

Estudio de Anomalías Bioquímicas Asociadas a Cáncer de Cuello Uterino que se Pueden
Detectar por Espectroscopia de Impedancia Eléctrica

Sandra Milena Pinto Bohórquez

Trabajo de Grado para Optar el título de Doctora en Química

Directores

David Alejandro Miranda Mercado

Doctor en Ciencias Químicas

Stellia Carolina Méndez

Doctora en Ciencias, Bioquímica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Doctorado en Química

Bucaramanga

2020

A Isabella, por su existencia que le da sentido a la mía.

A mi familia, por sostenerme cuando soplaban malos vientos

Agradecimientos

A mi director de tesis David Alejandro Miranda Mercado, por brindarme nuevamente la oportunidad de investigar, por su dirección y su imprescindible apoyo durante este tiempo.

A Stelia Carolina Méndez, por su orientación y su siempre buena disposición para escucharme y animarme.

A Sandra Corzo, por prepararme el camino para conocer las singularidades del campo de la Impedancia Eléctrica y por su apoyo en el desarrollo de la investigación.

A Mary, Dorita, Olga, Erika, Mónica, Sandra, Edguis y Fredy, por su cariño y colaboración desinteresada.

A mis padres Reynaldo y Ana, a mis hermanos, Diego, Lina y Karen por alentarme y creer en mí, por su complicidad cada vez que emprendo algo.

A mi esposo por querer acompañarme en este trayecto de vida, por su paciencia y por compartir conmigo el entusiasmo y las decepciones.

A la familia Meneses-Mendoza, que más que esperar me han querido acompañar y me han brindado su cariño y apoyo.

A Lili por su cariño y por estar siempre dispuesta a apoyarme.....Gracias

A todos Ustedes ¡GRACIAS!

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos	14
1.1 Objetivos Específicos.....	14
2. Antecedentes	15
2.1 El cáncer en cifras.....	15
2.2 Cáncer de cuello uterino: riesgos, diagnóstico y tratamiento	16
2.3 Anomalías bioquímicas en células cancerosas	19
2.4 Impedancia eléctrica (IE).....	22
2.5 EIE: Mediciones tetrapolares para tamizaje de cáncer de cuello uterino	25
3. Simulación y estudio de las propiedades eléctricas del medio extracelular.....	27
3.1 Generalidades	28
3.2 Metodología.....	32
3.2.1. Reactivos.....	32
3.2.2. Preparación del medio extracelular artificial.. ..	32
3.2.3. Cultivo Celular.....	32
3.2.4. Medición de la Conductividad.. ..	33
3.3 Resultados y discusión.....	33
3.4 Conclusiones.....	37

4.	Propiedades eléctricas de las células cervicales en suspensión.....	38
4.1.	Generalidades	38
4.2.	Metodología.....	41
4.2.1.	Preparación de soluciones.	41
4.2.2.	Soluciones para limpieza química y electroquímica de los electrodos.	41
4.2.3.	Preparación de soluciones electrolíticas.....	41
4.2.4.	Preparación de los electrodos.....	41
4.2.5.	Caracterización de corriente de medición.	42
4.2.6.	Mantenimiento de las Células HeLa..	42
4.2.7.	Recolección de muestras de tejido cervical.....	43
4.2.8.	Determinación de Viabilidad Celular.....	44
4.2.9.	Medición de los espectros de impedancia eléctrica..	44
4.2.10.	Análisis de datos.....	45
4.2.11.	Disposición de los residuos biológicos.....	47
4.3.	Resultados y discusión.....	48
4.3.1.	Caracterización de la corriente de medición..	48
4.3.2.	Caracterización Eléctrica de las células cervicales en suspensión.....	50
4.3.3.	Diferencias en la forma de los espectros de impedancia eléctrica y su relación con anomalías bioquímicas.....	53
4.3.4.	Diagramas de radar y diferenciación de forma del espectro.	57
4.3.5.	Análisis de Anomalías encontradas en pacientes.....	59
4.4.	Conclusiones.....	62

5.	Alteración proteica en cáncer de cuello uterino y su relación con las propiedades eléctricas de células en suspensión	62
5.1.	Generalidades	63
5.2.	Metodología.....	66
5.3.	Resultados y discusión.....	67
5.3.1.	Expresión proteica diferenciada en cáncer de cérvix.	67
5.3.2.	Expresión de proteínas que interactúan con canales iónicos.	73
5.3.3.	Expresión de proteínas con diversas funciones.....	77
5.4.	Conclusiones.....	81
6.	Conclusiones	82
	Referencias bibliográficas.....	85
	Apéndices.....	105

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentraciones iónicas [mEq/L] y valores de la conductividad [mS/cm] para tejido cervical normal y neoplásico.	34
Tabla 2. Efecto de la cinética de crecimiento de células HeLa.	36
Tabla 3. Promedios de viabilidad y desviación estándar para las categorías Normal, ASCUS e Infecciones	53
Tabla 4. Expresión de Proteínas en Cáncer cervical asociado al transporte de iones a través de los Canales iónicos.....	70
Tabla 5. Expresión de Proteínas en Cáncer cervical con diversas funciones:	78

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de membrana celular como un conductor eléctrico.	24
Figura 2. Espectro ideal de las propiedades eléctricas de suspensiones celulares y tejido en términos de la parte real ϵ_r' y la parte imaginaria ϵ_r'' de la impedancia.....	25
Figura 3. Configuración de cuatro electrodos tipo Van der Paw.....	26
Figura 4. Composición iónica del medio extra e intracelular	28
Figura 5. Modelo teoría del medio efectivo.....	40
Figura 6. Sonda de medición de cuatro electrodos, utilizada para medidas de células cervicales en suspensión..	45
Figura 7. Esquema gráfico para la metodología del análisis de la forma geométrica.	
Figura 8. Voltamperograma cíclico de electrodo de oro en H_2SO_4 (0.5M)..	48
Figura 9. Cronopotenciograma del electrodo de medición (Au) en solución de PBS.	49
Figura 10. Distribución por rango de frecuencia del número de células cervicales extraídas a las 36 pacientes participantes del estudio.	51
Figura 11. Espectros de impedancia clasificación normal.....	52
Figura 12. Espectros de impedancia promedio	54
Figura 13. Comparación de espectro promedio del modelo biológico (HeLa) y paciente con HSIL.....	55
Figura 14. Espectros de impedancia eléctrica de células cervicales con vaginosis bacteriana.	57
Figura 15. Representación gráfica del área bajo la curva para las clasificaciones.).....	58
Figura 16. Representaciones gráficas de áreas bajo la curva medios MH1 y MH2.	61
Figura 17. Interacciones esquemáticas entre canales iónicos..	74

Lista de Apéndices

Apéndice A.....	105
Apéndice B.....	107

Resumen

Título: Estudio de Anomalías Bioquímicas Asociadas a Cáncer de Cuello Uterino que se Pueden Detectar por Espectroscopia de Impedancia Eléctrica*

Autor: Sandra Milena Pinto Bohórquez. **

Palabras clave: Espectroscopia de Impedancia eléctrica, cáncer cervical, propiedades eléctricas, células en suspensión.

Descripción

Mejorar los programas de prevención de cáncer de cuello uterino es una necesidad que se ve reflejada en las altas tasas de incidencia y mortalidad asociadas a esta enfermedad. El cáncer de cuello uterino se caracteriza por desarrollarse lentamente, sin embargo, no suele presentar síntomas en sus etapas tempranas, dificultando su diagnóstico oportuno. La detección temprana de esta enfermedad juega un papel importante en el éxito de su tratamiento y por tanto es clave para mejorar las tasas de supervivencia en pacientes. Con el fin de contribuir al mejoramiento de la detección temprana del cáncer cervical, en esta investigación se propuso estudiar las anomalías bioquímicas que afectan las propiedades eléctricas de las células cervicales en su proceso de transformación maligna. Para esto, se midió el espectro de impedancia eléctrica (eIE) de 36 muestras de células cervicales en suspensión, las cuales fueron clasificadas con diferentes patologías: normales, normales con infecciones, ASCUS y HSIL de acuerdo con el resultado del test de Papanicolaou. Los espectros obtenidos fueron analizados por medio de gráficos de radar, dando lugar a una forma y área diferente en cada grupo de clasificación. Adicionalmente, se presentan unos medios electrolíticos que modelan anomalías presentes en células cervicales. Los resultados encontrados en este estudio sugieren, que la forma del eIE de células cervicales en suspensión, permite diferenciar anomalías encontradas en células normales con infecciones, neoplasias o incluso cáncer cervical.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: David Alejandro Miranda Mercado; Doctor en Ciencias, Química y Stelia Carolina Méndez; Doctora en Ciencias, Bioquímica.

Abstract

Title: Study of Biochemical Anomalities Associated with Cervical Cancer detectable by Electrical Impedance Spectroscopy. *

Author: Sandra Milena Pinto Bohórquez. **

Keywords: Spectroscopy of electrical impedance, cervical cancer, electrical properties, cells in suspension.

Description: Improvement in prevention techniques for cervical cancer is necessary, as shown by the high rates in incidence and mortality associated to this disease. Cervical cancer characterizes for developing slowly, and frequently by not showing any symptoms on the first stages, making it difficult to be timely diagnosed. Early detection of this cancer is vital for the success of the treatment, and consequently, vital for the decrease of its mortality rates. In order to improve the early detection of cervical cancer, this research studied the biochemical anomalies that affect the electrical properties of cervical cells in their process of malignant transformation. To do so, the researchers measured the Electrical Impedance Spectrum (EIS) of 36 sample cervix cells in suspension. These cells were classified with different pathologies (normal, normal with infections, ASCUS and HSIL) according to Papanicolaou test results. The spectra obtained were analyzed in radar graphics, giving different forms and areas for each classified group. Additionally, artificial electrolytic media was used to model abnormalities present in cervical cells. The results on this research suggest that the EIS form in cervix cells in suspension, allows distinguishing abnormalities found in normal cells from cells with infections, neoplasm or even cervical cancer.

*Bachelor Thesis

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: David Alejandro Miranda Mercado; PhD in Chemical Sciences -Phd and Stelia Carolina Méndez, PhD in Biochemical Sciences.

Introducción

Un aspecto importante asociado al cáncer de cuello uterino (CCU) es el aumento en la expectativa de vida de la mujer afectada si es detectado y tratado a tiempo (Cortiñas, Centeno, Sánchez & Martín, 2009). En Colombia se utiliza la citología de Papanicolaou como técnica de detección temprana de CCU, desafortunadamente, esta técnica no ha tenido el éxito esperado debido a diversos factores, entre los que resaltan la baja calidad del sistema de adquisición, lectura de muestras y la ausencia de las pacientes a la hora de reclamar resultados, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento a tiempo (Londoño, 2012).

Diversas investigaciones sobre el estudio de las propiedades eléctricas de las células biológicas y su interpretación mediante modelos, han permitido sentar las bases de la técnica de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) (Gabriel, Gabriel, & Corthout, 1996; Miranda, Barrero & Echeverri, 2006). Las investigaciones han reportado una clara diferencia en las propiedades eléctricas del tejido normal y canceroso (Brown et al., 2000; Das *et al.*, 2015; Walker, Brown, Hose & Smallwood, 2000).

El grupo de investigación Ciencia de materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS) de la Universidad Industrial de Santander ha venido desarrollando una serie de trabajos relacionados con el estudio de las propiedades eléctricas de tejido humano por medio de EIE. Sin embargo, con el fin de aportar al mejoramiento de la técnica de EIE en el tamizaje de cáncer cervical, es necesario el análisis de los fundamentos bioquímicos que conllevan el desarrollo de estas neoplasias y que están relacionados con los cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales. Para este propósito en esta investigación se planteó la siguiente hipótesis:

“Por medio de medidas de espectros de impedancia eléctrica realizadas en células en suspensión se pueden detectar anomalías bioquímicas asociadas a riesgo de cáncer”.

A continuación, se presenta la distribución por capítulos del trabajo doctoral realizado: En el primer capítulo se presenta la revisión conceptual para el desarrollo de la investigación. En el segundo capítulo se aborda el primer objetivo específico relacionado con la simulación del medio extracelular artificial (MEA) planteado para evaluar los cambios en las concentraciones iónicas asociadas a los diferentes estadios neoplásicos. En el tercer capítulo se presenta la caracterización eléctrica de las células cervicales en suspensión y el análisis de la forma de los espectros de impedancia obtenidos en pacientes y el modelo de células de carcinoma cervical (HeLa). En el cuarto capítulo, se analiza la expresión de proteínas reportada y su efecto sobre las propiedades eléctricas de las células cervicales y finalmente en el quinto, las conclusiones generales y recomendaciones para futuros trabajos. Los resultados obtenidos en este estudio permiten proponer a la EIE como una herramienta útil para mejorar las actuales técnicas de tamizaje de cáncer cervical.

1. Objetivos

El objetivo general fue estudiar qué anomalías bioquímicas pueden relacionarse con los cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales y su efecto sobre la forma y el área del espectro de impedancia eléctrica (eIE). Para alcanzarlo se trazaron los siguientes objetivos específicos:

1.1 Objetivos específicos

Evaluar soluciones electrolíticas como modelo de medio extracelular que simule anomalías bioquímicas en células cervicales.

Analizar los espectros de impedancia eléctrica de células de tejido cervical normal y HeLa.

Determinar diferencias en las propiedades eléctricas de los espectros de impedancia eléctrica obtenidos de células de tejido cervical normal y HeLa.

Identificar proteínas asociadas a propiedades eléctricas de células de tejido cervical.

Determinar asociaciones entre las proteínas identificadas y su posible relación con los cambios en las propiedades eléctricas de las células.

2. Antecedentes

2.1 El cáncer en cifras

La problemática del cáncer en el mundo está reflejada en las altas tasas de incidencia y mortalidad que presenta esta enfermedad. En 2018 la agencia para la investigación en cáncer (IARC) reportó que el 71.3% de las muertes y el 62% de los nuevos casos se produjeron en países en vía de desarrollo como África, Asia, América central y América del Sur, y se estima que para el año 2030 aproximadamente 24 millones de personas estén afectadas (International Agency for Research on Cancer, 2019).

Las altas tasas de incidencia y mortalidad de esta enfermedad están asociadas a la complejidad que presenta su aparición y evolución. De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (INC), en Colombia, durante el periodo comprendido entre 2000-2006, se presentaron anualmente alrededor de 70.887 casos nuevos de cáncer: 38.751 en mujeres y 32.316 en hombres. En mujeres la tasa de incidencia ajustada por edad fue de 196,9 por cada 100.000 habitantes y en hombres de 186,6. En el año 2010 el 16.9% del total de defunciones en el país correspondió a esta enfermedad (33.450), 17.069 mujeres y 16.381 hombres (Pardo, C., & Cendales, R., 2018). En contraste, para el área metropolitana de Bucaramanga el total de casos de incidencia reportados entre 2008-2012 fueron 8.775 casos, de los cuales el 57.2% fueron en mujeres (Uribe PCJ, Serrano GSE, Hormiga SCM, 2018).

El cáncer de cuello uterino (CCU) sigue siendo una de las principales causas de muerte en mujeres alrededor del mundo, afectando principalmente a los países en vía de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (2019), en el año 2018 se presentaron 570.000 nuevos casos de CCU y murieron alrededor de 311.000 mujeres. En el contexto colombiano el cáncer

de cuello uterino ocupa el tercer lugar en tasas de mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer (Bravo & Muñoz, 2018). Para el año 2011, se reportaron en Colombia 1744 muertes por causa del cáncer cervical. En el departamento de Santander, las estadísticas sobre la incidencia de CCU para el período 2002-2006 indican que se presentaron 199 casos, con una mortalidad de 82 mujeres y entre 2007-2011 la mortalidad para este tipo de cáncer en el departamento registró 405 muertes (Pardo & Cendales, 2018).

2.2 Cáncer de cuello uterino: riesgos, diagnóstico y tratamiento

El cuello uterino es la parte fibromuscular del útero, tiene una longitud de 3 a 4 cm y un diámetro de 2.5 cm, se ubica en la parte inferior y conecta al cuerpo del útero con la vagina. Está conformado por dos partes y dos tipos de células, la cercana al cuerpo del útero o endocérvix, contiene las células glandulares y la próxima a la vagina o exocérvix está cubierta por células escamosas. Estos dos tipos de células confluyen en un lugar llamado zona de transformación, esta zona se encuentra revestida por epitelio escamoso de tipo metaplásico y es el lugar de asiento de todas las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino. Al igual que otras neoplasias malignas, estas células no se tornan cancerosas de repente, si no que se van transformando gradualmente con cambios precancerosos que se convierten finalmente en cáncer (Saslow, D., et al, 2012).

Los dos tipos más comunes de cánceres de cuello uterino son: Carcinoma escamoso, cuyo origen son las células exocervicales y presentan características de las células escamosas al ser observadas al microscopio, y el Adenocarcinoma que se originan en las células glandulares. Aunque cada 9 de 10 casos de cáncer cervical corresponde a carcinomas, en los últimos 20 años los adenocarcinomas se han vuelto más comunes.

El cáncer invasivo de cuello uterino se desarrolla lentamente durante el tiempo en que las células cambian de normal a lesiones precancerosas llamadas *Neoplasia Intraepitelial Cervical* (NIC) o displasia (Serman, 2002). Sobre la base de la citología el sistema de clasificación Bethesda, ha calificado los cambios en las células del cuello uterino en varias categorías (Solomon et al., 2002):

- Lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL).
- Lesión intraepitelial de alto grado (HSIL).
- Carcinoma invasivo (CAI)
- Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)
- Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS)

Las células atípicas ASCUS se caracterizan por cambios leves en la citología cuyo origen es desconocido y AGUS se refiere a las células glandulares que pueden tener su origen en el canal cervical o el útero. Las lesiones intraepiteliales LSIL y HSIL son consideradas como displasias leves y lesiones precancerosas, respectivamente. La evolución de este tipo de cáncer puede durar dos años en desarrollarse, lo cual conlleva a un alto riesgo de progresión invasiva si no es tratado eficientemente.

El cáncer cervical está asociado a diferentes factores, dentro de los cuales se encuentran el consumo de cigarrillo, factores inmuno-supresivos, alto número de embarazos llevados a término, antecedentes familiares de cáncer de cuello uterino; pero el factor de riesgo que se

considera el más importante, es la infección con el virus del papiloma humano (VPH) (Serrano et al., 2004).

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es una infección de transmisión sexual que en la mayoría de casos es superada por un efectivo sistema inmune. Los principales genotipos asociados con el cáncer cervical son el VPH 16 y 18, los cuales son responsables aproximadamente del 70% de esta enfermedad (Dyson, Howley, Munger & Harlow, 1989). Durante el ciclo normal del virus, los genomas del papiloma humano, se encuentran como episomas en el núcleo de las células infectadas, sin embargo, en las lesiones de bajo grado los genomas se integran a la célula huésped, y esta integración conduce al desarrollo de lesiones precancerosas (NIC) y cancerosas (Naucler et al., 2007).

Existen varias pruebas de detección para identificar lesiones precancerosas que incluyen la citología cervicovaginal (CCV), desarrollada por Papanicolaou y Triut en 1943. Desde su introducción y uso ha logrado disminuir las muertes por cáncer cervical en un 75% en Estados Unidos (Ball & Madden, 2003), pero a pesar de ser una técnica muy utilizada presenta una alta tasa de falsos-negativos por errores en la toma de la muestra y en la preparación de la lámina.

La inspección visual con ácido acético (VIA), permite la observación visual del cérvix luego de aplicar una solución diluida de ácido acético del 3-5%, el epitelio anormal se muestra como zonas acetoblanas que dependiendo de las características se pueden clasificar como lesiones negativas o sospechosas. Esta técnica tiene una mayor sensibilidad, pero menor especificidad que la citología convencional para la detección de cáncer (Poli, Bidinger & Gowrishankar, 2015). Otras técnicas de detección utilizadas incluyen análisis del DNA para el virus del

papiloma humano (Eide & Debaque, 2012), inspección visual con solución de yodo-yodurada de lugol y citología con base líquida (Hutchinson et al., 1999).

Una vez confirmado el cáncer de cuello uterino por citología, colposcopia y/o biopsia, es importante tener cuenta la etapa en que se encuentre la enfermedad, y otros factores como la edad de la paciente y su estado de salud, para escoger la opción más adecuada de tratamiento: cirugía, radioterapia, quimioterapia o terapia dirigida. En las etapas tempranas se puede utilizar cirugía o radiación combinada con quimioterapia, mientras que para las etapas más avanzadas usualmente se utiliza radiación con quimioterapia como tratamiento principal (Serman, 2002).

Es importante estar alerta a los factores de riesgo, técnicas de tamizaje y opciones diagnósticas disponibles, teniendo en cuenta que el CCU es una enfermedad potencialmente prevenible, además se debe tener especial atención al manejo de las lesiones preinvasivas, con el fin de disminuir los índices de morbilidad, incidencia y mortalidad.

2.3 Anomalías bioquímicas en células cancerosas

El cáncer es una enfermedad compleja que requiere de múltiples factores, tanto genéticos como epigenéticos, para su desarrollo. Se caracteriza por la presencia de una proliferación celular independiente de mitógenos, inestabilidad genética y por último la invasión a otros tejidos (metástasis) (Esteller, 2000). Con mayor frecuencia las mutaciones ocurren en los reguladores de crecimiento positivo (Oncogenes) encargados de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular y en los reguladores negativos (Genes supresores de tumores) que se encargan del control de los procesos del ciclo celular, inhibiendo su proliferación y el desarrollo de tumores (Foster, 2008).

Las células cancerosas presentan alteraciones metabólicas importantes con el fin de sobrevivir en un medio de tejido inadecuado, por lo tanto deben coordinar la absorción de nutrientes necesarios para su proliferación y de esa forma poder cumplir las demandas anabólicas y catabólicas necesarias para la producción de ATP y síntesis de biomasa (Sullivan, Gui, & Heiden, 2016).

Un ejemplo claro de la alteración metabólica en células cancerosas es la glicolisis aeróbica, que le otorga a la célula maligna una ventaja proliferativa que le permite generar fuentes energéticas suficientes para su biosíntesis, este efecto fue estudiado por primera vez por Otto Warburg en 1924 y es conocido como efecto Warburg, se caracteriza por la alta producción de lactato independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Liberti & Locasale, 2016). La alta concentración de lactato producida por el tumor está relacionada con el incremento de la metástasis en diversos tipos de cáncer, como el de cuello uterino, cabeza y nuca (Walenta et al., 2000), aunque los cánceres presentan diferentes perfiles metabólicos, el efecto Warburg está ampliamente asociado a esta enfermedad (Coller, 2014).

Todas estas alteraciones metabólicas inducen otros cambios oncogénicos requeridos para obtener el combustible necesario en el crecimiento celular y el rompimiento glucolítico, generando metabolitos que actúan como precursores en diversas rutas anabólicas, incluyendo las vías pentosa fosfato (PPP), serina y triacilglicerol, con el fin de sintetizar nuevos nucleótidos, aminoácidos y lípidos (Bloch et al., 2014; DeBerardinis et al., 2007).

Es importante resaltar el papel que cumplen las diversas proteínas en la desregulación del metabolismo energético de las células cancerosas, favoreciendo la expresión de tumores en diferentes tipos de cáncer como: próstata, cuello uterino (Zhao, He, Wang, Zhang, & Wu,

2015), gástrico y ovario. Entre las principales proteínas se encuentran: piruvato Kinasa M2 (PKM2), transportadoras de monocarboxilatos (MCTs), fosfoinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, Myc, p53, hexocinasa II, fosfofructo cinasa 1, HIF-1, glutaminasa, transaminasas, que actúan principalmente en el aumento de la vía glucolítica (Cantor & Sabatini, 2012). La inactivación de proteínas como p53 y pRb, ya sea por mutaciones genéticas o por la presencia de virus, como el del papiloma humano (VPH) genera la desregulación del ciclo celular y la activación de varios protooncogenes (Milde-langosch & Riethdorf, 2003).

Un ejemplo claro de esta activación se evidencia en el desarrollo de las neoplasias cervicales donde la activación del ADN del VPH se produce dentro de la región viral de los genes E1 y E2, que codifican proteínas no estructurales que participan en la transformación celular (Hausen, 2000), desencadenando la expresión no controlada de los oncogenes virales E6 y E7 (Zheng & Baker, 2006). Estos oncogenes desempeñan un rol importante en el desarrollo de la neoplasia cervical: la oncoproteína E6 degrada e inactiva la proteína p53, supresora de tumores (Scheffner, Werness, Huibregtse, Levine, & Howley, 1990); así mismo la oncoproteína E7 se une a la proteína de la retinoblastoma pRB inhibiendo la formación de pRb-E2F, que regula numerosos procesos celulares (Nogueira et al., 2017). Estas oncoproteínas han sido consideradas marcadores específicos en las lesiones precancerosas y leves que causa el virus del papiloma humano (VPH).

Durante el desarrollo de la neoplasia cervical, la expresión proteica es muy activa (Capítulo 4), proteínas supresoras de tumores como p16INK4a, cuya sobreexpresión se encuentra asociada con la progresión hacia la carcinogénesis cervical (von Knebel Doeberitz, 2002) y factores relacionados en el desarrollo de tumores como Ki-67, que se expresa en la mayoría de las fases del ciclo celular (Ancuța et al., 2009), se utilizan para determinar lesiones citológicas.

2.4 Impedancia eléctrica (IE)

La impedancia eléctrica (Z), definida como la oposición que presenta un cuerpo al paso de corriente, es un número complejo que define la relación entre el voltaje (V), el flujo de corriente (I) y el desfase entre ambos (ϕ) (Martinsen, Grimnes & Mirtaheeri, 2000) (Ecuación 1):

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

Ecuación 1

Donde $R(\omega)$, representa la parte real de la impedancia en términos de la componente resistiva y $jX(\omega)$ la parte imaginaria de la impedancia, en términos de la componente reactiva. La impedancia eléctrica de una muestra biológica refleja las propiedades físicas reales del tejido, entre las diferentes propiedades nuestro interés se centra en las propiedades eléctricas, ya que son éstas las que se utilizan para deducir las diferentes magnitudes que permiten la caracterización y evolución frecuencial.

La detección del cáncer a partir de las propiedades eléctricas del tejido está fundamentada en los principios fisicoquímicos de la interacción de la corriente eléctrica con el tejido (Barsoukov & Macdonald, 2005). La técnica más utilizada para este tipo de estudio se denomina Espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS), y consiste en excitar el tejido con una señal sinusoidal (AC) en un amplio rango de frecuencias, de la forma (Ecuación 2):

$$I = I_0 \text{sen}(2\pi f_0 t)$$

Ecuación 2.

Donde I_0 es la amplitud de la señal y f_0 la frecuencia de la misma. La respuesta dependerá de la conductividad (σ) y la permitividad eléctrica (ϵ). Estos parámetros determinan, por un lado, la capacidad para permitir el movimiento de los portadores de carga libre y, por otro, la medida de su polarizabilidad.

Desde un punto de vista microscópico, el tejido vivo puede ser modelado, de manera simplificada, como un conductor eléctrico, y puede ser representado por un circuito conformado por dos resistencias (R_1 y R_2) que modelan los medios extra e intracelular, y un condensador que representa la interfase dieléctrica conformada por la membrana celular (Figura 1.A). Por sus componentes, la membrana celular actúa como un condensador (Figura 1.B). Cuando se aplica un campo eléctrico constante los iones cargados eléctricamente se mueven y se acumulan en ambos lados de la membrana, si el campo es alterno y se aumenta la frecuencia aparecen corrientes de desplazamiento a través de la pared celular dando lugar a fenómenos de relajación (Figura 2) (Grimnes, Rikshospitalet & Schwan 2002). Estos fenómenos son el resultado de polarizaciones de varios dipolos y del movimiento de las cargas que inducen un fenómeno de conducción. Los portadores de cargas son principalmente iones y la fuente principal de dipolos son las moléculas polares del agua en los tejidos.

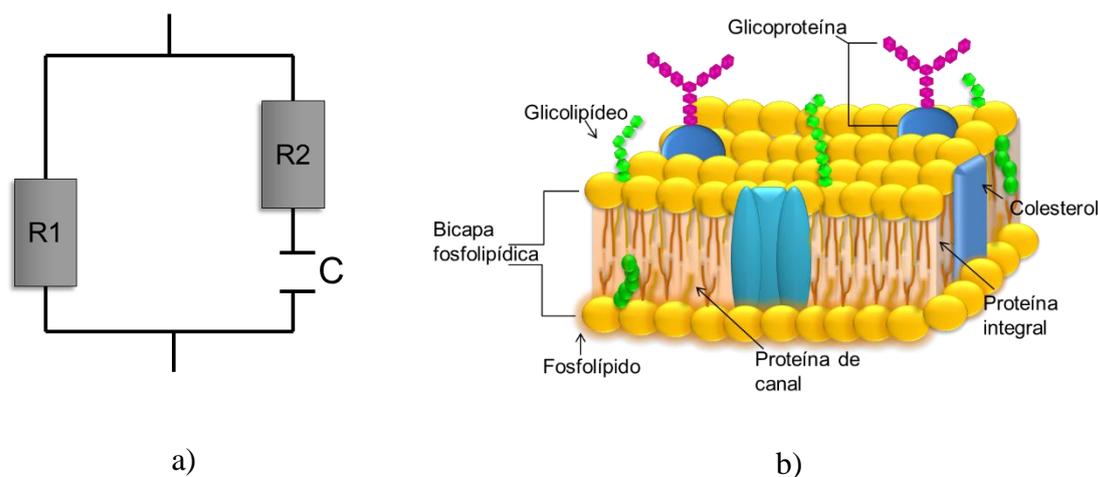


Figura 1. Modelo de membrana celular como un conductor eléctrico. (A) Circuito R-C modela el comportamiento eléctrico de una célula, donde R_1 y R_2 resistencias del medio extra e intracelular y C, capacitor modela la membrana celular. (B) Membrana celular conformada por la doble capa de fosfolípidos, proteínas de canal, integrales y glicoproteínas.

Como se mencionó anteriormente, las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos dependen de la amplitud, I_0 , y frecuencia, f_0 , de la señal de excitación. Para amplitudes bajas, es decir, densidades de corriente y campos eléctricos inferiores a $1\text{mA}/\text{cm}^2$ y $1\text{V}/\text{cm}^2$, respectivamente, el tejido cumple la ley de Ohm, mostrando un comportamiento lineal.

En el caso de la dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia de excitación, tal como se muestra en la Figura 2 para una suspensión celular, Grimnes *et al.*, (2002) reportan tres zonas de dispersión en las que esta interacción tiene diferentes efectos en el tejido, éstas son: Zona **alfa** (por debajo de algunos kHz aproximadamente), esta zona recoge numerosos efectos relacionados con el procedimiento experimental de adquisición del espectro: procesos en la doble capa iónica y de polarización de los electrodos en la interfase electrodo-electrolito. En la zona **beta** (de 100 KHz hasta 10 MHz, aproximadamente), se observan las dispersiones

de tipo estructural, principalmente por la polarización interfacial Maxwell-Wagner en la interface membrana-electrolito (Grimnes et al., 2002), o debidas a la dependencia frecuencial de dipolos moleculares, llamados entonces dispersiones de Debye (Debye, 1929). Por último, la zona gamma (frecuencias superiores a 100MHz) en el rango del microondas, esta dispersión se debe a la asociación- disociación de grupos cargados de pequeñas moléculas tales como el agua.

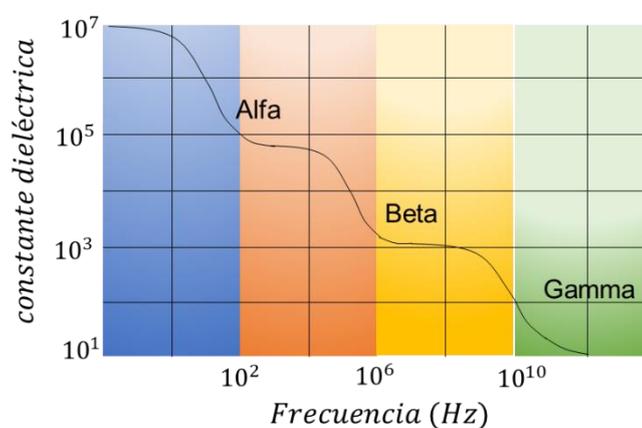


Figura 2. Espectro ideal de las propiedades eléctricas de suspensiones celulares y tejido en términos de la parte real ϵ_r' y la parte imaginaria ϵ_r'' de la impedancia.

En la Figura 2 se puede observar una zona de dispersión gamma cuyo origen se encuentra en los procesos dispersivos de las moléculas de agua ligada a proteínas y en el movimiento de otras proteínas internas.

2.5 EIE: Mediciones tetrapolares para tamizaje de cáncer de cuello uterino

Las propiedades eléctricas de los materiales biológicos permiten relacionar propiedades microscópicas con fenómenos macroscópicos, haciendo posible el desarrollo de técnicas para su caracterización como la EIE. Esta técnica ha permitido diferenciar entre tejidos y células

normales o cancerosas en diversos órganos (Brown, Milnes, Abdul, & Tidy, 2005). Entre las diferentes configuraciones utilizados por la EIE en mediciones biológicas, se encuentran los métodos tetrapolares o de cuatro electrodos, donde la corriente de excitación, pasa a través de dos electrodos y la respuesta en voltaje es medida por los otros dos (Figura 3).

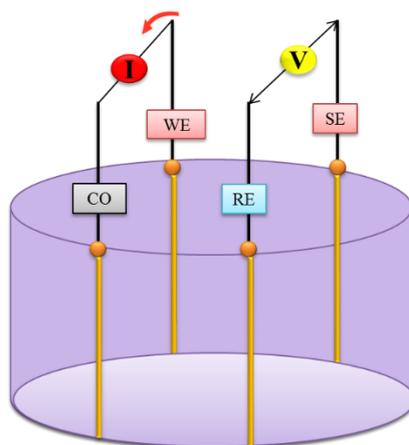


Figura 3. Configuración de cuatro electrodos tipo Van der Pauw. (CO: contraelectrodo; WE: electrodo de trabajo; SE: Sensor y RE: electrodo de referencia). La excitación de corriente se realiza en los electrodos CO y WE y la respuesta en voltaje se mide por SE y RE.

El sistema tetrapolar ha sido utilizado en mediciones de impedancia eléctrica en varias áreas de investigación, desde bioimpedancia en tejido (Miranda, Vargas & Zamora, 2010), hasta mediciones geológicas (Burtman & Zhdanov, 2015). En este tipo de configuración se puede separar la impedancia producida por los electrodos, de la de los tejidos o células. Al aplicar una corriente alterna entre dos de los electrodos y medir el potencial resultante en los otros dos, es posible calcular la impedancia de transferencia, disminuyendo de esta forma los fenómenos de polarización (Schwan, 1963). Sin embargo, si los cuatro electrodos están alineados, no todos los volúmenes pequeños en la celda de medición contribuyen igualmente con la impedancia. Los volúmenes cercanos a los electrodos aportan más que los que están alejados,

dando lugar a zonas de sensibilidad negativa entre los electrodos de excitación y los de medición (Grimnes & Martinsen, 2006). Por su parte el método de cuatro electrodos, elaborado por Van der Paw, cuya disposición simétrica de los electrodos y espesor despreciable con respecto al tamaño de la celda, disminuyen en cierto grado estos inconvenientes. Este tipo de celdas (Van der Paw), puede ser utilizada en mediciones de conductividad eléctrica de la solución de electrolitos (Moron, Rucki, & Szczepanik, 1997), teniendo en cuenta que para esta disposición la constante de celda, depende solo de una única dimensión geométrica: la altura de celda.

3. Simulación y estudio de las propiedades eléctricas del medio extracelular

Los componentes iónicos del medio extracelular ayudan a mantener la homeostasis celular, además de permitirle a la célula realizar diversos procesos bioquímicos y mantener su potencial de membrana. Su composición incluye altas concentraciones de cationes como sodio que participan en el transporte activo a través de la membrana. Durante la transformación oncogénica de las células cervicales, la concentración de estos iones va cambiando a medida que transcurre el desarrollo de las neoplasias. A partir de valores reportados por la literatura (Miranda, Corzo & Correa, 2013) y por medio de soluciones electrolíticas que simulan el medio extracelular, se estudió el efecto de estos cambios sobre los procesos regulados por los iones, como la apoptosis, vías de señalización, metabolismo, expresión de proteínas y transporte iónico.

3.1 Generalidades

El tejido vivo puede ser considerado un conductor electrolítico, sus medios extra e intracelular contienen iones libres que pueden migrar y conducir la corriente eléctrica. Los componentes iónicos y bioquímicos del tejido ayudan a mantener la homeostasis celular y les permiten a las células llevar a cabo procesos químicos, osmóticos, mecánicos y eléctricos, garantizando que el volumen celular, pH intracelular y las concentraciones iónicas se mantengan constantes. La composición del medio extracelular incluye una alta concentración de iones sodio (~145 mEq) y cloro (~103 mEq) y pequeñas cantidades de potasio (~5 mEq), calcio (~5 mEq), magnesio (~2 mEq) y moléculas orgánicas derivadas del metabolismo de las proteínas (Pedersen, Hoffmann & Novak, 2013). A diferencia del medio extracelular, el intracelular contiene una alta concentración de potasio y grupos fosfatos (Sperelakis, 1995), como se muestra en la Figura 4.

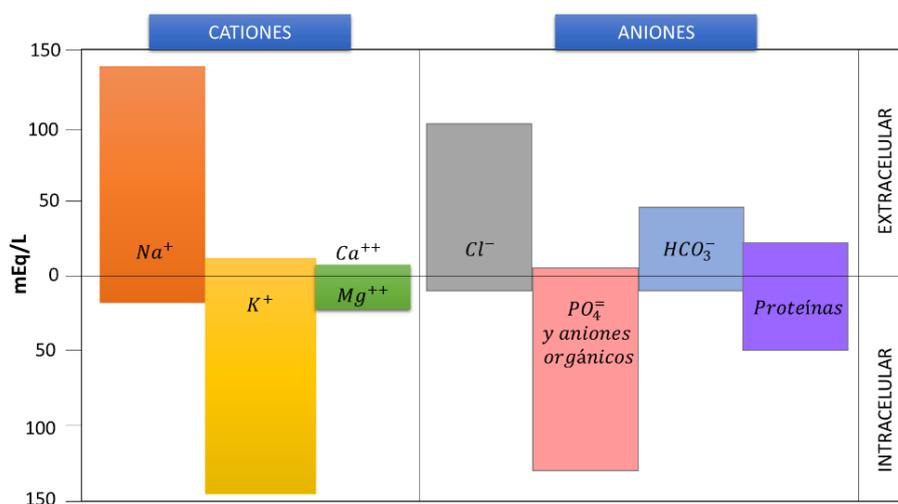


Figura 4. Composición iónica del medio extra e intracelular

Para mantener la homeostasis celular se requiere un control coordinado en los mecanismos renales y respiratorios, así como de soluciones amortiguadoras que ayuden a garantizar el equilibrio ácido–base. Cuando estos mecanismos son alterados por diferentes condiciones patológicas los valores de potencial de hidrógeno (pH) del medio extracelular pueden aumentar o disminuir ocasionando un desbalance en la osmoregulación de los diferentes sistemas reguladores (Sperelakis, 1995). Los canales iónicos y el control de flujo de iones pueden regular varios aspectos de la homeostasis de los tejidos. La dinámica de transporte de iones (TIC) es una parte fundamental en la regulación y proliferación del ciclo celular, su importancia radica en el cambio de volumen celular a través de su progresión en el ciclo celular (Lehen'kyi, Shapovalov, Skryma, & Prevarskaya, 2011).

El transporte iónico también cumple una función importante en la regulación de las vías de muerte celular programada o apoptosis (Bortner & Cidlowski, 2007). Durante la transformación oncogénica, la función de los canales iónicos puede ser alterada y su desregulación tiene implicaciones en la tumorigénesis y metástasis, de hecho las anomalías a nivel de los canales iónicos han sido implicadas en varios aspectos del desarrollo del cáncer (Storm *et al.*, 2013).

Alteraciones patológicas también cambian las propiedades eléctricas del tejido y las células, puesto que éstas reflejan el movimiento de la carga eléctrica dentro del material en respuesta a un campo eléctrico externo (Das, Das & Chatterjee 2015). Cuando un campo eléctrico externo es aplicado al material biológico, los iones en los medios acuosos migran en dirección del campo. La migración de iones corresponde con una densidad de corriente dada (Ecuación 3):

$$\vec{J} = (\sigma_s + j\omega\varepsilon_0\varepsilon)\vec{E} = j\omega\varepsilon_0\varepsilon^*\vec{E} = j\omega\varepsilon_0(\varepsilon' - j\varepsilon'')\vec{E}$$

Ecuación 3

Donde: σ_s es la conductividad eléctrica del material, ω , la frecuencia angular, ϵ_0 , la permitividad en el vacío, ϵ , la permitividad del material, ϵ' , la constante dieléctrica y ϵ'' , factor de pérdida del material.

Como la permitividad depende de la frecuencia, entonces (Ecuación 4),

$$\vec{J} = \sigma_s \vec{E} + j\omega \epsilon_0 \epsilon \vec{E}$$

Ecuación 4

Las ecuaciones 3 y 4 pueden ser representadas por la constante dieléctrica y la conductividad (Ecuación 5):

$$\sigma^* = \sigma_s + j\omega \epsilon_0 \epsilon$$

Ecuación 5

En materiales biológicos, como el tejido, la conductividad (σ_s) se debe al aporte de los iones, mientras que la permitividad, ϵ , es debida a la relajación dieléctrica del material. La relajación dieléctrica depende de la frecuencia de excitación y para un dieléctrico perfecto puede ser escrita por la Ecuación 6 (Gabriel, Gabriel, & Corthout et al., 1996)

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s + \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau}$$

Ecuación 6.

La permitividad eléctrica (ε) depende del tipo de material. Para un tejido con presencia de células normales y células transformadas – cancerosas se puede expresar como una combinación lineal de la permitividad eléctrica del tejido normal (ε_n) y las células transformadas (ε_c), donde cada una de ellas ocupa una cierta fracción de volumen n_n y n_c , respectivamente (Ecuación 7),

$$\varepsilon = n_n \varepsilon_n + n_c \varepsilon_c$$

Ecuación 7.

La conductividad y la permitividad eléctrica de las células cancerosas (ε_c) es mayor que para células normales (ε_n) (Miranda *et al.*, 2013). Estas propiedades pueden ser usadas para conocer el estatus fisiológico de las células.

Con el fin de estudiar el efecto de las concentraciones iónicas del medio extracelular sobre las propiedades eléctricas del tejido cervical en los diferentes estadios neoplásicos (Miranda *et al.*, 2013), se preparó un medio extracelular artificial que emula la composición iónica del medio extracelular (Pedersen, Hoffmann & Novak, 2013). Las conductividades extracelulares de los tejidos normales y neoplásicos fueron preparadas utilizando diluciones seriales del modelo extracelular con la misma relación entre las concentraciones de cada especie iónica, los valores de conductividad oscilaron entre 1190 $\mu\text{S} / \text{cm}$ y 4386 $\mu\text{S} / \text{cm}$. Finalmente se analizó el efecto de la proliferación celular sobre las propiedades eléctricas del medio utilizando células HeLa en suspensión y adheridas en un tiempo de 72 horas.

3.2 Metodología

3.2.1. Reactivos. Para esta parte de la investigación se utilizaron los siguientes reactivos, todos adquiridos comercialmente de Sigma-Aldrich: fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y cloruro de potasio (KCl).

3.2.2. Preparación del medio extracelular artificial. El medio extracelular artificial fue preparado de acuerdo con las concentraciones iónicas reportadas para plasma y líquido intersticial (Guyton, Hall, Zocchi & Aicardi, 2006). Se utilizó una solución buffer de fosfato de sodio monobásico (2760mg) y fosfato de sodio dibásico (2840mg) con el fin de mantener el pH celular en 7.4. Para ajustar las concentraciones del medio se adicionaron los cloruros de sodio (456.3mg), calcio (28.0mg) y potasio (20.0mg) a la solución amortiguadora; esto se realizó a temperatura ambiente y con control de pH, manteniendo un volumen final de 100 mL con agua tipo I.

Los medios extracelulares de tejido neoplásico cervical fueron modelados a partir de diluciones seriales del medio iónico extracelular, utilizando agua tipo I. Las soluciones se prepararon teniendo en cuenta los valores de conductividad reportados para tejido cervical en los diferentes estadios neoplásicos (Miranda *et al.*, 2013).

3.2.3. Cultivo Celular. Se utilizaron botellas plásticas medianas con 10 mL de medio EMEM (pH 7,3) suplementado con 7% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, glutamina 2mM, galactosa 10mM y estreptomycinina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los cultivos celulares se mantuvieron a

37 °C en una incubadora con 5% de CO₂ para su adhesión, crecimiento y replicación hasta obtener la cantidad de células necesarias para el desarrollo de los experimentos.

3.2.4. Medición de la Conductividad. La conductividad de los medios extracelulares simulados se midió con un medidor multiparámetro portátil HACH HQ40D. Por otra parte, las medidas de conductividad de los medios extracelulares de las células HeLa, se realizaron utilizando el Conductivímetro Thermo Scientific Orion 3 Star. En la medición se utilizó el sobrenadante extracelular extraído y centrifugado a 3000 gravedades durante 5 minutos en la centrifuga refrigerada Awel MF 20R, para una cinética de crecimiento de 0, 12, 24, 48 y 72 horas, con un número inicial de 1.5×10^6 células en cada botella.

3.3 Resultados y discusión

Los valores de conductividad del medio extracelular artificial y las concentraciones de los iones para tejido cervical normal y neoplásico se presentan en la Tabla 1. Los valores obtenidos sugieren que la concentración iónica en el medio extracelular aumenta a medida que aumenta el grado de malignidad del tejido, es decir, la conductividad eléctrica del tejido en los diferentes estadios, LSIL, HSIL y CA, puede asociarse con las concentraciones iónicas de 17.5, 25 y 50mM, respectivamente.

Tabla 1.

Concentraciones iónicas [mEq/L] y valores de la conductividad [mS/cm] para tejido cervical normal y neoplásico (CA: canceroso, HSIL y LSIL).

Concentración [mM]	Conductividad [mS/cm]	Na ¹⁺	K ¹⁺	Ca ²⁺	Cl ¹⁻	
		[mM]				
200	15.2	142	4	5	103	
75	6.40	53.3	1.5	1.9	38.6	
50	4.62	35.5	1,0	1.3	25.8	CA
37.5	3.83	26.6	0.8	0.9	19.3	
25	2.85	17.8	0.5	0.6	12.9	HSIL
17.5	1.91	12.4	0.4	0.4	9	LSIL
12.5	1.6	8.9	0.3	0.3	6.4	

Teniendo en cuenta el modelo presentado por Gheorghiu (1993) para células en suspensión, el cual sugiere que los cambios en los medios extracelulares pueden inducir cambios en el medio intracelular de acuerdo con la Ecuación 8, donde δ_{ext} y δ_{int} es la densidad de carga en el interior (R_1) y exterior (R_1+d) de la membrana, respectivamente; podemos inferir que los cambios en las concentraciones iónicas del medio extracelular son el resultado de cambios en las concentraciones del medio intracelular.

$$\delta_{ext} = \delta_{int} \left(\frac{R_1}{R_1 + d} \right)^2$$

Ecuación 8.

Por lo tanto, estos cambios en las concentraciones de Na^{1+} , K^{1+} , Ca^{2+} y Cl^{1-} observadas para el tejido neoplásico podrían estar asociadas a desregulaciones en el transporte de los canales iónicos (ICT) (Arcangeli *et al.*, 2009). Estos cambios en las concentraciones iónicas pueden afectar el metabolismo celular, la expresión proteica y la muerte celular programada por dos razones, primero, la diferencia en las concentraciones de los iones y protones en el tejido neoplásico cervical puede afectar el gradiente de concentración en la membrana mitocondrial y segundo, las alteraciones en las concentraciones de los iones y protones (pH) en el citoplasma pueden inducir daños a nivel mitocondrial como alteraciones en el potencial de membrana, formación de canales en la membrana mitocondrial externa, liberación de calcio en el citoplasma, aumento de las especies reactivas de oxígeno, inactivación de la fosforilación oxidativa, entre otros que están relacionados con la inducción de diversos tipos de cáncer (Szabo & Zoratti, 2014; Yang & Brackenbury, 2013).

Algunos autores sugieren que los cambios encontrados en los valores de conductividad de tejido cervical pueden ser atribuidos a las alteraciones sufridas por la estructura tisular durante las etapas neoplásicas (Brown, Milnes, Abdul, & Tidy, 2005). Sin embargo, estudios recientes aluden que los valores de conductividad también se ven afectados por otros factores relacionados con la composición del tejido, (Das *et al.*, 2015).

Con el fin, de analizar si los cambios en la conductividad del medio extracelular están influenciados por la organización de las células, se diseñó una cinética de crecimiento, utilizando cultivos de HeLa. Los resultados de las medidas realizadas se resumen en la Tabla 2, donde se muestran los valores de conductividad del medio extracelular artificial de las células HeLa en suspensión y adheridas, teniendo en cuenta una cinética de crecimiento, proliferación y confluencia celular.

Tabla 2.

Efecto de la cinética de crecimiento de células HeLa sobre los valores de conductividad (σ mS/cm).

Medio	N° de células(cel/m L)	σ_1	σ_2	σ_3	σ_4	σ_5	$\sigma_{promedio}$
		[mS/cm]					
EMEM7%	0	7.14	7.16	7.15	7.16	7.14	7.15
Suspendidas	1.5x10⁶	14.76	15.81	15.75	15.75	15.71	15.56
	1.97x10⁶	16.02	16.69	16.09	16.09	16.7	16.32
	2.6x10⁶	16.42	16.34	16.31	16.31	16.77	16.43
	2.9x10⁶	16.81	16.36	16.7	16.67	16.68	16.64
	2.96x10⁶	16.6	16.55	16.53	16.32	16.8	16.56

Nota: Se reportan los valores de conductividad de 5 medidas y su respectivo valor promedio

Los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento celular están representados por el promedio de cinco mediciones. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey para la comparación de los promedios. Los resultados, con un valor de $p < 0.05$, muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa sobre la variable de respuesta.

Al realizar el análisis sobre los valores de conductividad en los seis grupos (EMEM, suspendidas, 12h, 24h, 48h y 72h) se obtuvo un valor de ($p = 1.38 \times 10^{-4}$) lo que indica que se encuentran variaciones en las propiedades eléctricas del medio extracelular artificial para los tiempos establecidos.

Sin embargo, el efecto por separado en cada uno de los grupos mostró que las principales diferencias se presentan entre los valores del medio de cultivo (EMEM) y las células en suspensión. Este cambio en la conductividad del medio al adicionar las células, se debe al

efecto de metabolitos, iones, interacciones con los aminoácidos de la proteína y la matriz extracelular, entre otros (Naranjo, Noguera-Salvá & Guerrero, 2009).

Sin embargo, al analizar los valores de conductividad obtenidos una vez las células han iniciado el proceso de adhesión a la botella de cultivo (12h) e iniciado el crecimiento (24h) ($p=0.9834$), proliferación (48h) ($p=0.7889$) y confluencia máxima (72h) ($p=0.9955$), no se observaron cambios significativos en la variable de medición. Estos resultados sugieren que los valores de conductividad del medio extracelular no se ven afectados por el crecimiento, proliferación y confluencia celular.

3.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades eléctricas del medio extracelular artificial sugieren un aumento en las concentraciones de los principales iones en el medio (Na^{1+} , K^{1+} , Ca^{2+} , Cl^{1-}) a medida que avanza el grado de malignidad en el tejido cervical. Estos cambios en las concentraciones iónicas posiblemente se asocian a desregulaciones bioquímicas que experimenta el tejido a nivel de transporte iónico, potencial de membrana o daño mitocondrial.

Al estudiar las propiedades eléctricas del medio extracelular artificial de las células en suspensión y adheridas, se encontró que la conductividad eléctrica cuando las células están en suspensión (no adheridas) son diferentes a cuando las células se adhieren. Las células HeLa son anclaje-dependiente, por lo tanto, cuando están en suspensión no se han establecido las condiciones necesarias de adhesión celular al sustrato para iniciar el crecimiento, proliferación y confluencia. Una vez establecidas las condiciones de adherencia, entonces, el aumento del número de células y la velocidad de crecimiento no afectan de manera significativa sus propiedades eléctricas.

4. Propiedades eléctricas de las células cervicales en suspensión

A partir del análisis de la forma de los espectros de impedancia eléctrica de células cervicales en suspensión se observaron diferencias en las características eléctricas de células normales y anormales. Los datos experimentales fueron clasificados de acuerdo con el patrón de forma obtenido, el cual se obtuvo con algoritmos programados en Python; además, se determinó la forma y área característica para los datos en cada grupo de clasificación. Algunas anomalías encontradas en pacientes fueron analizadas con argumentos de la teoría del medio efectivo (EMT), lo cual permitió proponer experimentos a partir de soluciones electrolíticas osmolares para modelar, con un medio homogéneo equivalente al medio heterogéneo real, las propiedades eléctricas observadas. Se encontró una buena relación entre el modelo de las soluciones electrolíticas y las medidas experimentales.

4.1. Generalidades

La caracterización eléctrica del tejido cervical a partir del uso de la EIE, se ha propuesto como una herramienta para mejorar la sensibilidad y la especificidad en el tamizaje del cáncer de cuello uterino (Miranda, Corzo & González-Correa, 2012; Olarte, Aristizábal, Osorio & Rojas, 2010; Brown *et al.*, 2000). Este método de estudio ha demostrado su potencial en la extracción de datos sobre la morfología y la fisiología de las células (Tidy *et al.*, 2013). Al aplicar un potencial eléctrico sinusoidal en un cierto rango de frecuencias, el patrón del flujo de corriente, determinado por las características estructurales de las células, puede ser modelado por parámetros eléctricos diferentes (de acuerdo con la estructura) que permiten describir la forma del espectro de impedancia y diferenciar las células normales de las neoplásicas (Das, Das & Chatterjee, 2015). De esta manera, la magnitud de la impedancia y su dependencia de la

frecuencia son función de la composición del material. A frecuencias del orden de 1 GHz, la estructura molecular es el factor determinante, mientras que a bajas frecuencias (<100 Hz) es posible determinar las propiedades eléctricas de la matriz extracelular y los efectos de difusión de las cargas libres acumuladas alrededor de la membrana (Gheorghiu, 1993; Schwan, 1963).

Al ser perturbadas las células cervicales con pequeñas señales de corriente, la respuesta de las células normales es diferente al de las células con anomalías. La principal diferencia se encuentra en la dispersión presentada a bajas frecuencias (zona α). Desde el punto de vista eléctrico, esta diferencia se asocia a los cambios en las propiedades resistivas y reactivas (capacitivas) de las células, que en su proceso de transformación maligna sufren alteraciones en el potencial de membrana (Cone, 1970; Liu, Qiang & Du, 2017). Como ya se mencionó en los capítulos anteriores, los cambios en las concentraciones iónicas en el medio extracelular, afectan las propiedades eléctricas y los procesos que están regulados por estos iones. Estos cambios hacen posible que la EIE pueda identificar alteraciones tempranas en el desarrollo del cáncer cervical (Das, Kamil, Biswas & Das, 2012; Walker, Brown, Blackett, Tidy & Smallwood, 2003) o incluso otras infecciones causadas por la presencia de bacterias (Yang & Bashir, 2008) y hongos.

Para el análisis de los espectros de impedancia eléctrica de materiales dieléctricos, se suelen utilizar modelos físico-matemáticos que describen sus propiedades. Uno de los más utilizados para describir materiales biológicos es el de Cole-Cole (Cole & Cole, 1941). En este modelo se derivan una serie de parámetros, que permiten caracterizar el material (Brown, Wilson & Bertemes-Filho, 2000) teniendo en cuenta su estructura y composición. Sin embargo, para el análisis de los resultados obtenidos en células cervicales en suspensión, este modelo no presenta una relación clara con las propiedades fisiológicas encontradas en las medidas

realizadas en pacientes con algún tipo de anomalía. Por lo anterior para el análisis de algunas anomalías encontradas en pacientes se hace uso de conceptos de la teoría del medio efectivo (EMT).

La EMT establece que un medio heterogéneo puede ser modelado con un medio homogéneo equivalente (medio efectivo), que macroscópicamente responde a perturbaciones externas de la misma forma que el original (Choy, 2015). La teoría EMT ha sido probada y extendida para diferentes materiales (Burtman & Zhdanov, 2015), lo cual muestra su aplicabilidad práctica. En esta investigación se formuló la siguiente hipótesis, inspirada en la teoría EMT: un medio heterogéneo (Figura 5) como el de las células en suspensión puede ser modelado por una solución homogénea conformada por la mezcla de diferentes sustancias.

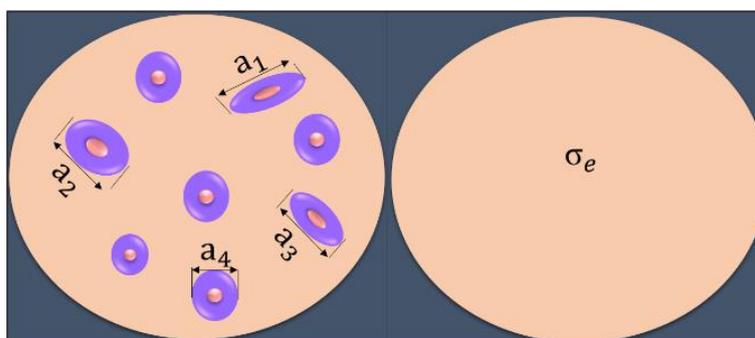


Figura 5. Modelo teoría del medio efectivo. (Izquierda) Medio heterogéneo con incrustaciones de diferente tamaño, orientación y forma. (Derecho) Su respectivo modelo efectivo.

4.2. Metodología

4.2.1. **Preparación de soluciones.** Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua tipo 1 (18.2 M Ω) obtenida en un equipo Milli-Q, y empleando reactivos grado analítico.

4.2.2. **Soluciones para limpieza química y electroquímica de los electrodos.** Se utilizó H₂SO₄: H₂O₂ en proporción (3:1) para la limpieza química y una solución 0.5M de H₂SO₄, para la limpieza electroquímica.

4.2.3. **Preparación de soluciones electrolíticas.** La solución salina amortiguadora (PBS 1X) se preparó a partir de Cloruro de sodio (138mM), Cloruro de potasio (3mM), hidrógeno fosfato de sodio (8.1mM) y di- hidrógeno fosfato de potasio (1.5mM), se utilizó ácido clorhídrico (HCl) 1M para ajustar el pH en 7.4.

Las soluciones electrolíticas para modelar las propiedades eléctricas de células cervicales en suspensión se prepararon a partir de una solución buffer de fosfato salino con pH= 7,4. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriales utilizando agua tipo 1. Para determinar el efecto por separado de los iones de sodio (Na¹⁺) y potasio (K¹⁺) sobre el espectro de impedancia eléctrica, se prepararon soluciones tampón de cada ion, utilizando NaCl (0.3mM), NaHPO₄ (0.81mM), Na₂HPO₄ (0.15mM) y de KCl (0.3mM), KH₂PO₄ (0,029mM), K₂HPO₄ (0,022mM). Todas las soluciones se prepararon teniendo en cuenta factores osmolares para garantizar la homeostasis celular.

4.2.4. **Preparación de los electrodos.** Se fabricaron los electrodos de oro mediante la soldadura de cuatro alambres de oro (18 quilates, 1 mm de diámetro y 15 mm de largo), cada uno en un ángulo de 90° con un alambre de plata con las mismas dimensiones. Los electrodos

de oro fueron sometidos a una limpieza química sumergiéndolos en una solución 1:3 v/v H₂O₂ (9.8M): H₂SO₄ (11,8M) durante 3 minutos para remover los compuestos orgánicos presentes en la superficie. Después, los electrodos fueron limpiados electroquímicamente en medio ácido por voltamperometría cíclica en una celda convencional de tres electrodos a temperatura ambiente. El oxígeno disuelto se eliminó mediante burbujeo de N₂ durante 15 min. Fue utilizada una barra de grafito de alta pureza (99.9995%, 5 mm de diámetro) como contra-electrodo y un electrodo de Ag / AgCl / 3.0M KCl como electrodo de referencia. Se realizaron ciclos de oxidación-reducción en H₂SO₄ (0.5M) para cada electrodo en una ventana de potencial de -0.1 a 1.6 V a una velocidad de barrido de 0.1 V/s⁻¹, hasta obtener el comportamiento electroquímico característico del oro. Todas las mediciones electroquímicas se realizaron con un potenciostato/ galvanostato, Autolab PGSTAT 302N y se utilizó el software NOVA 1.11.

4.2.5. Caracterización de corriente de medición. Para la caracterización de la corriente de medición, se realizaron experimentos cronopotenciometricos en una solución de PBS, aplicando un pulso de corriente de 0.1, 1 y 10 μ A durante 100 s. Se utilizó una celda convencional de tres electrodos, con un electrodo de Ag/AgCl (3 M KCl) como electrodo de referencia, una barra de grafito de alta pureza (99.9995%) como electrodo auxiliar y un alambre de oro como electrodo de trabajo. Las mediciones electroquímicas se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT 302N y empleando el software NOVA 1.11.

4.2.6. Mantenimiento de las Células HeLa. Las células HeLa utilizadas en la investigación fueron donadas por el laboratorio de oxidaciones biológicas de la Universidad Federal de Paraná, quienes a su vez las obtuvieron comercialmente de la ATCC (del inglés

American Type Culture Collection), entidad que tiene más de 85 años de experiencia en el aislamiento, identificación y comercialización de células en cultivo.

Las células se cultivaron siguiendo la metodología estándar basada en el uso del medio EMEM, suplementado con 7% de suero fetal bovino y antibiótico (Gentamicina 50 mg/L). Las células fueron cultivadas en botellas plásticas y mantenidas en incubadora con 5% de CO₂ y 37°C, para adhesión, crecimiento y replicación hasta la obtención de la cantidad necesaria para el desarrollo de los experimentos.

4.2.7. Recolección de muestras de tejido cervical. La recolección de las muestras biológicas se llevó a cabo una vez aprobado el estudio por parte del Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander, como consta en el Acta No 25 del 16 de Diciembre del 2016. Una vez obtenido el consentimiento voluntario de 36 pacientes, con edades entre 20 y 56 años; las células cervicales fueron extraídas por raspado de Papanicolaou según la técnica estandarizada en los servicios de prevención y promoción del Hospital Universitario de Santander, todo esto con el acompañamiento de personal especializado en el consultorio médico. Las células extraídas fueron suspendidas en 1 mL de solución fosfato salina (PBS) con el fin de preservar el estado celular intacto y facilitar el depósito de la suspensión en la celda de medición. El número de células obtenidas por raspado de Papanicolaou se estimó por medio del conteo celular de la solución y la Ecuación 9. Para la cuantificación, se tomaron 10 µL de cada muestra y con la ayuda de la cámara Neubauer se realizó el conteo bajo visión microscópica.

$$C = n \times 10^4 \times d$$

Ecuación 9

Donde, C es el número de células totales por mL; n el promedio de células presentes en 1mm^2 y d es el factor de dilución.

4.2.8. Determinación de Viabilidad Celular. La viabilidad celular se determinó utilizando azul de tripán, colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y a células muertas. En este procedimiento se utilizaron $90\ \mu\text{L}$ de suspensión de células cervicales y se adicionaron $10\ \mu\text{L}$ de solución de azul de tripan al 0.4%, antes de ser observadas al microscopio óptico (REF) haciendo uso de la cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad se calculó de acuerdo con la Ecuación 10.

$$\%(CV) = 100x \frac{NC}{CT}$$

Ecuación 10

Donde CV corresponde a las células viables, NC a las células no coloreadas y CT a las células totales.

4.2.9. Medición de los espectros de impedancia eléctrica. Las mediciones eléctricas de las células en suspensión se realizaron en un potencióstato-galvanostato Autolab PGSTAT204 con módulo FRA. Se utilizó una sonda con conexión de cuatro puntas, como se muestra en la Figura 6. Para estas medidas se utilizaron cuatro (4) electrodos de oro, y una corriente de perturbación de $10\ \mu\text{A}$, en un rango de frecuencia entre 1Hz -1 MHz. Se tomaron 80 datos por espectro.

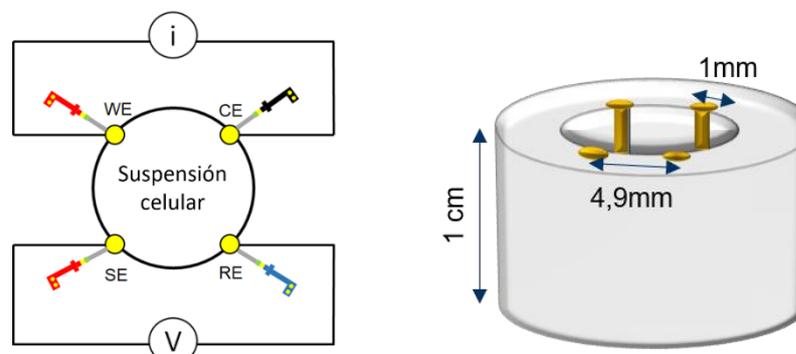


Figura 6. Sonda de medición de cuatro electrodos, utilizada para medidas de células cervicales en suspensión. WE: electrodo de trabajo; CE: Contra-electrodo; R: electrodo de referencia y S: electrodo sensor.

4.2.10. **Análisis de datos.** Espectros de impedancia Eléctrica. Las muestras se clasificaron de acuerdo a los resultados de la citología cervicovaginal, para ello se definieron cuatro categorías basadas el sistema Bethesda: Normal, Normal con infecciones (hongos-bacterias), ASCUS, y HSIL, además, se incluyó una categoría para las células HeLa, modelo biológico de cáncer cervical. Para el análisis de los espectros de impedancia eléctrica (eIE) se llevó a cabo un análisis visual sistemático por triplicado, utilizando el sistema de doble ciego, para evitar errores en la clasificación. Los espectros fueron graficados en la misma escala de frecuencia (1.0 Hz y 0.1 MHz) y de impedancia (0-400 Ω), con el fin de identificar patrones característicos, permitiendo discriminar entre las diferentes categorías establecidas. Una vez clasificados, se determinó el espectro promedio para las categorías que presentaron mayor número de datos (Normal, ASCUS y HeLa). Este promedio fue calculado mediante un algoritmo programado en Python, utilizando la librería panda que permite realizar análisis y estructura de datos. El algoritmo desarrollado calcula el valor promedio de la parte real de la impedancia para cada valor de frecuencia de medida. Los datos de impedancia eléctrica de

cada categoría se normalizaron mediante la Ecuación 11, con el propósito de realizar un análisis de dispersión de los datos a través de diagramas de cajas y bigotes.

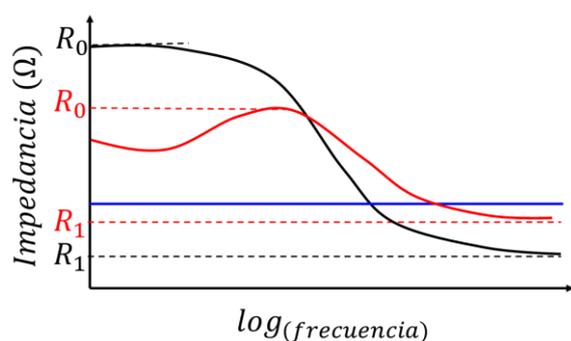
$$R_{Norm} = R / R_{max}.$$

Ecuación 11

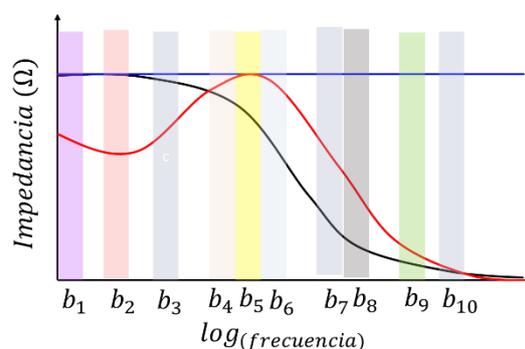
Donde R , representa la parte real de la impedancia, R_{Norm} , es la parte real normalizada de la impedancia y R_{max} el valor máximo la parte real de la impedancia.

Los espectros promedio calculados para las categorías Normal (28 muestras), ASCUS (5muestras) y HeLa (6 muestras) fueron normalizados (Figura 7. A) y representados en una forma geométrica utilizando un algoritmo desarrollado en Python. Para esto, los espectros se dividieron en diez bandas de frecuencia (Figura 7. B), dando origen a un decágono cuyos ejes están dispuestos radialmente, y la longitud de cada lado representa el valor medio de la parte real de la impedancia en cada banda (Figura 7. C).

A.



B.



C.

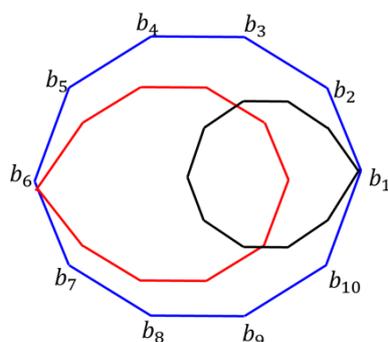


Figura 7. Esquema gráfico para la metodología del análisis de la forma geométrica. (A) Espectros promedios representativos (B) selección de bandas y (C) obtención del decágono.

A los valores de área de los decágonos de las categorías Normal, Ascus y HeLa se les realizó un análisis estadístico, con el fin de determinar diferencias significativas entre los grupos. Este análisis se llevó a cabo en dos etapas: Primero un test de normalidad Kolmogorov-Sminorv, Liefors y Shapiro-Wilk, seguido del test Kruskal-Wallis-Anova para datos no paramétricos.

4.2.11. **Disposición de los residuos biológicos.** Los residuos biológicos generados en el desarrollo de este proyecto fueron manipulados de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos-2010 del Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia y los lineamientos del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la Universidad Industrial de Santander.

Los residuos biosanitarios generados del cultivo de células HeLa están clasificados como residuos infecciosos de riesgo biológico, por esta razón fueron dispuestos en bolsa de color rojo con el rótulo “Riesgo biológico”. Estos desechos fueron entregados en la ruta de

recolección y almacenamiento de residuos organizados por el PGIR, para su entrega a la empresa encargada de su disposición final.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Caracterización de la corriente de medición. En la Figura 8 se presenta el comportamiento electroquímico característico de un electrodo de oro en medio ácido (Ma *et al.*, 2013), en el cual es posible identificar el intervalo de potencial en el cual la respuesta en corriente corresponde a la corriente capacitiva asociada a los procesos de carga y descarga de la doble capa eléctrica y no a reacciones farádicas que involucran transformaciones del estado superficial de los electrodos.

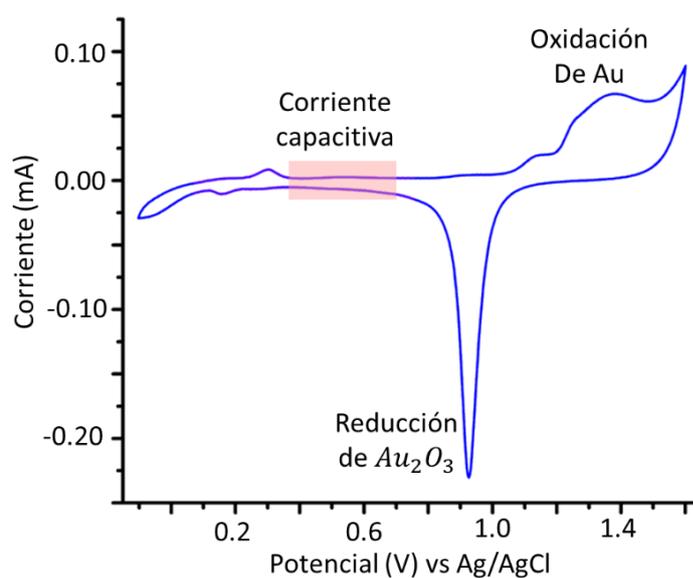


Figura 8. Voltamperograma cíclico de electrodo de oro en H_2SO_4 (0.5M) con una velocidad de barrido de 100mV/s y en una ventana de potencial de (-0.5 V a 1.6V).

La Figura 9 muestra los cronopotenciogramas obtenidos sobre un electrodo de oro en una solución de PBS al aplicar una señal de corriente de 0.1, 1.0 y 10 μA . Para la corriente de

medición de $10 \mu\text{A}$ se observó un tiempo de estabilización τ_1 , el cual fue determinado a través de la segunda derivada de la curva cronopotenciometrica con respecto al tiempo. Al identificar el potencial al cual corresponde este tiempo de estabilización en la curva cronopotenciometrica y ubicarlo en el voltamperograma de la Figura 8, se observó que éste corresponde a un potencial en la región de corriente capacitiva. Realizando el mismo proceso para las corrientes más bajas se encontró que los potenciales asociados a los tiempos de estabilización se encuentran en la región donde ocurren reacciones de transferencia de carga.

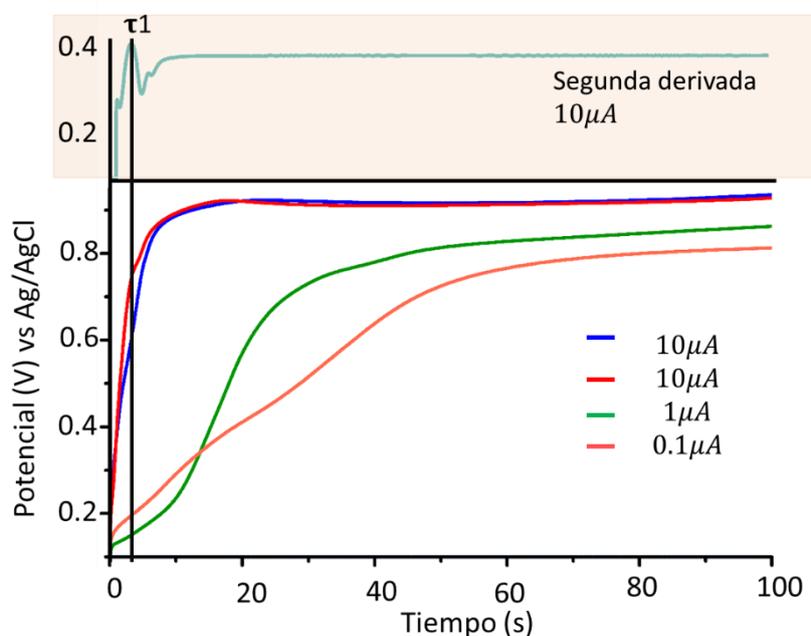


Figura 9. Cronopotenciograma del electrodo de medición (Au) en solución de PBS. Pulsos de corriente (línea azul y roja: $10 \mu\text{A}$) (línea verde: $1 \mu\text{A}$) (línea naranja: $0.1 \mu\text{A}$)

Teniendo en cuenta que la finalidad es medir medios electrolíticos con células en suspensión, sin que ocurran transformaciones en la superficie de los electrodos de oro se eligió una corriente de $10 \mu\text{A}$ para realizar las medidas de Impedancia Eléctrica galvanostática.

4.3.2. Caracterización Eléctrica de las células cervicales en suspensión. El análisis visual de los 36 espectros de impedancia, obtenidos a partir de las muestras celulares de pacientes, se realizó de acuerdo a lo descrito en el ítem 4.2.9. Los espectros fueron clasificados en cuatro (4) grupos teniendo en cuenta patrones de forma similares: Normales, Normales con infecciones, ASCUS y HSIL. A partir de los resultados de la citología cervicovaginal, técnica actualmente utilizada para el tamizaje de cáncer de cuello uterino, se obtuvieron: 28 diagnósticos normales, 2 normales con infecciones (vaginosis bacterial), 5 con atipia celular escamosa indeterminada (ASCUS) y 1 con neoplasia intraepitelial alta (HSIL).

Al comparar los resultados obtenidos del análisis visual y la citología se observó una correspondencia entre la forma del espectro de impedancia eléctrica (eIE) y las categorías de clasificación utilizadas por el sistema Bethesda. Por otra parte, se observó que, aunque el patrón de forma se conserva para cada categoría de clasificación, el valor de la magnitud de la impedancia real cambia de una muestra a otra. Esta variación puede estar asociada a diversos factores. Uno de los factores más influyentes y que se debe resaltar teniendo en cuenta la metodología utilizada en este estudio, es el número de células de cada muestra. Considerando que la cantidad de células obtenidas en el raspado de Papanicolaou depende de condiciones de la paciente tales como: la edad, el estado fisiológico, el ciclo hormonal, entre otros; la densidad celular de las muestras fue un parámetro no controlado en este estudio.

En el histograma de la Figura 10 se puede observar la variabilidad en el número de células de las muestras evaluadas; siendo (1.15-1.65 millones) el rango que más se repite.

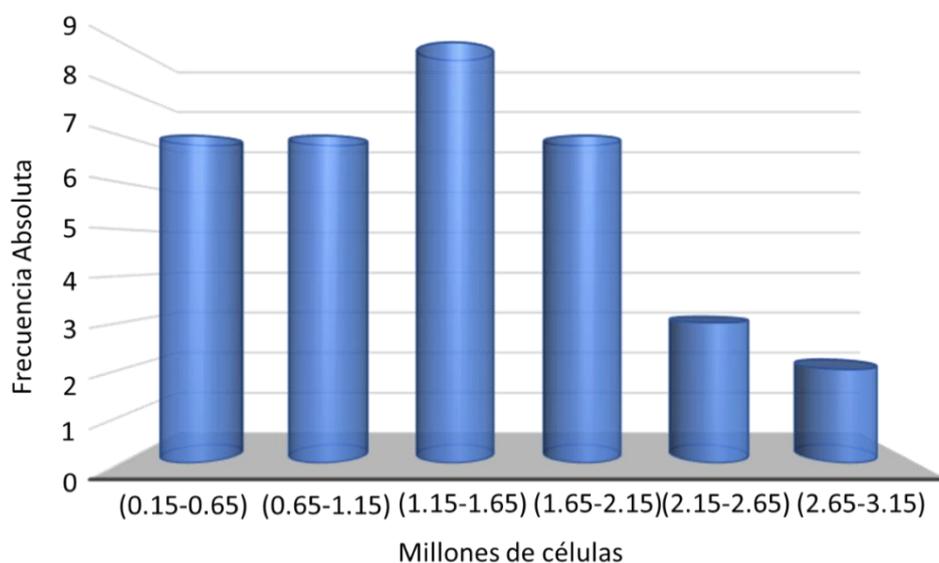
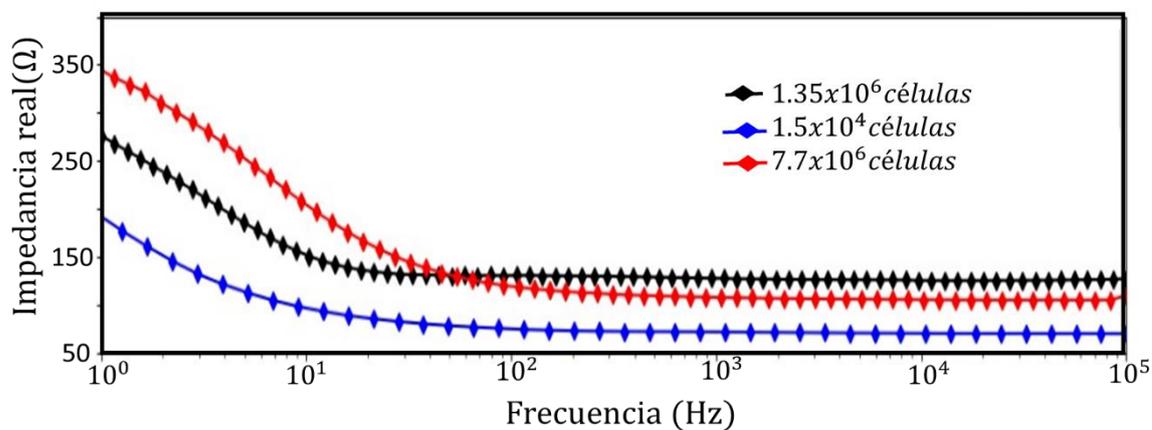


Figura 10. Distribución por rango de frecuencia del número de células cervicales extraídas a las 36 pacientes participantes del estudio.

Siendo la impedancia eléctrica una propiedad extensiva de la materia, es de esperarse que la diferencia en el número de células, influya directamente en su valor (Brown *et al.*, 2000; Das, Kamil, Biswas & Das, 2014). En la Figura 11 A se muestran los resultados para tres diferentes valores de densidad celular, estos eIE corresponden a la clasificación normal y son representativos para dar explicación a la dependencia entre el número de células y la magnitud de la impedancia. La diferencia en los resultados es más significativa a frecuencias menores a 100 Hz, donde el incremento en la magnitud de la impedancia es directamente proporcional al número de células.

A.



B.

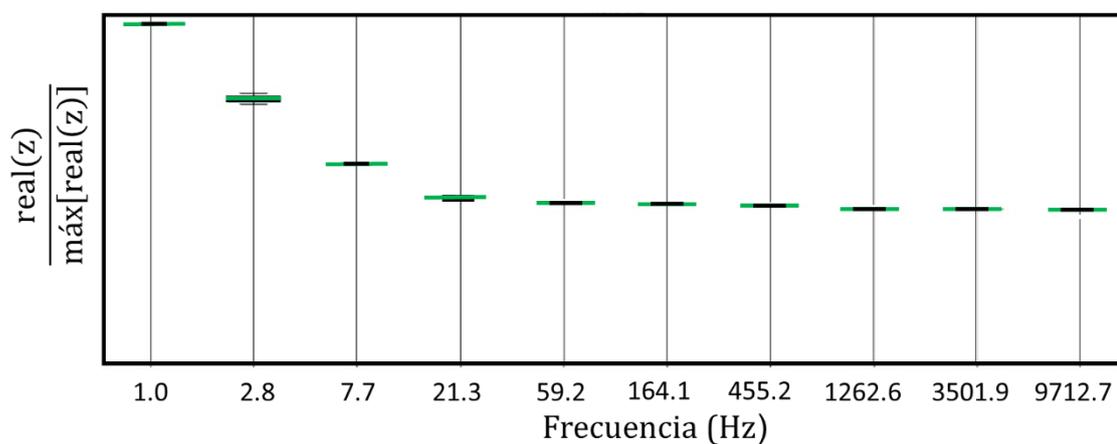


Figura 11. Espectros de impedancia clasificación normal. (A) Influencia del número de células sobre el valor numérico de la parte real de la impedancia. (B) Análisis de dispersión de los datos normalizados para observar el efecto del número de células sobre la forma del eEI.

Sin embargo, en el análisis de dispersión de los datos normalizados (Figura 11. B), se encontró que el comportamiento medio (línea verde) para cada valor de frecuencia conserva la tendencia en la forma del espectro. Lo anterior sugiere que la variabilidad en el número celular

afecta solo el valor numérico, pero no la forma del espectro de impedancia eléctrica, característica importante que puede ser utilizada para diferenciar células normales y anormales.

4.3.3. Diferencias en la forma de los espectros de impedancia eléctrica y su relación con anomalías bioquímicas. La respuesta eléctrica de las células cervicales en suspensión, está influenciada por su estado fisiológico y patológico. Una de las principales diferencias que exhiben las células se debe al efecto del potencial de membrana que presentan cuando están vivas (Prodan, Prodan & Miller, 2008; Schwan, 1994), esto hace necesario garantizar que, al momento de la medida eléctrica, las células se encuentren viables fisiológicamente. Para evitar posibles variaciones en la respuesta eléctrica de las 36 muestras recolectadas, la viabilidad celular fue determinada de acuerdo a la metodología descrita en (4.2.7). Los resultados obtenidos para todas las muestras presentan porcentajes superiores al 80% (Apéndice A), los promedios determinados en las categorías con mayor número de datos muestran valores superiores al 89% de viabilidad celular (Tabla 3).

Tabla 3.

Promedios de viabilidad y desviación estándar para las categorías Normal, ASCUS e Infecciones

Clasificación	Promedio (%)	Desviación estándar
Normal	90,73	+/- 3,85
ASCUS	89,24	+/- 5,93
Infecciones	91,08	+/-8,60

Una vez confirmadas las condiciones fisiológicas de las células cervicales utilizadas en esta investigación, se analizó el efecto de los cambios patológicos sobre la forma del eIE (Figura 12).

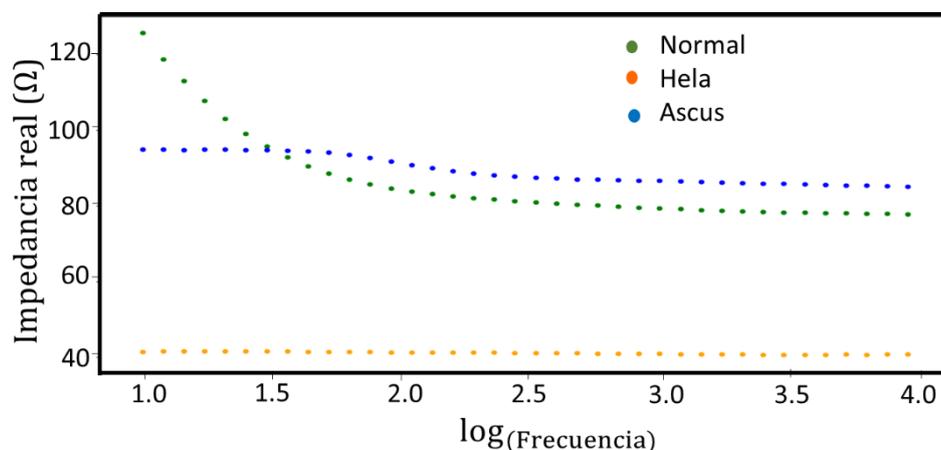


Figura 12. Formas de los Espectros de impedancia para las categorías Normal, ASCUS y el modelo de carcinoma cervical HeLa.

Como se puede observar, los atributos eléctricos de las células cervicales en suspensión van cambiando a medida que se presenta algún tipo de transformación neoplásica o anomalía bioquímica. La respuesta eléctrica de las células normales es muy diferente al de las células cancerosas, estas últimas muestran un comportamiento más resistivo en el rango de frecuencia de medición. Esto se debe principalmente a la pérdida de heterogeneidad de su membrana en la fase inicial de la carcinogénesis. Esta degeneración hace que se vuelva más permeable a sustancias solubles en agua, permitiendo la migración al exterior de iones como potasio (K^{1+}), magnesio (Mg^{2+}) y calcio (Ca^{2+}); mientras que el sodio se acumula en el interior (Lang & Stournaras, 2014). Estos cambios en las concentraciones iónicas conllevan a una despolarización de la membrana (Cone, 1975) y a la pérdida de la homeostasis celular, puesto que eventos como la proliferación y apoptosis celular están regulados por estos iones (Capítulo 4)

En la colección de espectros obtenida, se encontró una muestra con diagnóstico de neoplasia intraepitelial alta (HSIL), su espectro de impedancia se contrastó con el modelo biológico de carcinoma humano (HeLa).

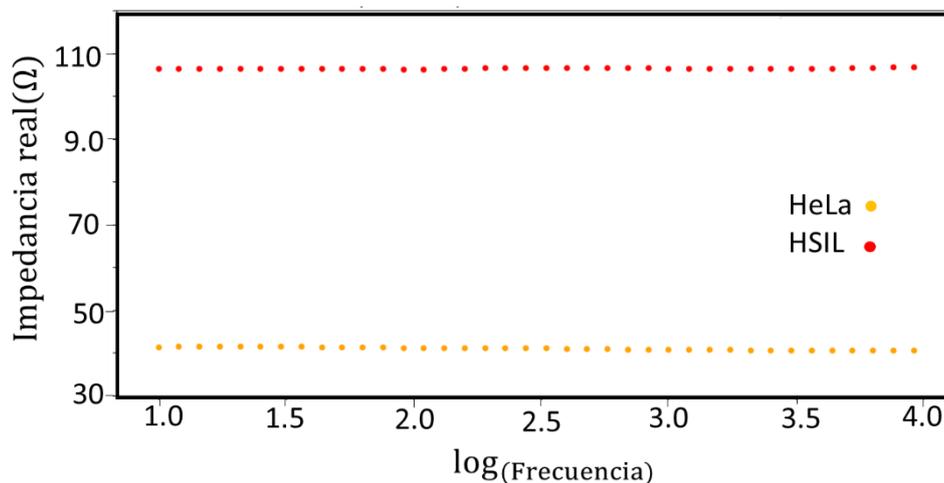


Figura 13. Comparación de espectro promedio del modelo biológico (HeLa) y paciente con HSIL.

En la Figura 13 se puede observar que tanto la muestra de células HeLa como la HSIL, conservan el mismo comportamiento resistivo descrito anteriormente; las discrepancias se presentan en el valor numérico de impedancia, pero están justificadas por la diferencia en la densidad celular de cada muestra.

A diferencia de las cancerosas, las células normales presentaron un espectro de impedancia donde se puede evidenciar los efectos capacitivos que exhibe su membrana celular. La dispersión eléctrica mostrada a bajas frecuencias, se asocia a la presencia de canales iónicos con selectividad y permeabilidad específicas, que permiten mantener un gradiente de potencial a través de la membrana. Este gradiente juega un papel importante en la regulación de procesos como, la proliferación y diferenciación celular (Bot & Prodan, 2009). A medida que aumenta

la frecuencia, la corriente eléctrica pasa a través de las células debido a una menor resistencia de su membrana, esto hace que el valor de impedancia disminuya hasta obtener un comportamiento casi constante.

Como se puede observar en el eIE obtenido para ASCUS, se presenta una dispersión más pequeña que en la normal. Considerando que las células cervicales han sufrido algún tipo de anomalía sin llegar a una lesión intraepitelial definitiva; es posible que su membrana haya sufrido una pequeña despolarización por cambios en su gradiente iónico. Este planteamiento se sustenta en la sección 3.3.5 Análisis de Anomalías encontradas en pacientes., en el cual se analizaron algunas anomalías presentes en esta categoría.

Por otra parte, en este estudio se encontraron dos muestras normales que presentaron vaginosis bacteriana (VB). Infección común que ocurre al perderse el equilibrio entre los diferentes tipos de bacterias que se encuentran en la vagina. En los resultados mostrados en la Figura 14, los dos espectros obtenidos tienen una forma muy similar, con variaciones debidas a la densidad celular.

A diferencia de las células normales, las propiedades eléctricas en esta categoría, están influenciadas por el metabolismo de las bacterias presentes en la muestra. En su proceso metabólico, estos microorganismos liberan iones al medio extracelular afectando su composición. Los resultados de estos cambios se ven reflejados en la forma del espectro, donde los valores de impedancia varían en todo el rango de frecuencia.

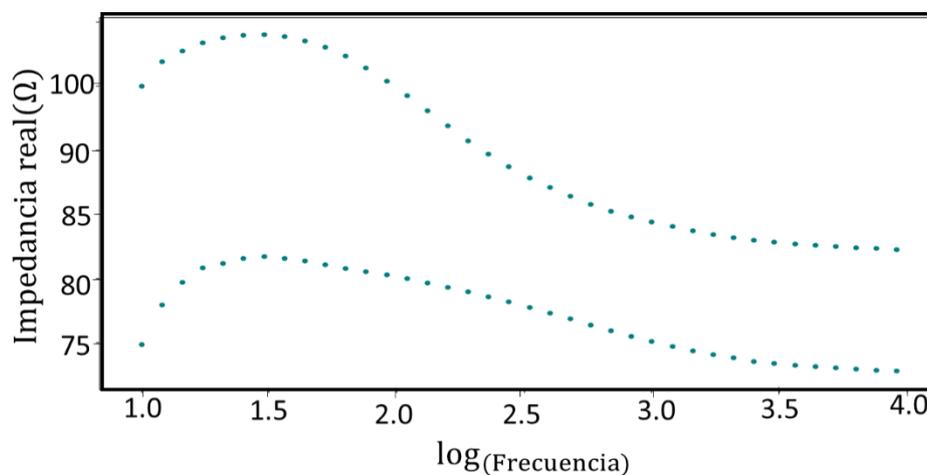


Figura 14. Espectros de impedancia eléctrica de células cervicales con vaginosis bacteriana.

4.3.4. Diagramas de radar y diferenciación de forma del espectro. Varios estudios sugieren la utilidad de la EIE como técnica de acompañamiento en el tamizaje de cáncer de cuello uterino. Con resultados donde a partir del eIE es posible extraer parámetros diferenciables entre tejido o células normales y cáncer (Brown, Milnes, Abdul & Tidy, 2005; Das *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2016). Sin embargo, en nuestro estudio se encontraron diferentes anomalías celulares que no se ajustan a modelos como el Cole-Cole (Cole & Cole 1941), ampliamente utilizado.

De acuerdo con esto, se seleccionaron diez bandas de frecuencia que dieron origen al decágono que se presenta en la Figura 15. Los bordes poligonales representan la media de impedancia en cada banda de frecuencia.

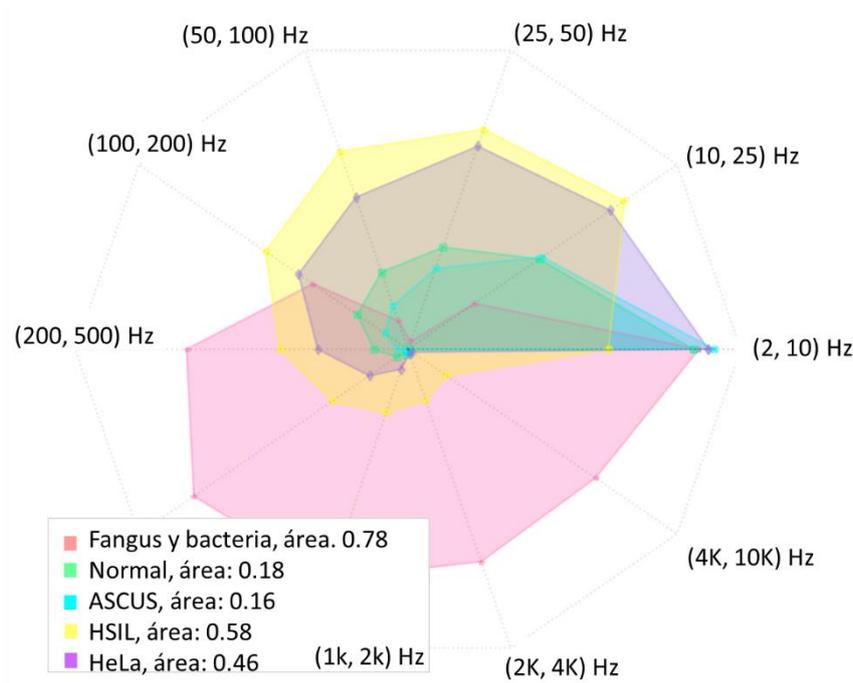


Figura 15. Representación gráfica del área bajo la curva para las clasificaciones. (rosado: infecciones verdes: normal; azul: ASCUS; amarillo HSIL y violeta: Hela)

Los decágonos de las categorías Normal (decágono verde) y ASCUS (decágono azul) muestran una forma y área similares (0.16 y 0.18 respectivamente). Las mayores diferencias en forma y tamaño entre estas clasificaciones se encontraron en el rango de bajas frecuencia (50-200Hz). En el caso de las células HeLa y HSIL, los decágonos también presentaron una forma y un valor de área similares (0.46 y 0.58 respectivamente). Mientras que para la normal - infecciones, el decágono obtenido presenta una forma y área bastante diferente (0.78) en comparación con las otras clasificaciones. Si se comparan los valores del área de los decágonos obtenidos entre la categoría normal, HeLa y HSIL, se observa una diferencia de 0.28 y 0.40 respectivamente.

Dado el comportamiento no normal de las áreas de los decágonos (Apéndice B), obtenidos a partir de los gráficos de radar en los grupos: Normal ($p < 0.01$), Ascus ($p < 0.01$) y HeLa ($p > 0.20$); se realizó un análisis ANOVA Kruskal-Wallis para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las categorías.

El análisis mostró que existen diferencias significativas entre los valores de área para las categorías Normal y HeLa ($p = 0,000142$) y HeLa - Ascus ($p = 0,0073$). Sin embargo, entre Normal y Ascus el valor de ($p = 1.00$), indica que no hay diferencias entre estos grupos. Como se mencionó anteriormente estas categorías tienen una forma y área muy similar y se requiere un mayor número de muestras (Ascus), con el fin de hacer un seguimiento a la evolución de la paciente. Las otras dos clasificaciones encontradas (HSIL e infecciones) no entraron en el análisis debido a que presentaron muy pocos datos.

Es importante resaltar que la metodología propuesta para el análisis de los eIE a partir de su forma muestra diferencias entre las células cervicales normales y el modelo de carcinoma cervical humano (HeLa). Sin embargo, se requiere de un estudio con un mayor número de pacientes que permita obtener una muestra más representativa en todas las categorías; por esta razón, en el grupo de investigación CIMBIOS se propuso un proyecto de investigación el cual está siendo financiado por la Universidad Industrial de Santander, con el objetivo de validar la Espectroscopia de Impedancia Eléctrica de células en suspensión, como técnica para el tamizaje de cáncer de cuello uterino, proyecto que cuenta con el apoyo de la Liga Santandereana contra el Cáncer.

4.3.5. Análisis de Anomalías encontradas en pacientes. A partir del análisis de forma del eIE presentado anteriormente y los argumentos de la teoría del medio efectivo es posible

proponer la hipótesis que: “Un medio heterogéneo de células en suspensión, se puede modelar como un medio homogéneo de soluciones electrolíticas”.

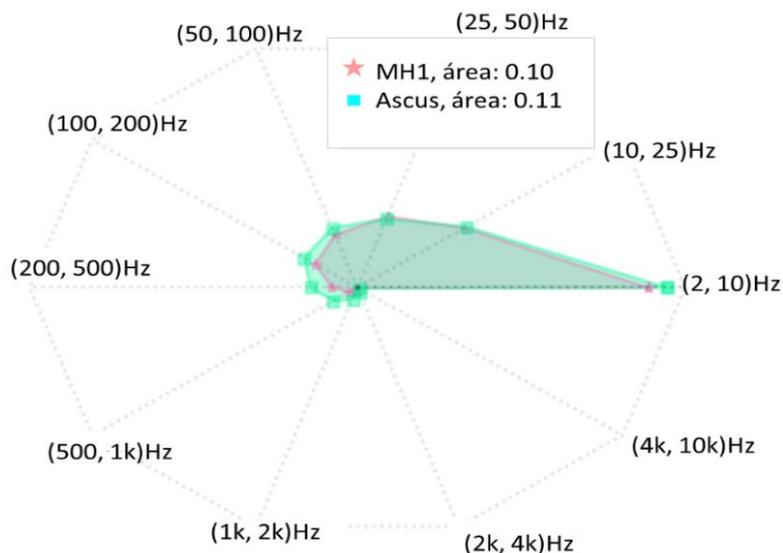
Para sustentar este planteamiento, se utilizaron dos medios artificiales homogéneos (MH1 y MH2) preparados por dilución de la solución extracelular en un factor de (1:10) y (1:100) respectivamente.

Tanto MH1 como MH2 están formados por soluciones hipotónicas, donde la disminución en la concentración de iones sodio y potasio modela el comportamiento del medio heterogéneo compuesto por células cervicales en suspensión. Estos cambios en la concentración afectan el gradiente iónico, rasgo característico en el proceso de transformación maligna (Cone, 1975).

Como se menciona en el capítulo 4, iones como sodio y potasio controlan diferentes mecanismos relacionados con la homeostasis celular. El cambio en sus concentraciones afecta los mecanismos de funcionamiento de las bombas de sodio y potasio, encargadas del transporte a través de la membrana (Brackenbury, 2012). Además, estos iones son marcadores oncogénicos (Ramírez *et al.*, 2013) y pueden conferir una ventaja al crecimiento y proliferación celular en las primeras etapas de transformación como en el caso de ASCUS.

La forma geométrica de los modelos y sus respectivos parámetros de área se muestran en la Figura 16 A y B. En general se puede observar una tendencia muy similar entre los dos medios, tanto de forma como del área encerrada, con pequeñas diferencias entre las frecuencias (0.1-1KHz). Sin embargo, para ser el primer modelo propuesto para modelar anomalías en células cervicales, se obtuvieron resultados con una muy buena aproximación. Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos, la hipótesis planteada permitió modelar experimentalmente a través de soluciones electrolíticas las propiedades eléctricas de las células anómalas (ASCUS).

A.



B.

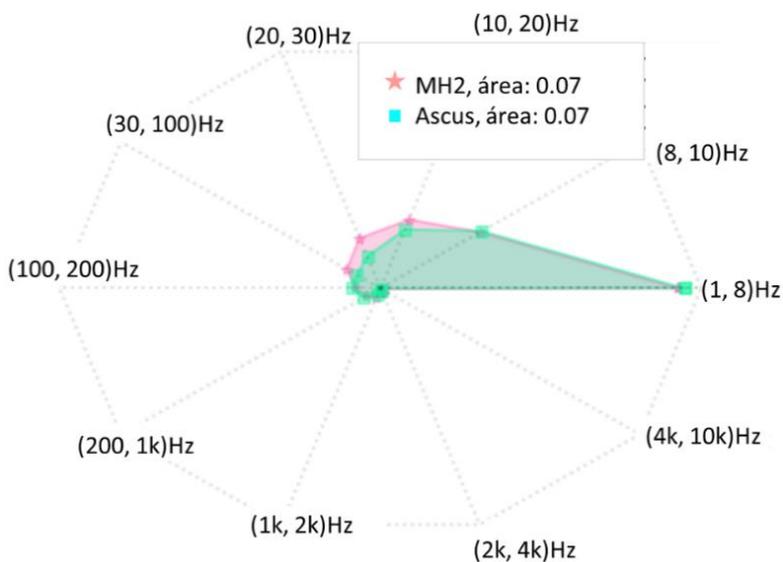


Figura 16. Representaciones gráficas de áreas bajo la curva medios MH1 y MH2. (A). Representación gráfica del área bajo la curva para el MH1 (con un factor de dilución: 1/10) (solución hipotónica de iones sodio, potasio y cloro) y medio heterogéneo (células cervicales-ASCUS). (B) Representación gráfica del área bajo la curva para el MH1 (con un factor de

dilución: 1/100) (solución hipotónica de iones sodio, potasio y cloro) y medio heterogéneo (células cervicales-ASCUS)

4.4. Conclusiones

El estudio de las propiedades eléctricas de las células cervicales en suspensión, permitió establecer una relación entre la forma del espectro de impedancia eléctrica y el estado de las células. Teniendo en cuenta que el estado de las células está relacionado con anomalías bioquímicas en el tejido, los resultados obtenidos sugieren que el estudio de las propiedades eléctricas de células en suspensión podría ser utilizado para analizar dichas anomalías. Además, se encontró que la forma del espectro es independiente de la densidad celular de la muestra.

El análisis de los espectros de impedancia por medio de gráficos de radar mostró diferencias significativas entre la forma y área de células normales y las células de carcinoma cervical (HeLa), estos resultados permiten proponer a la Espectroscopia de Impedancia Eléctrica de células cervicales en suspensión como técnica de tamizaje para cáncer de cuello uterino.

5. Alteración proteica en cáncer de cuello uterino y su relación con las propiedades eléctricas de células en suspensión

El estudio de las propiedades eléctricas de las células cervicales en suspensión con EIE, ha mostrado que es posible diferenciar entre células normales y células con diversos grados de lesión neoplásica (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las diferencias en sus propiedades eléctricas se encuentran relacionadas con anomalías bioquímicas que se presentan en el desarrollo de la neoplasia cervical, en donde la alteración de las concentraciones iónicas a través de la membrana citoplasmática es la anomalía más influyente (Chávez, Zúñiga

y Camacho, 2015). De esta forma, en este capítulo se presenta una revisión de la expresión proteica diferenciada en cáncer cervical y su posible relación con parámetros eléctricos que permiten discriminar el estado celular en este tipo de cáncer.

5.1. Generalidades

Las células cervicales en su proceso de cancerización presentan un patrón de expresión proteica diferente a las células normales (Santos L *et al.*, 2011). El estudio de estos patrones de expresión se ha realizado a partir de muestras de tejido cervical usando diferentes métodos de análisis de proteínas, que han permitido identificar biomarcadores y dianas para posibles usos terapéuticos. La evolución del cáncer de cuello uterino (CCU) implica la alteración de diversos genes y proteínas que participan en aspectos celulares como proliferación, apoptosis y diferenciación. Entre estos genes afectados durante la transformación neoplásica, se incluyen los que codifican los procesos de transporte iónico en la membrana plasmática (Lang & Stournaras, 2014; Wong *et al.*, 2004; Zhu X *et al.*, 2009). Estos procesos son controlados por múltiples factores, dentro de los cuales la concentración intracelular de iones resulta importante en la expresión de canales y transportadores iónicos (TI) (Schwab & Stock, 2014).

Los canales iónicos (CI) son proteínas integrales de membrana que permiten de forma selectiva el paso de iones que se mueven a través del gradiente electroquímico. El transporte de iones es parte integral de la regulación, progresión y proliferación del ciclo celular, y se encuentra estrechamente controlado por los procesos de difusión a través de la membrana (Becchetti, 2011). El papel que desempeñan los CI en los diferentes tipos de cáncer ha sido ampliamente estudiado, ya que su desregulación contribuye de manera importante en el proceso de transformación oncológica, crecimiento y migración (Besson *et al.*, 2015; Bomben, Turner,

Barclay & Sontheimer, 2011; Prevarskaya, Skryma & Shuba, 2018). Todos estos procesos celulares están altamente regulados y requieren la secreción de proteasas que alteran la matriz extracelular facilitando el paso de iones a través del entorno circundante (Prevarskaya, Skryma & Shuba, 2010).

Los canales iónicos se pueden clasificar de acuerdo con la función que cumplen o por las especies iónicas que los atraviesan. Los estudios moleculares han permitido identificar las proteínas específicas dentro de las familias y subfamilias que forman el complejo de canales y la función específica que cumplen en el desarrollo celular normal o maligno (Diaz *et al.*, 2007; Monteith, Davis & Thomson, 2012; Ortiz *et al.*, 2011).

En cáncer se han encontrado ciertas características o sellos distintivos que los diferencian del crecimiento celular normal. Dentro de este grupo sobresalen 5 características claves en el proceso de proliferación celular, y metástasis. (1) Autosuficiencia en las señales de crecimiento, debido a que las células tumorales adquieren autonomía de crecimiento al producir y liberar mitógenos intrínsecos que actúan de forma autocrina o paracrina (Pedersen & Stock, 2013), alterando la expresión de receptores en la superficie celular, así como la desregulación de las vías intracelulares que afectan la expresión génica. (2) Evasión de apoptosis o muerte celular programada, las células cancerosas utilizan mecanismos que reducen el flujo de Ca^{2+} regulando negativamente la expresión de canales permeables a este ion o a las vías de señalización que los activan (Berridge, Bootman & Lipp, 1998). (3) Estabilización o extensión de los telómeros, otorgándole a la célula un alto e ilimitado potencial replicativo. (4) Alta actividad Angiogénica, las células tumorales requieren de la presencia de oxígeno y nutrientes para mantener su estatus proliferativo, por lo tanto, las células endoteliales vasculares (CEV) deben estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos necesarios para este proceso,

secretando factores mitogénicos que promueven la expansión rápida de las células tumorales e incrementan el riesgo de metástasis (Harris, 2002; Prevarskaya *et al.*, 2018). (5) Invasión de tejidos y metástasis, debido a su alto potencial de migración las células tumorales pueden penetrar en los vasos sanguíneos o linfáticos y proliferar en otro sitio (Provenzano *et al.*, 2006). La migración celular es un proceso que implica la formación de sitios de adhesión, varios canales iónicos se han visto implicados en este proceso que es fundamental para la progresión del cáncer (Fiorio & Munaron, 2014; Schwab, Fabian, Hanley & Stock, 2012).

En cáncer de cuello uterino, los canales iónicos se han propuesto como posibles marcadores tumorales y dianas terapéuticas. Dentro del grupo de canales expresados en este tipo de cáncer, se encuentran los canales de potasio, sodio y calcio principalmente. La familia de canales de potasio KCNH1 y KCNH4, encargadas del transporte de los iones K^+ a través de la membrana, se encuentran sobre-expresados (Brackenbury, 2012; Chávez, Zúñiga & Camacho, 2015; Ramírez *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009), estos canales se activan por la despolarización de la membrana y por la concentración de calcio intracelular (Kunzelmann, 2005). Los canales de sodio como SCN2A, SCNB1 y SCN7A, todos dependientes de voltaje se encuentran también expresados en cáncer de cuello uterino, regulan la migración e invasión celular (Brackenbury, 2012; Chávez *et al.*, 2015). Cuando ocurre la despolarización de la membrana se abren y se inactivan permaneciendo de esta forma hasta que la membrana nuevamente se repolariza (Brackenbury, 2012). Las proteínas S100A9, TRPM2, STM1, eEF1A1 y PDGFA, que hacen parte de la familia de canales permeables al ion Ca^{2+} , se encuentran significativamente alterados en cáncer cervical (Di Quinzio *et al.*, 2007; Zhao, He, Wang, Zhang & Wu, 2015; Zhu *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que la afluencia de este ion es necesaria para la progresión en el ciclo celular, los cambios en los niveles de Ca^{2+} extra e intracelular determinan la

progresión a través de diferentes fases del ciclo celular. Otro evento celular importante regulado por este ion es la muerte celular programada o apoptosis, puesto que al entrar el calcio al citoplasma cierra el poro mitocondrial y obliga a la mitocondria a producir el ATP que se requiere para el control de la homeostasis celular (Berridge *et al.*, 1998; Monteith *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la enorme cantidad de información en la literatura que reporta alteraciones en la expresión proteica en los procesos de generación de células cancerosas, esta revisión tiene como objetivo proporcionar una visión general de la relación entre la expresión proteica en células cervicales normales y cancerosas y su posible efecto sobre las propiedades eléctricas

5.2. Metodología

Para identificar las características de las proteínas que pueden contribuir a los cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales, se realizó una revisión bibliográfica de la expresión proteica diferenciada en displasia y cáncer cervical reportada en los últimos 20 años.

Una vez realizada la revisión bibliográfica se relacionó la información obtenida, identificando los genes y proteínas comunes en los reportes y su efecto sobre la expresión en cáncer cervical. Con la relación obtenida de esta información se consultaron diferentes bases bioinformáticas: (Human Protein Atlas, Protein Data Bank y Interactome 3D), con el fin de entender el comportamiento biológico y su efecto en los procesos de difusión a través de la membrana. Los parámetros generales de búsqueda para los genes y proteínas reportados fueron: Función, Ubicación, Ontología génica (GO) e interacciones.

Finalmente, se realizó una clasificación de las proteínas y los genes de acuerdo con las características y funciones que pudiesen contribuir a cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales.

5.3. Resultados y discusión

El análisis de la expresión de proteínas ha permitido el descubrimiento de biomarcadores importantes en el diagnóstico y elucidación de vías de señalización afectadas en diferentes tipos de cáncer. El aumento o la baja expresión de estas proteínas que participan en procesos claves para mantener la homeostasis celular han sido ampliamente estudiados (Di Quinzio et al., 2007; Brackenbury, 2012; Higuera *et al.*, 2016; Kendrick, Conner & Huh, 2006; Liu, Zhang, Hu, Chen & Zhao, 2016; Santos *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2009). A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica sobre la expresión proteica en cáncer cervical reportada en los últimos 20 años. En esta revisión se emplearon gestores de búsqueda (SCOPUS), bases de datos (SpringerLink, Elsevier, Scielo) y bases bioinformáticas (Human Protein Atlas, Protein Data Bank y String) especializadas en proteínas. Solo artículos publicados en revistas científicas fueron incluidos, otras publicaciones científicas como capítulos de libros o artículos de conferencias fueron excluidas. Se consideraron artículos publicados en inglés y disponibles en versión de texto completo.

5.3.1. Expresión proteica diferenciada en cáncer de cérvix. Teniendo en cuenta que una de las principales características en la transformación celular es el cambio en las concentraciones iónicas de la matriz extra e intracelular, que afectan el transporte iónico produciendo la despolarización de la membrana (Brackenbury, 2012; Cone, 1970); se propuso determinar las características de las proteínas que pudiesen contribuir con los cambios en las

propiedades eléctricas de las células cervicales. Para ello se seleccionaron 50 artículos que fueron agrupados en dos categorías. La primera, conformada por 26 artículos que reportan la expresión proteica diferenciada para cáncer cervical y la segunda por 24 artículos que reportan la expresión de proteínas relacionadas con canales iónicos en cáncer de cérvix.

De esta revisión se encontraron 63 proteínas, de las cuales 25 fueron reportadas por el 50% de los autores consultados. Para cada una de las proteínas se reportó la función, ubicación y el índice de sobreexpresión de algunas de ellas. Estos parámetros fueron determinados con la ayuda de bases bioinformáticas, en las tablas 4 y 5 se presentan los resultados obtenidos de esta revisión. Las 63 proteínas se clasificaron en 3 grupos:

- Proteínas con expresión en Canales Iónicos (Tabla 4)
- Proteínas que interactúan con Canales Iónicos (Figura 17)
- Proteínas desreguladas en cáncer cervical con diversas funciones (Tabla 5)

Esta clasificación se realizó teniendo en cuenta las funciones moleculares y los procesos celulares que llevan a cabo las proteínas, con el fin de relacionarlas con los cambios en las propiedades eléctricas observadas en las células cervicales.

Expresión de Proteínas relacionadas con Canales Iónicos. Se encontró la expresión desregulada de 11 proteínas de Canales Iónicos (Tabla 4), encargadas de la regulación y del transporte de iones sodio (Na^+), Calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) a través de la membrana. En la Tabla 4 se reporta el nombre, su ubicación celular y la función descrita para cada una de las proteínas. Este grupo es de especial interés por su efecto directo sobre las propiedades eléctricas

de las células y por su participación en procesos celulares como apoptosis, proliferación, activación de mitógenos, entre otros (Lang & Stournaras, 2014; Pedersen & Stock C, 2013).

La sobre-expresión en cáncer cervical de TRPM2, proteína de canal catiónico encargada del flujo de calcio (Ca^{2+}) y sodio (Na^+), juega un rol importante en los procesos que implican la señalización regulada por niveles de (Ca^{2+}) intracelular, como la apoptosis y la modulación del potencial de membrana (Zhu *et al.*, 2009). Al aumentar la concentración intracelular de este ion (por el paso de calcio extracelular) también incrementa la actividad del canal uniéndose al dominio citoplásmico, logrando la estabilización del canal en una conformación abierta. La actividad de TRPM2 también está regulada por factores como ADP ribosa cíclico, que junto con Ca^{2+} son requeridos para su activación (Starkus, Beck, Fleig & Penner, 2007). Otros canales con expresión alterada, cuya desregulación en cáncer cervical puede afectar la progresión y diferenciación en el ciclo celular son S100A9 (Zhao *et al.*, 2015). Estas proteínas con múltiples ligandos de unión al calcio (Ca^{+2}) (Markowitz & Carson, 2013) se localizan en el citoplasma, su actividad dentro del citoesqueleto intracelular y la matriz extracelular depende de las concentraciones de este ion. (Isaksen & Fagerhol, 2001). Al aumentar los niveles de calcio se promueve la translocación de S100A9 a la membrana, probablemente por mecanismos de las proteínas quinasas que actúan en los procesos de fosforilación a nivel del ciclo celular (Goebeler, Roth, Van den Bos, Ader & Sorg, 1995). Estos eventos de fosforilación pueden controlar los reordenamientos del citoesqueleto importantes para la migración celular (Vogl, *et al.*, 2004). Es importante resaltar la función que cumple el calcio en la regulación de este canal iónico, teniendo en cuenta que, como se describió en el capítulo anterior, este ion presenta un cambio en la concentración del medio extracelular a medida que se desarrolla la neoplasia cervical. Entre las diversas funciones que lleva a cabo este catión a nivel intracelular (Monteith,

Davis & Roberts-Thomson, 2012) se encuentra la modulación del citoesqueleto, que es también mediada por la proteína Beta-Tubulina (TUBB) (Brini, Calì, Ottolini, & Carafoli, 2013; Parker, Kavallaris & McCarroll, 2014; Salama, Malone, Mihaimed & Jones, 2007). La TUBB es el principal constituyente de los microtúbulos (Parker, Kavallaris & McCarroll, 2014) y se encuentra expresada en la mayoría de tumores epiteliales (Zhao *et al.*, 2015). En cáncer cervical su alteración puede estar implicada en los procesos de proliferación, señalización, migración celular y transporte intracelular (Chao *et al.*, 2006). Así mismo, se encontró la desregulación de las proteínas STM1, PDGFA y eEF1A1 (Di Quinzio *et al.*, 2007) encargadas de mediar el ingreso de Ca^{2+} a la matriz intracelular, estos canales actúan ingresando este ion al agotarse las reservas internas debido a la polarización de la membrana. Es importante resaltar que la desregulación de los canales mencionados anteriormente, hace que las células sean más susceptibles al estrés oxidativo causando una mayor translocación nuclear del factor de transcripción antioxidante NRF2, afectando la homeostasis celular (Lang & Stournaras, 2014; Phan *et al.*, 2017; Prevarskaya *et al.*, 2018).

Tabla 4.

Expresión de Proteínas en Cáncer cervical asociado al transporte de iones a través de los Canales iónicos.

N°	Proteína	Nombre	Índice de expresión	Ubicación	Función	Ref.
1	eEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	-1.77	Membrana celular, citoplasma y núcleo	Proteína moduladora de Ca^{2+} (calmodulin binding protein), proteína mensajera de unión de Ca^{2+}	Zhao <i>et al.</i> , 2015; Di Quinzio <i>et al.</i> , 2007
2	S100A9	S100 calcium binding protein A9	+1.75	Citoplasma y núcleo	Sitio de unión de iones Ca^{2+} y Zn	Zhao <i>et al.</i> , 2015; Zhu <i>et al.</i> , 2009

N°	Proteína	Nombre	Índice de expresión	Ubicación	Función	Ref.
3	TUBB	Tubulin Beta chain	+1.94	Citoesqueleto	Transporte intracelular (interactúa con canal de Ca)	Zhao <i>et al.</i> , 2015
4	TRPM2	Receptor potencial de canal catiónico.	+8.6	Membrana nuclear y lisosomas	Canal de cation, no selectivo, independiente de voltaje que regula el ingreso de Na ⁺ y Ca ²⁺ , mediando el incremento de los niveles citoplasmáticos de Ca.	Zhu <i>et al.</i> , 2009
5	KCNH1	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1	+ NR	Membrana celular y núcleo	Canal de K, transporte de iones K ¹⁺ . Proteína moduladora de Ca (calmodulin binding protein)	Chávez <i>et al.</i> , 2015; Zhu <i>et al.</i> , 2009; Ramírez <i>et al.</i> , 2013
6	KCNH4	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	+ NR	Membrana celular	Canal de K dependiente de voltaje y regulador de transporte transmembrana de iones	Brackenbury, 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2015
7	STM1	Stromal interaction molecule 1	NR	Retículo endoplasmático y citoesqueleto	Mediador del ingreso de Ca ²⁺ al producirse la disminución de Ca ²⁺ intracelular	Ramírez <i>et al.</i> , 2013; Zhu <i>et al.</i> , 2009

N°	Proteína	Nombre	Índice de expresión	Ubicación	Función	Ref.
8	PDGFA	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	NR	Membrana celular	Mediador del ingreso de iones Ca^{2+} al medio intracelular, debido a la polarización de la membrana	Ramírez <i>et al.</i> , 2013
9	Nav 1.2	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 2	+NR	Membrana celular	Mediador de la permeabilidad de iones Na^{+} dependiente de voltaje. Responde a la diferencia de potencial a través de la membrana	Brackenbury, 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2015
10	Nav 1.4	Sodium voltage-gated channel beta subunit 1	+NR	Membrana celular y medio extracelular	Regulador e inhibidor del canal de Na^{+} . dependiente de voltaje	Brackenbury, 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2015
11	Nav 1.7	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 7	+NR	Membrana Celular	Canal de Na^{+} dependiente de voltaje. Sitio de intercambio de iones	Brackenbury, 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2015

Nota: Los signos (+) se refieren a que la proteína se encontró con sobreexpresión respecto a los valores de referencia) y (-) valores por debajo de la referencia. Se utilizó (NR) cuando el valor numérico no se encuentra reportado.

Los canales de potasio dependientes de voltaje KCNH1 y KCNH4 son marcadores oncogénicos que pueden conferir una ventaja de crecimiento a las células cancerosas y favorecer la proliferación celular (Ramírez *et al.*, 2013). Su expresión está regulada por importantes vías de señalización como p53, PIP2 (Fosfatidil-inositol-4-5 bifosfato), pequeñas moléculas endógenas como H_2O_2 , ácido araquidónico y la concentración intracelular de calcio (Wulff, Castle & Pardo, 2009). En cáncer cervical estos canales tienen alta expresión debido

a que las células infectadas con el oncogén E6- del HPV inactivan la proteína supresora de tumores p53, que regula el ciclo celular ante un daño en el ADN y es conocida como el guardián del genoma (Díaz *et al.*, 2009; Hemmerlein *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2018).

Los canales dependientes de voltaje con sobre expresión en neoplasias y cáncer de cérvix Nav 1.2, Nav 1.4 y Nav 1.7 (Brackenbury, 2012), actúan como mediadores en el proceso de permeabilidad. Estos canales se activan por la despolarización de la membrana celular y su expresión anormal está relacionada con las características de las células cancerosas como proliferación, migración e invasión (Chávez *et al.*, 2015; Pedersen & Stock, 2013).

5.3.2. Expresión de proteínas que interactúan con canales iónicos.

Los canales iónicos además de encargarse del transporte de iones como calcio, sodio, potasio y cloro a través de la membrana, pueden realizar interacciones (Marcotte *et al.*, 1999) con otras proteínas implicadas en importantes vías de señalización como TP53 y la familia de proteínas S100A.

En la figura 17 se presenta las interacciones encontradas, entre proteínas de canales iónicos y proteínas con expresión general desregulada en cáncer de cuello uterino. Se encontraron interacciones directas de tipo genómico y de co-expresión conservada entre proteínas de canal, encargadas del transporte de iones como calcio, sodio y potasio: EEF1A1, SCN2A, KCNH1 y PDGFA. Y de tipo funcional entre la familia de proteínas S100A y TP53. Para realizar el interactoma, se utilizó la base de datos de interacciones proteína-proteína STRING (<https://string-db.org>).

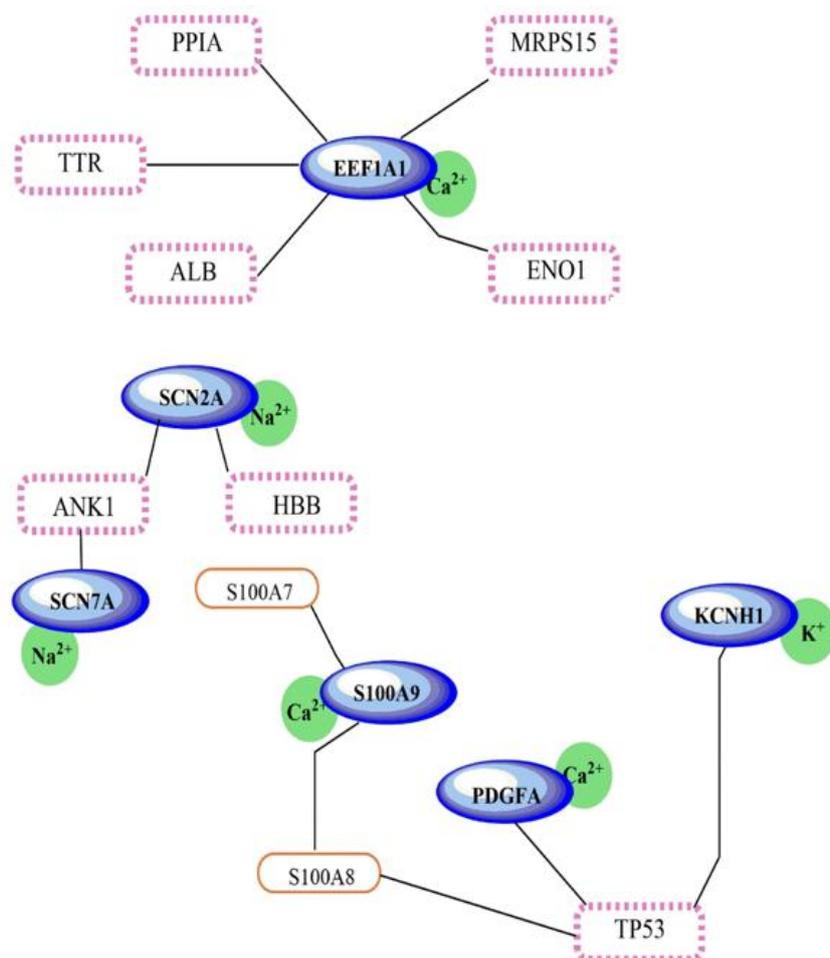


Figura 17. Interacciones esquemáticas entre canales iónicos. Se presentan las interacciones entre proteínas de canal, representadas en ovalos azules con su respectivo ión (círculos verdes) y las proteínas desreguladas en cáncer de cuello uterino (cajas en líneas de trazos), con diversas funciones. Las interacciones representadas en la figura corresponden a asociaciones físicas directas de tipo (genómico y de co-expresión conservada) como las de las proteínas Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1), Sodium voltage-gated channel alpha subunit 2 (SCN2A), Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1 (KCNH1) y Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C (PDGFA). Las interacciones encontradas de calcium binding protein S100, calcium binding protein A9 (S100A9) con calcium binding protein A7

(S100A7) y calcium binding protein A8 (S100A8) (cajas ovalas naranjas) y las de la proteína supresora de tumores TP53, son de tipo funcional, determinadas experimentalmente.

Como ya se mencionó, las proteínas de canal regulan varios aspectos importantes en el desarrollo del cáncer que pueden afectar sus propiedades eléctricas, como el potencial de membrana, que en el proceso de carcinogénesis celular se mantiene a un nivel más bajo que en células normales (Brackenbury, 2012). La despolarización de la membrana celular conlleva la interrupción de conexiones eléctricas (Haltiwanger, 2010), que afectan las propiedades de las células y permite la diferenciación del estatus normal y neoplásico. En la desregulación proteica en cérvix se encontró la interacción del gen Tp53, que codifica la proteína p53 conocida como supresora de tumores, esta proteína se encuentra regulada por el flujo de calcio citosólico, cuya concentración intracelular desempeña una importante función en la muerte celular programada (Hamada et al., 1996; Wang *et al.*, 2004), para tal fin se requiere la activación de las bombas y canales transportadores que una vez activos se pueden unir a bombas dependientes de ATP, y liberan el Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático otorgándole a la célula la capacidad de entrar en apoptosis (Boehning, Patterson & Snyder, 2004). En cáncer cervical se encontró que esta proteína interacciona con tres proteínas de canal: PDGFA, S100A8 y KCNH1, (Figura 17) encargadas del transporte de iones calcio y potasio al medio intracelular (Chávez *et al.*, 2015; Brackenbury, 2012; Kendrick *et al.*, 2006).

Otra proteína moduladora de calcio de interacción con proteínas desreguladas es, el factor de elongación eucariota alfa 1 (EEF1A1), cuyo aumento en su expresión induce la activación la proteína p53. Sin embargo, en cáncer cervical sus niveles de expresión están por debajo del normal (-1,77) (Di Quinzio *et al.*, 2007), por lo que podría estar relacionado con la inactivación

del p53. EEF1A1 también es el componente principal del sistema de traducción en mamíferos y participa en diversos procesos celulares (Blanch, Robinson, Watson, Cheng & Irwin, 2013).

En la Figura 17 se presenta su interacción con 5 proteínas entre las cuales están: Albumina(ALB), Transtiretina(TTR), proteínas pre-albúmina que transportan moléculas endógenas, La proteína mitocondrial ribosomal (MRPS15) relacionada con la síntesis de proteínas en la mitocondria (Zhao *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2009), peptidil-propil isomerasa (PP1A) (Lu, 2003) proteína de desdoblamiento necesaria para la infección del virus del papiloma y por último la alfa enolasa (ENO1) que participa en el crecimiento celular (Capello, Ferri-Borgogno, Cappello & Novelli, 2011) e interactúa con la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2), enzima que cataliza la reacción final de la vía glucolítica, para la producción de ATP (Israelsena & Vander, 2015; Liu *et al.*, 2016). Además, PKM2, posee actividad quinasa y desempeña un papel en la modulación de la expresión génica contribuyendo al desarrollo del tumor (Wong, De Melo & Tang, 2013). Es importante resaltar la participación de estas proteínas en la mediación de señales que requieren del flujo de iones para la señalización celular. Por lo anterior se plantea la hipótesis que los cambios en las concentraciones iónicas encontradas en el desarrollo de las neoplasias y el cáncer cervical afecten los niveles de expresión de estas proteínas ocasionando desregulaciones en las vías de señalización en que participan (Pinto, Corzo, Méndez-Sánchez & Miranda, 2015).

Otra de las interacciones encontradas en la expresión diferenciada en cáncer cervical fue la de los canales SCN2A y SCN7A dependientes de voltaje y encargados de modular el flujo de sodio intracelular (Diaz *et al.*, 2007; Hernandez-Plata *et al.*, 2012). Estas proteínas interactúan con anquirinas ANK1 que participan en la unión de las proteínas integrales de la membrana del citoesqueleto y con subunidades de β -Hemoglobina (HBB), principal portador de oxígeno y

dióxido de carbono en diferentes tipos de células, una de las funciones principales de esta proteína es atenuar el estrés oxidativo (Shin *et al.*, 2014; Hernandez-Plata *et al.*, 2012) inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos investigadores, han reportado que las corrientes de sodio Na⁺ reguladas por canales dependientes de voltaje pueden determinar la motilidad celular y la metástasis invasiva, así como los cambios en el citoesqueleto y la regulación y transcripción de diferentes genes (Lang & Stournaras, 2014; Schwab & Stock, 2014). Por lo tanto, es posible que las interacciones de ANK1 y HBB encontradas en cáncer cervical con estos canales puedan proporcionar un mecanismo adicional no canónico que afecten las propiedades bioeléctricas de las células.

5.3.3. Expresión de proteínas con diversas funciones. Teniendo en cuenta que la contribución al fenotipo maligno depende de diversos pasos consecutivos dentro de los cuales se encuentra el crecimiento tumoral, invasión local y metástasis, además de las interacciones específicas de las células con el microambiente (Hanahan & Weinberg, 2011), en esta sección se presenta la expresión desregulada de 8 proteínas, las cuales participan en diferentes procesos y que por su ubicación celular pueden contribuir indirectamente con los cambios en las propiedades eléctricas de las células cervicales.

En la Tabla 5 se presentan las proteínas desreguladas en cáncer cervical, que llevan a cabo funciones importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular y cuya desregulación (+) sobreexpresada con respecto a los valores normales de referencia o (-) inhibida puede influir en los cambios de las propiedades eléctricas de las células.

Tabla 5.

Expresión de Proteínas en Cáncer cervical con diversas funciones.

N°	Proteína	Nombre	Índice de expresión	Ubicación	Función	Ref.
1	ACSS1	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	+NR	Mitocondria	Importante en la homeostasis energética	Zhu <i>et al.</i> , 2009
2	F7	Coagulation factor VII	-2.09	Medio extracelular y mitocondria	Sitio de unión de iones Ca (interactúa con ALB)	Zhao <i>et al.</i> , 2015
3	GLRX	Glutaredoxin	+NR	Membrana celular, citoplasma y mitocondria	Regulador del transporte activo de Na a través de la membrana y transporte de Cu ²⁺	Kendrick <i>et al.</i> , 2006
4	MRPS15	Mitochondrial ribosomal protein S15	+NR	Mitocondria	Síntesis de proteínas en la mitocondria.	Zhu <i>et al.</i> , 2009
5	LUM	Lumican	+16.52	Región extracelular	Constituyente del medio extracelular	Higuera <i>et al.</i> , 2016
6	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	NR	Medio extracelular y citoplasma	Proteína de doblamiento, necesaria para la infección por el virus HIV (interactúa con PCK2 y eERF1A1)	Higuera <i>et al.</i> , 2016
7	ACTA2	Actin, alpha2, smooth muscle, aorta	+19.14	Filamentos de actina	Sitio de unión de la proteína quinasa	Higuera <i>et al.</i> , 2016

N°	Proteína	Nombre	Índice de expresión	Ubicación	Función	Ref.
8	SOD3	Superoxide dismutase 3	-1.77	Medio extracelular, citoplasma y núcleo	Sitio de unión de iones, responde a Cu^{2+} , Zn^{2+} y a hipoxia	Zhao <i>et al.</i> , 2015; 9]
9	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	-1.46	Citoplasma y núcleo	Interviene en la muerte celular de células tumorales. Tiene varios sitios de unión de cofactores Mg^{2+} , K^+ , el pH modifica su capacidad de unión (pH inferior a 5.00)	(Zhao <i>et al.</i> , 2015; Di Quinzio <i>et al.</i> , 2007

Nota: Los signos (+) se refieren a que la proteína se encontró con sobreexpresión respecto a los valores de referencia) y (-) valores por debajo de la referencia. La sigla NR significa que el valor no se encuentra reportado

La expresión desregulada de SOD3, PPIA, F7, LUM y IGSF1, ubicadas principalmente en la matriz extracelular (Human Protein Atlas), sitio donde se proporciona el andamiaje físico para que las células tumorales se adhieran y migren (Provenzano *et al.*, 2006) pueden influir de forma indirecta en los cambios de las propiedades eléctricas de las células cancerosas. De esta forma la baja expresión encontrada en cáncer cervical de superóxido dismutasa 3 (SOD3) encargada de catalizar la eliminación de radicales superóxidos (Che, Wang, Wang & Steven, 2015), podría afectar los niveles de hipoxia y las vías que se encuentran reguladas por este factor como apoptosis, glucolisis, angiogénesis entre otras (Harry, 2002).

Otra importante desregulación encontrada es la de la proteína Lumican (LUM) altamente expresada en cáncer cervical (Higuera *et al.*, 2016), la cual cumple un importante papel en la organización de la matriz extracelular (ME) desempeñando un rol clave en el crecimiento e invasión de las células cervicales cancerosas (Nikitovic, Papoutsidakis, Karamanos, & Tzanakakis, 2014). Así mismo las proteínas ubicadas en la matriz extracelular como: el factor de coagulación VII (F7), Inmunoglobulina 1 (IGSF1) y la peptidilpropil-isomerasa (PPIA), que participan en la integración de múltiples vías de señalización oncogénicas (Kendrick *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2015), ya sea como dianas importantes en la activación de factores de crecimiento o en la progresión del ciclo celular como es el caso de PPIA (Lu, 2003), pueden interactuar con los componentes de la ME, y afectar las propiedades eléctricas de las células lo que se podría evidenciar en los cambios encontrados a bajas frecuencias en el espectro de impedancia de pacientes con neoplasias cervicales (Das *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2013).

Por otra parte la desregulación de MRPS15 y ACCS1 proteínas ubicadas en la mitocondria, que participan en la síntesis de proteínas mitocondriales (Pérez-Martínez *et al.*, 2008), y en la conversión de acetil CoA en el metabolismo de los ácidos grasos (Tong, 2005), son de especial importancia en este análisis, debido a que los procesos celulares que llevan a cabo pueden afectar la homeostasis energética (Mendiola y Cruz, 2014) y la producción de ATP, Además la actina alfa 2 (ACTA2) otra de las proteínas presentadas en este grupo, hace parte de los filamentos de actina que conforman el citoesqueleto, en cáncer cervical se encuentra altamente expresada, posiblemente por las alteraciones que presenta el citoesqueleto en el proceso de carcinogénesis (Olson & Sahai, 2009). Estas alteraciones encontradas en las células cancerosas son el resultado de los cambios en la expresión de proteínas, lo que hace que las células adquieran mayor motilidad favoreciendo los procesos de invasión y metástasis (Efremov *et al.*,

2015). La desregulación en cáncer cervical de estas proteínas ubicadas en la mitocondria y el citoesqueleto, podrían aportar a los cambios en la conductividad eléctrica del medio intracelular de las células neoplásicas como lo reporta (Miranda *et al.*, 2013) y que no es posible simular con soluciones electrolíticas debido a la contribución electrónica del citoesqueleto al medio.

5.4. Conclusiones

El análisis de la expresión de proteínas en cáncer cervical permite establecer una posible relación entre su desregulación y los cambios en las propiedades eléctricas de las células durante el proceso de carcinogénesis. Se encontró que los índices de expresión de estas proteínas encargadas de regular diversos procesos celulares afectan el potencial de membrana, proliferación, motilidad y apoptosis celular. De igual forma las interacciones de proteínas encargadas del transporte de iones como Ca^{2+} , Na^{1+} y K^{1+} a través de la membrana plasmática pueden proporcionar mecanismos no canónicos que influyen en las vías de señalización reguladas por la concentración de estos iones.

6. Conclusiones

La hipótesis principal que se ha explorado durante el curso de este estudio es que: “Por medio de medidas de espectros de impedancia eléctrica realizadas en células en suspensión se pueden detectar anomalías bioquímicas asociadas a riesgo de cáncer”. En particular, analizar la relación entre las anomalías bioquímicas reportadas en células con diferentes patologías y su efecto sobre las propiedades eléctricas. Al explorar esta hipótesis, se encontraron los resultados que se listan a continuación:

- Las células contribuyen significativamente a la conductividad de un medio isotónico, lo que sugiere el intercambio iónico y metabólico.
- Las células adheridas a una superficie presentan conductividad diferente a las células en suspensión.
- La densidad celular y velocidad de crecimiento no afecta de manera significativa la conductividad de células adheridas.
- La densidad celular afecta el valor de la impedancia sin alterar la forma de los espectros de impedancia eléctrica de células en suspensión.
- Se encontraron diferencias significativas entre la forma y área de las células normales, y HeLa.
- Se propuso un modelo de análisis de la forma de los eIE que permite discriminar los estados de las células normales de las alteradas.

- El aumento de conductividad del medio extracelular del tejido cervical, está relacionado con aumento en las concentraciones de los iones Na^{1+} , K^{1+} , Ca^{2+} , Cl^{1-} , lo que se asocia con el aumento en el grado de malignidad en cáncer.
- Desde el punto de vista bioquímico se encontró: La expresión diferenciada de 11 proteínas relacionadas con canales iónicos que regulan el transporte Ca^{2+} , Na^{1+} y K^{1+} a través de la membrana como: TRPM2, STM1, PDGFA, eEF1A1, KCNH1 y KCNH4.
- Las proteínas de canal KCNH1, PDGFA y S100A9 interaccionan o son co-expresadas con la proteína Tp53 (supresora de tumores). En la mayoría de las células tumorales la proteína TP53 está inhibida para facilitar la proliferación celular. Para activar la Tp53 se requiere el aumento de la concentración de calcio citosólico y posteriormente inducir apoptosis.
- Las proteínas SOD3, PPIA y F7 se encuentran inhibidas al aumentar el grado de malignidad, estas proteínas están ubicadas en la matriz intracelular donde se proporciona el andamiaje físico para que las células tumorales se adhieran y migren.

Estos resultados nos permiten llegar a la conclusión de que la EIE es una técnica que puede ser usada para el pretamizaje de cáncer de cuello uterino, los cambios observados en los eIE de células cancerosas están relacionados con los cambios en la concentración iónica de Na^{1+} , K^{1+} , Ca^{2+} , Cl^{1-} en el medio extracelular artificial y es consecuencia de la expresión diferenciada de canales iónico y de proteínas que regulan estos canales.

Cumplido el objetivo de esta investigación, se recomienda, para una próxima, comprobar las diferencias entre las propiedades eléctricas de células normales y el modelo biológico de

carcinoma cervical (HeLa) a partir de un muestreo celular con un mayor número de pacientes que permita obtener más datos en las categorías (HSIL, ASCUS y LSIL), esto con el fin de validar la técnica para su aplicación clínica.

Referencias bibliográficas

- Ancuta, E., Ancuta, C., Cozma, L. G., Iordache, C., Anghelache-Lupascu, I., Anton, E., ... & Chirieac, R. (2009). Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Rom J Morphol Embryol*, 50(3), 413-8.
- Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S. y Becchetti A. (2009). Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Current medicinal chemistry*, 16, 66–93.
- Ball, C., & Madden, J. E. (2003). Update on cervical cancer screening: Current diagnostic and evidence-based management protocols. *Postgraduate medicine*, 113(2), 59-70.
- Barsoukov, E., & Macdonald, J. R. (2005). Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications, 2nd ed, Hoboken, NJ: *John Wiley & Sons*.
- Becchetti A. (2011). Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* (301) C255–C265.
- Berridge M.J, Bootman M.D. & Lipp P. (1998) Calcium – a life and death signal. *Nature* (395) 645-648.
- Besson, P., Driffort, V., Bon, E., Gradek, F., Chevalier, S., & Roger, S. (2015). How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2493-2501.

- Blanch A, Robinson F, Watson I.R, Cheng L.S. & Irwin M.S (2013). Eukaryotic Translation Elongation Factor 1-Alpha 1 Inhibits p53 and p73 Dependent Apoptosis and Chemotherapy Sensitivity. *Plos one* (8) e66436 1-7.
- Bloch, K., Smith, H., van Hamel Parsons, V., Gavaghan, D., Kelly, C., Fletcher, A., ... & Callaghan, R. (2014). Metabolic alterations during the growth of tumour spheroids. *Cell biochemistry and biophysics*, 68(3), 615-628.
- Boehning D, Patterson R.L. & Snyder S.H. (2004). Apoptosis And Calcium: New Roles For Cytochrome c And Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Cell Cycle* (3) 252-254.
- Bomben, V. C., Turner, K. L., Barclay, T. T. C., & Sontheimer, H. (2011). Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *Journal of cellular physiology*, 226(7), 1879-1888.
- Bortner C.D. y Cidlowski J.A. (2007). Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 462, 176–88.
- Bot, C., & Prodan, C. (2009). Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy. *European Biophysics Journal*, 38(8), 1049-1059.
- Brackenbury, W. J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels*, 6(5), 352-361.
- Bravo, L. E., & Muñoz, N. (2018). Epidemiology of cancer in Colombia. *Colombia Médica*, 49(1), 9-12.

- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *In Metallomics and the Cell. Springer, Dordrecht* 119-168
- Brown, B. H., 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 & Gynaecology*, 112(6), 802-806.
- 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. *The Lancet*, 355(9207), 892-895.
- Brown, B. H., Wilson, A. J., & Bertemes-Filho, P. (2000). Bipolar and tetrapolar transfer impedance measurements from volume conductor. *Electronics Letters*, 36(25), 2060-2062.
- Burtman, V., & Zhdanov, M. S. (2015). Induced polarization effect in reservoir rocks and its modeling based on generalized effective-medium theory. *Resource-Efficient Technologies*, 1(1), 34-48.
- Cantor, J. R., & Sabatini, D. M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery*, 2(10), 881-898.
- Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P. & Novelli F. (2011). α -enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS Journal* (278) 1064–1074.
- Cole, K. S., & Cole, R. H. (1941). Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics. *The Journal of chemical physics*, 9(4), 341-351.

- Coller, H. A. (2014). Is cancer a metabolic disease?. *The American journal of pathology*, *184*(1), 4-17.
- Cone C.D. (1970) Variarion of the transmembranc potential level as a basic mechanism of mirosis control. *Oncology*. (24) 438-470.
- Cortiñas, P., Centeno, I., Sánchez, J., & Martín, D. (2009). Reunión de consenso en virus de papiloma humano 2008. *Gac Méd Caracas*, *117*(1), 49-69.
- Chao, A., Wang, T. H., Lee, Y. S., Hsueh, S., Chao, A. S., Chang, T. C., ... & Lai, C. H. (2006). Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *International journal of cancer*, *119*(1), 91-98.
- Chávez M.G, Zúñiga V. & Camacho J. (2015). Ion channels in cervical cancer: New perspectives in diagnosis and therapy. *Cervical Cancer: From Public Health to Molecular Pathogenesis (1)* 111-133.
- Che M. Wang R, Wang H.-Y. & Steven Zheng X.F. (2015). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today* (1686) 1-7.
- Choy, T. C. (2015). Effective medium theory: principles and applications (Vol. 165). Oxford University Press.
- Das L., Das S. & Chatterjee J. (2015). Electrical Bioimpedance Analysis: A New Method in Cervical Cancer Screening. *Journal of Medical Engineering*, 636075. doi.org/10.1155/2015/636075.

- Das, D., Kamil, F. A., Biswas, K., & Das, S. (2012). Electrical characterization of suspended HeLa cells using ECIS based biosensor. *In 2012 Sixth International Conference on Sensing Technology (ICST) IEEE*. 734-737.
- Das, D., Kamil, F. A., Biswas, K., & Das, S. (2014). Evaluation of single cell electrical parameters from bioimpedance of a cell suspension. *RSC Advances*, 4(35), 18178-18185.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19345-19350.
- Debye, P. J. W. (1929). Polar molecules. *Chemical Catalog Company*, Incorporated.
- Di Quinzio M.K.W, Oliva K, Holdsworth S.J, Ayhan M, Walker S.P, Rice G.E, Georgiou H.M. y Permezel M. (2007). Proteomic analysis and characterisation of human cervico-vaginal fluid proteins. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. (47) 9–15.
- Diaz, D., Delgadillo, D. M., Hernández-Gallegos, E., Ramírez-Domínguez, M. E., Hinojosa, L. M., Ortiz, C. S., ... & Gomora, J. C. (2007). Functional Expression of Voltage-Gated Sodium Channels in Primary Cultures of Human Cervical Cancer. *Journal Of Cellular Physiology* (210) 469–478.
- Díaz, L., Ceja-Ochoa, I., Restrepo-Angulo, I., Larrea, F., Avila-Chávez, E., García-Becerra, R., & Alvarez-Rios, E. (2009). Estrogens and human papilloma virus oncogenes

regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer research*, 69(8), 3300-3307.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., & Harlow, E. D. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243(4893), 934-937.

Efremov Y.M, Dokrunova A.A, Efremenko A.V, Kirpichnikov M.P, Shaitan K.V. & Sokolova O.S. (2015). Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* (1) 1-9.

Eide, M. L., & Debaque, H. (2012). HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. In *Annales de pathologie. Elsevier Masson*, 32(6), e15-e23.

Esteller, M. (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *European journal of cancer*, 36(18), 2294-2300.

Fiorio Pla, A., & Munaron, L. (2014). Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 20130103.

Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.

Gabriel, C., Gabriel, S., & Corthout, Y. E. (1996). The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in medicine & biology*, 41(11), 2231.

- Gabriel, C., Gabriel, S., & Corthout, Y. E. (1996). The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in medicine & biology*, 41(11), 2231.
- Gheorghiu, E. (1993). The resting potential in relation to the equivalent complex permittivity of a spherical cell suspension. *Physics in Medicine & Biology*, 38(7), 979.
- Goebeler, M., Roth, J., Van den Bos, C., Ader, G., & Sorg, C. (1995). Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochemical Journal*, 309(2), 419-424.
- Grimnes, S., & Martinsen, Ø. G. (2006). Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(1), 9.
- Grimnes, S., Rikshospitalet, O., & Schwan, N. H. P. (2002). Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue. *Encyclopedia of surface and colloid science*, 20, 2643-2653.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., Zocchi, L., & Aicardi, G. (2006). *Fisiología médica* Madrid: Elsevier.
- 11
- Haltiwanger S. (2010). The Electrical Properties of cancer Cells. Recuperado de <http://www.royalrife.com/haltiwanger1.pdf>.
- Hamada K, Alemany R, Zhang W-W, Hittelman W.N, Lotan R, Roth J.A. & Mitchell M.F. (1996) Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Research*. (56) 3047-3054.

- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (144) 646–674.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 38.
- Hausen, H. Z. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 690-698.
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., de Queiroz, F. M., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., ... & Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular cancer*, 5(1), 41.
- Hernandez-Plata E, Ortiz C.S, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, Rivera M. & Gomora J.C. (2012). Overexpression of NaV1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int. J. Cancer* (130) 2013–2023.
- Herrera, L. V., Chaparro, C., Corzo, S. P., Pinto, S. M., Yáñez, G., Torres-Mejia, M., ... & Miranda, D. A. (2016). Electrical Properties of Normal Cervical Human Cells in Suspension: The Relation between Normal Tissue and Electrical Impedance Spectrum. *In II Latin American Conference on Bioimpedance*, 44-47.
- Higuera, S., Rubi, I., Garibay Cerdaneres, O. L., Illades Aguiar, B., Flores Alfaro, E., Jiménez López, M. A., ... & Alarcón Romero, L. D. C. (2016). Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometrybased Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México. *Proteome Science*. (1) 14:10.

- Hutchinson, M. L., Zahniser, D. J., Sherman, M. E., Herrero, R., Alfaro, M., Bratti, M. C., ... & Schiffman, M. (1999). Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. *Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 87(2), 48-55.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2019). Lyon, France: Global Cancer Observatory. Recuperado de: <http://gco.iarc.fr/>
- Isaksen, B., & Fagerhol, M. K. (2001). Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Molecular Pathology*, 54(5), 289.
- Israelsena W.J. & Vander Heiden M.G. (2015). Pyruvate kinase: function, regulation and role in cáncer. *Semin Cell Dev. Biol.* (43) 43–51.
- Kendrick J.E, Conner M.G. & Huh W.K. (2006). Gene Expression Profiling of Women with Varying Degrees of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease* (11) 25-28.
- Kunzelmann K. (2005). Ion Channels and Cancer. *J. Membrane Biol.* (205) 159–173.
- 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), 20130108.
- Lehen'kyi, V., Shapovalov, G., Skryma, R. y Prevarskaya, N. (2011) Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C1281–C1289.

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.
- Liu M.-Y, Zhang H, Hu Y.-J, Chen Y.-W. & Zhao X.-N. (2016). Identification of key genes associated with cervical cancer by comprehensive analysis of transcriptome microarray and methylation microarray. *Oncology Letters* (12) 473-478.
- Liu, J., Qiang, Y., & Du, E. (2017). Measurement of electrical properties of sickle cells from electrical impedance of cell suspension. *In ASME 2017 International Mechanical Engineering Congress and Exposition*. V003T04A026-V003T04A026
- Londoño, B., Ramírez, C. M., Urquijo, L. E., Ospino, M. L., Londoño, C., Ortiz, L. C., ... & Castellanos, V. (2012). Plan nacional para el control de cáncer en Colombia 2012-2020. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología.
- Lu K.P. (2003). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer cell*. FOCUS (4) 175-180.
- Ma, W., Ying, Y. L., Qin, L. X., Gu, Z., Zhou, H., Li, D. W., ... & Long, Y. T. (2013). Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nature protocols*, 8(3), 439.
- Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Ng, H. L., Rice, D. W., Yeates, T. O., & Eisenberg, D. (1999). Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science*, 285(5428), 751-753.

- Markowitz, J., & Carson III, W. E. (2013). Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(1), 100-109.
- Martinsen, Ø. G., Grimnes, S., & Mirtaheri, P. (2000). Non-invasive measurements of post-mortem changes in dielectric properties of haddock muscle—a pilot study. *Journal of Food Engineering*, 43(3), 189-192.
- Mendiola A.V. y Cruz I.S. (2014). Metabolismo energético y cáncer. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17108-113.
- Milde-Langosch, K., & Riethdorf, S. (2003). Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *Journal of cellular physiology*, 196(2), 224-244.
- Miranda D.A., Corzo S.P. y González-Correa C-A. (2013). Cervical cancer detection by electrical impedance in a Colombian setting. *J Phys Conf Ser.* 434, 012056. doi:10.1088/1742-6596/434/1/012056.
- Miranda Mercado, D. A., Barrero Pérez, J. G., & Echeverri Perico, J. H. (2006). Estudio piloto de detección temprana de cáncer de cuello uterino basado en espectroscopía de impedancia eléctrica. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 38(3).
- Miranda Mercado, D. A., Vargas Carreño, E. J., & Zamora Rangel, C. J. (2010). Electrical impedivity in the early detection of cervical cancer. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 42(3), 212-219.
- 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. *In Journal of Physics: Conference Series* 407(1), 012010.
- Monteith G.R., Davis F.M. & Roberts-Thomson S.J. (2012) Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *Journal of Biological Chemistry* (287) 31666-31673.
- Moron, Z.(2004). Conductance Cells Based On Van Der Pauw Theorem. Division of Measurement and Measuring Systems, Faculty of Electronics Wroclaw University of Technology. Recuperado de: <http://home.mit.bme.hu/~kollar/IMEKO-procfiles-for-web/congresses/WC-16th-Wien-2000/Papers/Topic%2004/Moron.PDF>
- Naranjo, T. Á., Noguera-Salvá, R., & Guerrero, F. F. (2009). La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Española de Patología*, 42(4), 249-261.
- Naucler, P., Ryd, W., Törnberg, S., Strand, A., Wadell, G., Elfgrén, K., ... & Hansson, B. G. (2007). Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 357(16), 1589-1597.
- Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2014). Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biology*, 35 206-214.
- Nogueira, M. O., Hošek, T., Calçada, E. O., Castiglia, F., Massimi, P., Banks, L., ... & Pierattelli, R. (2017). Monitoring HPV-16 E7 phosphorylation events. *Virology*, 503, 70-75.

- Olarte-Echeverri, G., Aristizábal-Botero, W., Osorio, G. F., & Rojas-Díaz, J. (2010). Espectroscopia de impedancia eléctrica en cáncer invasivo del cuello uterino en mujeres de Caldas (Colombia), 2008-2009. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *61(1)*, 28-33.
- Olson M.F. & Sahai E. (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* (26) 273–287.
- Organización Mundial de la Salud, (24 de Enero de 2019). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 18 de Mayo de 2019, de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
- Ortiz C.S, Montante-Montes D, Saqui-Salces M, Hinojosa L.M, Gamboa-Dominguez A, Hernández-Gallegos E, Martínez-Benítez B, Solís-Pancoatl M.R, Garcia-Villa E, Ramírez A, Aguilar-Guadarrama R, Gariglio P, Pardo L.A, Stühmer W. y Camacho J. (2011). Eag1 potassium channels as markers of cervical displasia. *Oncology Reports* (26) 1377-1383.
- Pardo, C., & Cendales, R. (2018). Cancer incidence estimates and mortality for the top five cancer in Colombia, 2007-2011. *Colombia Médica*, *49(1)*, 16-22.
- Parker A.L, Kavallaris M. y McCarroll J.A. (2014). Microtubules and their role in cellular stress in cáncer. *Front. Oncol.* (4) 1-19.
- Pedersen S.F. & Stock C. (2013). Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer Res.* (73) 1658-1661.

- Pedersen, S.F., Hoffmann, E.K., y Novak, I. (2013). Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer. *Front Physiol.*, 4, 233. doi:10.3389/fphys.2013.00233.
- Pérez-Martínez X. Funes S, Camacho-Villasana Y, Marjavaara S, Tavares-Carreón F, & Shingú-Vázquez M. (2008). Protein Synthesis and Assembly in Mitochondrial Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* (8) 1335-1350.
- Phan, N. N., Wang, C. Y., Chen, C. F., Sun, Z., Lai, M. D., & Lin, Y. C. (2017). Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncology letters*, 14(2), 2059-2074.
- Pinto S.M, Corzo S.P, Méndez-Sánchez S.C. & Miranda D.A. (2015). Electrolytic Extracellular Phantom to Study the Low-Frequency Conductivity of Cervical Neoplasia. *IFMBE Proceedings* (54) 9-11.
- Poli, U. R., Bidinger, P. D., y Gowrishankar, S. (2015). Visual inspection with acetic acid (via) screening program: 7 years experience in early detection of cervical cancer and pre-cancers in rural South India. *Indian journal of community medicine: official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine*, 40(3), 203.
- Prevarskaya N, Skryma R. & Shuba Y (2018). Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies?. *Physiol Rev.* (98) 559 –621.
- Prevarskaya N, Skryma R. & Shuba Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine* (16) 107-121.
- Prodan, E., Prodan, C., & Miller Jr, J. H. (2008). The dielectric response of spherical live cells in suspension: an analytic solution. *Biophysical journal*, 95(9), 4174-4182.

- Provenzano P.P, Eliceiri K.W, Campbell J.M, Inman D.R, White J.G. y P.J. Keely. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasión. *BMC Medicine* 4:38.
- Ramírez A, Vera E, Gamboa-Domínguez A, Lambert P, Gariglio P & Camacho J. (2018). Calcium-activated potassium channels as potential early markers of human cervical cáncer. *Oncology Letters* (15) 7249-7254.
- Ramírez, A., Hinojosa, L. M., d J Gonzales, J., Montante-Montes, D., Martínez-Benítez, B., Aguilar-Guadarrama, R., ... & García-Becerra, R. (2013). KCNH1 potassium channels are expressed in cervical cytologies from pregnant patients and are regulated by progesterone. *Reproduction*, 146(6), 615-623.
- Salama I, Malone P.S, Mihaimed F. & Jones J.L. (2007). A review of the S100 proteins in cáncer. *EJSO* (34) 357-364.
- Santos L, León-Galván M.F, Marino-Marmolejo E.N, Barba de la Rosa A.P, Rodríguez A.L, González-Amaro R. y Guevara-González R.G. (2011). Identification of differential expressed transcripts in cervical cancer of Mexican patients. *Tumor Biol.* (32) 561–568.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., ... & Wentzensen, N. (2012). American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(3), 147-172.

- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6), 1129-1136.
- Schwab A & Stock C. (2014) Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Phil. Trans. R. Soc. B* (369) 20130102.
- Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J., & Stock, C. (2012). Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological reviews*, 92(4), 1865-1913.
- Schwan, H. P. (1963). Electric characteristics of tissues. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1(3), 198-208.
- Schwan, H. P. (1963). Electric characteristics of tissues. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1(3), 198-208.
- Schwan, H. P. (1994). Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models. *In Proceedings of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. (1), A70-A71
- Serman, F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 67(4), 318-323.
- Serrano, R. O., Pérez, C. J. U., Martínez, L. A. D., & Romero, Y. R. D. (2004). Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*, 55(2), 146-160.

- Shin N.-R, Lee Y.-Y, Kim S.-H, Choi C.H, Kim T.-J, Lee J.-W, Bae D.-S. y Kim B.-G. (2014). Prognostic value of pretreatment hemoglobin level in patients with early cervical cancer. *Obstet. Gynecol. Sci.* (57) 28-36.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., ... & Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 287(16), 2114-2119.
- Sperelakis N. (1995) Origin of the resting membrane potential. *Physiology*. Little, Brown, Boston (N. Sperelakis and R. Banks, Eds.).
- Starkus J, Beck A, Fleig A. & Penner R. (2007). Regulation of TRPM2 by Extra- and Intracellular Calcium. *J. Gen. Physiol.* (130) 427–440.
- Storm P., Kjaer K.T., Trulsson M., Ho C.S.J., Dosnon M., Westergren T., Chao Y., Rydstrom A., Yang H., Falsig S. y Svanborg C. (2013). A Unifying Mechanism for Cancer Cell Death through Ion Channel Activation by HAMLET. *PLoS ONE* 8(3), e58578. doi: 10.1371/journal.pone.0058578.
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2016). Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 680.
- Szabo I, Zoratti M. (2014). Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev.* 94(2), 519–608.
- Tidy, J. A., Brown, B. H., Healey, T. J., Daayana, S., Martin, M., Prendiville, W., & Kitchener, H. C. (2013). Accuracy of detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia

- using electrical impedance spectroscopy with colposcopy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 120(4), 400-411.
- Tong L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* (62) 1784–1803.
- Uribe PCJ, Serrano GSE, Hormiga SCM, (2018). Cancer incidence and mortality in Bucaramanga, Colombia. 2008-2012. *Colomb Med (Cali)*, 49(1), 73-80.
- Vogl, T., Ludwig, S., Goebeler, M., Strey, A., Thorey, I. S., Reichelt, R., ... & Werner, S. (2004). MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *blood*, 104(13), 4260-4268.
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European journal of cancer*, 38(17), 2229-2242.
- Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfør, K., Rofstad, E. K., & Mueller-Klieser, W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer research*, 60(4), 916-921.
- Walker, D. C., Brown, B. H., Blackett, A. D., Tidy, J., & Smallwood, R. H. (2003). A study of the morphological parameters of cervical squamous epithelium. *Physiological measurement*, 24(1), 121.

- Walker, D. C., Brown, B. H., Hose, D. R., & Smallwood, R. H. (2000). Modelling the electrical impedivity of normal and premalignant cervical tissue. *Electronics Letters*, 36(19), 1603-1604.
- Wang J.-L, Zheng B.-Y, Li X.-D, Ångstrom T., Lindstrom M.S. & Wallin K.-L. (2004) Predictive Significance of the Alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. *Clinical Cancer Research* (10) 2407-2414
- Wong N, De Melo J. & Tang D. (2013). PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *International Journal of Cell Biology* (2013) 1-12.
- Wong Y.F, Cheunga T.H, Loa K.W.K, Wangb V.W, Chana C.S, Ngc T.B, Chungc T.K.H. y Mokb S.C. (2004). Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Letters* (211) 227–234.
- Wulff H, Castle N.A. & Pardo L.A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature Review* (8) 982-1001.
- Yang M. y Brackenbury W.J. (2013) Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology*. 4(181) 1-10, doi:10.3389/fphys.2013.00185.
- Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology advances*, 26(2), 135-150.

- Zhao, Q., He, Y., Wang, X. L., Zhang, Y. X., & Wu, Y. M. (2015). Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* (17) 620–631
- Zheng, Z. M., & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 11, 2286.
- Zhu, X., Lv, J., Yu, L., Zhu, X., Wu, J., Zou, S., & Jiang, S. (2009). Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 112(1), 248-256.

Apéndice A

Datos para la determinación de la viabilidad celular en las cuatro categorías establecidas: normal, ASCUS, infecciones y cáncer.

Status	N° células Totales	N° células teñidas	N° células viables (%)
NORMAL	7.70 x 10 ⁵	8.50 x 10 ⁴	88.96
	5.20 x 10 ⁵	6.00 x 10 ⁴	88.46
	1.76 x 10 ⁶	2.35 x 10 ⁵	88.98
	1.38 x 10 ⁶	2.00 x 10 ⁴	98.55
	1.40 x 10 ⁶	1.50 x 10 ⁵	89.29
	1.60 x 10 ⁵	2.20 x 10 ⁴	86.25
	1.40 x 10 ⁶	1.60 x 10 ⁴	81.43
	8.70 x 10 ⁵	3.40 x 10 ⁴	96.02
	6.20 x 10 ⁵	2.70 x 10 ⁴	86.45
	3.00 x 10 ⁶	8.00 x 10 ⁵	83.33
	1.90 x 10 ⁶	1.50 x 10 ⁴	95.79
	2.02 x 10 ⁶	4.50 x 10 ⁵	87.72
	1.50 x 10 ⁶	1.20 x 10 ⁵	92
	2.04 x 10 ⁶	1.75 x 10 ⁵	91.4
	2.36 x 10 ⁶	9.50 x 10 ⁵	89.75
	8.00 x 10 ⁵	3.40 x 10 ⁵	87.5
	1.62 x 10 ⁶	2.40 x 10 ⁵	85.19
	2.16 x 10 ⁶	6.10 x 10 ⁴	97.18
	1.04 x 10 ⁶	3.80 x 10 ⁵	93.46
	1.07 x 10 ⁶	4.00 x 10 ⁵	92.62
9.60 x 10 ⁵	8.10 x 10 ⁴	91.56	
2.35 x 10 ⁶	7.20 x 10 ⁵	89.36	

	1.22 x 10 ⁶	1.08 x 10 ⁵	91.15
	1.17 x 10 ⁶	6.50 x 10 ⁵	94.44
	1.12 x 10 ⁶	5.70 x 10 ⁵	89.11
	1.26 x 10 ⁶	4.20 x 10 ⁵	86.67
	3.00 x 10 ⁶	5.30 x 10 ⁵	86.03
	2.15 x 10 ⁶	7.90 x 10 ⁴	96.33
ASCUS	3.00 x 10 ⁵	5.50 x 10 ⁴	81.67
	2.01 x 10 ⁶	3.00 x 10 ⁵	88.15
	4.80 x 10 ⁵	2.90 x 10 ⁴	93.96
	1.80 x 10 ⁶	2.50 x 10 ⁴	86.11
INFECCIONES	1.60 x 10 ⁵	2.00 x 10 ⁴	85
	6.00 x 10 ⁵	1.70 x 10 ⁴	97.17
CÁNCER	3.05 x 10 ⁶	7.34 x 10 ⁴	97.59

Apéndice B

A continuación, se presentan los valores de área obtenidos de los gráficos de radar para las categorías: Normal, HeLa, HSIL, ASCUS e infecciones.

Clasificación	Área	Clasificación	Área
NORMAL	0.16	HeLa	0.47
	0.19		0.46
	0.22		0.45
	0.18		0.48
	0.17		0.49
	0.18		0.48
	0.21		0.44
	0.19		0.47
	0.17		0.46
	0.18		0.48
	0.18	HSIL	0.58
	0.23		0.11
	0.17	ASCUS	0.07
	0.16		0.14
	0.18		0.24
	0.18		0.26
	0.19	INFECCIONES	0.92
	0.2		0.63
	0.2		
	0.18		
0.19			
0.2			
0.16			
0.16			
0.18			
0.17			
0.18			