



Desarrollo de un sistema microfluidico (*lab-on-a-chip*) accesible y de bajo costo para detección de células tumorales circulantes de cáncer de mama

Development of an accessible and low-cost micro-fluidic system (lab-on-a-chip) for detecting circulating breast cancer tumor cells

Julio Valdivia-Silva^{1,a,b}, Luz Pérez-Tulich^{1,c}, Luis Flores-Olazo^{1,d}, Marco Málaga-Julca^{1,e}, Adolfo Ubidia^{1,c}, Aaron Fleschman^{2,f}, Heinner Guio^{1,3,a,g}

¹ Departamento de Bioingeniería, Universidad de Ingeniería y Tecnología. Lima, Perú.

² Lerner Research Institute, Biomedical Engineering Department, Cleveland Clinic. Cleveland, Ohio, Estados Unidos.

³ INBIOMEDIC Research and Technological Center. Lima, Perú.

^a Médico cirujano; ^b doctor en Ciencias Biomédicas; ^c biólogo; ^d ingeniero electrónico; ^e estudiante de medicina; ^f doctor en Ingeniería Biomédica; ^g doctor en Ciencias Médicas.

Correspondencia

Julio E. Valdivia Silva
jvaldivias@utec.edu.pe

Recibido: 15/07/2019

Arbitrado por pares

Aprobado: 22/01/2020

Citar como: Valdivia-Silva J, Pérez-Tulich L, Flores-Olazo L, Málaga-Julca M, Ubidia A, Fleschman A, et al. Desarrollo de un sistema microfluidico (*lab-on-a-chip*) accesible y de bajo costo para detección de células tumorales circulantes de cáncer de mama. *Acta Med Peru.* 2020;37(1):40-7. doi: <https://doi.org/10.35663/amp.2020.371.967>

RESUMEN

Objetivo: desarrollar un sistema microfluidico (*lab-on-a-chip*) para la detección de células tumorales circulantes de cáncer de mama (CTCs). **Materiales y métodos:** se diseñó el dispositivo en 3D y se fabricó usando fotolitografía suave y una cortadora láser. Se evaluó el funcionamiento del sistema y del arreglo magnético usando células Jurkat y células de cáncer de mama que poseen diferente expresión de los marcadores superficiales CD45 y EpCAM. Los anticuerpos contra los marcadores fueron unidos a perlas magnéticas. Adicionalmente se usaron nanopartículas de hierro para evaluar su atrapamiento. **Resultados:** las nanopartículas lograron atraparse de manera significativa en el área propuesta por el modelamiento de campos magnéticos. Las células tumorales marcadas con los anticuerpos magnéticos quedaron atrapadas. **Conclusiones:** se logró fabricar un *lab-on-a-chip* capaz de atrapar CTCs generando una excelente herramienta de diagnóstico y de análisis de la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: Equipo para diagnóstico; Células tumorales circulantes; Magnetismo; Cáncer de mama (fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective. to develop a microfluidic system (*lab-on-a-chip*) for detecting circulating breast cancer tumor cells. **Materials and methods.** the device was designed using 3D technology, and it was manufactured using soft photolithography and a laser cutting machine. The system performance and its magnetic settings were assessed using Jurkat cells and breast cancer cells that show different expression of CD45 and EpCAM surface markers. Antibodies against these markers were bound to magnetic pellets. Additionally, iron nanoparticles were used for assessing their entrapment. **Results.** nanoparticles were significantly trapped in the area set by magnetic field modeling. Tumor cells labeled with magnetic antibodies became trapped. **Conclusions.** we were able to manufacture a *lab-on-a-chip* system that is capable to trap circulating breast cancer tumor cells, which may become an excellent tool for diagnosis and follow-up for this condition.

Keywords: Diagnostic equipment; Circulating tumor cells; Magnetics; Breast cancer (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de enfermedad y mortalidad a nivel mundial. Esta patología se caracteriza por una reproducción descontrolada de células atípicas, lo que altera a los sistemas que regulan la reproducción, ciclo y muerte celular. El crecimiento celular anormal puede dar paso a una mayor acumulación de capacidades que permitan la invasión de tejidos periféricos a través de la migración de células neoplásicas por el territorio sanguíneo, generando nuevas tumoraciones, proceso conocido como metástasis ^[1,2].

Las células tumorales circulantes (CTCs), son células liberadas al torrente sanguíneo y son consideradas el componente pivotante de la cascada metastásica ^[3], se caracterizan por la reducción de la adhesión célula a célula, pérdida de la polaridad apical-basolateral y pérdida de la expresión de los marcadores epiteliales, mientras es inducida la expresión de genes mesenquimales ^[4]. Una célula que se separa de su tejido muere por anoikis (apoptosis específica a señales de contacto), pero las CTCs adquieren nuevas características ampliamente estudiadas en un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT). Las CTCs expresan diferentes moléculas en su superficie como EpCAM y citoqueratinas, y ausencia de CD45 que han servido para su identificación en sangre. Hasta el momento, no han sido caracterizadas exhaustivamente para poder definir que moléculas les dan la capacidad de hacer metástasis. A pesar de ello, son estas características de adhesión las que nos permiten diferenciarlas de otras células pertenecientes al torrente sanguíneo, y por tanto poder aislarlas con técnicas inmunológicas y cuantificarlas para inferir el estado de la progresión del cáncer en un paciente.

Dado el impacto de las CTCs, como biomarcador clínico para el diagnóstico y pronóstico de varios cánceres, recientemente se ha introducido una gran cantidad de métodos de detección para las CTCs, siendo los métodos basados en separación celular de mayor ayuda diagnóstica ^[4,5]. La separación celular es un paso importante en la investigación biológica y médica, y es también un paso crítico en el análisis de muestras en el área clínica para realizar diagnóstico de múltiples enfermedades. Sin embargo, las técnicas de separación celular que se usan habitualmente presentan una serie de desventajas que afectan la especificidad de búsqueda y que tienen el potencial de dañar a las células que se quieren encontrar durante el procedimiento, debido al estrés realizado como la centrifugación.

Una forma importante de evitar el daño celular, es la técnica de separación celular magnética, que combina la alta especificidad dada por el uso de anticuerpos que se unen a la molécula presente en la membrana de la célula que se busca atrapar (antígeno), y un método de separación rápido que utiliza un campo magnético sin incrementar el estrés celular ^[6]. De manera interesante, la separación magnética, ha sido validada por un equipo denominado *CellSearch*[®], que utiliza el fundamento de esta técnica para separar CTCs de muestras de sangre de pacientes de cáncer. Sin embargo, el método es criticado por

su alto costo y su poca capacidad de capturar células con baja expresión de EpCAM ^[5].

Por otro lado, los dispositivos de microfluídicos en estas áreas han demostrado ser particularmente prometedores, ya que ofrecen sistemas analíticos en microescala que se destacan por el bajo consumo de muestras y reactivos, gran flexibilidad para adaptarse a otras tecnologías de vanguardia, usar cantidades flujo precisos y bien definidos, y por una alta capacidad de automatización, presentando ventajas significativas sobre los sistemas convencionales de gran escala ^[5].

Además, en términos de separación magnética, el uso de dispositivos de microfluidos acoplados a magnetos ya se viene investigando desde hace algunos años debido a las ventajas que se presenta frente a dispositivos en escala macro, pero todavía hay problemas relacionados al rango del campo magnético generado por los elementos magnéticos del dispositivo, ya que estos generalmente se encuentran en la periferia y la captura de células puede verse restringida a algunas regiones dependiendo del grosor de los canales ^[6]. A pesar de las desventajas, se planteó un nuevo diseño de un dispositivo microfluídico que utilizaría la técnica de fraccionamiento magnético celular para la separación de CTCs, ya que, en eritrocitos infectados con *Plasmodium vivax* se logró una excelente separación celular debido a las diferencia en la concentración de hierro y por tanto de intensidad de campo magnético.

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo desarrollar un dispositivo *lab-on-a-chip* unido a un conjunto de magnetos para atrapar CTCs validando su funcionamiento con células circulantes cancerosas Jurkat y con perlas magnéticas para posteriormente usar algunas muestras de sangre y parametrizar las variables necesarias. Esta información será de gran ayuda para entender las características de este tipo de células que permitirá implementar un mejor sistema de detección celular en pacientes con la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y estudio

Estudio de desarrollo experimental, investigación aplicada al desarrollo de un producto biomédico.

Desarrollo del dispositivo microfluídico

Diseño del dispositivo

El dispositivo fue diseñado en el software *SolidWorks* donde se generó el prototipo (Figura 1A).

Fabricación del dispositivo

El *lab-on-a-chip* fue fabricado con una cortadora laser (*Trotec laser*), localizada en los laboratorios de fabricación digital en Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC), usando cintas adhesivas 3M. El arreglo magnético fue armado con imanes

de neodimio en una configuración desarrollada por los autores analizada por simulación computacional para encontrar los puntos necesarios donde el campo magnético alcance mayor intensidad.

Prueba de flujo laminar

Para verificar el correcto estado del canal y el óptimo flujo laminar del líquido se hizo pasar agua con colorante (verde) a través del canal haciendo uso de la bomba de microfluidos. Un total de 20 ml de fluido con una densidad de 1100 g/ml (densidad de la sangre de 1053 a 1060 g/ml) fue impulsado por una bomba a una velocidad de 5 ml/h.

Prueba de atrape magnético

Para evaluar el arreglo magnético dentro del dispositivo, se colocaron diferentes concentraciones de nanopartículas de hierro (Fe_3O_4) al líquido de prueba para evaluar cuales eran las condiciones óptimas de flujo y velocidad para lograr tener una visualización adecuada por microscopía óptica. Esta se obtuvo a 76 mg/ml de nanopartículas. También esto sirvió para observar si la configuración del arreglo magnético estaba bien definido.

Prueba de pasaje de sangre entera y de leucocitos a través del dispositivo de microfluidos

Se extrajeron muestras de sangre (10 ml) de dos personas clínicamente sanas miembros del equipo de investigación quienes estuvieron de acuerdo voluntariamente y brindaron su consentimiento informado, la primera muestra se colocó en el interior de una incubadora (*Shel Lab*), directamente con 5 ml de PBS y 2,5 ml de nanopartículas de hierro libres (no unidas a anticuerpos, 50 mg/ml) por 24 horas, y a la segunda muestra se le realizó un proceso de extracción de linfocitos con *Ficoll™* (*Histopack 1077*); estos linfocitos fueron incubados con 2,5 ml de nanopartículas de hierro libres por 48 horas.

Cultivo de células Jurkat, MDA-MB-468, MDA-MB 231

Las células Jurkat son células inmortalizadas que provienen de un tipo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (ATCC CRL-2063), caracterizadas por una menor expresión del marcador CD45 en comparación a las células sanguíneas sanas. Las células MDA-MB-468 son una línea de cáncer mamario caracterizada por una expresión alta del marcador EpCAM (ATCC HTB-132). Las líneas celulares fueron utilizadas en pruebas iniciales o como controles de la captura de células CD45+ y EpCAM+, la línea celular MDA-MB-231 fue utilizada para evaluar la capacidad del dispositivo para capturar células con baja expresión de EpCAM (ATCC HTB-26).

Las células Jurkat, MDA-MB-468, MDA-MB 231, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y Penicilina - estreptomycin al 10% bajo condiciones de cultivo típicas: 5% CO_2 a 37°C en el laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Biología Sintética de la UTEC.

RESULTADOS

Diseño y fabricación del dispositivo

Se diseñó y fabricó un dispositivo microfluídico (15 x 6 x 5 cm) de aluminio constituido por un sistema de flujo laminar y un arreglo magnético interpolar con imanes de neodimio dispuestos de manera que, se pueda colocar de manera modular un *lab-on-a-chip* descartable que contiene un canal para flujo laminar. El arreglo magnético permite determinar zonas de alta intensidad de campo y gradiente magnético en los extremos del canal, y es en estas zonas donde las células circulantes tumorales quedarán atrapadas debido al efecto magnético. En las Figura 1A y 1B se muestra un esquema del sistema, las flechas rojas indican las zonas de alta intensidad de campo magnético que son donde quedarán atrapadas las células tumorales circulantes. Estas áreas fueron validadas con el paso de nanopartículas magnéticas como se describió en la metodología.

Adicionalmente desarrollamos un segundo dispositivo impreso en 3D con ácido poliláctico (PLA), el cual fue probado al mismo tiempo que el prototipo de aluminio. Es importante comentar que ambos dieron resultados similares y no hubo diferencias en los experimentos descritos a continuación.

Sistema de flujo laminar

Microcanales

El microcanal por donde pasa el flujo laminar es un elemento principal del sistema microfluídico. Para fabricarlo empleamos técnicas de prototipado rápido como el corte láser y materiales de bajo costo como láminas de policarbonato de 0,25 mm de espesor. El proceso consiste en cortar una lámina de policarbonato en tres partes para luego pegarlas y formar el canal, el diseño se ilustra en la Figura 1B.

Para fabricar el canal se usó corte laser y para ensamblarlo usamos cinta adhesiva (3M-467 200MP) que se pega a ambos lados de la lámina para luego cortarla, el proceso y dimensiones se muestran en las Figuras 2 y 3.

Interface con el exterior

Una vez construido el canal se fabricó un sistema que permitió introducir de manera controlada el fluido a examinar, esto se denominó «*interface con el exterior*» (*Chip to world interface*).

Para este fin, se fabricó lo que se ha denominado como «bloques conectores» usando una impresora 3D del tipo FDM (*Fused Deposition Modeling*) y un filamento de PLA como insumo de la impresora. Para inyectar el fluido a través de los bloques conectores, y a su vez estos con el canal, se utilizó la combinación denominada comercialmente «*flangeless nut-tubing- ferrule*» una especie de conector tuerca tubular sin borde.

Finalmente, se fabricó la base que da soporte al sistema y donde se asegura el canal con los bloques conectores, el sistema de flujo laminar se muestra en la Figura 4 y 5.

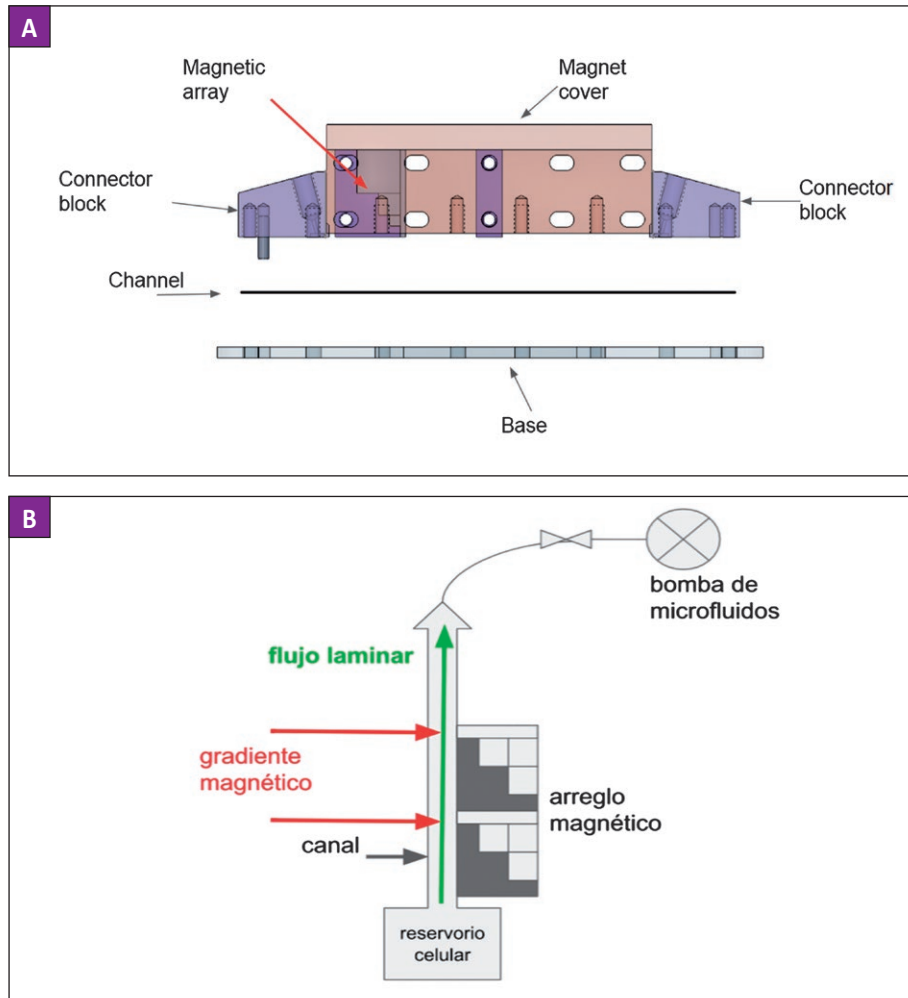


Figura 1. A. Diseño del dispositivo en 3D (SolidWork) mostrando sus componentes. B. Esquema del funcionamiento del dispositivo

Arreglo magnético interpolar

La última parte del dispositivo consiste en colocar sobre el canal un arreglo magnético interpolar, este arreglo consiste en colocar imanes y material ferromagnético distribuidos estratégicamente para generar zonas con alta intensidad de campo magnético que atraparán a las células durante su recorrido en el canal. En la Figura 1 y 5, se puede ver el arreglo magnético empleado y su posición en el sistema.

Evaluación del funcionamiento del sistema y del arreglo magnético

Para evaluar el funcionamiento del dispositivo se analizó su capacidad de detener partículas magnéticas en el flujo laminar del canal además de células sanguíneas aisladas y cultivadas con nanopartículas. Para corroborar esto se usaron líneas celulares de cáncer marcadas con anticuerpos magnéticos y se determinó si eran atrapadas en las zonas establecidas mediante microscopía.

El dispositivo microfluídico funcionó correctamente en las pruebas realizadas, el canal es hermético y permite que el flujo

laminar se dé sin problemas. El campo magnético que genera el arreglo de imanes de 1,2 Tesla fue suficiente para atrapar nanopartículas de hierro en flujo de agua, lo cual corroboró el objetivo deseado (Figura 6).

Las muestras de sangre procesadas como se describió, fueron expuestas directamente al sistema que contiene el campo magnético (imán de neodimio), y se separaron dos fracciones en cada oportunidad: una fracción de lo retenido por el sistema y otra de lo que circuló libremente. Al microscopio, se evidenció la presencia de nanopartículas y células blancas que contenían a las nanopartículas mientras que, en la fracción no retenida se encontraron glóbulos rojos y algunas células blancas que no interactuaron con las nanopartículas (38% de células blancas no retenidas del total contabilizado).

A las líneas celulares incubadas con anticuerpos anti-CD45 y anti-EpCAM unidas al fluoróforo FITC se añadió las perlas magnéticas que tenían acoplado un anticuerpo anti FITC. De esta manera la perla magnética sólo podría unirse a quien tenga el anticuerpo deseado unido al FITC. Esta suspensión celular se inyectó por el dispositivo que al pasar por el campo magnético producido

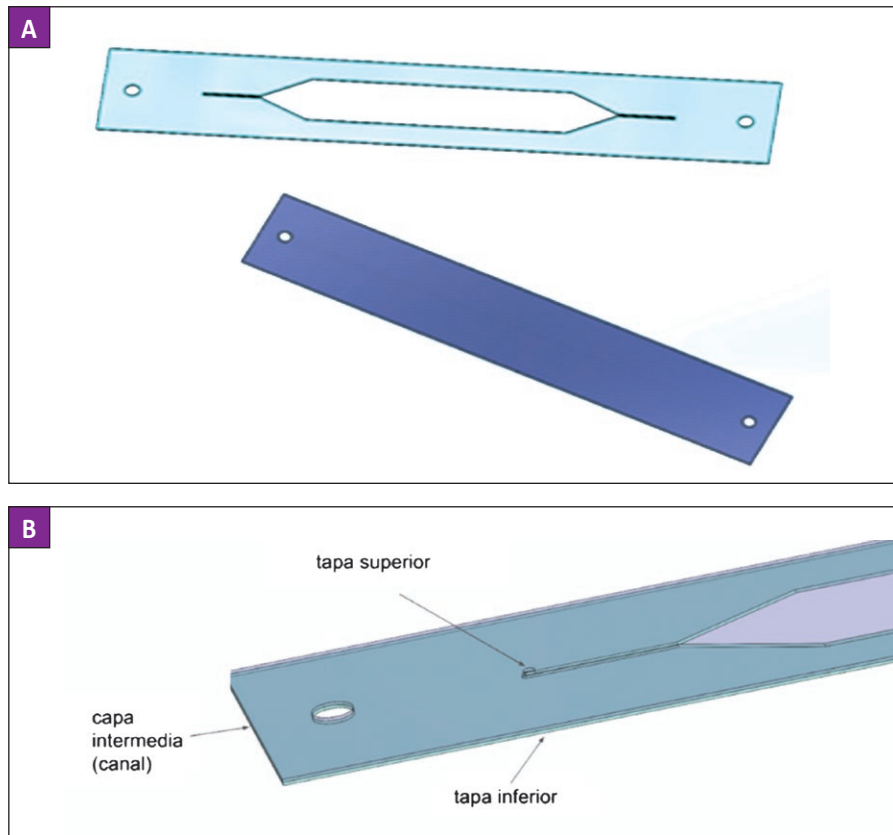


Figura 2. A. Partes del canal, capa intermedia e inferior. B. Diseño canal ensamblado. El canal es ensamblado fácilmente al dispositivo y es descartable para cada paciente.

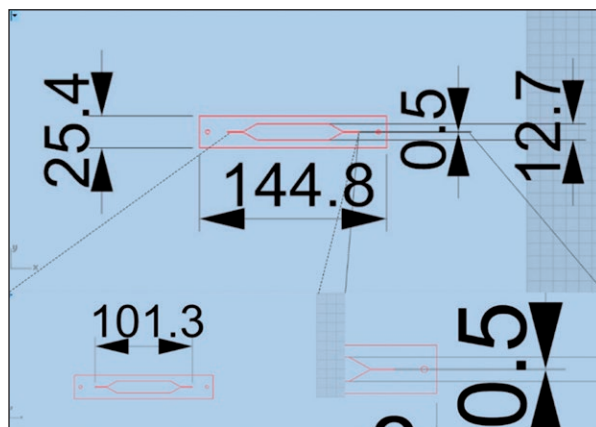


Figura 3. Dimensiones del sistema del canal (en mm).

por imanes de neodimio acoplados al dispositivo, retuvo a las células unidas a las partículas (CD45 + / EpCAM +) mientras que, las células que no se unieron (CD45 - / EpCAM -) siguieron su curso hasta salir por el otro extremo del dispositivo. Los resultados son mostrados en la Tabla 1 y fueron ratificados por microscopía óptica y de fluorescencia en todos los casos. Dados los resultados preliminares, se logró demostrar de esta manera la capacidad del dispositivo microfluídico para realizar fraccionamiento magnético (separación de células de interés).

Tabla 1. Ensayos que se realizaron con los anticuerpos anti CD45 y anti EpCAM

Perlas magnéticas anti FITC	Jurkat o linfocitos (Control +)*	MDA-MB 468 (Control)†	MDA-MB-231 (Prueba de detección)‡
Anti -CD45	Sí	No	No
Anti -EpCAM	No	Sí	Sí
Control de isotipo	No	No	No

* Las células Jurkat fueron utilizadas como control positivo y MDA-MB-468 como control negativo, del marcador de superficie CD45.

† Las células MDA-MB-468 fueron utilizadas como control positivo por su alta expresión del marcador EpCAM, mientras que linfocitos de una persona sana fueron utilizados como control negativo.

‡ La línea MDA-MB-231 fue utilizada para evaluar la capacidad del dispositivo para capturar células con baja expresión de EpCAM.

DISCUSIÓN

Los dispositivos microfluídicos denominados *lab-on-a-chip* son actualmente una herramienta de solución para la generación de nuevas estrategias diagnósticas de bajo costo y de fácil portabilidad a diferencia de los equipos médicos que pueden ser poco accesibles en zonas donde hay población con difícil acceso geográfico o con bajos ingresos económicos. Es muy fácil poder evaluar la progresión de enfermedades crónicas como el cáncer

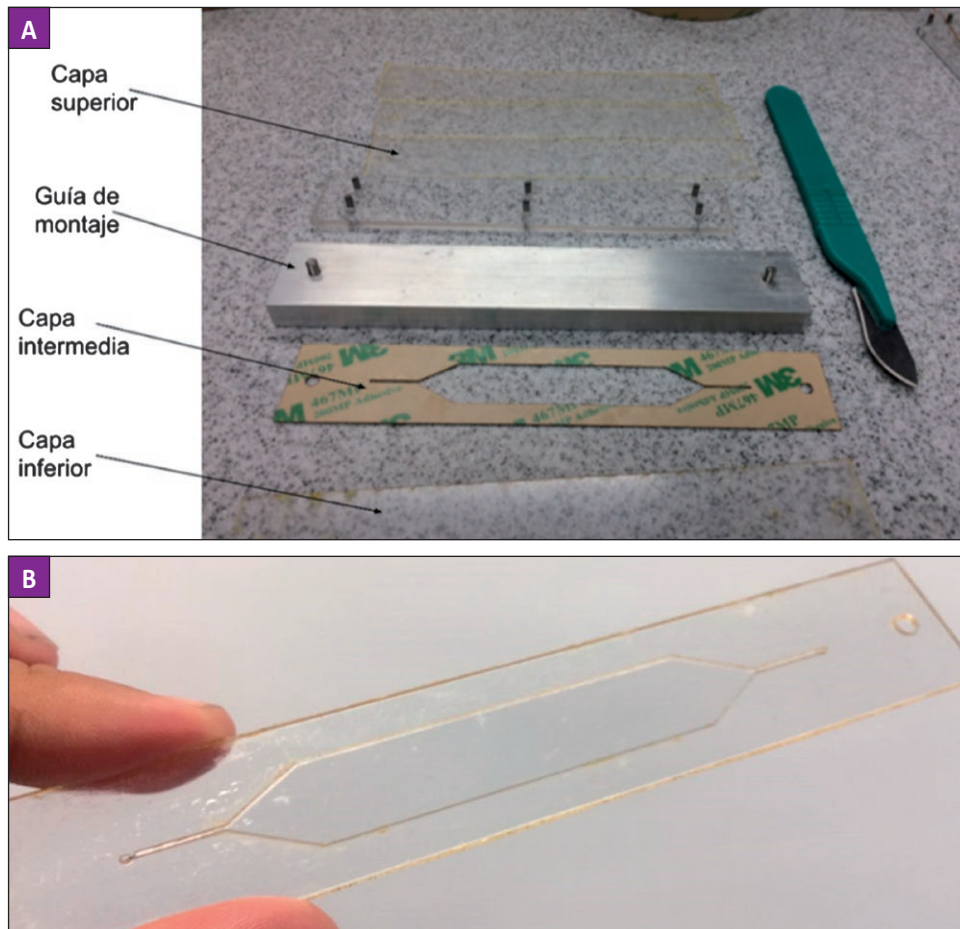


Figura 4. A. Montaje del canal. B. Canal ensamblado

en centros donde existen todos los equipos necesarios en un mismo lugar, pero es muy difícil poder utilizar imagenología como tomografía o resonancia magnética, por ejemplo, en poblaciones andinas o de la selva. Por lo tanto, el uso de nuevas técnicas que puedan ayudar en la evaluación de la progresión de este tipo de enfermedades se torna una necesidad urgente en nuestro país.

En el presente estudio se desarrolló y fabricó un *lab-on-a-chip* prototipo que puede atrapar CTCs magnetizadas con un arreglo de imanes de neodimio. Sus resultados preliminares muestran la efectividad del sistema para atrapar en primer término nanopartículas de hierro y luego células cancerosas marcadas con anticuerpos magnetizados anti-CD45 y anti-EpCAM. No obstante, se requiere la validación del dispositivo con pacientes lo que conllevará a un nuevo estudio que permitirá la comparación entre la imagenología y el número de células tumorales circulantes analizando la correlación de estas dos técnicas como ya se ha descrito anteriormente^[5-14]. Esta correlación permitiría guiar al médico oncólogo en el cambio de la tomografía y la resonancia magnética que son muy costosas y de poca accesibilidad. Esto también abre paso al uso de posibles brazaletes con esta misma tecnología^[15,16] que puedan detectar la señal magnética en células de un tumor primario *in situ* y su paso a la liberación de CTCs al torrente sanguíneo alertando la progresión de la enfermedad y

por ende la necesidad de una medida terapéutica urgente. Por otro lado, el poder atrapar estas células tumorales podría ayudar a caracterizarlas mejor y encontrar nuevos antígenos que sirvan para detectarlas más rápidamente y quizás poder discriminar las células circulantes con capacidades metastásicas de las que no.

Finalmente, el desarrollo del dispositivo apoyado por el Colegio Médico del Perú busca generar una sinergia entre las necesidades médicas y la ingeniería. Hoy los profesionales bioingenieros en el mundo unen estas dos áreas para que de acuerdo al contexto y realidad de cada país, se puedan dar soluciones multidisciplinarias en beneficio de los pacientes. Actualmente, está en progreso el estudio con pacientes con cáncer de mama para detectar las CTCs en muestras de sangre.

Contribuciones de autoría. Todos los autores han contribuido activamente en la realización de este trabajo.

Potencial conflictos de intereses. Ninguno.

Fuente de financiamiento. El presente estudio ha sido financiado por recursos internos de la Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC) y por el Fondo Premio de Investigación Básica del Colegio Médico del Perú.



Figura 5. Sistema de flujo laminar, bloques conectores y canal incorporado.

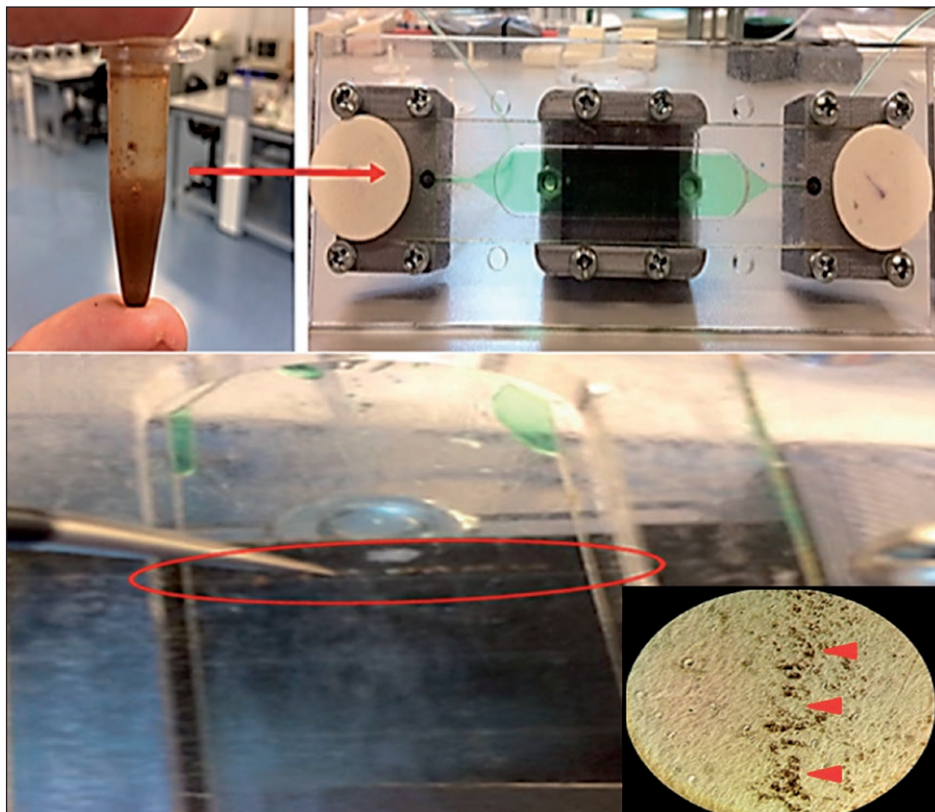


Figura 6. A. Nanopartículas de hierro. **B.** Nanopartículas de hierro atrapadas en el sistema

La muestra de sangre entera, incubada por 24 horas fue llevada al dispositivo de microfluidos para detectar si había internalización de partículas de manera no específica en las células. De ser este el caso se correría el riesgo de atrapar células no cancerígenas en futuros ensayos. Para esto se observó que la sangre se había dividido en dos fases por sedimentación, de las cuales se procedió a preparar 3 muestras, una de cada fase y una muestra mezclada. Se utilizó un flujo de 5 ml por hora dado que es el flujo base que con que se trabaja en este tipo de ensayos. La muestra de la fase superior (fase con linfocitos) pasó por el dispositivo durante 36 minutos (equivalente a 3 ml), al finalizar se desmontó la lámina del armazón acoplado a la bomba de microfluidos, y se llevó al microscopio. En el microscopio se observó que no habían células atrapadas pero si las nanopartículas, y al revisar el líquido residual se observó que las células estaban allí.

ORCID:

Julio Valdivia-Silva, <https://orcid.org/0000-0002-7061-3756>

Luz Pérez-Tulich, <https://orcid.org/0000-0003-4652-067X>

Luis Flores-Olazo, <https://orcid.org/0000-0002-0754-0849>

Marco Málaga-Julca, <https://orcid.org/0000-0002-6477-8423>

Adolfo Ubidia, <https://orcid.org/0000-0001-6980-526X>

Aaron Fleschman, <https://orcid.org/0000-0002-6128-3425>

Heinner Guio, <https://orcid.org/0000-0003-0078-1188>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M. Molecular Cell Biology 6th edition. New York: WH Freeman & Co; 2007.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21387
- Datar RH, Ao Z, Cote RJ. Significance of Studying Circulating Tumor Cells. En: Cote RJ, Datar R. Circulating Tumor Cells: Advances in Basic Science and Clinical Applications. Universidad de Miami; 2016.
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Cancer. 2012;12:178. doi: 10.1186/471-2407-12-178
- Nicolazzo C, Raimondi C, Francescangeli F, Ceccarelli S, Trenta P, Magri V, et al. EpCAM-expressing circulating tumor cells in colorectal cancer. Int J Biol Markers. 2017;32(4):e415-e420. doi: 10.5301/ijbm.5000284.
- Khashan SA, Dagher S, Alazzam A, Mathew B, HHilal-Alnaqbi A. Microdevice for continuous flow magnetic separation for bioengineering applications. J Micromech Microeng. 2017;27:055016. doi: 10.1088/1361-6439/aa666d
- Myunga JH, Honga S. Microfluidic devices to enrich and isolate circulating tumor cells. Lab Chip. 2015;15(24):4500-11. doi:10.1039/c5lc00947b
- Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. Therapeutic advances in medical oncology. 2010;2(6):351-65. doi: 10.1177/1758834010378414
- Hughfan Z. Circulating Tumor Cells. Isolation and Analysis. New Jersey, US and Canada: John Wiley & Sons, Inc; 2016.
- Plaks V, Koopman CD, Werb. Circulating Tumor Cells. Science. 2013;341(6151):1186-8. doi: 10.1126/science.1235226
- Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Carothers S, Michael B, et al. EpCAM-negative cancer associated circulating cells (CACS) in blood samples of women with triple-negative breast cancer (TNBC). J Clin Oncol. 2011;29(15):e11559. doi: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.e11559
- Barriere G, Fiei P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. Ann Transl Med. 2014;2(11):109. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04
- Schneider T, Moore LR, Jing Y, Haam S, Williams PS, Fleischman AJ, et al. Continuous flow magnetic cell fractionation based on antigen expression level. J Biochem Biophys Methods. 2006;68(1):1-21. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.02.011
- Zborowski M. Continuous-flow magnetic cell sorting using soluble immunomagnetic label. En: Häfel U, Schütt W, Teller J, Zborowski M. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. New York: Springer Science/Business Media New York; 1997.
- Man Y, Wang Q, Kimmner W. Currently used markers for CTC isolation – Advantages, limitations and impact on Cancer prognosis. J Clin Exp Pathol. 2011;1(1):1-7. doi: 10.4172/2161-0681.1000102
- Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. Nature. 2006;442(7101):368-73. doi: 10.1038/nature05058