H. W., ... Lee, Y. J. (2012). Genetic polymorphisms in the ITPKC gene and cervical squamous cell carcinoma risk. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(11), 2153-2159.
<https://doi.org/10.1007/s00262-012-1280-y>

Yuan, P., Leonetti, M. D., Pico, A. R., Hsiung, Y., & MacKinnon, R. (2010). Structure of the Human BK Channel Ca²⁺-Activation Apparatus at 3.0 Å Resolution. *Science*, 329(5988), 182-186. <https://doi.org/10.1126/science.1190414>

Zhdanov, M. S. (2018). Generalized effective medium theory of induced polarization. *Society of Exploration Geophysicists - SEG International Exposition and 76th Annual Meeting 2006*, SEG 2006, 73(5), 805-809.

Apéndice A

Implementación del algoritmo de transformación de los datos de impedancia

Este algoritmo permite transformar los valores de impedancia eléctrica medidos en tres puntas (Z_{3p}) a valores de impedancia en cuatro puntas (Z_{4p}). El algoritmo estima una cantidad adimensional compleja $Z_a = \text{real}(Z_a) + j \text{imag}(Z_a)$, a partir de los datos experimentales de Z_{4p} y Z_{3p} para muestras de PBS en un rango de frecuencias aplicadas desde 100 kHz a 0,1 Hz tomando 80 datos por espectro, sus componentes real e imaginaria se normalizaron en función de Z_a y se calcularon mediante las ecuaciones (5) y (6) respectivamente.

$$\text{real}(Z_a) = \frac{\text{real}(Z_{4p})}{R_{4p}} - \frac{\text{real}(Z_{3p})}{R_{3p}} \quad (5)$$

$$\text{imag}(Z_a) = \frac{\text{imag}(Z_{4p})}{I_{4p}} - \frac{\text{imag}(Z_{3p})}{I_{3p}} \quad (6)$$

R_{4p} , R_{3p} , I_{4p} y I_{3p} se calculan mediante las ecuaciones:

$$R_{4p} = \max\{\text{real}(Z_{4p})\} \quad (7)$$

$$R_{3p} = \max\{\text{real}(Z_{3p})\} \quad (8)$$

$$I_{4p} = \max\{\text{imag}(Z_{4p})\} \quad (9)$$

$$I_{3p} = \max\{\text{imag}(Z_{3p})\} \quad (10)$$

Posteriormente, se construyó una función continua $Z_a(\omega)$ por medio de interpolación spline cúbico que permitiera transformar los datos Z_{3p} a Z_{4p} medidos en un rango de frecuencias diferente. Donde Z'_{4p} corresponde a los valores de impedancia ya transformados y se calcula según la ecuación (11).

$$Z'_{4p} = \text{real}(Z_{4p}) + j \text{imag}(Z_{4p}) \in \mathbb{C} \quad (11)$$

Despejando las componentes $\text{real}(Z_{4p})$ e $\text{imag}(Z_{4p})$ de las ecuaciones (5) y (6) respectivamente, se obtienen las expresiones (12) y (13) para calcular Z'_{4p} .

$$\text{real}(Z_{4p}) = R_{4p} \left[\text{real}(Z_a) + \frac{\text{real}(Z_{3p})}{R_{3p}} \right] \quad (12)$$

$$\text{imag}(Z_{4p}) = I_{4p} \left[\text{imag}(Z_a) + \frac{\text{imag}(Z_{3p})}{I_{3p}} \right] \quad (13)$$

El algoritmo fue implementado en Python por el investigador David A. Miranda adscrito a la Escuela de Física UIS.