



Tratamientos y Tecnologías Basadas en Electroporación



Editado por:
Peter Kramar
Damijan Miklavčič

Traducido por:
Felipe Maglietti



El libro de los

Tratamientos y Tecnologías Basadas en Electroporación

Editado por:
Peter Kramar
Damijan Miklavčič

Traducido por:
Felipe Maglietti

1^{ra} edición

www.ebtt.org

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni
knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID=20753155
ISBN 978-961-243-401-4 (pdf)

URL: <http://www.ebtt.org/book>

Copyright © 2020 es retenido por los autores. Cualquiera puede copiar y distribuir libremente este material con fines educativos, pero no puede vender el material con fines de lucro. Para preguntas sobre este libro, contacte al prof. Damijan Miklavčič, Universidad de Ljubljana, Facultad de Ingeniería Eléctrica, damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si.

Traducido por: Felipe Maglietti
Revisión de la traducción por: Antoni Ivorra

Editor: Založba FE, Ljubljana
Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana
prof. dr. Sašo Tomažič
1. elektronska izdaja

Prefacio

Este libro fue creado para satisfacer la necesidad de una introducción concisa a la electroporación y las tecnologías y tratamientos basados en electroporación para aquellos que están comenzando, incluidos los estudiantes. El campo de la electroporación es un campo verdaderamente interdisciplinario, ya que requiere conocimientos básicos y avanzados en física, química, biología, ingeniería y medicina y, por lo tanto, es muy difícil comenzar sin esta amplia visión interdisciplinaria. La mayor parte del material se basa en un curso de posgrado y en un taller internacional de tecnologías y tratamientos basados en electroporación, que se celebra en Liubliana cada dos años desde 2003 y desde 2011 todos los años (ver historia en www.ebtt.org). Otra parte del material proviene de la experiencia de los autores contribuyentes y de su experiencia en la enseñanza y capacitación de estudiantes en posdoctorados en este campo interdisciplinario. Agradecemos a todos los autores que han contribuido con material para este libro.

Damijan Miklavčič

Capítulo 1	7
La célula en el campo eléctrico – Potencial transmembrana inducido	
Tadej Kotnik	
Capítulo 2	22
Propiedades eléctricas de los tejidos y sus cambios durante la electroporación	
Damijan Miklavčič, Bor Kos	
Capítulo 3	41
<i>Electropermeabilización celular in vitro</i>	
Justin Teissie	
Capítulo 4	59
Electrotransferencia de ácidos nucleicos <i>in vitro</i>	
Marie-Pierre Rols	
Capítulo 5	79
Simulaciones de dinámica molecular de la electroporación de membranas lipídicas	
Mounir Tarek	
Capítulo 6	114
Estrés eléctrico y permeabilización de membrana a nanoescala y multiescala	
P. Thomas Vernier	
Capítulo 7	131
Electrotransferencia génica in vivo	
Maja Čemažar	
Capítulo 8	146
Electrotransferencia de vacunas de ADN	
Véronique Prétat and Gaëlle Vandermeulen	
Capítulo 9	151
Electroquimioterapia desde el laboratorio hasta el paciente: principios, mecanismos y aplicaciones	
Gregor Serša	
Capítulo 10	166
Electroquimioterapia en la práctica clínica; Lecciones del desarrollo y la implementación, y perspectivas futuras	
Julie Gehl	
Capítulo 11	172
Desarrollo de equipos y electrodos	
Damijan Miklavčič, Matej Reberšek	
Capítulo 12	192
Electroporación y electropermeabilización - Armand el rompecabezas	
Lluís M Mir	
	192

Capítulo 1

La célula en el campo eléctrico – Potencial transmembrana inducido

Tadej Kotnik

Universidad de Liubliana, Facultad de Ingeniería Eléctrica, Liubliana, Eslovenia.

Resumen: Bajo condiciones fisiológicas, la membrana plasmática celular presenta un voltaje en reposo en el rango de las decenas de milivoltios. La exposición de la célula a un campo eléctrico externo induce un componente adicional de potencial transmembrana, proporcional a la magnitud del campo externo y se superpone al componente en reposo. A diferencia del voltaje en reposo, el voltaje inducido varía con la posición, y depende de la forma de la célula y su orientación con respecto al campo eléctrico. En células en suspensión, también depende de la fracción de volumen ocupada por ellas. Hay un retraso entre la aplicación del campo eléctrico externo y el cambio del potencial transmembrana inducido por él, típicamente algo por debajo de un microsegundo, pero puede ser mayor cuando las células están suspendidas en un medio de baja conductividad. Como consecuencia de este retraso, para exposiciones a campos eléctricos con frecuencias superiores a 1 MHz, o a pulsos eléctricos con duraciones inferiores a 1 μ s, la amplitud del voltaje inducido comienza a disminuir con el aumento de la frecuencia del campo eléctrico o con una disminución de la duración del pulso. A frecuencias de campo cercanas al rango de los gigahercios, o con duraciones de pulso en el rango de nanosegundos, esta atenuación se vuelve tan pronunciada que los voltajes inducidos en las membranas de los orgánulos en el interior de la célula se vuelven comparables, e incluso pueden exceder el voltaje inducido en la membrana plasmática.

La célula y su membrana plasmática

Una célula puede considerarse desde varios aspectos. Saltaremos la descripción más habitual, la de un biólogo, y nos centraremos en dos más técnicas, la descripción eléctrica y la geométrica.

Desde el punto de vista eléctrico, una célula puede describirse más o menos como un electrolito (el citoplasma) rodeado por una cubierta eléctricamente aislante (la membrana plasmática). Fisiológicamente, el exterior de la célula también se parece a un electrolito. Si una célula se expone a un campo eléctrico externo, el campo se concentra dentro de la membrana. Esto da como resultado una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana denominado potencial transmembrana inducido, que se superpone al potencial transmembrana en reposo típicamente presente en condiciones fisiológicas. El potencial transmembrana puede afectar el funcionamiento de los canales activados por voltaje presentes en la membrana, e iniciar un potencial de acción, estimular las células cardíacas y, cuando es lo suficientemente grande, también conduce a la electroporación de la membrana celular. Las regiones de membrana donde se han formado los poros están estrechamente correlacionadas con las regiones donde el potencial transmembrana inducido fue más alto [1].

Con campos eléctricos que varían rápidamente en el tiempo, tales como ondas con frecuencias en el rango de megahercios o más altas, o pulsos eléctricos con duraciones en el rango de los submicrosegundos, tanto la membrana como sus alrededores deben tratarse como materiales con conductividad eléctrica distinta de cero y una permitividad dieléctrica distinta de cero.

Desde el punto de vista geométrico, la célula se puede caracterizar como un cuerpo geométrico (el citoplasma) rodeado por una corteza de espesor uniforme (la membrana). Para las células en suspensión, el modelo más simple de la célula es una esfera rodeada por una corteza esférica. Para una mayor generalización, la esfera puede ser reemplazada por un esferoide (o un elipsoide), pero en este caso, el requerimiento de un espesor uniforme complica sustancialmente la descripción de la corteza. Si su superficie interna es un esferoide o un elipsoide, su superficie externa carece de una caracterización geométrica simple, y viceversa. Afortunadamente, esta complicación no afecta el voltaje inducido en estado estacionario en la membrana plasmática de tales células, que aún puede determinarse analíticamente.

Las esferas, los esferoides y los elipsoides pueden ser modelos razonables para las células en suspensión, pero no para las células en los tejidos. Ningún cuerpo geométrico simple puede modelar una célula

típica en un tejido y, además, cada célula generalmente difiere en su forma del resto. Con geometrías irregulares y/o con células cercanas entre sí, el voltaje inducido no puede determinarse analíticamente y, por lo tanto, no puede formularse como una función explícita. Esto nos priva de algunos de los conocimientos disponibles de las expresiones explícitas, pero utilizando computadoras modernas y métodos numéricos, el voltaje inducido en cada célula irregular en particular se puede determinar con bastante exactitud.

Potencial transmembrana en reposo

Bajo condiciones fisiológicas, un voltaje en el rango de -90 mV hasta -40 mV siempre está presente en la membrana celular [2,3]. Este voltaje es causado por un pequeño déficit de iones positivos en relación con los negativos en el citoplasma, lo que es una consecuencia del transporte de iones específicos a través de la membrana. Los actores más importantes en este transporte son: (i) las bombas de Na-K, que exportan iones Na^+ fuera de la célula y simultáneamente importan iones K^+ a la célula; y (ii) los canales de fuga K, a través de los cuales los iones K^+ pueden fluir a través de la membrana en ambas direcciones. El potencial transmembrana en reposo refleja el equilibrio electroquímico de la acción de estos dos mecanismos, y quizás la forma más fácil de explicar la presencia de este voltaje es describir cómo se alcanza el equilibrio.

La bomba Na-K funciona en ciclos. En un solo ciclo, exporta tres iones Na^+ fuera de la célula e importa dos iones K^+ hacia el interior de ella. Esto genera un pequeño déficit de iones positivos en el citoplasma y un gradiente de potencial eléctrico, que atrae los iones positivos a la célula y los iones negativos fuera de la célula. Pero al mismo tiempo, la bomba también genera gradientes de concentración de Na^+ y K^+ , que atraen los iones Na^+ a la célula y los iones K^+ fuera de la célula. Los iones K^+ son los únicos que poseen un mecanismo significativo de transporte pasivo a través de la membrana, es decir, los canales de fuga de K, y a través de estos los iones K^+ son conducidos hacia el equilibrio del gradiente eléctrico y de concentración. Cuando se alcanza este equilibrio, el gradiente eléctrico a través de la membrana determina el potencial transmembrana en reposo, que está continuamente presente en la membrana.

Los iones no balanceados responsables del potencial transmembrana en reposo representan una fracción muy pequeña de todos los iones en el citoplasma, por lo que la diferencia de presión osmótica generada por

este desequilibrio es insignificante. Además, la membrana actúa como un condensador cargado, con los iones desequilibrados que se acumulan cerca de su superficie, de modo que el citoplasma en general puede verse como eléctricamente neutro.

Potencial transmembrana inducido

Cuando una célula biológica se coloca en un campo eléctrico, esto conduce a una distorsión local del campo en la célula y sus alrededores. Como se describe en la sección introductoria de este capítulo, debido a la baja conductividad de la membrana, en las proximidades de la célula, el campo se concentra en la membrana celular, donde es varios órdenes de magnitud mayor que en el citoplasma y fuera de la célula. Esto produce lo que se conoce como potencial transmembrana inducido, que se superpone al componente en reposo. En las siguientes subsecciones, describimos con más detalle el potencial transmembrana inducido en células de varias formas y bajo diversas condiciones. En cada caso considerado, los principios de superposición permiten conocer el potencial transmembrana completo al agregar el componente en reposo al inducido.

Células esféricas

Para una exposición a un campo eléctrico homogéneo de corriente continua (CC), el voltaje inducido en la membrana celular se determina resolviendo la ecuación de Laplace. Aunque las células biológicas no son esferas perfectas, en los estudios teóricos generalmente se consideran como tales. Como primera aproximación, la membrana plasmática puede tratarse como no conductora. Bajo estos supuestos, el potencial transmembrana inducido $\Delta\Phi_m$ viene dado por una fórmula a menudo denominada ecuación de Schwan (en estado estacionario) [4],

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2}ER\cos\theta, \quad (1)$$

donde E es el campo eléctrico en la región donde está situada la célula, R es el radio de la célula y θ es el ángulo medido desde el centro de la célula con respecto a la dirección del campo. El voltaje es proporcional al campo eléctrico aplicado y al radio de la célula. Además, tiene valores

extremos en los puntos donde el campo es perpendicular a la membrana, es decir, en $\theta = 0^\circ$ y $\theta = 180^\circ$ (los "polos" de la célula), y entre estos polos varía proporcionalmente al coseno de θ (ver Fig. 1, línea discontinua).

El valor de $\Delta\Phi_m$ dado por la ecuación (1) se establece típicamente varios μs después del inicio de la aplicación del campo eléctrico. Con exposiciones a un campo de corriente continua que duran cientos de microsegundos o más, esta fórmula se puede aplicar de manera segura para obtener el valor máximo en estado estacionario del potencial transmembrana inducido. Para describir el comportamiento transitorio durante los microsegundos iniciales, se usa la ecuación de Schwan de primer orden [5],

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2} ER \cos \theta (1 - \exp(-t / \tau_m)), \quad (2)$$

donde τ_m es la constante de tiempo de carga de la membrana,

$$\tau_m = \frac{R \epsilon_m}{2d \frac{\sigma_i \sigma_e}{\sigma_i + 2\sigma_e} + R\sigma_m} \quad (3)$$

con σ_i , σ_m y σ_e las conductividades del citoplasma, la membrana celular y el medio extracelular, respectivamente, ϵ_m la permitividad dieléctrica de la membrana, d el grosor de la membrana y R nuevamente el radio celular.

En ciertos experimentos in vitro, donde se usan medios extracelulares artificiales con conductividades sustancialmente más bajas que las fisiológicas, el factor 3/2 en las ecuaciones (1) y (2) disminuye su valor, como se describe en detalle en [6]. Pero en general, las ecuaciones (2) y (3) son aplicables a exposiciones a campos eléctricos sinusoidales (corriente alterna, AC) con frecuencias inferiores a 1 MHz, y a pulsos eléctricos rectangulares de más de 1 μs .

Para determinar el voltaje inducido por frecuencias de campo aún más altas o pulsos aún más cortos, también deben tenerse en cuenta las permitividades dieléctricas de los electrolitos en ambos lados de la membrana. Esto lleva a una mayor generalización de las ecuaciones (2) y (3) a un modelo de segundo orden [7-9], y los resultados que esto arroja se describirán en la última sección de este capítulo.

Células esferoidales y elipsoidales

Otra forma de generalización es asumir una forma de célula más general que la de una esfera. La generalización más directa es a un esferoide (un cuerpo geométrico obtenido al rotar una elipse alrededor de uno de sus radios, de modo que una de sus proyecciones ortogonales es una esfera, y las otras dos son la misma elipse) y luego a un elipsoide (un cuerpo geométrico en el que cada una de sus tres proyecciones ortogonales es una elipse diferente). Para obtener los análogos de la ecuación de Schwan para tales células, se resuelve la ecuación de Laplace en coordenadas esferoidales y elipsoidales, respectivamente [10-12]. Además del hecho de que esta solución es en sí misma algo más compleja que la de las coordenadas esféricas, la generalización de la forma invoca dos complicaciones adicionales descritas en los dos párrafos siguientes.

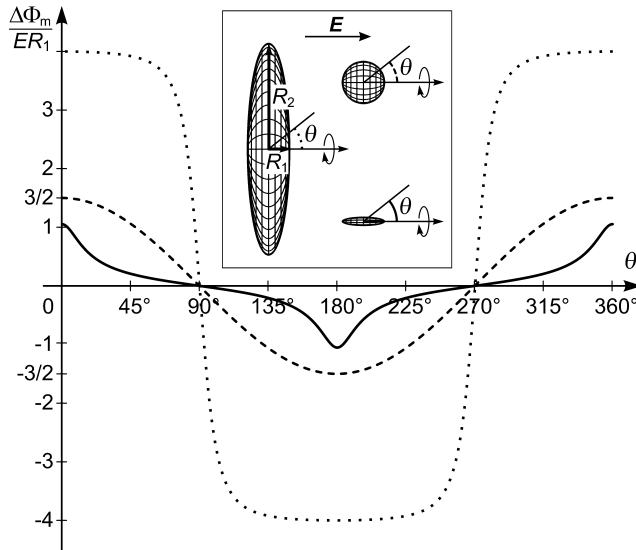


Figura 1: $\Delta\Phi_m$ normalizado en estado estacionario en función del ángulo polar θ para células esferoidales con el eje de simetría rotacional alineado con la dirección del campo. Línea continua: una célula esferoidal oblonga con $R_2 = 0.2 \times R_1$. Línea discontinua: una célula esférica, $R_2 = R_1 = R$. Línea punteada: una célula esferoidal oblonga con $R_2 = 5 \times R_1$.

Una descripción de una célula es geoméricamente realista si el grosor de su membrana es uniforme. Este es el caso si la membrana representa el espacio entre dos esferas concéntricas, pero no con dos esferoides o elipsoides confocales. Como resultado, el grosor de la membrana

modelada en coordenadas esferoidales o elipsoidales es necesariamente no uniforme. Al resolver la ecuación de Laplace en estas coordenadas, obtenemos la distribución espacial del potencial eléctrico en un entorno no realista. Sin embargo, bajo el supuesto de que la conductividad de la membrana es cero, el potencial transmembrana inducido obtenido de esta manera sigue siendo realista. Es decir, el blindaje del citoplasma se completa y, por lo tanto, el potencial eléctrico en todas partes dentro del citoplasma es constante. Por lo tanto, la geometría de la superficie interna de la membrana no afecta la distribución potencial fuera de la célula, que es lo mismo que ocurriría si la célula fuera un cuerpo no conductor homogéneo de la misma forma¹. Una discusión más rigurosa de la validez de este enfoque se puede encontrar en [10]. La figura 1 compara el potencial transmembrana inducido en dos esferoides con el eje de simetría rotacional alineado con la dirección del campo, y el inducido en una esfera.

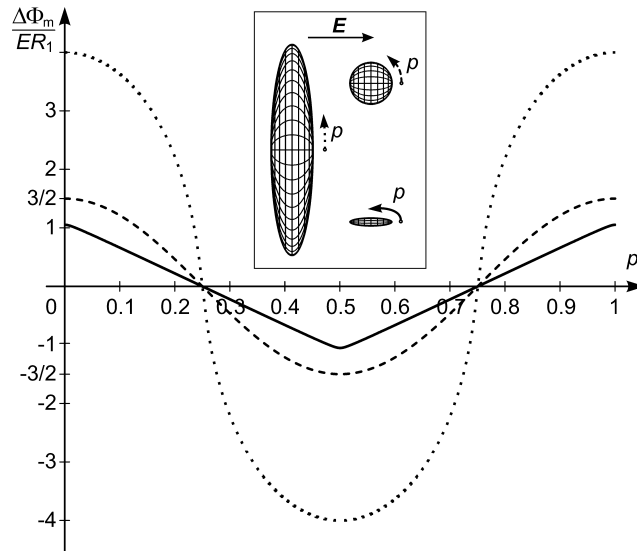


Figura 2: $\Delta\Phi_m$ normalizado en estado estacionario en función de la longitud de arco normalizada p para células esferoidales con el eje de simetría rotacional alineado con la dirección del campo. Línea continua: una célula esferoidal oblonga con $R_2 = 0.2 \times R_1$. Línea discontinua: una célula esférica, $R_2 = R_1 = R$. Línea punteada: una célula esferoidal oblonga con $R_2 = 5 \times R_1$.

Para las células no esféricas, generalmente es más revelador expresar $\Delta\Phi_m$ en función de la longitud del arco que en función del ángulo θ (para una esfera, las dos magnitudes son directamente proporcionales). Para

mayor uniformidad, se usa la versión normalizada de la longitud del arco, denotada por p y aumentando de 0 a 1 equidistantemente a lo largo del arco de la membrana. Esto se ilustra en la Fig. 2 para las células para las cuales $\Delta\Phi_m(\theta)$ se muestra en la Fig. 1, y todas las gráficas de $\Delta\Phi_m$ en las células no esféricas se presentarán de aquí en adelante.

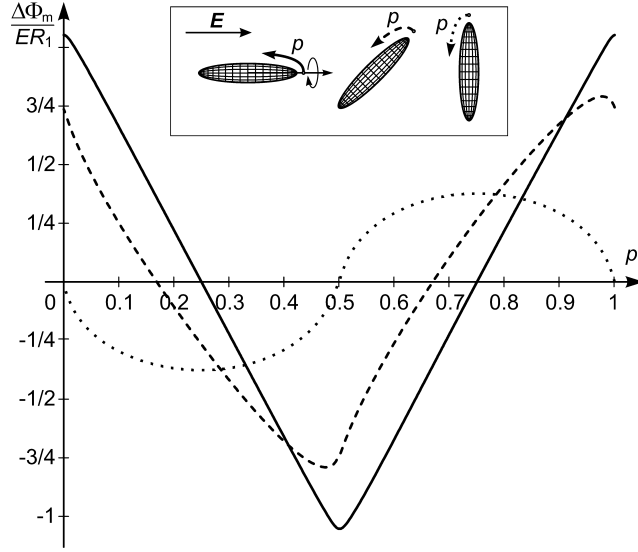


Figura 3: $\Delta\Phi_m(p)$ normalizado en estado estacionario para una célula esferoidal oblonga con $R_2 = 0.2 \times R_1$. Línea continua: eje de simetría rotacional (ESR) alineado con el campo. Línea discontinua: ESR a 45° con respecto al campo. Línea punteada: ESR perpendicular al campo.

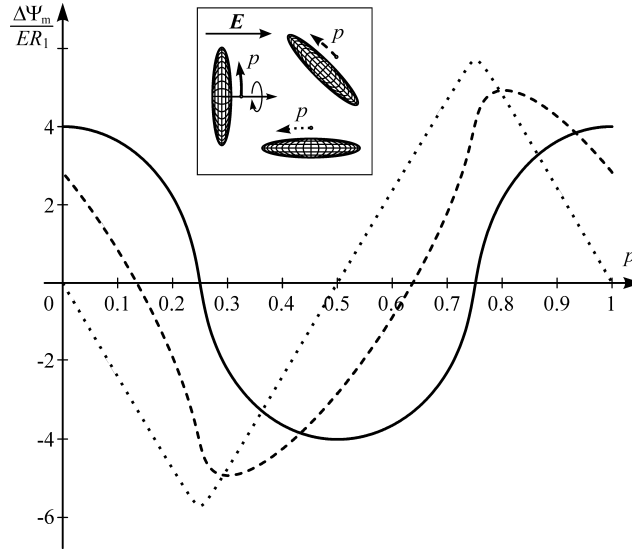


Figura 4: $\Delta\Phi_m(p)$ normalizado en estado estacionario para una célula esferoide oblonga con $R_2 = 5 \times R_1$. Línea continua: eje de simetría rotacional (ESR) alineado con el campo. Línea discontinua: ESR a 45° con respecto al campo. Línea punteada: ESR perpendicular al campo.

La segunda complicación de generalizar la forma de la célula de una esfera a un esferoide o a un elipsoide es que el voltaje inducido ahora también se vuelve dependiente de la orientación de la célula con respecto al campo eléctrico. Para lidiar con esto, uno descompone el vector de campo en los componentes paralelos a los ejes del esferoide o el elipsoide, y escribe el voltaje inducido como una combinación lineal correspondiente de los voltajes inducidos para cada una de las tres orientaciones coaxiales [11,12]. Las Figs. 3 y 4 muestran el efecto de rotación de dos esferoides diferentes con respecto a la dirección del campo.

Células de forma irregular

Para una célula que tiene una forma irregular, el potencial transmembrana inducido no puede determinarse de manera totalmente exacta, ya que para tal geometría la ecuación de Laplace no se puede resolver analíticamente. Utilizando computadoras modernas y herramientas de elementos finitos como COMSOL Multiphysics, el voltaje inducido en una célula irregular dada se puede determinar

numéricamente, como se describe en detalle en [13,14]. Si bien los resultados obtenidos de esta manera son bastante exactos, solo son aplicables a la forma de célula particular para la cual fueron calculados. La Fig. 5 muestra ejemplos de dos células que crecen en una placa de Petri y los voltajes inducidos en sus membranas.

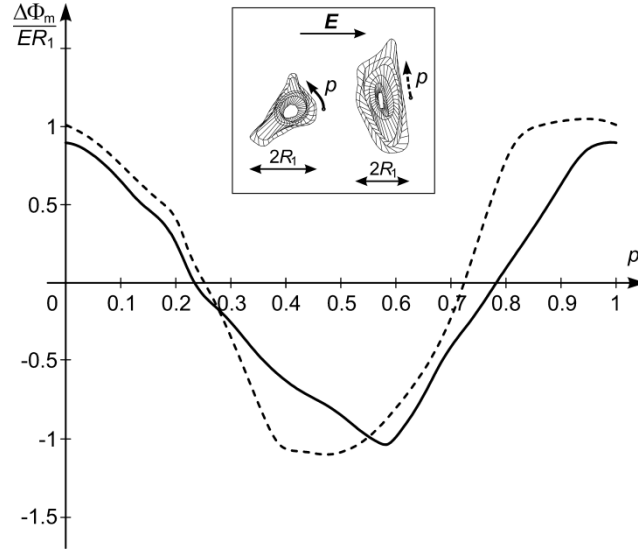


Figura 5: $\Delta\Phi_m(p)$ normalizado en estado estacionario para dos células de forma irregular que crecen en la superficie plana de una placa de Petri.

Células en suspensiones densas

En suspensiones celulares diluidas, la distancia entre las células es mucho mayor que las células mismas, y el campo local fuera de cada célula prácticamente no se ve afectado por la presencia de otras células. Por lo tanto, para las células que representan menos del 1% del volumen de la suspensión (para una célula esférica con un radio de 10 μm , esto significa hasta 2 millones de células/ml), la desviación del potencial transmembrana inducido real de uno predicho por la ecuación de Schwan es despreciable. Sin embargo, a medida que la fracción de volumen ocupada por las células aumenta, la distorsión del campo local alrededor de cada célula por la presencia de otras células en la vecindad se vuelve más pronunciada, y la predicción producida por la ecuación de Schwan es menos realista (Fig. 6). Para fracciones de volumen superiores al diez por ciento, así como para grupos y redes de células, uno tiene que usar

soluciones analíticas numéricas o aproximadas apropiadas para un análisis confiable del potencial transmembrana inducido [15,16]. Independientemente de la fracción de volumen que ocupen, siempre que las celdas estén suspendidas, flotan libremente y su disposición es bastante uniforme. Asintóticamente, esto correspondería a una red cúbica de células centrada en una cara, y esta red también es la más apropiada para el análisis del potencial transmembrana inducido en las células en suspensión.

Para fracciones de células aún mayores, las propiedades eléctricas de la suspensión comienzan a parecerse a las de un tejido, pero solo hasta cierto punto. La disposición de las células en los tejidos no se parece necesariamente a una red cúbica centrada en una cara, ya que las células pueden formar estructuras específicas (por ejemplo, capas). Además, las células en los tejidos pueden estar acopladas eléctricamente (por ejemplo, a través de uniones gap). Estas y otras características específicas de las interacciones entre las células en los tejidos y los campos eléctricos se considerarán con más detalle en el capítulo siguiente.

Campos de alta frecuencia y pulsos muy cortos

La constante de tiempo de carga de membrana (τ_m) dada por la ecuación (3) implica que hay un retraso entre la aplicación eléctrico externo y el voltaje inducido por este campo. Como se mencionó anteriormente, τ_m (y, por lo tanto, el retraso) está algo por debajo de un microsegundo en condiciones fisiológicas, pero puede ser mayor cuando las células se suspenden en un medio de baja conductividad. Para campos alternos (AC) con un período de oscilación mucho más largo que τ_m , así como para pulsos rectangulares mucho más largos que τ_m , la amplitud del voltaje inducido no se ve afectada. Sin embargo, para campos AC con un período comparable o más corto que τ_m , así como para pulsos más cortos que τ_m , la amplitud del voltaje inducido comienza a disminuir.

Para ilustrar cómo se atenúa la amplitud del potencial transmembrana inducido a medida que aumenta la frecuencia del campo AC, graficamos la amplitud normalizada del voltaje inducido en función de la frecuencia del campo. Para una célula esférica, la gráfica obtenida se muestra en la Fig. 6. La meseta de baja frecuencia y la pendiente descendente que sigue se describen en la ecuación de Schwan de primer orden, pero la meseta de alta frecuencia solo se describe en el modelo de segundo orden [7-9], en el que todas las conductividades eléctricas y las permitividades dieléctricas son tenidas en cuenta.

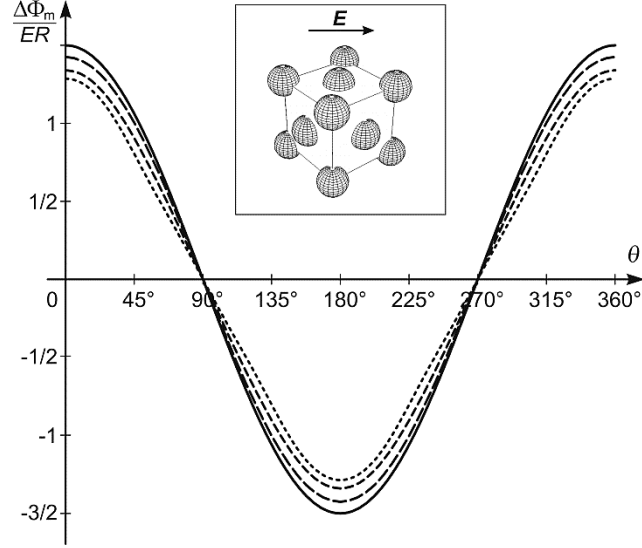


Figura 6: $\Delta\Phi_m(\theta)$ normalizado en estado estacionario para células esféricas en suspensiones de varias densidades (distancias intercelulares). Línea continua: El resultado analítico para una sola célula como lo da la ecuación (1). Líneas discontinuas: resultados numéricos para células dispuestas en una red cúbica centrada en una cara y que ocupan (con longitud de trazo decreciente) 10%, 30% y 50% del volumen total de la suspensión.

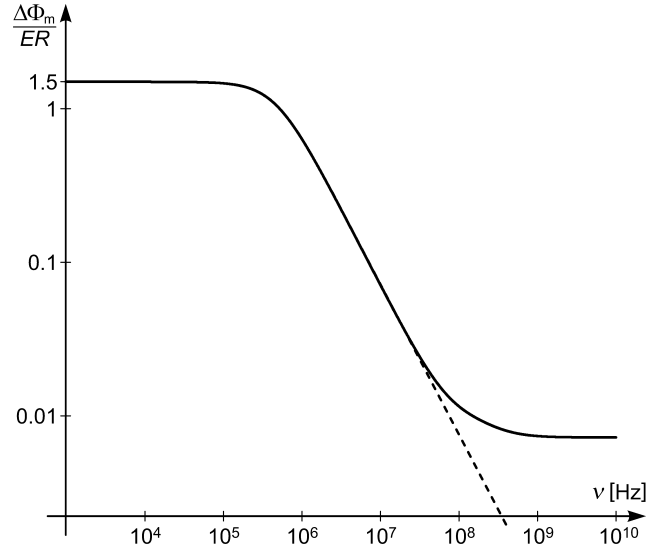


Figura 7: Amplitud de $\Delta\Phi_m$ normalizada en estado estacionario en función de la frecuencia del campo de AC. La curva discontinua muestra la ecuación de

Schwan de primer orden, y la curva sólida la de segundo. Nótese que ambos ejes son logarítmicos.

Con frecuencias de campo cercanas al rango de GHz, o con duraciones de pulso en el rango de nanosegundos, la atenuación del voltaje inducido en la membrana plasmática de la célula se vuelve tan pronunciada que este voltaje se vuelve comparable al voltaje inducido en las membranas de los orgánulos en el interior de la célula. En ciertas circunstancias, particularmente si el interior de la organela es eléctricamente más conductor que el citosol, o si la membrana de la organela tiene una permitividad dieléctrica menor que la membrana celular, el voltaje inducido en la membrana de esta organela puede exceder temporalmente el voltaje inducido en la membrana plasmática [17]. En principio, esto podría proporcionar una explicación teórica para una serie de reportes recientes de que impulsos eléctricos muy cortos e intensos (decenas de ns, millones o decenas de millones de V/m) también pueden inducir la electroporación de las membranas de los orgánulos [18-20].

Referencias

- [1] T. Kotnik, G. Pucihar, D. Miklavčič. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *J. Membrane Biol.* 236: 3-13, 2010.
- [2] K.S. Cole. *Membranes, Ions and Impulses*. University of California Press, Berkeley, USA, 1972.
- [3] H.L. Atwood, W.A. Mackay. *Essentials of Neurophysiology*. BC Decker, Toronto, Canada, 1989.
- [4] H.P. Schwan. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5: 147-209, 1957.
- [5] H. Pauly, H.P. Schwan. Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforsch.* 14B: 125-131, 1959.
- [6] T. Kotnik, F. Bobanović, D. Miklavčič. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields — a theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 285-291, 1997.
- [7] C. Grosse, H.P. Schwan. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63: 1632-1642, 1992.
- [8] T. Kotnik, D. Miklavčič, T. Slivnik. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields — a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45: 3-16, 1998.
- [9] T. Kotnik, D. Miklavčič. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47: 1074-1081, 2000.

- [10] T. Kotnik, D. Miklavčič. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.* 79: 670-679, 2000.
- [11] J. Gimsa, D. Wachner. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys. J.* 81: 1888-1896, 2001.
- [12] B. Valič, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissié, M.P. Rols, D. Miklavčič. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* 32: 519-528, 2003.
- [13] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valič, D. Miklavčič. Numerical determination of the transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals Biomed. Eng.* 34: 642-652, 2006.
- [14] G. Pucihar, D. Miklavčič, T. Kotnik. A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE T. Biomed. Eng.* 56: 1491-1501, 2009.
- [15] R. Susil, D. Šemrov, D. Miklavčič. Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro. Magnetobiol.* 17: 391-399, 1998.
- [16] M. Pavlin, N. Pavšelj, D. Miklavčič. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49: 605-612, 2002.
- [17] T. Kotnik, D. Miklavčič. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys. J.* 90: 480-491, 2006.
- [18] K.H. Schoenbach, S.J. Beebe, E.S. Buescher. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22: 440-448, 2001.
- [19] S.J. Beebe, P.M. Fox, L.J. Rec, E.L. Willis, K.H. Schoenbach. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J.* 17: 1493-1495, 2003.
- [20] E. Tekle, H. Oubrahim, S.M. Dzekunov, J.F. Kolb, K.H. Schoenbach, P. B. Chock. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys. J.* 89: 274-284, 2005.

Agradecimientos

Este trabajo recibió el apoyo de la Agencia Eslovena de Investigación.



Tadej Kotnik nació en Liubliana, Eslovenia, en 1972. Realizó el doctorado en biofísica de la Universidad de París XI y el doctorado en Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubliana, ambos en 2000. Actualmente es Catedrático y ex Vicedecano de Investigación en la Facultad de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubliana. Sus intereses de investigación incluyen la electrodinámica de la membrana celular, así como el estudio teórico y experimental de

fenómenos biofísicos relacionados particularmente con la electroporación de membrana y la electrotransferencia génica. Tadej Kotnik es primer autor de 23 artículos en revistas clasificadas por SCI citadas más de 1200 veces, excluyendo las citas personales, y coautor de 28 artículos adicionales citados más de 800 veces, excluyendo las citas personales. Su índice h es 26. En 2001 recibió el Premio Galvani de la Bioelectrochemical Society.

Capítulo 2

Propiedades eléctricas de los tejidos y sus cambios durante la electroporación

Damijan Miklavčič, Bor Kos

Universidad de Liubliana, Facultad de Ingeniería Eléctrica, Liubliana, Eslovenia

Resumen: Las propiedades eléctricas pasivas de los tejidos biológicos, tales como la permitividad y la conductividad, son importantes en la resolución de problemas aplicados de electroporación. La densidad de corriente, así como las vías por las cuales circula la corriente de un pulso eléctrico aplicado son determinadas por la permitividad relativa y la conductividad de los tejidos biológicos. A continuación, presentamos brevemente las bases teóricas de la conducción de corriente eléctrica en materiales biológicos, y los factores que afectan a la medición de las propiedades dieléctricas de los tejidos y que deben ser tenidos en cuenta al momento de diseñar un procedimiento de medición. Se encuentran grandes discrepancias entre los datos reportados por diferentes investigadores en la literatura. Estas diferencias se deben a las diferentes técnicas de medición utilizadas, al hecho de que las propiedades del tejido macroscópico no son homogéneas, a dispersiones, a anisotropía, a no linealidad, así como a la dependencia con la temperatura y a cambios a lo largo del tiempo. Además, cuando el tejido biológico se expone a un campo eléctrico alto, se producen cambios en sus propiedades eléctricas.

Introducción

Las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos y las suspensiones celulares han sido de interés durante más de un siglo. Estas propiedades determinan las vías del flujo de la corriente a través del cuerpo y, por lo tanto, son muy importantes en el análisis de una amplia gama de

aplicaciones biomédicas. En un nivel más fundamental, el conocimiento de estas propiedades eléctricas puede conducir a la comprensión de los procesos biológicos básicos subyacentes. Para analizar la respuesta de un tejido al estímulo eléctrico, se necesitan datos sobre la conductividad y la permitividad relativa de los tejidos u órganos en estudio. Una descripción microscópica de la respuesta es complicada por la variedad de formas celulares y su distribución dentro del tejido, así como por las diferentes propiedades de los medios extracelulares.

A baja frecuencia, la conductividad eléctrica está determinada principalmente por la concentración de iones extracelulares y su movilidad.

Por lo tanto, se usa con mayor frecuencia un enfoque macroscópico para caracterizar distribuciones de campo en sistemas biológicos. Sin embargo, incluso a nivel macroscópico, las propiedades eléctricas son complicadas. Estas pueden depender de la orientación del tejido en relación con el campo aplicado (anisotropía direccional), la frecuencia del campo aplicado (el tejido no es un dieléctrico perfecto, ni un conductor perfecto) o pueden depender del tiempo y el espacio (p. ej. cambios en la conductividad del tejido durante la electroporación) [1] - [3].

Materiales biológicos en el campo eléctrico

Las propiedades eléctricas de cualquier material, incluidos los tejidos biológicos, se pueden dividir en dos categorías: conducción y aislamiento. En un conductor, las cargas eléctricas se mueven libremente en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico, mientras que en un aislante (dieléctrico) las cargas son fijas y, por lo tanto, no pueden moverse libremente; la corriente no fluye.

Si un conductor se coloca en un campo eléctrico externo, las cargas se redistribuirán dentro del conductor hasta que el campo interno resultante sea cero. En el caso de un aislante, no hay cargas libres, por lo que no se produce una migración neta de cargas. En materiales polares, los centros de carga positiva y negativa en las moléculas (por ejemplo, agua) no coinciden. Un campo aplicado, E_0 , tiende a orientar los dipolos y produce un campo dentro del dieléctrico, E_p , que se opone al campo aplicado. Este proceso se llama polarización. La mayoría de los materiales contienen una combinación de dipolos y cargas libres. Por lo tanto, el campo eléctrico en cualquier material se reduce en relación con su valor de espacio libre. El campo interno resultante dentro del material, E , es entonces

$$E = E_0 - E_p$$

El campo interno resultante se reduce en una cantidad significativa en relación con el campo aplicado si el material es un aislante y es esencialmente cero para un buen conductor. Esta reducción se caracteriza por un factor ϵ_r , que se denomina permitividad relativa o constante dieléctrica, de acuerdo con

$$E = \frac{E_0}{\epsilon_r}$$

En la práctica, la mayoría de los materiales, incluido los tejidos biológicos, en realidad muestran algunas características de ambos, aislantes y conductores, porque contienen dipolos y cargas que pueden moverse, pero de manera restringida [4], [5].

A nivel macroscópico, describimos que el material tiene una permitividad, ϵ , y una conductividad, σ . La permitividad caracteriza la capacidad del material para atrapar o almacenar cargas o rotar dipolos moleculares, mientras que la conductividad describe su capacidad para transportar cargas. La permitividad también ayuda a determinar la velocidad de la luz en un material, de modo que el espacio libre tiene una permitividad $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ F/m. Para otros medios:

$$\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$$

La energía almacenada por unidad de volumen en un material, u , y la potencia disipada por unidad de volumen, p , son:

$$u = \frac{\epsilon E^2}{2} \quad p = \frac{\sigma E^2}{2}$$

Considere una muestra de material que tiene un espesor, d , y un área de sección transversal, A (Figura 1).

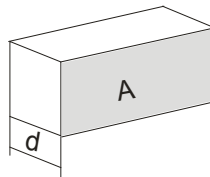


Figura 1: Consideración de una pequeña parte teórica de un material.

Si el material es un aislante, entonces tratamos la muestra como un condensador con capacidad (C); si es un conductor, entonces lo tratamos como un conductor con conductancia (G):

$$C = \epsilon \cdot A/d \qquad G = \sigma \cdot A/d$$

Un modelo simple para un material real, como un tejido, sería una combinación paralela del condensador y el conductor. Si se aplica un voltaje constante (DC) V a través de esta combinación en paralelo, entonces fluiría una corriente de conducción $I_c = GV$ y se almacenaría una cantidad de carga $Q=CV$. Sin embargo, si se aplica un voltaje alterno (AC) a la combinación:

$$V(t)=V_0\cos(\omega t)$$

La carga en las placas del condensador ahora está cambiando con la frecuencia f. Caracterizamos este flujo como una corriente de desplazamiento:

$$I_d = dQ/dt = -\omega CV_0 \sin(\omega t)$$

La corriente total que fluye a través del material es la suma de las corrientes de conducción y desplazamiento, que están separadas 90 ° en fase, con las corrientes de desplazamiento “adelantadas” respecto al voltaje aplicado. La corriente total es $I = I_c + I_d$, por lo tanto

$$I = GV + C \cdot dV/dt = (\sigma + i\omega\epsilon)V \cdot A/d$$

El material real, entonces, se puede caracterizar por tener una admitancia, Y^* , dada por:

$$Y^* = G + i\omega C = (A/d)(\sigma + i\omega\epsilon)$$

donde * indica una cantidad de valor complejo. En términos de propiedades del material, definimos una conductividad correspondiente de valor complejo

$$\sigma^* = (\sigma + i\omega\epsilon)$$

La descripción de un material en términos de su admitancia enfatiza su capacidad para transportar corriente. Alternativamente, podríamos enfatizar su capacidad para restringir el flujo de corriente considerando su impedancia $Z^* = 1 / Y^*$, o para una conductancia pura, su resistencia, $R = 1 / G$.

También podemos denotar la corriente total como:

$$I = (\epsilon_r - i\sigma/\omega\epsilon_0) i\omega\epsilon_0 A/d = C \frac{dV}{dt}$$

Podemos definir una permitividad relativa de valor complejo:

$$\epsilon^* = \epsilon_r - \frac{i\sigma}{\omega\epsilon_0} = \epsilon_r' - i\epsilon_r''$$

con $\epsilon_r' = \epsilon_r$ and $\epsilon_r'' = \sigma/(\omega\epsilon_0)$. La conductividad compleja y la permitividad compleja están relacionadas por:

$$\sigma^* = i\omega\epsilon^* = i\omega\epsilon_0\epsilon_r^*$$

Podemos considerar la conductividad de un material como una medida de la habilidad de su carga para ser transportada a lo largo de su volumen en respuesta al campo eléctrico aplicado. Del mismo modo, su permitividad es una medida de la habilidad de sus dipolos para rotar o para almacenar su carga en respuesta al campo aplicado. Tenga en cuenta que, si la permitividad y la conductividad del material son constantes, la corriente de desplazamiento aumentará con la frecuencia, mientras que la corriente de conducción no cambia. A bajas frecuencias, el material se comportará como un conductor, pero los efectos capacitivos serán más importantes a frecuencias más altas. Para la mayoría de los materiales, sin embargo, σ^* y ϵ^* dependen de la frecuencia. Dicha variación se llama dispersión y se debe a la relajación dieléctrica: el retraso en la polarización molecular después del cambio del campo eléctrico en un material. Los tejidos biológicos exhiben varias dispersiones diferentes en un amplio rango de frecuencias [4].

Las dispersiones pueden entenderse en términos de la orientación de los dipolos y del movimiento de los portadores de carga. A frecuencias relativamente bajas, es relativamente fácil que los dipolos se orienten en respuesta al cambio en el campo aplicado, mientras que los portadores de carga viajan distancias más grandes sobre las cuales hay una mayor oportunidad de atrapar un defecto o interfaz como la membrana celular [6]. A medida que aumenta la frecuencia, los dipolos son menos capaces de seguir los cambios en el campo aplicado y la polarización correspondiente desaparece. Por el contrario, los transportadores de carga recorren distancias más cortas durante cada medio ciclo y tienen menos probabilidades de quedar atrapados. A medida que aumenta la frecuencia, la permitividad disminuye y, debido a que la captura se vuelve menos importante, aumenta la conductividad. En un material heterogéneo, como el tejido biológico, se observan varias dispersiones como se ilustra en la

Figura 2. En resumen, la dispersión alfa en el rango de kilohercios se debe a los efectos de la membrana celular, como los canales iónicos regulados y la difusión iónica, y es la primera de las dispersiones en desaparecer con la muerte del tejido. La dispersión beta se puede observar alrededor del rango de megahercios debido a la carga capacitiva de las membranas celulares. Por encima de la dispersión beta, la impedancia de las membranas celulares cae drásticamente, permitiendo que la corriente eléctrica pase a través no solo del espacio extracelular, sino también intracelular. Esta dispersión es particularmente interesante ya que también es evidente en la conductividad del material. La última, la dispersión gamma (por encima del rango de gigahercios) se debe a los mecanismos dipolares de las moléculas de agua en el material.

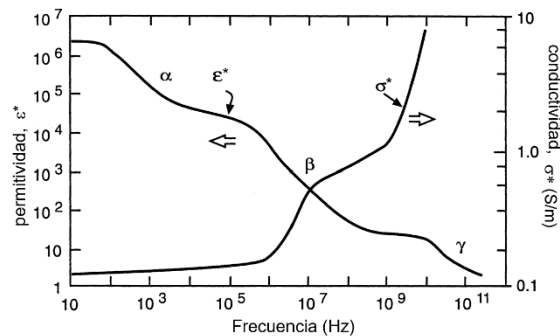


Figura 2: Dependencia de la frecuencia típica de la permitividad y la conductividad complejas de un material heterogéneo como el tejido biológico.

Mediciones de las propiedades dieléctricas de los tejidos

Existe una gran discrepancia entre datos encontrados en la literatura sobre las propiedades eléctricas de materiales biológicos. La medición de las propiedades dieléctricas del tejido puede ser complicada debido a varios factores, como la falta de homogeneidad del tejido, la anisotropía, el estado fisiológico del tejido, los cambios estacionales y relacionados con la edad y la enfermedad y la polarización de los electrodos [1].

Inhomogeneidad de los tejidos

El tejido es un material altamente no homogéneo. La célula en sí está compuesta por una membrana aislante que envuelve un citosol conductor. Una suspensión de células puede considerarse a bajas frecuencias simplemente como inclusiones no conductoras en un fluido conductor [6]. El aislamiento es proporcionado por la membrana celular. A frecuencias en el rango de MHz, el acoplamiento capacitivo a través de esta membrana se vuelve más importante, permitiendo que la corriente eléctrica pase no solo alrededor de la celda, sino también a través de ella. En el tejido, las células están rodeadas por una matriz extracelular, que puede ser extensa, como en el caso del hueso, o mínima, como en el caso del tejido epitelial. El tejido no contiene células de un solo tamaño y función. El tejido se perfunde con sangre y se une al sistema nervioso central mediante neuronas. Por lo tanto, es difícil (si no imposible) extrapolar las propiedades dieléctricas de una suspensión celular a las de un tejido intacto.

Anisotropía de tejidos

Algunos materiales biológicos, como el hueso y el músculo esquelético, son anisotrópicos. Por lo tanto, cuando se hace referencia a los valores medidos de conductividad y permitividad, es necesario incluir datos sobre la orientación de los electrodos con respecto al eje principal del tejido; por ejemplo, longitudinal, transversal o una combinación de ambos. Por ejemplo, los músculos están compuestos de fibras, células individuales muy grandes alineadas en la dirección de la contracción muscular. La conducción eléctrica a lo largo de la longitud de la fibra es significativamente más fácil que la conducción en la dirección perpendicular a las fibras. Por lo tanto, el tejido muscular manifiesta propiedades eléctricas anisotrópicas típicas. La conductividad longitudinal es significativamente mayor que la conductividad transversal (puede ser hasta 8 veces mayor) [7].

La anisotropía tisular depende de la frecuencia. Es decir, si la frecuencia de la corriente es lo suficientemente alta, las propiedades anisotrópicas desaparecen. Específicamente para el tejido muscular, eso ocurre en el rango de frecuencia de MHz, es decir, en la dispersión beta.

Factores fisiológicos y cambios de tejido

Cualquier cambio en la fisiología del tejido debe producir cambios en las propiedades eléctricas del tejido. Este principio se ha utilizado para identificar y/o monitorear la presencia de diversas enfermedades o afecciones [8], [9].

Los tumores generalmente tienen un mayor contenido de agua que los tejidos normales debido a la necrosis celular, pero también a la vascularización irregular y fenestrada. La mayor conductividad de los tumores en el rango de frecuencia de MHz se ha identificado como un objetivo potencial para las aplicaciones de imágenes [10]. Además, puede haber diferencias en la estructura de la membrana ya que la grasa es peor conductor de la electricidad que el agua. Los cambios en la impedancia de los tejidos reflejan el porcentaje de grasa corporal o agua [8]. También se ha informado que los cambios patológicos en el hígado, como la enfermedad del hígado graso o la cirrosis pueden influir en las propiedades medidas del tejido a frecuencias de 100 MHz [9].

Además, la muerte o la escisión del tejido produce cambios significativos en sus propiedades eléctricas. El metabolismo del tejido disminuye tras haber sido extirpado y, a menudo, la temperatura baja. Si el tejido es sostenido por medio del mantenimiento de la temperatura y un sistema de perfusión, puede estabilizarse en un estado vivo in vitro (ex vivo) por un período limitado de tiempo. Sin embargo, si no se le proporcionan estas medidas de soporte, se producirán cambios irreversibles, seguidos de muerte celular y tisular. Por estas razones, se debe tener mucho cuidado en la interpretación de las mediciones eléctricas que se realizaron en tejidos extirpados.

Las propiedades eléctricas del tejido también dependen de su temperatura. La movilidad de los iones que transportan la corriente aumenta con la temperatura a medida que disminuye la viscosidad del fluido extracelular. Para monitorear el progreso del tratamiento de hipertermia, se ha sugerido el uso del rápido aumento de la conductividad que se produce con la temperatura. Además, otros posibles cambios, como la hinchazón celular y el edema, u oclusión del flujo sanguíneo, afectan las propiedades del tejido.

Polarización de los electrodos

La polarización de los electrodos es una manifestación de la organización de las cargas que ocurre en la interfaz tejido/muestra-electrodo

en presencia de moléculas de agua e iones hidratados. El efecto aumenta al aumentar la conductividad de la muestra [11].

En una suspensión celular se puede formar una capa de contraíón en cada electrodo. La caída de potencial en esta capa reduce el campo eléctrico disponible para impulsar el transporte de cargas en la suspensión, lo que resulta en una conductividad aparentemente menor de la suspensión. A medida que aumenta la frecuencia, la capa de contraíón es menos capaz de seguir los cambios en la señal aplicada, la caída potencial en la interfaz muestra-electrodo disminuye y la conductividad aparente de la suspensión aumenta. Por lo tanto, la polarización del electrodo es más pronunciada a frecuencias más bajas y a amplitudes más bajas de la señal de voltaje medida.

El proceso es más complicado en el tejido. La inserción de electrodos invasivos puede causar primero la liberación de electrolitos debido a un traumatismo del tejido circundante y luego puede producirse el desarrollo de una región de la herida poco conductiva. Esta región puede blindar parte del electrodo de la corriente iónica y así reducir los efectos de polarización en comparación con una solución iónica con conductividad equivalente al fluido intracelular.

El material del electrodo juega un papel importante en la determinación de su impedancia de polarización, cuya importancia relativa disminuye con el aumento de la frecuencia. Se considera una buena práctica medir la impedancia del tejido in vivo después de esperar un tiempo suficiente para que los procesos de polarización del electrodo se estabilicen. Un tiempo típico puede ser del orden de treinta minutos.

Se utilizan dos configuraciones de electrodos básicos diferentes para medir las propiedades eléctricas de los materiales biológicos; el método de dos electrodos y el de cuatro electrodos.

Método de dos electrodos: adecuado para mediciones de corriente alterna (AC). No se puede usar como tal para mediciones de corriente continua (DC) debido a la polarización del electrodo, lo que en consecuencia da resultados incorrectos para la conductividad de la muestra entre los electrodos. Para las mediciones de AC, el rango de frecuencia sobre el cual la polarización del electrodo es importante depende en cierta medida del sistema que se esté midiendo y del material del electrodo. Para las suspensiones celulares es importante hasta casi 100 kHz, mientras que para el tejido medido in vivo es significativo solo hasta aproximadamente 1 kHz. Al variar la separación de los electrodos, se puede determinar y eliminar la contribución de la polarización del electrodo, sin embargo, este es un método que se aplica mejor a las muestras líquidas, ya que requiere electrodos de placas paralelas.

Método de cuatro electrodos: se puede utilizar para mediciones de DC y AC. Se usan dos pares de electrodos: un par de electrodos de corriente externos y un par de electrodos de voltaje internos. La corriente de la fuente pasa a través de la muestra. Se colocan los electrodos de voltaje a una separación conocida en la muestra entre los electrodos de corriente. Al medir la corriente como la caída de voltaje a través de una resistencia en serie con la muestra y la caída de voltaje a través de los electrodos internos, se puede determinar la conductividad de la muestra entre los electrodos internos. La ventaja de este método es que la polarización en los electrodos de corriente no tiene influencia en la diferencia de voltaje entre los electrodos de voltaje. La polarización en los electrodos de voltaje es insignificante tanto para DC como para AC debido a la alta impedancia de entrada del sistema de medición. El inconveniente es que los resultados de la medición se interpretan en base a la suposición de que el tejido es homogéneo en toda la región donde se realiza la medición.

Respuesta eléctrica del tejido al campo eléctrico

Se han observado cambios en la conductividad del tejido in vivo si el tejido se somete a un campo eléctrico suficientemente alto. Dicho esto, podemos utilizar las propiedades dieléctricas del hígado y tratar de calcular la respuesta eléctrica teórica a un pulso de voltaje rectangular corto que tiene una duración de 100 μ s y un tiempo de ascenso de 1 μ s (parámetros de pulso típicos utilizados para electroquimioterapia). Utilizamos el circuito RC en paralelo para modelar la respuesta eléctrica del tejido (ver Fig. 3).

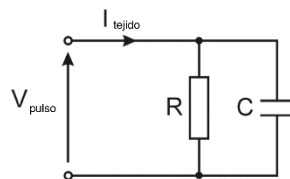


Figura 3: Circuito RC en paralelo: una representación teórica de la respuesta de los tejidos a los pulsos eléctricos.

Las complicaciones surgen de los hechos de que i) los parámetros del pulso (la duración del pulso, el tiempo de ascenso y caída) determinan el

contenido de su espectro de frecuencia y ii) la conductividad y permitividad del tejido dependen de la frecuencia. La respuesta obtenida para el primer pulso se presenta en la Fig. 4. Al comienzo del pulso de voltaje, se observa corriente de desplazamiento transitoria capacitiva. A medida que las membranas se cargan, el voltaje a través de ellas aumenta y la corriente medida disminuye. Pronto se alcanza el estado estacionario y la corriente se estabiliza a través de la conductancia del líquido extracelular. Como el modelo que describe las dispersiones dieléctricas es lineal, el cambio del voltaje aplicado escala proporcionalmente a la amplitud de la corriente.

Podemos comparar esta respuesta calculada con la respuesta medida en hígado de rata in vivo para el mismo pulso que el anterior y diferentes amplitudes de pulso que se extienden hasta las intensidades de campo electroporadoras (Fig. 5) [12]. Para el voltaje aplicado más bajo podemos ver una buena concordancia con la respuesta calculada. A medida que aumenta la intensidad del campo, la respuesta eléctrica del tejido ya no es lineal, lo que significa que la corriente aumenta más rápido que el voltaje. La corriente también aumenta durante el pulso mismo, como se puede ver por el aumento de la corriente en los voltajes más altos en la Figura 5. La medición de las propiedades eléctricas pasivas de los tejidos electroporados podría proporcionar retroalimentación en tiempo real sobre el resultado del tratamiento [12], [13]. Sin embargo, se debe tener cuidado en la interpretación del aumento de la corriente durante el tratamiento de electroporación, debido a la variabilidad natural de las propiedades dieléctricas del tejido, y a que el aumento de la conductividad también puede ser producto del calentamiento del tejido [14], [15].

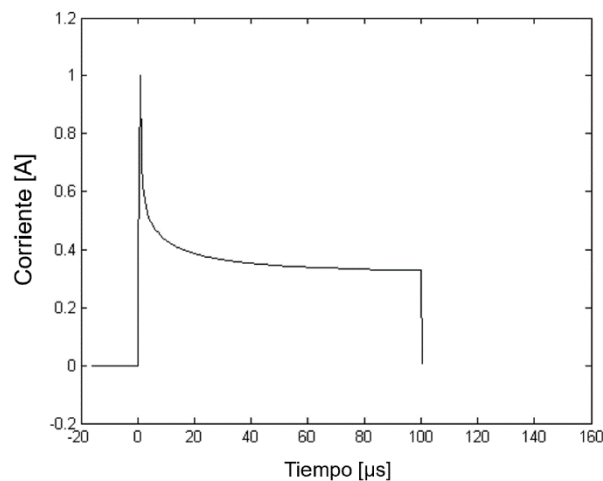


Figura 4: Respuesta calculada del tejido durante la administración del pulso de voltaje rectangular con una duración de 100 μs con un tiempo de ascenso de 1 μs y una amplitud de 120 V. Se asumen electrodos de placa con una distancia entre electrodos de 4,4 mm.

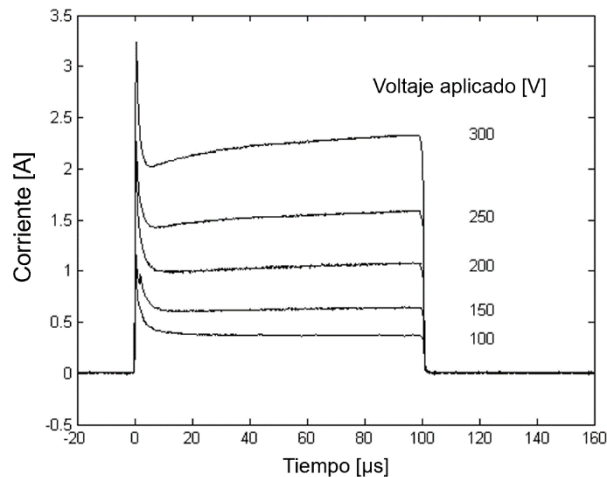


Figura 5: Respuesta medida del tejido durante el suministro de pulsos rectangulares de 100 μs de diferentes amplitudes al hígado de rata in vivo. Adaptado de Cukjati et al. [10]. Los pulsos se generaron usando un generador Jouan GHT1287B; se utilizaron electrodos de placa con una distancia entre electrodos de 4,4 mm.

La respuesta medida es coherente con la hipótesis de que el grueso de la conductividad del tejido también debería aumentar de manera medible ya que a nivel celular la electroporación causa el aumento de la conductancia de la membrana [16]. Al medir tejido ex vivo y tejido fantasma hecho de material gelatinoso [17] y tejido hepático ex vivo [18] usando MREIT, pudimos demostrar que los cambios de conductividad eléctrica debidos a la electroporación de la membrana dependen de la amplitud y ocurren solo en el tejido real pero no en el tejido fantasma. Sin embargo, no está claro a qué valor aumenta la conductividad del tejido como consecuencia de la electroporación de la membrana plasmática. Se ha estipulado que podría estar cerca del valor en el rango de dispersión beta [19].

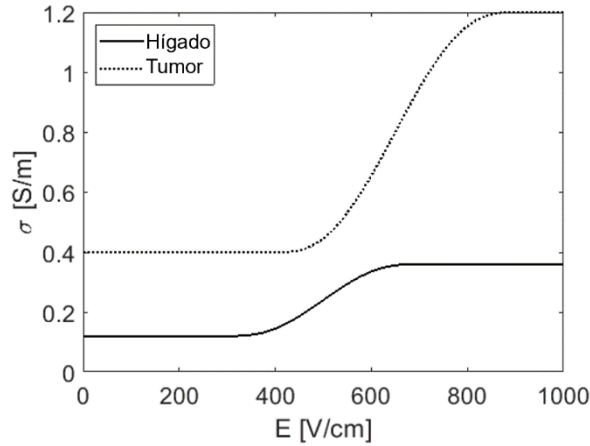


Figura 6: Conductividad de los tejidos en función de la intensidad del campo eléctrico local.

En aplicaciones donde los pulsos eléctricos se aplican externamente a la piel o a través de ella a tejidos subyacentes (como un tumor subcutáneo), uno podría esperar que se requieran amplitudes de voltaje muy altas para vencer la alta resistencia de la piel y permeabilizar los tejidos subyacentes. A saber, los tejidos entre los electrodos pueden verse como resistencias conectadas en serie. La aplicación de voltaje en dicho circuito (divisor de voltaje) hace que el voltaje se distribuya entre las resistencias proporcionalmente a sus resistividades [20]. Al aplicar pulsos eléctricos, casi todo el voltaje aplicado cae así sobre el tejido más resistivo (menos conductivo), en este caso en las capas más externas de la piel. Eso daría como resultado una fuerza de campo eléctrico muy alta en la piel, mientras que el campo eléctrico en otros tejidos seguiría siendo insuficiente para una electroporación celular exitosa. Si nuestro objetivo es la electroquimioterapia del tumor subyacente, uno podría preguntarse cómo es posible una electroquimioterapia exitosa de tumores subcutáneos cuando se usan electrodos de placa externa. La respuesta radica en el aumento de las conductividades de los tejidos durante la electroporación, un fenómeno que también se observó in vivo. Este aumento de conductividad conduce a un cambio en la distribución del campo eléctrico, que expone al tumor a un campo eléctrico lo suficientemente alto como para una permeabilización exitosa de la membrana celular [21]. Para respaldar aún más esta hipótesis, describimos este proceso con un modelo numérico, teniendo en cuenta los cambios en las propiedades eléctricas del tejido durante la electroporación. En la Figura 6 se muestran seis pasos del proceso de electroporación en el modelo de tumor subcutáneo para un voltaje de 1000 V entre los electrodos.

La distribución del campo eléctrico se muestra en V/cm. El paso 0 denota la distribución del campo eléctrico tal como era justo antes de que comenzara el proceso de electroporación, por lo tanto, cuando todos los tejidos todavía tenían sus conductividades iniciales. Cuando se aplica el voltaje a los electrodos, el campo eléctrico se distribuye en el tejido de acuerdo con las relaciones de conductividad de los tejidos en el modelo. La intensidad de campo es más alta en los tejidos con conductividad más baja, donde la caída de voltaje es más grande. En nuestro caso, casi toda la caída de voltaje ocurre en la capa de piel, que tiene una conductividad de aproximadamente 10-100 veces más baja que los tejidos que se encuentran debajo.

Si observamos el último paso del análisis secuencial, el paso 5, a 1000 V (Fig. 7), el tumor está completamente permeabilizado, e incluso en algunas áreas el campo eléctrico está por encima del umbral irreversible.

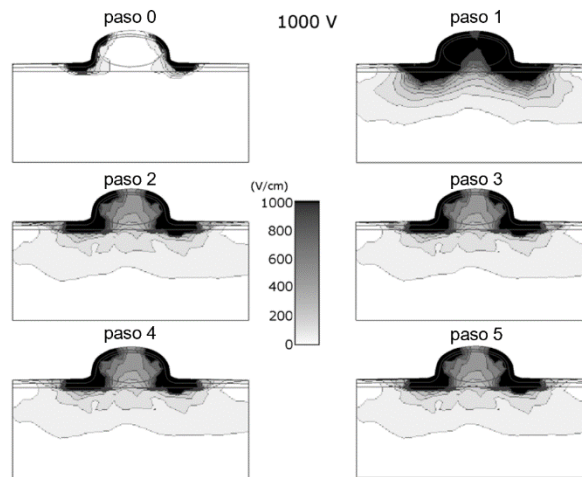


Figura 7: Seis pasos del análisis secuencial del proceso de electroporación en el modelo de tumor subcutáneo a 1000 V aplicados entre dos electrodos de placa con una separación de 8 mm [21]. Los intervalos de tiempo entre los pasos en general no son uniformes. Los diferentes pasos siguen un orden cronológico, pero no tienen un valor de tiempo exacto asociado a ellos. La distribución del campo eléctrico se muestra en V/cm.

Se puede encontrar una situación similar al aplicar pulsos eléctricos en un pliegue de piel con electrodos de placa como se utiliza para la transfección génica in vivo en la piel [22]. La piel consta de tres capas principales: epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo (Fig. 8). La

epidermis está formada por diferentes capas, pero la que define más sus propiedades eléctricas es la capa más externa, el estrato córneo. Aunque es muy delgada (típicamente alrededor de $20\text{ }\mu\text{m}$), contribuye en gran medida a las propiedades eléctricas de la piel. Su conductividad es de tres a cuatro órdenes de magnitud más baja que las conductividades de las capas más profundas de la piel. Nuevamente, cuando se aplican pulsos eléctricos en un pliegue de piel a través de electrodos de placa, casi todo el voltaje aplicado cae en el estrato córneo, lo que causa un campo eléctrico muy alto en esa capa, mientras que el campo eléctrico en las capas más profundas de la piel (las capas objetivo para transfección génica) permanece demasiado bajo. Del mismo modo que en el caso de los tumores subcutáneos, el aumento de las conductividades de las capas de la piel durante la electroporación expone las capas de la piel debajo del estrato córneo a un campo eléctrico lo suficientemente alto como para una permeabilización exitosa [23].

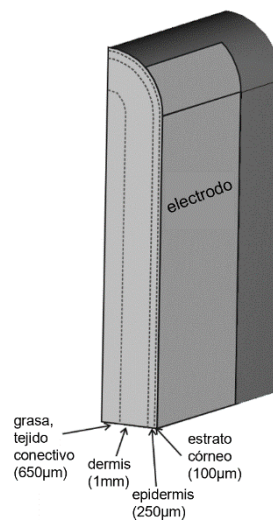


Figura 8: Esquema de un pliegue cutáneo como se describe en el modelo numérico. Aquí solo se presenta una cuarta parte del pliegue de la piel.

Propiedades del tejido durante la electroporación a alta frecuencia

Recientemente, la electroporación a alta frecuencia está recibiendo considerable atención después de que se señaló en la literatura, que la

misma con duraciones de pulso entre 1 μ s y 100 μ s está relativamente inexplorada [24]. Los pulsos más cortos, combinados con alguna pausa entre ellos tienen el potencial de reducir la estimulación nerviosa y muscular presente en los pulsos de electroporación "clásicos" [25]. Dado que los parámetros de pulso en la electroporación a alta frecuencia suelen emplear un mayor número de pulsos bipolares de corta duración, el contenido de frecuencia de estos pulsos puede ser notablemente diferente de los típicos impulsos de electroporación de 100 μ s [26]. Una posible ventaja de esto es que podría haber un menor contraste de conductividad, entre p. ej. tumor y tejido sano circundante, sin embargo, las frecuencias principales de tejido de estos trenes de pulsos siguen siendo lo suficientemente bajas como para que la electroporación provoque un aumento significativo de la conductividad debido a la electroporación de la membrana.

Conclusiones

La explicación teórica del proceso de electroporación ofrece información útil para la comprensión de los procesos biológicos subyacentes y permite predecir el resultado del tratamiento [27]. Por lo tanto, se debe emplear el debido esfuerzo en medir las propiedades eléctricas de los tejidos y sus cambios durante la electroporación [28].

Una de las preocupaciones asociadas con la electroporación podría ser el calentamiento resistivo del tejido. No es deseable un calentamiento excesivo, no solo para evitar quemaduras en la piel y garantizar la seguridad del paciente, sino también para evitar daños a las células viables. Se ha demostrado que existe la posibilidad de un calentamiento resistivo del tejido excesivo durante la electroporación [29], por lo tanto, se debe considerar el aspecto térmico en la planificación del tratamiento y el análisis teórico de aplicaciones específicas de tratamientos basados en electroporación [26]. Para mantenerse dentro del límite de seguridad y lograr un tratamiento exitoso, es necesario estimar el calentamiento, mediante modelos teóricos, como parte de la planificación del tratamiento [30].

Referencias

- [1] D. Miklavčič, N. Pavšelj, and F. X. Hart, "Electric Properties of Tissues," in *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, M. Akay, Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. ebs0403.

- [2] K. R. Foster and H. P. Schwan, "Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review," *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 17, no. 1, pp. 25–104, 1989.
- [3] C. Gabriel, A. Peyman, and E. H. Grant, "Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 MHz," *Phys. Med. Biol.*, vol. 54, no. 16, pp. 4863–4878, Aug. 2009.
- [4] J. P. Reilly, *Applied Bioelectricity*. New York, NY: Springer New York, 1998.
- [5] S. Grimnes and O. G. Martinsen, *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*, Second edition. Elsevier, 2008.
- [6] S. Huclova, D. Erni, and J. Fröhlich, "Modelling and validation of dielectric properties of human skin in the MHz region focusing on skin layer morphology and material composition," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 45, no. 2, p. 025301, Jan. 2012.
- [7] B. R. Epstein and K. R. Foster, "Anisotropy in the dielectric properties of skeletal muscle," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 21, pp. 51–55, 1983.
- [8] F. X. Hart, "Bioimpedance in the clinic," *Slovenian Medical Journal*, vol. 78, no. 12, Dec. 2009.
- [9] A. Peyman *et al.*, "Variation in dielectric properties due to pathological changes in human liver," *Bioelectromagnetics*, vol. 36, no. 8, pp. 603–612, Dec. 2015.
- [10] D. O'Loughlin, M. O'Halloran, B. M. Moloney, M. Glavin, E. Jones, and M. A. Elahi, "Microwave Breast Imaging: Clinical Advances and Remaining Challenges," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 65, no. 11, pp. 2580–2590, 2018.
- [11] H. P. Schwan, "Electrode Polarization Impedance and Measurements in Biological Materials*," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 148, no. 1, pp. 191–209, Feb. 1968.
- [12] D. Cukjati, D. Batiuskaite, F. Andre, D. Miklavcic, and L. Mir, "Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 501–507, May 2007.
- [13] A. Ivorra, B. Al-Sakere, B. Rubinsky, and L. Mir, "In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome," *Phys Med Biol*, vol. 54, no. 19, pp. 5949–5963, Oct. 2009.
- [14] R. C. G. Martin *et al.*, "Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: A call for standardization of energy delivery: IRE Technique in Pancreatic Cancer," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 114, no. 7, pp. 865–871, Dec. 2016.
- [15] A. H. Ruarus, L. G. P. H. Vroomen, R. S. Puijk, H. J. Scheffer, T. J. C. Faes, and M. R. Meijerink, "Conductivity Rise During Irreversible Electroporation: True Permeabilization or Heat?," *CardioVascular and Interventional Radiology*, vol. 41, no. 8, pp. 1257–1266, Aug. 2018.
- [16] M. Pavlin and D. Miklavcic, "Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: A theoretical analysis," *Biophys. J.*, vol. 85, no. 2, pp. 719–729, 2003.
- [17] M. Kranjc, F. Bajd, I. Serša, and D. Miklavčič, "Magnetic resonance electrical impedance tomography for measuring electrical conductivity during electroporation," *Physiol Meas*, vol. 35, no. 6, pp. 985–996, Jun. 2014.
- [18] M. Kranjc, F. Bajd, I. Sersa, E. J. Woo, and D. Miklavcic, "Ex vivo and in silico feasibility study of monitoring electric field distribution in tissue during electroporation based treatments," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, p. e45737, 2012.
- [19] R. E. Neal 2nd, P. A. Garcia, J. L. Robertson, and R. V. Davalos, "Experimental characterization and numerical modeling of tissue electrical conductivity during pulsed

- electric fields for irreversible electroporation treatment planning,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 59, no. 4, pp. 1076–1085, Apr. 2012.
- [20] N. Pavšelj and D. Miklavčič, “Numerical modeling in electroporation-based biomedical applications,” *Radiol. Oncol.*, vol. 42, no. 3, pp. 159–168, Sep. 2008.
- [21] N. Pavšelj, Z. Bregar, D. Cukjati, D. Batiuskaite, L. M. Mir, and D. Miklavcic, “The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 8, pp. 1373–1381, Aug. 2005.
- [22] N. Pavšelj and V. Preat, “DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse,” *J. Controlled Release*, vol. 106, no. 3, pp. 407–415, Sep. 2005.
- [23] N. Pavšelj, V. Pr  at, and D. Miklav  i  , “A Numerical Model of Skin Electroporabilization Based on In Vivo Experiments,” *Ann Biomed Eng*, vol. 35, no. 12, pp. 2138–2144, Sep. 2007.
- [24] J. C. Weaver, K. C. Smith, A. T. Esser, R. S. Son, and T. R. Gowrishankar, “A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: a region where additional intracellular effects are expected,” *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 236–243, Oct. 2012.
- [25] C. B. Arena *et al.*, “High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction,” *Biomed Eng Online*, vol. 10, p. 102, 2011.
- [26] S. Bhonsle, M. F. Lorenzo, A. Safaai-Jazi, and R. V. Davalos, “Characterization of Nonlinearity and Dispersion in Tissue Impedance During High-Frequency Electroporation,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 65, no. 10, pp. 2190–2201, Oct. 2018.
- [27] D. Miklavcic *et al.*, “Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy,” *Biomed Eng Online*, vol. 9, p. 10, 2010.
- [28] J. Langus, M. Kranjc, B. Kos, T. Šuštar, and D. Miklav  i  , “Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue,” *Scientific Reports*, vol. 6, p. 26409, May 2016.
- [29] I. Lackovic, R. Magjarevic, and D. Miklavcic, “Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer,” *IEEE Trans. Dielect. Electr. Insul.*, vol. 16, no. 5, pp. 1338–1347, Oct. 2009.
- [30] B. Kos, P. Voigt, D. Miklavcic, and M. Moche, “Careful treatment planning enables safe ablation of liver tumors adjacent to major blood vessels by percutaneous irreversible electroporation (IRE),” *Radiol Oncol*, vol. 49, no. 3, pp. 234–241, Sep. 2015.

Agradecimientos

Este trabajo recibí el apoyo de la Agencia Eslovena de Investigación.

Damijan Miklavčič nació en Liubliana, Eslovenia, en 1963. Realizó una Maestría y un Doctorado en Ingeniería Eléctrica en la Universidad de Liubliana en 1991 y 1993, respectivamente. Actualmente es profesor y jefe del Laboratorio de Biocibernética de la Facultad de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubliana. Sus áreas de investigación son la ingeniería biomédica y el estudio de la interacción de los campos electromagnéticos



con los sistemas biológicos. En los últimos años se ha centrado en los aspectos de ingeniería de la electroporación como base del suministro de fármacos a las células en modelos tumorales in vitro e in vivo. Su investigación incluye experimentación biológica, modelado numérico y desarrollo de hardware para electroquimioterapia, electroporación irreversible y electrotransferencia génica.

Bor Kos nació en Liubliana, Eslovenia, en 1983. Recibió un Doctorado en Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubliana en 2013. Actualmente es Profesor Asistente en la Facultad de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubliana. Su campo de investigación es bioelectromagnética e ingeniería biomédica con un enfoque principalmente en el modelado numérico de la electroporación. Desde que se realizó el primer tratamiento de tumores



profundos con electroquimioterapia en el Instituto de Oncología de Liubliana, Bor Kos se ha dedicado constantemente al desarrollo, la validación y el avance de la planificación numérica del tratamiento para tratamientos basados en electroporación. Por sus contribuciones al campo, recibió el premio Alessandro Chiabrera 2018, presentado por EBEA. Participa en colaboraciones internacionales de investigación y realiza publicaciones con colegas de Dinamarca, Hungría, Francia, Alemania, Italia, Israel, Polonia, España, Reino Unido y Estados Unidos.

Capítulo 3

Electropermeabilización celular in vitro

Justin Teissié

IPBS UMR 5089 CNRS y Universidad de Toulouse, Toulouse, Francia.

Resumen: La electropulsación (aplicación de pulsos eléctricos de corta duración) es uno de los métodos no virales más exitosos para introducir moléculas extrañas en células vivas in vitro. Este capítulo describe los factores que controlan la electropermeabilización de moléculas pequeñas (<4 kDa). La duración del pulso se selecciona desde los submicrosegundos a unos pocos milisegundos. La descripción de los eventos in vitro lleva la atención del lector a los procesos que ocurren antes, durante y después de la electropulsación de las células. Se define el papel de los diferentes parámetros eléctricos (intensidad de campo, duración del pulso, retraso entre pulsos). La cinética de los procesos que afectan la superficie celular se describe destacando que la mayor parte del intercambio a través de la membrana ocurre después del pulso, durante el llamado resellado. La contribución de la célula a este paso crítico se explica de forma tentativa. Los eventos que ocurren en la membrana celular parecen estar controlados por el metabolismo celular.

Introducción

La aplicación de pulsos de campo eléctrico a células conduce a la permeabilización transitoria de la membrana plasmática (electropermeabilización). Este fenómeno aporta nuevas propiedades a la membrana celular: se permeabiliza, se vuelve proclive a fusionarse y se pueden insertar proteínas de membrana exógenas. Se ha utilizado para introducir una gran variedad de moléculas en muchas células diferentes in vitro [1, 2].

El presente capítulo informa sobre lo que se llama "electropermeabilización clásica". Esto significa que es relevante el efecto

de los pulsos de campo que duran desde microsegundos (μ s) a varios milisegundos (ms), con un tiempo de subida de unos pocos cientos de nanosegundos. En este dominio del tiempo, la espectroscopía dieléctrica de una célula muestra que la membrana puede considerarse como un aislante no conductor (de hecho, pueden estar presentes algunas fugas activas). La física del proceso fue parte de la conferencia del profesor Kotnik.

Uno de los problemas limitantes sigue siendo que se conocen muy poco sobre los mecanismos fisicoquímicos que apoyan la reorganización de la membrana celular. La electroporación no consiste simplemente en perforar agujeros en la bicapa lipídica. La fisiología de la célula está controlando muchos parámetros. La desestabilización asociada a la pérdida de la impermeabilidad de la membrana es un estrés para las células y puede afectar la viabilidad de las mismas.

Esta conferencia explica los factores que controlan la electroporación a moléculas pequeñas (<4 kDa). Se describen los eventos que ocurren antes, durante y después de la electropulsación de las células.

Preámbulo: ¿qué es una membrana biológica?

El objetivo principal de la electroporación celular es la membrana celular, más precisamente la membrana plasmática. Los orgánulos pueden verse afectados cuando están protegidos por la membrana plasmática o por un efecto posterior del transporte vinculado a la permeabilización de la membrana plasmática (absorción de iones, fuga de metabolitos secundarios). En muchos enfoques, como las simulaciones de dinámica molecular, la descripción biológica de la membrana se limita a una bicapa lipídica. Esto está lejos de la complejidad biológica y debe usarse solo para investigaciones de física de materia condensada. Cuando el proceso se aplica a una célula (y a un tejido), se obtiene una descripción más sofisticada de la organización de la membrana biológica. Es un ensamblaje complejo entre proteínas y una mezcla de lípidos. Es el resultado de una red de fuerzas débiles que resulta en un patrón complejo de presión lateral a través de la membrana. Muchos movimientos laterales y rotacionales de los componentes de la membrana están presentes en una escala de tiempo de microsegundos. Los movimientos transversales espontáneos son impulsados por energía o son el resultado de eventos relacionados con el tráfico de membrana (endocitosis, exocitosis). La distribución de lípidos no es homogénea como se supone en el modelo de matriz fluida, sino que se detectan acumulaciones específicas localizadas

(balsas). Esto se debe al hecho de que una membrana biológica es una entidad activa donde se produce un flujo continuo de componentes (el denominado tráfico de membrana). La endocitosis y la exocitosis son procesos involucrados en la organización de la membrana. Estos procesos se ven afectados por los diferentes estresores aplicados a la célula. Las señales mecánicas son transducidas por la membrana. Esto cuesta mucha energía provista por el metabolismo celular. Otra consecuencia es el gradiente iónico a través de la membrana que resulta del equilibrio entre el bombeo activo y las fugas espontáneas. Un aspecto final es que los daños a la membrana se reparan no solo mediante un proceso intramembranario (como para un material viscoelástico) sino también mediante un proceso de parcheo mediado por vesículas citosólicas.

Por lo tanto, resulta muy difícil proporcionar una descripción física precisa de una membrana biológica a nivel molecular. O bien se utilizan aproximaciones excesivamente simplificadas (usando vesículas lipídicas, un enfoque de la física de la materia blanda) o se proporciona una descripción fenomenológica con ajuste a ecuaciones fisicoquímicas (un enfoque de ciencias de la vida). Ambos enfoques son válidos siempre que se tenga en cuenta los límites de la exactitud que posee cada uno. La presente conferencia estará dentro del enfoque de ciencias de la vida para dar la información adecuada para aplicaciones clínicas y biotecnológicas.

A- Una descripción biofísica y una validación biológica

A-1 El campo externo induce la modulación de la diferencia de potencial de la membrana

Un campo eléctrico externo modula la diferencia de potencial de membrana ya que una célula puede considerarse como un condensador esférico [3]. La diferencia de potencial transmembrana (TMP) inducida por el campo eléctrico después de un tiempo de carga (capacitiva), $\Delta\Psi_i$, es una función compleja $g(\lambda)$ de las conductividades específicas de la membrana (λ_m), el buffer usado durante la aplicación del pulso (λ_o) y el citoplasma (λ_i), el grosor de la membrana, el tamaño de la célula (r) y el empaque. Así,

$$\Delta\Psi_i = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E \cdot \cos \theta \quad (1)$$

en la que θ designa el ángulo entre la dirección normal a la membrana en el punto considerado de la superficie celular y la dirección del campo, E la

intensidad del campo, r el radio de la célula y f , un factor de forma (siendo la célula un esferoide). Por lo tanto, $\Delta\Psi_i$ no es uniforme en la superficie celular. Es máximo en las posiciones de la célula frente a los electrodos. Estas predicciones físicas se verificaron experimentalmente por videomicroscopía utilizando sondas fluorescentes sensibles a la diferencia de potencial [4 - 6]. Más localmente en la superficie celular, se ve afectado por la curvatura local y los defectos asociados al empaque. Esta descripción es válida en suspensiones celulares diluidas. En sistemas densos, el auto-blindaje en la población celular afecta la distribución de campo local y reduce la distribución de campo local (efectiva) [7]. Se necesitan intensidades de campo más fuertes para obtener el mismo potencial inducido. Otro factor que afecta las diferencias de potencial inducidas es la forma de las células y su orientación relativa a las líneas de campo. Cuando la diferencia de potencial transmembrana resultante $\Delta\Psi$ (es decir, la suma entre el valor en reposo de la membrana celular $\Delta\Psi_o$ y el valor electroinducido $\Delta\Psi_i$) alcanza localmente 250 mV, esa parte de la membrana se vuelve altamente permeable para pequeñas moléculas cargadas y se detecta transporte [3, 8].

Un parámetro más es que, como la membrana plasmática debe considerarse como un condensador, hay un tiempo de carga de la membrana que puede afectar la magnitud del TMP cuando la duración del pulso es corta (submicrosegundos) o en buffers de baja conductividad.

A-2 Parámetros que afectan la electroporabilización

A-2-1 Parámetros de campo eléctrico

La permeabilización está controlada por la intensidad del campo. Una intensidad de campo mayor que un valor crítico ($E_{p,r}$) debe aplicarse a la suspensión celular. De la ecuación (1), la permeabilización se obtiene primero para θ cerca de 0 o de π . $E_{p,r}$ es tal que:

$$\Delta\Psi_{i,perm} = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E_{p,r} \quad (2)$$

La permeabilización es, por lo tanto, un proceso local en la superficie celular. La extensión de la superficie permeabilizada de una célula esférica, A_{perm} , viene dada por:

$$A_{perm} = A_{tot} \frac{\left(1 - \frac{E_{p,r}}{E}\right)}{2} \quad (3)$$

donde A_{tot} es la superficie celular y E es la intensidad del campo aplicado. El aumento de la intensidad de campo aumentará la parte de la superficie celular que se lleva al estado electropermeabilizado.

Estas predicciones teóricas se apoyan experimentalmente directamente en suspensiones celulares al medir la fuga de metabolitos (ATP) [9] en una población o a nivel de una sola célula mediante microscopía de fluorescencia digitalizada [10, 11]. La parte permeabilizada de la superficie celular es una función lineal del recíproco de la intensidad del campo. La permeabilización, debido a alteraciones estructurales de la membrana, se detecta en un área restringida en la superficie celular. En otras palabras, ¡la célula obedece las predicciones físicas! El área afectada por el campo eléctrico depende también de la forma (esferoide) y de la orientación de la célula con las líneas del campo eléctrico [12]. Cambiar la orientación del campo entre los diferentes pulsos aumenta la fracción de la superficie celular que es permeabilizada.

Los resultados experimentales obtenidos al monitorear los cambios de conductancia en la suspensión celular [13] o mediante la observación en el microscopio de fluorescencia a nivel de células individuales [10, 11] muestran que la densidad de las alteraciones locales está fuertemente controlada por la duración del pulso. Un aumento del número de pulsos primero conduce a un aumento del nivel de permeabilización local.

La intensidad de campo controla la geometría de la parte de la célula que es permeabilizada. Esto es sencillo para las células esféricas (y validado por microscopía de fluorescencia) pero más complicado con otras formas de células. Dentro de esta área, la densidad de defectos es uniforme y está bajo el control de la duración del (de los) pulso(s).

A-2-2 Tamaño de célula

El potencial inducido depende del tamaño de la célula (Eq (1)). El porcentaje de células electropermeabilizadas en una población, donde está presente la heterogeneidad de tamaño, aumenta con un aumento en la intensidad de campo. La parte relativa de la superficie celular que está permeabilizada es más grande en una célula más grande con una intensidad de campo dada [13]. Las células grandes son sensibles a las intensidades de campo más bajas que las pequeñas. Las células en placa de cultivo se permeabilizan con un valor de E_p menor que cuando están en suspensión. Además, las células grandes en una población parecen ser más frágiles. Se observa una permeabilización irreversible de una subpoblación cuando se aplican pulsos de campo bajo (pero mayores que E_p). Otra característica es que el tiempo de "carga" está gobernado por el tamaño de la célula [14].

A-3 Fuerzas que actúan sobre la membrana

El pulso de campo eléctrico externo genera una fuerza mecánica neta transitoria que tiende a estirar la membrana esférica [15]. Esta fuerza, que causa deformación, aparece debido a los estreses de Maxwell existentes en la corteza dieléctrica esférica. La fuerza radial total actúa sobre la membrana durante el proceso transitorio y tiende a estirar al microorganismo. Incluso puede conducir a la ruptura de la membrana, lo que resulta en la muerte de este [16]. Como la elasticidad celular se basa en el citoesqueleto de actina, este estiramiento afectaría la organización celular interna mediante la transducción de señales.

B- Investigaciones estructurales

B-1 Investigaciones de P31 RMN de la región de la cabeza polar de los fosfolípidos

La RMN del átomo de fósforo en el grupo de cabeza de fosfatidilcolina se vio fuertemente afectada cuando las capas múltiples de lípidos se sometieron a pulsos de campo eléctrico. Se concluye que la conformación del grupo de la cabeza se vio muy afectada, mientras que no se pudo detectar influencia en la estructura y la dinámica de las cadenas de hidrocarburos [17]. En las células CHO electropermeabilizadas, se observó un nuevo pico anisotrópico con respecto a las células de control en el análisis espectroscópico con P 31 RMN de los componentes de fosfolípidos [18]. Una reorganización de la región del grupo de cabeza polar que conduce a un debilitamiento de la capa de hidratación puede explicar estas observaciones. También se pensó que esto explicaba la fusogenicidad de estas células inducida por el campo eléctrico.

B-2 Enfoques estructurales con tecnologías avanzadas

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) se ha utilizado ampliamente para obtener imágenes de muestras biológicas vivas en las células a nanoescala en ausencia de tinción o preparación celular. [19] La AFM, en los modos de imagen, puede sondear las modificaciones morfológicas de las células inducidas por la EP. En el modo de espectroscopia de fuerza, es posible seguir las propiedades nanomecánicas de una célula y probar las modificaciones mecánicas inducidas por la EP. Se observaron ondulaciones transitorias de la superficie de la membrana como consecuencia de la electropermeabilización y se midió una disminución de la elasticidad de la membrana en un 40% en células CHO vivas [20]. Un efecto interno afectó a toda la superficie celular, lo que puede estar relacionado con la desestabilización del citoesqueleto.

Debido a la naturaleza no lineal y coherente de la microscopía de generación de segunda armónica (SHG, por sus siglas en inglés), los patrones de radiación 3D de las membranas neuronales teñidas fueron sensibles a la distribución espacial de los dispersores, y en particular a la formación de defectos en la membrana. Se observaron densidades más altas de dispersores (alteraciones de la membrana), que duraron <5 milisegundos, en sectores de membrana perpendiculares al campo, mientras que se observó menor densidad en ubicaciones parcialmente tangentes [21, 22]. Se

detectaron mayores densidades de poros en el polo anódico en comparación con el polo catódico.

La dispersión anti-Stokes Raman coherente (CARS, por sus siglas en inglés) es una espectroscopia sin etiqueta. Recientemente se utilizó para confirmar que las proteínas se vieron afectadas durante la electroporación [23, 24].

Los resultados de la CARS son indicativos de una alteración de las moléculas de agua interfaciales, una consecuencia directa de la fusogenicidad de las membranas electroporadas [25].

C-Aspectos prácticos de la electroporación

C-1 Tamizado de la electroporación

Tras el pulso, la electroporación permite una difusión libre de moléculas pequeñas (hasta 4 kDa) sea cual sea su naturaleza química. Los compuestos polares atraviesan fácilmente la membrana. Pero la característica más importante es que esta organización de membrana es reversible, sin embargo, de larga duración en las células. Se observa difusión durante los segundos y minutos que siguen al pulso de milisegundos. La mayor parte del intercambio tuvo lugar después del pulso [10, 11]. El resellado de los defectos de la membrana y de la permeabilización inducida es un proceso de varios pasos de primer orden, que parece estar controlado por la reorganización de proteínas y orgánulos. Pero en cuanto a otros daños macroscópicos de la membrana plasmática, se ha demostrado que la electroporación causa que las vesículas internas (lisosomas) realicen exocitosis para reparar el daño de la membrana, un proceso mediado por calcio llamado exocitosis lisosómica. El resellado de membrana es, por lo tanto, un proceso celular.

C-2 Intercambio transmembrana asociado

La transferencia molecular de moléculas pequeñas (<4 kDa) a través del área permeabilizada se debe principalmente al gradiente de concentración a través de la membrana. Las fuerzas electroforéticas durante el pulso pueden contribuir [10]. La difusión impulsada por la concentración de moléculas polares de bajo peso después del pulso en la membrana electroporada puede describirse utilizando la ecuación de Fick [9].

Esto da la siguiente expresión para una molécula S dada y una célula con un radio r:

$$\phi(S, t) = 2\pi r^2 \cdot P_s \cdot \Delta S \cdot X(N, T) \left(1 - \frac{E_{p,r}}{E}\right) \exp(-k \cdot (N, T) \cdot t) \quad (4)$$

donde $\phi(S, t)$ es el flujo en el tiempo t después de los N pulsos de duración T (el retraso entre los pulsos es corto en comparación con t), P_s es el coeficiente de permeabilidad de S a través de la membrana permeabilizada y ΔS es la concentración diferencia de S a través de la membrana. X informa sobre la densidad de defectos de conducción en el campo afectado en la tapa de la superficie celular. Ep depende de r (tamaño). El retraso entre pulsos claramente está jugando un papel en la definición de X, pero esto aún debe ser investigado en detalle. La caracterización de la electropermeabilización depende claramente del transporte de S a través de P_s y de la sensibilidad de su detección. Para una célula dada, el tiempo de resellado (recíproco de k) es una función de la duración del pulso, pero no de la intensidad del campo como se verifica por videomicroscopía digitalizada [9]. Se observa un fuerte control por parte de la temperatura. La integridad del citoesqueleto debe preservarse [27]. El resellado de las membranas celulares es un proceso complejo controlado por el nivel de ATP. Las células hambrientas son frágiles. Una pregunta abierta es saber si se trata de un autosellado u otros componentes de la célula están involucrados. La fusión de orgánulos puede estar involucrada, como en el caso de la reparación de la membrana que ocurre después del daño inducido por láser. El resellado es complejo ya que la cancelación de la permeabilización se obtiene cuando se administran pulsos bipolares con un breve retraso entre impulsos [29,30].

C-3 Respuestas celulares

Cuando las células se someten a pulsos de campo eléctrico de corta duración, se observa una fuga de metabolitos del citoplasma que puede ocasionar pérdida de la viabilidad. Esto puede ocurrir justo después del pulso (muerte a corto plazo) o en un período mucho más largo cuando las células se han resellado (muerte a largo plazo) [27]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan en los loci permeabilizados, dependiendo de los parámetros del campo eléctrico [28]. Estas ROS pueden afectar la viabilidad. Este es un inconveniente importante para la transferencia de especies sensibles (ácidos nucleicos). Agregar antioxidantes es un enfoque seguro [31].

Cuando una célula se permeabiliza, puede producirse un edema osmótico, que conduce a una entrada de agua en la célula. Este aumento del volumen celular está controlado por la duración del pulso y, por supuesto, por el estrés osmótico [32].

Hay una pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana en los eritrocitos [33] debido al edema osmótico inducido que provoca la hemólisis.

El estrés mecánico está presente durante la entrega del pulso cuando hay campos altos por la aparición de ondas de choque [34], lo que da lugar a una respuesta biológica [35].

Conclusión

Todas las observaciones experimentales sobre la electropermeabilización celular están en conflicto con un modelo ingenuo en el que se propone que ella sea consecuencia de perforar agujeros en una bicapa lipídica (ver [36], una reciente revisión). Las modificaciones bioquímicas, como la oxidación de los lípidos, pueden estar presentes según lo sugerido por las ampollas de membrana formadas justo después del suministro del pulso [37, 38]. Los cambios estructurales en la organización de la membrana que fundamentan la permeabilización siguen estando mal caracterizados. Aparece nueva información proporcionada por simulaciones computarizadas de grano grueso. Sin embargo, es posible mediante una cuidadosa selección de los parámetros de pulso, que depende de células, introducir cualquier tipo de moléculas polares en una célula de mamífero preservando su viabilidad. Los procesos que apoyan la transferencia son muy diferentes para diferentes moléculas. La transferencia está mediada electroforéticamente durante el pulso y está presente principalmente después del pulso impulsado por la difusión de pequeñas moléculas cargadas (fármacos) [39, 9]. El ARNsi solo se transfiere por el arrastre electroforético presente durante el pulso [40]. Los plásmidos de ADN se acumulan en puntos en la superficie celular electropermeabilizada durante el pulso y se transportan lentamente en el citoplasma a lo largo de los microtúbulos mediante un proceso metabólico [41, 42].

La electropermeabilización de la membrana celular es un proceso complejo. Para mejorar nuestro conocimiento, hay que tener mucho cuidado en la descripción del protocolo experimental [43].

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del CNRS y de la región Midi Pyrénées. El estado del arte en electropermeabilización presentado aquí se debe principalmente al trabajo colectivo de científicos y estudiantes de mi antiguo grupo de "Biofísica celular" de Toulouse. Se agradecen las discusiones con muchos colegas. *Esta investigación fue realizada en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA) y en el marco de la Acción COST TD1104.*

Referencias

- [1] Potter, H., Application of electroporation in recombinant DNA technology, in Methods in Enzymology, vol. 217, I. Academic Press, Editor. 1993.
- [2] Orlowski, S. and L.M. Mir, Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1154(1): 51-63.
- [3] Teissié, J. and M.P. Rols, An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys J*, 1993. 65(1): 409-13.
- [4] Gross, D., L.M. Loew, and W.W. Webb, Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophys J*, 1986. 50: 339-48.
- [5] Lojewska, Z., et al., Analysis of the effect of medium and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields. *Biophys J*, 1989. 56(1): 121-8.
- [6] Hibino, M., et al., Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J*, 1991. 59(1): 209-20.
- [7] Pucihar, G., et al., Electropermeabilization of dense cell suspensions. *Biophys J*. 2007 36(3): 173-185
- [8] Teissié, J. and T.Y. Tsong, Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 1981. 20(6): 1548-54.
- [9] Rols, M.P. and J. Teissie, Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J*, 1990. 58(5): 1089-98.
- [10] Gabriel, B. and J. Teissie, Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys J*, 1997. 73(5): 2630-7.
- [11] Gabriel, B. and J. Teissie, Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophys J*, 1999. 76(4): 2158-65.
- [12] Valič B, Golzio M, Pavlin M, Schatz A, Faurie C, Gabriel B, Teissié J, Rols MP, Miklavčič D. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* **32**: 519-528, 2003
- [13] Kinoshita, K., Jr. and T.Y. Tsong, Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1979. 554(2): 479-97.
- [14] Sixou, S. and J. Teissie, Specific electropermeabilization of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1028(2): 154-60.
- [15] Winterhalter M and Helfrich W Deformation of spherical vesicles by electric fields *J. Colloid Interface Sci.* 1988. 122 583-6

- [16] Harbich W. and Helfrich W Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields *Z Naturforsch* 1991 34a, , 133-1335.
- [17] Stulen G. Electric field effects on lipid membrane structure. *Biochim Biophys Acta*. 1981 ; 640(3):621-7
- [18] Lopez A, Rols MP, Teissie J. ³¹P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporabilized Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. 1988 ;27(4):1222-8
- [19] Pillet F, Chopinet L, Formosa C, Dague E Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2014) 1028–1050
- [20] Chopinet L, Roduit C, Rols MP, Dague E Destabilization induced by electroporabilization analyzed by atomic force microscopy *Biochimica et Biophysica Acta* 2013 1828 2223–2229
- [21] Zalvidea D, Claverol-Tintur'e E Second Harmonic Generation for time-resolved monitoring of membrane pore dynamics subserving electroporation of neurons *Biomedical Optics Express* 2011 / Vol. 2, No. 2 / 305-314
- [22] Moen, EK, Ibey, BL, Beier HT Detecting Subtle Plasma Membrane Perturbation in Living Cells Using Second Harmonic Generation Imaging *Biophysical Journal* 2014 106 L37–L40
- [23] Azan A, Untereiner V, Gobinet C, Sockalingum GD, Breton M, Piot O, Mir LM. Demonstration of the Protein Involvement in Cell Electroporabilization using Confocal Raman Microspectroscopy. *Sci Rep*. 2017 ;7:40448. doi: 10.1038/srep40448.
- [24] Azan A, Untereiner V, Descamps L, Merla C, Gobinet C, Breton M, Piot O, Mir LM. Comprehensive Characterization of the Interaction between Pulsed Electric Fields and Live Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Anal Chem*. 2017 ;89(20):10790-10797. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02079.
- [25] Azan A, Scherman M, Silve A, Breton M, Leray I, Dorval N, Attal-Trétout B, Mir LM Interfacial water probing by CARS spectroscopy on biological samples exposed to intense pulsed electric fields 2015 URSI AT-RASC Conference, ISBN: 9789090086286
- [26] Gabriel, B. and J. Teissie, Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporabilization of Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1266(2): 171-8.
- [27] Teissié, J. and M.P. Rols, Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporabilization. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 720: 98-110.
- [28] Gabriel, B. and J. Teissie, Generation of reactive-oxygen species induced by electroporabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *Eur J Biochem*, 1994. 223(1): 25-33.
- [29] Ibey BL, Ullery JC, Pakhomova ON, Roth CC, Semenov I, Beier HT, Tarango M, Xiao S, Schoenbach KH, Pakhomov AG, Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporabilization and killing cells than monopolar pulses, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014 443 568–573.
- [30] Schoenbach KH, Pakhomov AG, Semenov I, Xiao S, Pakhomova ON, Ibey BL, Ion transport into cells exposed to monopolar and bipolar nanosecond pulses, *Bioelectrochemistry* 2015 103 44–51.
- [31] Markelc B, Tevz G, Cemazar M, Kranjc S, Lavrencak J, Zegura B, Teissie J, Sersa G. Muscle gene electrotransfer is increased by the antioxidant tempol in mice. *Gene Ther*. 2011. doi: 10.1038

- [32] Golzio, M., et al., Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 1998. 74(6): 3015-22.
- [33] Haest, C.W., D. Kamp, and B. Deuticke, Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1325(1): 17-33.
- [34] Barnes RA, Roth CC, Beier HT, Noojin G, Valdez C, Bixler J, Moen E, Shadaram M, Ibey BL. Probe beam deflection optical imaging of thermal and mechanical phenomena resulting from nanosecond electric pulse (nsEP) exposure in-vitro. *Opt Express*. 2017;25(6):6621-6643. doi: 10.1364/OE.25.006621.
- [35] Roth CC, Glickman RD, Martens SL, Echchgadda I, Beier HT, Barnes RA Jr, Ibey BL. Adult human dermal fibroblasts exposed to nanosecond electrical pulses exhibit genetic biomarkers of mechanical stress. *Biochem Biophys* 2017;9:302-309. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.01.007
- [36] Teissie J, Golzio M, Rols MP Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim Biophys Acta*, 2005 .1724(3): 270-80
- [37] Gass GV, Chernomordik LV Reversible large-scale deformations in the membranes of electrically-treated cells: electroinduced bleb formation. *Biochim Biophys Acta*. 1990 1023(1):1-11
- [38] Escande-Géraud ML, Rols MP, Dupont MA, Gas N, Teissie J. Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electropermeabilization in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*. 1988 939(2):247-59
- [39] Pucihar G, Kotnik T, Miklavcic D, Teissie J. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells *Biophys J*. 2008; **95**(6) :2837-48
- [40] Paganin-Gioanni A, Bellard E, Escoffre JM, Rols MP, Teissie J, Golzio M. Direct visualization at the single-cell level of ARNsi electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(26): 10443-7.
- [41] Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissie J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*. 1994; **66**(2):524-31.
- [42] Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**(3): 1292-7.
- [43] Cemazar M, Sersa G, Frey W, Miklavcic D, Teissie J Recommendations and requirements for reporting on applications of electric pulse delivery for electroporation of biological samples. *Bioelectrochemistry*. 2018; 122:69-76. doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.03.005.

APÉNDICE - Transporte transmembrana

Introducción

El transporte de membrana cumple con los principios termodinámicos básicos. Un principio general de la termodinámica que gobierna la transferencia de sustancias a través de membranas y otras superficies es que

el intercambio de energía libre, ΔG , para el transporte de una sustancia de concentración C_1 a otro compartimento donde está presente en C_2 es:

$$\Delta G = RT \log \frac{C_2}{C_1}$$

(T, temperatura; R, constante de los gases, es decir, 8.3145 J / mol·K.)

Cuando C_2 es menor que C_1 , ΔG es negativo y el proceso es termodinámicamente favorable. A medida que la energía se transfiere de un compartimento a otro, se alcanzará un equilibrio donde $C_2 = C_1$ ($\Delta G = 0$). Sin embargo, hay circunstancias, relevantes para el funcionamiento in vivo de las membranas biológicas, bajo las cuales no se alcanzará este equilibrio. Puede existir un potencial eléctrico de membrana que puede influir en la distribución de iones. Por ejemplo, para el transporte de iones desde el exterior al interior de una célula,

$$\Delta G = RT \log \frac{C_{interior}}{C_{exterior}} + ZF\Delta P \quad (1)$$

Donde F es la constante de Faraday, Z es la carga del ion y ΔP el potencial transmembrana. Si ΔP es negativo y Z es positivo, la contribución del término $ZF\Delta P$ a ΔG será negativa, es decir, favorecerá el transporte de cationes fuera de la célula. Entonces, si se mantiene la diferencia de potencial, el estado de equilibrio $\Delta G = 0$ no corresponderá a una concentración equimolar de iones en ambos lados de la membrana.

Difusión pasiva

La difusión simple y la ósmosis son de alguna manera similares. La difusión simple es el movimiento pasivo del soluto desde una concentración alta a una concentración más baja hasta que la concentración del soluto es uniforme y alcanza el equilibrio. La ósmosis es muy similar a la difusión simple, pero describe específicamente el movimiento del agua (no el soluto) a través de una membrana permeable hasta que haya una concentración igual de soluto en ambos lados de la membrana. La difusión simple y la ósmosis son dos formas de transporte pasivo

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (2)$$

Deriva electroforética

Cuando un campo eléctrico externo E está presente, tiene una acción sobre las moléculas en el buffer. Si la molécula está cargada (ácidos

nucleicos, iones, colorantes), en un campo eléctrico migrará al electrodo de carga opuesta.

Considere el caso simple de una partícula cargada (+ Q) que se mueve en un campo eléctrico (E) en un medio pobremente conductor, como el agua. Si la partícula se mueve a una velocidad constante hacia el cátodo (electrodo), la fuerza neta F_{tot} sobre la partícula es 0 (ya que $F = ma$, y la aceleración (a) de la partícula es 0 a velocidad constante). Se ejercen dos fuerzas sobre la partícula, la fuerza ejercida sobre la partícula cargada por el campo F_e , que está en la dirección del movimiento (hacia el cátodo), y la fuerza de rozamiento sobre la partícula cargada, F_f , que retrasa su movimiento hacia el cátodo.

Por lo tanto:

$$F_{tot} = F_e + F_f = 0, \quad (3)$$

donde $F_e = QE$ (la fuerza eléctrica) y $F_f = -fv$ (la fuerza de rozamiento), donde v es la velocidad de la partícula, y f es una constante llamada coeficiente de rozamiento. La última ecuación muestra que la fuerza F_f que obstaculiza el movimiento hacia el cátodo es proporcional a la velocidad de la partícula (Nota: en el caso de partículas cargadas negativamente, como los ácidos nucleicos, las direcciones de las fuerzas se invierten y la dirección del movimiento también)

El coeficiente de rozamiento depende del tamaño y la forma de la molécula. Cuanto mayor es la molécula, mayor es el coeficiente de rozamiento (es decir, más resistencia al movimiento de la molécula). El coeficiente de rozamiento para una partícula esférica viene dado por

$$f = 6\pi\eta R_s \quad (4)$$

donde η es la viscosidad y R_s (radio de Stokes) es el radio de la esfera hidratada.

De (1), (2), y (3), $F_e = F_f$, or

$$QE = fv \quad (5)$$

Por lo tanto, $v/E = Q/f = U$ = movilidad electroforética, o

$$U = \frac{v}{E} = \frac{Q}{2\pi\eta R_s} \quad (6)$$

Los iones contrarios en la solución (de las sales) forman una nube alrededor de la macromolécula cargada y blindan parcialmente la partícula cargada del campo eléctrico E .

Cuando el campo se entrega a través de una membrana "porosa", el rozamiento es crítico. "Poroso" significa que están presentes defectos

estructurales transitorios. Las moléculas más pequeñas pueden pasar a través de los defectos de la membrana más fácilmente que las moléculas más grandes, por lo que existe un mecanismo de tamizado adicional que contribuye al transporte efectivo

Nota: la nomenclatura de electrodos puede ser confusa para algunos de ustedes. Como se mencionó anteriormente, los cationes se mueven hacia el cátodo (donde ocurre la reducción), por lo que el cátodo debe ser negativo. Del mismo modo, el anión se mueve hacia el ánodo (donde se produce la oxidación), por lo que el ánodo debe ser positivo.

Difusión facilitada

La difusión facilitada, también llamada ósmosis mediada por transportadores, es el movimiento de moléculas a través de la membrana celular a través de proteínas de transporte especiales que están incrustadas dentro de la membrana celular. Las moléculas grandes e insolubles, como la glucosa, las vesículas y las proteínas requieren una molécula transportadora para moverse a través de la membrana plasmática. La difusión facilitada es un proceso pasivo: los solutos se mueven por su gradiente de concentración y no requieren el gasto de energía celular.

Transporte activo y co-transporte

En el transporte activo, un soluto se mueve contra una concentración o gradiente electroquímico mediante proteínas de transporte que consumen energía metabólica, generalmente ATP. En el transporte activo primario, la hidrólisis del proveedor de energía (por ejemplo, ATP) se lleva a cabo directamente para transportar el soluto en cuestión (enzima ATPasa). En el transporte activo secundario (co-transporte), el proveedor de energía actúa indirectamente; la energía se almacena en un gradiente electroquímico para transportar un compuesto objetivo contra su gradiente.

El transporte activo primario está mediado por la formación de un complejo sustrato-transportador; por lo tanto, cada proteína de transporte tiene una constante de afinidad por un soluto. En el caso de una enzima esto es equivalente a la constante de Michaelis-Menten.

$$J = \frac{J_{max}S}{K_m + S} \quad (7)$$

Algunas características importantes del transporte activo, además de su capacidad de intervenir incluso contra un gradiente, su cinética y el uso de ATP, son su alta selectividad.

Bombas

Una bomba es una proteína que hidroliza el ATP para transportar un soluto particular a través de una membrana y, al hacerlo, genera un potencial de membrana con gradiente electroquímico. Este gradiente es de interés como indicador del estado de la célula a través de parámetros como el potencial de Nernst

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion afuera de la célula}]}{[\text{ion adentro de la célula}]} \quad (8)$$

Con el bombeo activo, la ecuación de Goldman da el potencial de reposo

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{afuera} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{adentro}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{adentro} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{afuera}} \right) \quad (9)$$

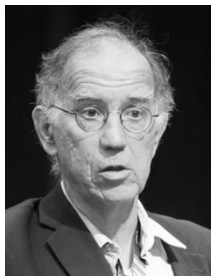
E_m es el potencial transmembrana P_{ion} es la permeabilidad para ese ion, $[ion]_{afuera}$ es la concentración extracelular de ese ion, $[ion]_{adentro}$ es la concentración intracelular de ese ion.

Transporte por vesículas

Las vesículas especializadas median el transporte mediante interacciones complejas con la membrana. Su carga intravesicular se entrega al otro lado de la membrana. Esto se llama transcitosis (endo y exocitosis). El proceso es activo, lo que significa que requiere energía y la acción de la maquinaria celular.

Lecturas y videos sugeridos

- <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/cells/transport-across-a-cell-membrane/a/passive-transport-and-active-transport-across-a-cell-membrane-article>
- <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/vesiclebudding.html>
- http://www.like2do.com/learn?s=Membrane_vesicle_trafficking
- Popescu I. Aurel, Biophysics. Current Status and Future Trends, Publishing House of the Romanian Academy, 2016



Justin Teissié nació el 24 de marzo de 1947 en Poitiers, Francia. Obtuvo el título de Físico en la Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de Paris (ESPCI) en 1970. Obtuvo el doctorado en Química Macromolecular con un proyecto sobre detección de fluorescencia del potencial de acción bajo la dirección del Prof. Monnerie (ESPCI) y Changeux (Institut Pasteur) en 1973. Obtuvo un DSC en Biofísica con un proyecto sobre la caracterización de fluorescencia de las películas de Langmuir Blodgett en Toulouse en 1979. Fue post doctorado en la Facultad de

Medicina de la Universidad John Hopkins en Baltimore entre 1979 y 1981. Cargo actual: Directeur de recherches au CNRS emérito. Autor de más de 250 artículos científicos.

Capítulo 4

Electrotransferencia de ácidos nucleicos *in vitro*

Marie-Pierre Rols

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, Francia

Resumen: Las membranas celulares pueden permeabilizarse transitoriamente mediante la aplicación de pulsos eléctricos. Este proceso, llamado electropermeabilización o electroporación, permite que las moléculas hidrofílicas, tales como fármacos contra el cáncer y ácidos nucleicos, ingresen a las células y tejidos específicos. El conocimiento de los procesos involucrados en la permeabilización de la membrana y en la transferencia de genes es obligatorio para que este método prometedor se use de manera eficiente y segura. Por lo tanto, se debe abordar el comportamiento de las membranas y las células mientras el campo eléctrico está presente y después de su aplicación. La descripción de los mecanismos completos se beneficia de los estudios realizados en diferentes modelos biológicos (vesículas lipídicas, células en cultivo 2D y 3D) y de diferentes herramientas de microscopía que permiten visualizar los procesos. Los experimentos de imágenes de células individuales revelaron que la absorción de moléculas (fármacos antitumorales, ácidos nucleicos) tiene lugar en regiones de membrana bien definidas y depende de sus propiedades químicas y físicas (tamaño, carga). Las moléculas pequeñas pueden atravesar libremente la membrana electropermeabilizada y tener acceso libre al citoplasma. Las moléculas más pesadas, tales como ADN plasmídico, enfrentan barreras físicas (membrana plasmática, acumulación en el citoplasma, envoltura nuclear) que generan un mecanismo complejo de transferencia. La electrotransferencia génica ciertamente implica diferentes pasos, que ocurren en escalas de tiempo relativamente grandes. Como se presentará, estos pasos incluyen la interacción inicial con la membrana electropermeabilizada, el cruce de la membrana, el transporte dentro de la célula hacia los núcleos y finalmente la expresión génica.

Introducción

La terapia génica es una opción de tratamiento para una serie de enfermedades como son los trastornos hereditarios y el cáncer. A pesar del hecho de que se han desarrollado muchos métodos de vectorización durante las últimas décadas, la técnica aún debe mejorarse para que sea eficiente y segura (1). Entre los diferentes enfoques, la electroporación aparece como la más prometedora. Este método físico se puede usar de manera eficiente para la entrega dirigida de moléculas en una amplia gama de células y tejidos (2). La electroporación es hoy en día una técnica bien conocida de transfección celular utilizada en los laboratorios. La terapia génica para vacunación y en oncología son los principales campos de aplicación de la electrotransferencia de ADN en la clínica (3, 4). La traslación de los estudios preclínicos a ensayos clínicos comenzó hace 10 años. El primer ensayo clínico de electroporación de plásmidos realizado en pacientes con melanoma metastásico ha mostrado resultados esperanzadores (5). El método también se ha utilizado con éxito para el tratamiento de animales de compañía. Sin embargo, a pesar de que el trabajo pionero sobre el electrotransferencia de ADN plasmídico en células se inició hace más de 30 años (6), muchos de los mecanismos subyacentes a la electropermeabilización de la membrana y el electrotransferencia de ADN aún no se han dilucidado. Incluso si la electrotransferencia *in vitro* es eficiente en casi todas las líneas celulares, la administración y expresión de genes *in vivo* en tumores puede no ser tan eficiente como en la vectorización viral. Por lo tanto, es obligatorio, para aumentar la transferencia y expresión génica mientras se preserva la seguridad, aumentar el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes. Este capítulo tiene como objetivo describir los aspectos básicos de la electropermeabilización de la membrana y la transferencia de genes a las células y, al hacerlo, dar algunos consejos para realizar experimentos y optimizar los protocolos.

Electropermeabilización de la membrana

Las bases

Las células tienen un potencial transmembrana en reposo que es uniforme en toda su membrana plasmática. La exposición de las células vivas a pulsos eléctricos cortos e intensos induce cambios, dependientes de la localización, de este potencial transmembrana. Al depender del ángulo formado entre la dirección del campo eléctrico y la normal a la membrana,

los efectos del campo eléctrico no son uniformes a lo largo de la membrana. Los efectos máximos están presentes en los polos de las células frente a los electrodos cuando el potencial transmembrana resultante alcanza un valor umbral. Por encima de este umbral, se produce la permeabilización de la membrana celular. La electroporación de la membrana plasmática es un requisito previo para la electrotransferencia génica, ya que los ácidos nucleicos están altamente cargados y son moléculas grandes que no pueden ingresar a las células.

La forma de realizar un experimento

La electroporación se puede realizar de diferentes maneras dependiendo de la forma en que se cultivan las células. Para las células cultivadas en placa de Petri, el medio de cultivo se puede eliminar y reemplazar por un búfer isoosmótico de bajo contenido iónico. Este búfer para administrar los pulsos permite limitar el efecto Joule y, por lo tanto, ayuda a preservar la viabilidad celular. La composición de este medio es generalmente un búfer fosfato 10 mM, sacarosa 250 mM y $MgCl_2$ 1 mM. Desde un punto de vista práctico, el fondo de la placa de Petri puede servir como una cámara de electropulsación. Para las células en suspensión, las células resuspendidas en el búfer para electropulsación, se colocan en cubetas compradas o en cámaras "caseras" que se pueden obtener fácilmente colocando los electrodos en el fondo de la placa de Petri (ver Figura 1). Los pulsos eléctricos se entregan a través de un conjunto de electrodos conectados al generador de pulsos. En la mayoría de los experimentos, se utilizan generadores de pulsos eléctricos de onda cuadrada. A diferencia de los generadores de caída exponencial, estos permiten el control independiente de la amplitud de los pulsos de campo eléctrico E y su duración T . Esto es importante para las células de mamíferos que no tienen pared celular y, por lo tanto, se ven más afectadas por los pulsos eléctricos que las bacterias y las levaduras. Los parámetros del pulso eléctrico deben seleccionarse teniendo en cuenta las características de las células, en particular su tamaño. Un paso clave para garantizar aún más la electrotransferencia y expresión de ADN es determinar las mejores condiciones eléctricas que permitan tanto la permeabilización de la membrana plasmática como la preservación de la viabilidad celular.

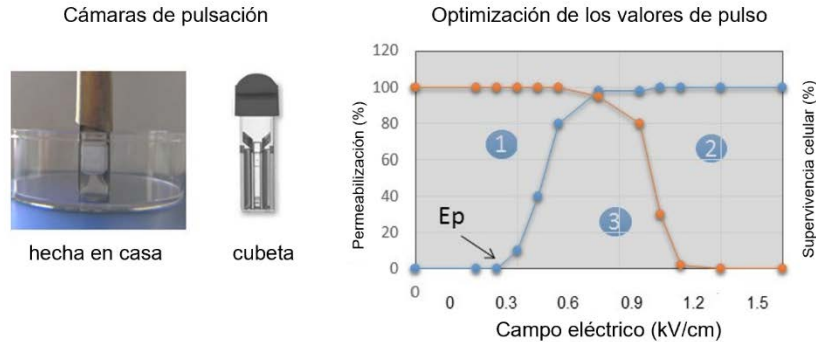


Fig. 1 Consejos para sus experimentos. Las células se pulsan en placa de Petri o en cubetas. Las células permeabilizadas y viables se trazan en un gráfico para definir las condiciones óptimas ((1) $E < E_p$ o justo por encima, mala permeabilización; (2) $E \gg E_p$, pérdida de viabilidad; (3) mejores valores).

El uso de la vídeo microscopía permite la visualización del fenómeno de permeabilización a nivel de células individuales. Los indicadores fluorescentes de permeabilización de la membrana, como el yoduro de propidio (PI), son muy convenientes para detectar la electrotransferencia de moléculas al citoplasma. Simplemente se puede agregar a las células antes de la aplicación de los pulsos eléctricos. La absorción del tinte fluorescente en las células es la indicación de la electropermeabilización de la membrana. Cualquiera que sea el valor de la duración de los pulsos T , la permeabilización solo aparece por encima de un valor umbral de intensidad de pulso E , llamado E_p . Por lo tanto, el primer experimento que se realiza consiste en someter las células a valores crecientes de E y determinar la eficiencia de la permeabilización (es decir, el porcentaje de células que han sido electropermeabilizadas, células cuyos núcleos se vuelven fluorescentes). Para $E < E_p$, que en el ejemplo de la Figura 1 es igual a 0,3 kV/cm, no se produce permeabilización. Por encima de E , el aumento de E conduce a la permeabilización progresiva de toda la población celular, que se obtiene a 0,8 kV/cm. Entonces, el siguiente paso es la determinación de la viabilidad celular. Para valores de campo superiores a 0,9 kV/cm, la viabilidad se ve afectada. Una vez obtenido, este tipo de resultados permite definir fácilmente las mejores condiciones para la permeabilización de la membrana y también para la electrotransferencia génica. En el ejemplo que se muestra en la Figura 1, los valores del campo eléctrico que se pueden usar varían de 0,6 a 1,0 kV/cm.

Cinética de la permeabilización de la membrana

La electroporación de las células es un proceso rápido que se puede detectar inmediatamente después de la aplicación de pulsos eléctricos. Por lo general, el transporte a través de la membrana no es homogéneo en toda la membrana celular. Ocurre en los lados de las células que miran a los electrodos, de forma asimétrica, es más pronunciado del lado de la célula que mira hacia el ánodo que hacia el cátodo (Figura 2), es decir, más en el área hiperpolarizada que en el área despolarizada, lo que está de acuerdo con las consideraciones teóricas y experimentales como se explica en otros capítulos. La electroporación se puede describir como un proceso de 3 pasos con respecto al campo eléctrico: (i) antes de la electropulsación, la membrana plasmática actúa como una barrera física que impide el intercambio libre de moléculas hidrofílicas entre el citoplasma celular y el medio externo; (ii) durante la electropulsación, cuando los parámetros de los pulsos se han definido correctamente, $E > E_p$, la formación de estructuras transitorias permeables frente a los electrodos permite el intercambio de moléculas; se observa que el yoduro de propidio accede rápidamente al interior de la célula en la región que está frente a los electrodos, principalmente en el sitio que mira al ánodo; (iii) después de la electropulsación, la membrana puede permanecer permeable antes de que ocurra el resellado (7). La duración de la permeabilización se puede analizar agregando los colorantes fluorescentes en varios momentos después de los pulsos. Si la membrana celular aún es permeable, entonces la célula se tornará fluorescente. El resellado varía desde unos pocos segundos (cuando las células se colocan a 37 ° C justo después de la pulsación) hasta varias horas (cuando las células se mantienen en hielo) según las condiciones experimentales (parámetros de temperatura y pulso). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la viabilidad puede verse afectada ya que se producirá la liberación de ATP. Por lo tanto, es mejor evitar mantener las células a baja temperatura después del suministro de pulso.

Cualesquiera que sean las moléculas utilizadas para detectar la permeabilización (si son lo suficientemente pequeñas y cargadas), se observa una transferencia directa al citoplasma celular. Cuando se agregan después de la electropulsación, las moléculas aún pueden penetrar en las células, pero de manera menos eficiente porque el campo eléctrico actúa tanto en la permeabilización de la membrana como en la migración electroforética de las moléculas cargadas desde el exterior hacia el citoplasma. El mecanismo de electrotransferencia involucrado es de hecho específico para las propiedades fisicoquímicas de la molécula (8).

El progreso en el conocimiento de los mecanismos involucrados, en particular en el esclarecimiento de las estructuras de membranas responsables de la transferencia de moléculas, sigue siendo un desafío biofísico. Se ha propuesto que se crean poros hidrofílicos, y se ha

confirmado a través del modelado mediante dinámica molecular. Pero su existencia en células permeabilizadas aún no se ha demostrado. Se ha observado que la mezcla de fosfolípidos y los cambios en la movilidad lateral de las proteínas sugieren que parte de la superficie de la membrana está ocupada por defectos o poros y que estas estructuras se propagan rápidamente sobre la superficie celular (9). También se puede aprovechar la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) para visualizar directamente las consecuencias de la electroporación y medir localmente la elasticidad de la membrana. Los resultados obtenidos tanto en células CHO fijas como vivas dan evidencia de un efecto interno que afecta a toda la superficie celular que puede estar relacionado con la desestabilización del citoesqueleto. Por lo tanto, la AFM aparece como una herramienta útil para investigar el proceso básico de electroporación en células vivas en ausencia de cualquier tinción (10, 11).

Captación de PI

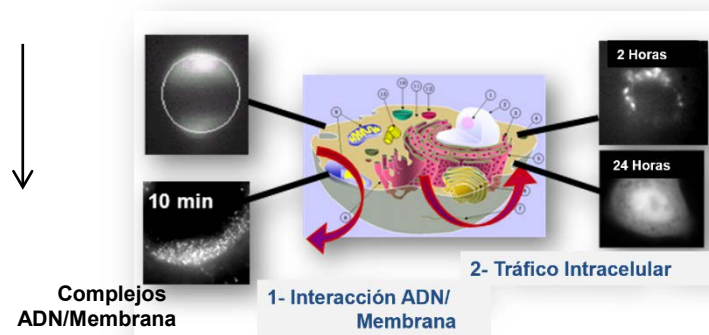


Figura 2: Mecanismos de electrotransferencia de moléculas. Izquierda: durante la aplicación de impulsos eléctricos: la membrana plasmática se electroporabiliza frente a los 2 electrodos (captación de PI). Se forman agregados de ADN. Esta interacción tiene lugar solo en la membrana que mira al cátodo. Derecha: Aproximadamente 2 h después de la aplicación de impulsos eléctricos, las moléculas de ADN están presentes alrededor del núcleo. Finalmente, la expresión de eGFP se detecta durante horas. La flecha indica la dirección del campo eléctrico.

El hecho de que toda la superficie celular se vea afectada no es tan obvio ya que la permeabilización solo se induce en regiones específicas de las células. Por lo tanto, incluso si los mecanismos completos de electroporación de la membrana (o electroporación) no se entienden completamente, y la existencia de las estructuras exactas

responsables de la absorción de moléculas aún es un debate, este método físico de vectorización se ha convertido en uno de los más eficientes para la transfección de genes.

Mecanismos de electrotransferencia de moléculas de ADN a las células

Lo que se sabe sobre el proceso

El primer experimento de transferencia génica mediado por electroporación se publicó hace más de 30 años (6). La traslación a la clínica se benefició de un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en la electrotransferencia de ácidos nucleicos de las últimas 3 décadas. En cuanto a la electroporación, los estudios unicelulares ayudaron a describir el proceso de electrotransferencia de ADN.

Además de la permeabilización de la membrana, la electrotransferencia de ADN depende de la electroforesis de ADN. El oligonucleótido debe estar presente durante el pulso para luego ser transferido al citoplasma. La movilidad electroforética del ADN no depende de su número de pares de bases. Se pueden utilizar pulsos cortos con alta intensidad de campo, pero son menos efectivos que los pulsos largos con menor intensidad de campo. Por lo tanto, los parámetros de los pulsos deben determinarse para hacer que la membrana sea permeable ($E > E_p$) mientras se preserva la mayor viabilidad celular posible (por encima del 30-50%). Los genes reporteros son útiles para optimizar el protocolo. En cuanto a la electroporación, se pueden utilizar microscopía unicelular y plásmidos fluorescentes para visualizar y determinar los diferentes pasos de la electrotransfección. Los plásmidos pueden marcarse con colorantes fluorescentes para permitir la visualización de su electrotransferencia. Las moléculas de ADN, que están cargadas negativamente, migran electroforéticamente cuando se someten al campo eléctrico. Bajo campos eléctricos que son demasiado pequeños para permeabilizar la membrana ($E < E_p$), el ADN simplemente fluye alrededor de la membrana en dirección al ánodo. Más allá del valor de campo crítico, por encima del cual se produce la permeabilización celular ($E > E_p$), el ADN interactúa con la membrana plasmática.

Interacción ADN / membrana

La interacción solo ocurre en el polo de la célula opuesta al cátodo y esto demuestra la importancia de las fuerzas electroforéticas en la fase inicial de la interacción ADN / membrana. Cuando se produce la interacción ADN-membrana, se observa la formación de "microdominios" cuyas dimensiones se encuentran entre 0.1 y 0.5 μm (Figura 2). También se ven grupos o agregados de ADN que crecen durante la aplicación del campo. Sin embargo, una vez que se corta el campo, el crecimiento de estos grupos se detiene. La electrotransferencia de ADN puede describirse como un proceso de varios pasos: el ADN cargado negativamente migra electroforéticamente hacia la membrana plasmática en el lado del cátodo donde se acumula. Esta interacción, que se observa durante varios minutos, dura mucho más que la duración del pulso del campo eléctrico. La translocación del plásmido desde la membrana plasmática al citoplasma y su posterior paso hacia la envoltura nuclear tiene lugar con una cinética que varía de minutos a horas.

Dinámica del proceso

La interacción ADN / membrana y, como consecuencia directa, la expresión génica, dependen de la polaridad del pulso eléctrico, la frecuencia de repetición y la duración. Ambos se ven afectados al invertir la polaridad y al aumentar la frecuencia de repetición o la duración de los pulsos. Estas observaciones revelaron la existencia de 2 clases de interacción de ADN / membrana: (i) un complejo de ADN / membrana metaestable del cual el ADN puede salir y regresar al medio externo y (ii) un complejo estable de ADN / membrana, donde el ADN no puede eliminarse, incluso aplicando pulsos eléctricos de polaridad invertida. Solo el ADN perteneciente a la segunda clase conduce a una expresión génica efectiva (12). La dinámica de la formación de membranas / complejos se ha entendido mal porque las observaciones directas se han limitado a escalas de tiempo que exceden el lapso de varios segundos. Sin embargo, la medición experimental del transporte de ADN plasmídico y de yoduro de propidio con una resolución temporal de 2 ms se ha realizado gracias a una cámara sensible y de alta velocidad y ha permitido la visualización del proceso de interacción ADN / membrana durante la aplicación del pulso (13). Los complejos de plásmidos, o agregados, comienzan a formarse en sitios distintos en la membrana celular durante el primer pulso. El aumento de la cantidad de pulsos no conduce a la creación de nuevos sitios, sino al aumento en la cantidad de ADN. La formación de complejos de plásmidos en sitios fijos sugirió que los dominios de membrana pueden ser responsables de la captación de ADN y de su falta de movilidad (como se observa directamente

bajo el microscopio o cuantificado por las mediciones de Fluorescencia de retorno después del blanqueamiento fotográfico (FRAP)) podría deberse a su interacción con el citoesqueleto de actina. Como se describirá más adelante en este capítulo, varias publicaciones informaron evidencia de la participación del citoesqueleto (14, 15). La dinámica de todo el proceso se reporta en la Tabla 1. Si la administración del pulso se produce en una escala de tiempo relativamente corta (μ s a ms), el tráfico posterior de ADN plasmídico se produce durante los minutos y horas posteriores a la administración del pulso.

Tabla 1. Cinética de los diferentes pasos involucrados en la entrega de genes.

Escala de tiempo	Pasos involucrados en la transferencia electromediada de ADN	Referencias
μ s	La membrana plasmática que está frente a los electrodos es permeabilizada	(7)
ms	Migración electroforética del ADN hacia la membrana	(7, 13)
s	Formación del complejo ADN/membrana	(12)
min	Conversión de la forma metastable del complejo ADN/membrana a la forma estable	(13)
hora	Translocación/difusión del ADN a través de la membrana	(14, 15)
día	Transporte del ADN hacia el núcleo a través del citoesqueleto	(16)

Transferencia del ADN a través del citoplasma

El proceso de transferencia de los plásmidos a través del citoplasma celular hacia la envoltura nuclear es un proceso complejo (17). Teóricamente, los micro agregados de ADN o las vesículas llenas de ADN podrían ser demasiado grandes para pasar a través de los poros formados por la electroporación. Sin embargo, las moléculas de ADN individuales, si bien pueden pasar a través de los electroporos, tienen una movilidad limitada dentro de la célula y pueden degradarse totalmente antes de llegar al núcleo. Es posible y vale la pena investigar la posibilidad de que el citoesqueleto de actina reaccione a la presencia de agregados de ADN y juegue un papel importante en el transporte intracelular posterior. Parece razonable que solo los agregados más allá de cierto tamaño (unos pocos cientos de nanómetros) puedan inducir una respuesta celular biológica y puedan ser transportados por la célula. Además, el hecho de que el ADN esté en forma agregada significa que el ADN en el centro está relativamente protegido de la degradación. Por lo tanto, para su uso en terapia génica, es óptimo que el ADN ingrese a la célula como moléculas individuales. Sin embargo, como el transporte posterior hacia el núcleo es mediado por efectos biológicos (posiblemente induciendo una respuesta del citoesqueleto de actina) y físicos (disminución de la degradación enzimática), resulta óptimo si el ADN está en una forma micro agregada.

Incluso si se comprende la primera etapa de la electrotransfección génica, es decir, la migración del ADN plasmídico hacia la membrana plasmática electroporabilizada y su interacción con ella, las pautas para mejorar la electrotransferencia génica no solo resultan de la forma en que se seleccionaron los parámetros de los pulsos. La expresión del ADNp está controlada por la viabilidad de la población pulsada y la expresión exitosa del plásmido depende de su migración posterior en la célula. Por lo tanto, las propiedades de difusión intracelular del ADN plasmídico, así como su inestabilidad metabólica y translocación nuclear, representan factores limitantes que deben tenerse en cuenta. El citoplasma está compuesto por una red de sistemas de microfilamentos y microtúbulos, junto con una variedad de orgánulos subcelulares presentes en el citosol. La estructura en forma de malla del citoesqueleto, la presencia de orgánulos y la alta concentración de proteínas provoca una acumulación sustancial de moléculas en el citoplasma, lo que dificulta la difusión del ADN plasmídico. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían conciliarse con la posibilidad de un desmontaje de la red del citoesqueleto que puede ocurrir durante la electroporabilización, y es compatible con la idea de que el citoplasma constituye una importante barrera de difusión para la transferencia de genes. En las condiciones inducidas durante la

electropermeabilización, el tiempo que tarda un ADN plasmídico en alcanzar los núcleos es significativamente mayor que el tiempo necesario para una molécula pequeña (horas en comparación con minutos). Por lo tanto, el ADN plasmídico presente en el citosol después de ser electrotransferido puede perderse antes de llegar al núcleo, por ejemplo, debido a la división celular. Finalmente, después del citoesqueleto, la envoltura nuclear representará el último, pero no menos importante obstáculo para la expresión del ADN plasmídico.

Pasaje a través de la envoltura nuclear y expresión génica

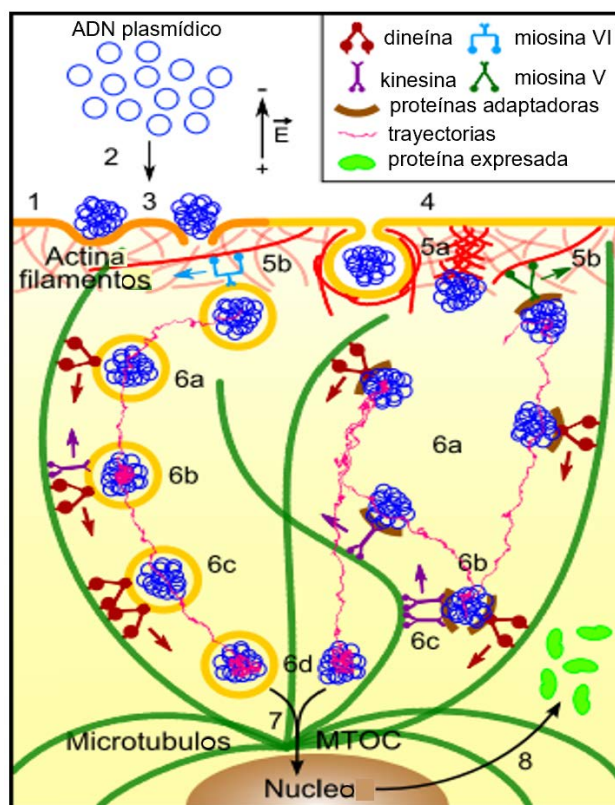


Figura 3: Representación esquemática del mecanismo de electrotransferencia de ADN. Durante los pulsos eléctricos, (1) la membrana plasmática se permeabiliza, (2) el ADN es empujado electroforéticamente sobre la membrana celular, lo que da como resultado (3) interacciones ADN-membrana. Después de volverse a sellar la membrana, (4) el ADN se internaliza por endocitosis y otros métodos donde la

actina puede la forma de ráfagas de polimerización. (5) Mientras se transportan activamente en el citoplasma por las redes de actina y tubulina, los agregados de ADN pasan a través de los compartimentos endosómicos. El ADN libre interactúa con la proteína adaptadora para ser transportado por las proteínas motoras. Para que se produzca la expresión génica, (6) el ADN tiene que escapar de los compartimentos endosómicos. Una vez en la región perinuclear, (7) el ADN cruza la envoltura nuclear para ser expresado y (8) produce las proteínas que luego son liberadas.

Un transporte alto no siempre resulta en un alto nivel de expresión. El tamaño relativamente grande del ADN plasmídico hace que sea poco probable que la entrada al núcleo ocurra por difusión pasiva. Los experimentos de rastreo de partículas individuales de agregados de ADN en células vivas mostraron cómo se transporta el ADN electrotransferido en el citoplasma hacia el núcleo. Se han analizado los modos de movimiento de los agregados de ADN en las células CHO. El transporte activo rápido de los agregados de ADN ocurre por distancias largas. Los experimentos de seguimiento en células tratadas con diferentes fármacos que afectan tanto a la red de actina como a la de tubulina demuestran claramente que el transporte está relacionado con la red de microtúbulos celulares (Figura 3, (16)).

Transporte activo de agregados de ADN

Varios estudios apuntan hacia la contribución de la endocitosis en la electrotransferencia de ADN, pero se deben realizar más investigaciones para comprender qué tipo/s, de endocitosis estaría involucrado. Es necesario comprender también cómo los campos eléctricos podrían estimular tales procesos. También debe destacarse que cualquier modelo de endocitosis solo explicaría la internalización de moléculas grandes, puesto que esta que no ayuda en el cruce libre de la membrana de moléculas pequeñas. Por lo tanto, debe considerarse que ocurre en paralelo con otro modelo válido para el intercambio transmembrana de moléculas pequeñas. Un modelo que podría conciliar todos los modelos de internalización del ADN sería que el mismo se acumula donde se forman los poros y que su inserción electroforéticamente impulsada en la membrana estira el poro y la membrana plasmática circundante. Esto generaría una curvatura de la membrana que podría reconocerse como una vesícula endocítica emergente e induciría una respuesta similar de la célula que para un proceso endocítico, con el reclutamiento de actina, clatrina, caveolina, dinamina y otros reguladores endocíticos (18, 19).

Las trayectorias del ADN electrotransferido poseen etapas de transporte activo interrumpido por fases de casi inmovilidad (15). Durante las fases

de transporte activo, los agregados de ADN presentaron un movimiento en promedio que tenía una velocidad de 250 nm/s, persistió durante 6 s y condujo a un desplazamiento de 1.3 μm . Sin embargo, las distribuciones fueron bastante amplias con velocidades de 50 nm/s a 3400 nm/s, desplazamientos de 0.1 μm a 12 μm y duraciones de transporte activo de 2 s a 30 s. Estos rangos concuerdan con otros tipos de dinámica de partículas intracelulares como se observa para virus, polyplexos, lipoplexos, receptores, endosomas y mitocondrias. Se demostró que las velocidades más bajas corresponden al transporte asociado a actina. De hecho, después de la interrupción de los microtúbulos usando el fármaco nocodazol, el transporte activo del ADN aún se produjo y las velocidades medidas estaban en el rango esperado para los motores de miosina que funcionan con actina, entre 50 nm/s y 300 nm/s para la miosina VI y entre 250 nm/s y 500 nm/s para miosina V. Además del transporte impulsado por motor de miosina, el movimiento relacionado con la actina también podría deberse a ráfagas de polimerización de actina que, según se informa, conducen virus, bacterias o endosomas desde la membrana plasmática al citosol con velocidades medias que varían de 50 a 600 nm/s.

Nuevos desafíos para aumentar la expresión génica

Como se mencionó anteriormente, el entramado denso del citoesqueleto impide la difusión libre de ADN en el medio intracelular. El ADN plasmídico electrotransferido, que contiene secuencias específicas, podría usar la red de microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas para moverse a través del citoplasma hasta el núcleo (20). Por lo tanto, claros limitantes de la expresión eficiente de genes utilizando pulsos eléctricos son, además del paso de moléculas de ADN a través de la membrana plasmática, la acumulación citoplasmática y la transferencia a través de la envoltura nuclear. Uno de los desafíos clave para la terapia génica electromediada es determinar los pasos que limitan la velocidad en este proceso complejo y encontrar estrategias para superar estos obstáculos. Una de las posibles estrategias para mejorar la captación de ADN en las células es usar pulsos cortos (10-300 ns) pero de alto voltaje (hasta 300 kV/cm) que afectan principalmente las estructuras y funciones intracelulares. A medida que disminuye la duración del pulso, por debajo de la constante de tiempo de carga de la membrana plasmática, los efectos de la membrana plasmática disminuyen y predominan los efectos intracelulares. Una idea para mejorar el éxito de la transfección, es realizar una permeabilización de membrana clásica que permita la electrotransferencia de ADN plasmídico al citoplasma celular, y luego, cuando el ADN haya alcanzado la envoltura nuclear, permeabilizar específicamente el núcleo usando nanopulsos cortos

e intensos. Por lo tanto, cuando se usaron junto con la electroporación clásica, los nanopulsos dieron la esperanza de aumentar la expresión génica (21). Sin embargo, este trabajo aún no se ha replicado. Otra idea es combinar pulsos eléctricos y ultrasonido asistidos con microburbujas de gas. Aunque la electroporación indujo la formación de agregados de ADN en la membrana celular, la sonoporación indujo su propulsión directa al citoplasma. Veinticuatro horas después, las células que recibieron electrosonoporación demostraron un aumento de cuatro veces en el nivel de transfección y un aumento de seis veces en la eficiencia de transfección en comparación con las células que se sometieron a electroporación sola (22). Por lo tanto, la sonoporación puede mejorar la transferencia de agregados de ADN electroinducidos al permitir su entrada libre y rápida en las células (23).

Vesículas lipídicas y esferoides como modelos alternativos para estudiar la electrotransferencia génica

Volviendo a un punto de vista mecanicista y debido a la complejidad de la composición de la membrana plasmática, otras herramientas experimentales pueden ser útiles para caracterizar los dominios de membrana observados durante la electrotransferencia génica. Para ese propósito, las vesículas unilamelares gigantes (GUV, por sus siglas en inglés) representan una forma conveniente de estudiar las propiedades de la membrana como la composición de la bicapa lipídica y la tensión de la membrana (24). Ofrecen la posibilidad de estudiar y visualizar procesos de membrana debido al tamaño de sus células en ausencia de cualquier restricción debido al citoesqueleto celular. Se pueden obtener por métodos simples como la electroformación y su composición puede ser muy simple (un tipo de fosfolípidos) o más compleja (varios lípidos, incluido el colesterol). Los experimentos mostraron una disminución en el radio de la vesícula que se observó debido a la pérdida de lípidos durante el proceso de permeabilización. Se observaron directamente tres mecanismos responsables de la pérdida de lípidos: formación de poros, formación de vesículas y formación de túbulos, que pueden estar involucrados en la absorción de moléculas. Sin embargo, no se pudo observar interacción entre el ADN plasmídico y la membrana GUV; durante la aplicación de los pulsos eléctricos tuvo lugar una transferencia directa de ADN a las GUV (25). Esto proporciona una evidencia clara de que las GUVs no siempre se comportan como la célula y un tejido no es un simple ensamblaje de células individuales. Por lo tanto, es necesario desarrollar y utilizar diferentes modelos, desde vesículas lipídicas simples hasta esferoides tumorales multicelulares tumorales más cercanos a la situación in vivo, para

comprender la permeabilización de la membrana y el proceso de electrotransferencia de ADN en los tejidos. Cada uno de estos modelos tiene ventajas y desventajas. Juntos combinados pueden ayudar en el estudio del proceso completo (tabla 2).

Tabla 2. Qué modelos se pueden utilizar para abordar los diferentes procesos de electropermeabilización y electrotransferencia de genes.

Modelo	Permeabilización de la membrana	Electrotransferencia de ADN
GUV	Visualización directa de la permeabilización de la membrana y sus consecuencias (deformación, pérdida de lípidos)	Falla al abordar la interacción ADN / membrana (el ADN se transfiere directamente dentro de la vesícula)
Cultivo celular 2D	Cinética de permeabilización y sus consecuencias (movilidad lateral y transversal de lípidos y proteínas)	Visualización de la formación de complejos de ADN / membrana y acceso al tráfico de ADN en las células
Cultivo celular 3D	Difusión y transferencia de moléculas que imitan situaciones complejas in vivo (contactos entre células, uniones, matriz extracelular)	Permite abordar la transferencia de ADN en 3D e imita lo que sucede in vivo (disminución de la expresión génica desde la periferia al centro)

A pesar de que la gran mayoría de los estudios que tratan la transferencia de moléculas por campos eléctricos se han realizado en cultivos celulares 2D en placa de Petri o en células cultivadas en suspensión, los esferoides multicelulares 3D representan un modelo in vitro atractivo, relevante, barato y fácil de manejar. Al crecer, los esferoides muestran un gradiente de células en proliferación. Estas células proliferantes se encuentran en las capas celulares externas y las células inactivas se ubican más centralmente. Esta heterogeneidad celular es similar a la encontrada en micro regiones avasculares de tumores (26). La microscopía confocal permitió visualizar la distribución de células permeabilizadas en esferoides sometidos a pulsos eléctricos. Los resultados revelaron que las células se permeabilizaron eficientemente, cualquiera que sea su localización en el esferoide, incluso aquellas en el centro del mismo, imitando situaciones in vivo observadas previamente. Se observó que la captación de yoduro de propidio estaba presente, pero era espacialmente heterogénea dentro del esferoide multicelular 3D después de la electroporación, con una disminución

progresiva de las células periféricas a las centrales. En el caso de moléculas grandes como el ADN plasmídico, los esferoides permitieron mostrar que la electroforesis, y no la deformación de los tejidos o la electroosmosis, es la fuerza impulsora del transporte intersticial. Además, y en el lado opuesto de las células en cultivos 2D, solo las células en un lado de la parte externa expresaron el gen reportero (27). Esta baja expresión concuerda con los experimentos in vivo en tumores. Los contactos cercanos entre las células y la matriz extracelular pueden actuar como barrera física que limita / previene la distribución del ADN (uniformemente) y explica la ausencia de expresión génica en la región interna del esferoide. El acceso limitado del ADN plasmídico a la región central del esferoide sigue siendo una barrera importante para la entrega eficiente de genes en los tejidos. Tomados en conjunto, estos resultados, de acuerdo con los obtenidos por el grupo de R. Heller (28), indican que el modelo esférico es más relevante para una situación in vivo que las células cultivadas como monocapas y, por lo tanto, pueden ser útiles para abordar los mecanismos de electrotransferencia de ADN. Para evaluar los efectos de la composición y organización de la matriz extracelular, así como las uniones intercelulares y la comunicación, se puede utilizar otro modelo de tejido conectivo humano reconstruido en 3D. Las láminas celulares, reconstruidas in vitro mediante un enfoque de ingeniería de tejidos, presentan múltiples capas de fibroblastos dérmicos primarios incrustados en una matriz extracelular (ECM) nativa rica en colágeno y pueden ser una herramienta útil para estudiar los mecanismos de electrotransferencia de ADN de la piel. Las células dentro de este tejido 3D estandarizado pueden electropermeabilizarse eficientemente mediante pulsos eléctricos de milisegundos de duración (29, 30). Además, dicho modelo dérmico con diseño de tejidos posee las propiedades mecánicas del tejido dérmico humano, a diferencia de los modelos de monocapa y esferoides de uso clásico (31). Una mejor comprensión de la electrotransferencia génica en un modelo de tejido de este tipo ayudaría a mejorar el enfoque de la terapia electrogénica, como ser la administración sistémica de proteínas terapéuticas y la vacunación de ADN.

Conclusiones

"La transferencia intracelular de materiales se ha convertido en un componente crítico de los intentos de edición del genoma, las terapias basadas en células ex vivo y una diversidad de aplicaciones de investigación fundamentales. Las limitaciones presentes en las tecnologías actuales motivan el desarrollo de una nueva generación de sistemas de

electroporación, que puedan entregar una amplia variedad de carga a diversos tipos de células. Todos los días, en institutos de investigación y centros clínicos de todo el mundo, los científicos usan kits y protocolos basados en vectores virales, agentes de transfección de lípidos y electroporación, entre otras opciones. Los complejos mecanismos de los métodos comúnmente utilizados y su impacto a menudo impredecible en el comportamiento celular han limitado drásticamente el espectro de experimentos biológicos y han reducido la eficacia de terapias potencialmente prometedoras. La comunidad de investigación biomédica se beneficiaría enormemente de una comprensión más mecanicista y transparente de la transferencia intracelular, tanto para promover el desarrollo de técnicas más robustas como para realizar aplicaciones médicas e industriales clave "(32). En este contexto, la llamada tecnología de electroporación es probablemente la más prometedora.

Las teorías clásicas de electropermeabilización presentan algunos límites para dar una descripción completa del transporte de moléculas a través de la membrana. Ciertos efectos de los parámetros del campo eléctrico sobre la permeabilización de la membrana y el transporte asociado de moléculas están bien establecidos, pero gran parte de lo que sucede a nivel molecular sigue siendo especulativo. Los modelos moleculares de las bicapas lipídicas y de la formación de electroporos están aportando una nueva e interesante visión del proceso. La desestabilización electroinducida de la membrana incluye la redistribución lateral y transversal de lípidos y proteínas, lo que lleva a modificaciones mecánicas y eléctricas que aún no se comprenden completamente. Se puede sugerir que tales modificaciones, que pueden variar según el microambiente, pueden estar involucradas en el transporte posterior de moléculas que interactúan con ellas, como las moléculas de ADN. La verificación experimental de los mecanismos básicos que conducen a la electropermeabilización y otros cambios en la membrana, las células y los tejidos sigue siendo una prioridad, dada la importancia de estos fenómenos para los procesos en biología celular y en aplicaciones médicas. La electrotransferencia génica in vivo enfrentará otros desafíos, tales como la necesidad de controlar la distribución del campo eléctrico y la expresión génica tanto en el espacio (entrega de ADN dirigida a las células) como en el tiempo. Todavía se requieren pautas para la transfección exitosa de ADN, pero podemos ser optimistas en que seguir trabajando para mejorar los mecanismos de electrotransferencia de genes producirá tratamientos más efectivos.

Referencias

- [1] Verma, I. M., and M. D. Weitzman. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74:711-738.
- [2] Yarmush, M. L., A. Golberg, G. Sersa, T. Kotnik, and D. Miklavcic. 2014. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annual review of biomedical engineering* 16:295-320.
- [3] Lambrecht, L., A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Preat, and G. Vandermeulen. 2016. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 13:295-310.
- [4] Sersa, G., J. Teissie, M. Cemazar, E. Signori, U. Kamensek, G. Marshall, and D. Miklavcic. 2015. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*.
- [5] Daud, A. I., R. C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A. I. Riker, V. K. Sondak, P. N. Munster, D. M. Sullivan, K. E. Ugen, J. L. Messina, and R. Heller. 2008. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 26:5896-5903.
- [6] Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1:841-845.
- [7] Golzio, M., J. Teissie, and M. P. Rols. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1292-1297.
- [8] Paganin-Gioanni, A., E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, and M. Golzio. 2011. Direct visualization at the single-cell level of ARNsi electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10443-10447.
- [9] Escoffre, J. M., E. Bellard, C. Faurie, S. C. Sebai, M. Golzio, J. Teissie, and M. P. Rols. 2014. Membrane disorder and phospholipid scrambling in electroporated and viable cells. *Biochim Biophys Acta* 1838:1701-1709.
- [10] Chopinet, L., C. Roduit, M. P. Rols, and E. Dague. 2013. Destabilization induced by electroporation analyzed by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1828:2223-2229.
- [11] Chopinet, L., C. Formosa, M. P. Rols, R. E. Duval, and E. Dague. 2013. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI (TM) mode. *Micron* 48:26-33.
- [12] Faurie, C., M. Rebersek, M. Golzio, M. Kanduser, J. M. Escoffre, D. Pavlin, J. Teissie, D. Miklavcic, and M. P. Rols. 2010. Electrically mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/Membrane complex formation. *Journal of Gene Medicine* 12:117-125.
- [13] Escoffre, J. M., T. Portet, C. Favard, J. Teissie, D. S. Dean, and M. P. Rols. 2011. Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 1808:1538-1543.
- [14] Rosazza, C., J. M. Escoffre, A. Zumbusch, and M. P. Rols. 2011. The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Mol Ther* 19:913-921.

-
- [15] Rosazza, C., A. Buntz, T. Riess, D. Woll, A. Zumbusch, and M. P. Rols. 2013. Intracellular tracking of single plasmid DNA-particles after delivery by electroporation. *Mol Ther*.
- [16] Rosazza, C., H. Deschout, A. Buntz, K. Braeckmans, M. P. Rols, and A. Zumbusch. 2016. Endocytosis and Endosomal Trafficking of DNA After Gene Electrotransfer In Vitro. *Molecular therapy. Nucleic acids* 5:e286.
- [17] Lechardeur, D., and G. L. Lukacs. 2006. Nucleocytoplasmic Transport of Plasmid DNA: A Perilous Journey from the Cytoplasm to the Nucleus. *Hum Gene Ther* 17:882-889.
- [18] Rosazza, C., S. H. Meglic, A. Zumbusch, M. P. Rols, and D. Miklavcic. 2016. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective. *Curr Gene Ther* 16:98-129.
- [19] Rems, L., and A. Miklavcic. 2016. Tutorial: electroporation of cells in complex materials and tissue. *J Appl Phys* 119:201101.
- [20] Vaughan, E. E., and D. A. Dean. 2006. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* 13:422-428.
- [21] Beebe, S. J., J. White, P. F. Blackmore, Y. Deng, K. Somers, and K. H. Schoenbach. 2003. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA Cell Biol* 22:785-796.
- [22] Escoffre, J. M., K. Kaddur, M. P. Rols, and A. Bouakaz. 2010. In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound Med Biol* 36:1746-1755.
- [23] Delalande, A., S. Kotopoulos, M. Postema, P. Midoux, and C. Pichon. 2013. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene* 525:191-199.
- [24] Riske, K. A., and R. Dimova. 2005. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys J* 88:1143-1155.
- [25] Portet, T., C. Favard, J. Teissie, D. Dean, and M. P. Rols. 2011. Insights into the mechanisms of electromediated gene delivery and application to the loading of giant vesicles with negatively charged macromolecules. *Soft Matter* 7:3872-3881.
- [26] Sutherland, R. M. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177-184.
- [27] Gibot, L., and M. P. Rols. 2013. Progress And Prospects: The Use Of 3D Spheroid Model As A Relevant Way To Study And Optimize Dna Electrotransfer. *Curr Gene Ther*.
- [28] Marrero, B., and R. Heller. 2012. The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. *Biomaterials*.
- [29] Madi, M., M. P. Rols, and L. Gibot. 2015. Efficient In Vitro Electroporation of Reconstructed Human Dermal Tissue. *J Membr Biol*.
- [30] Madi, M., M. P. Rols, and L. Gibot. 2016. Gene Electrotransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue. *Curr Gene Ther* 16:75-82.
- [31] Pillet, F., L. Gibot, M. Madi, M. P. Rols, and E. Dague. 2017. Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model. *Biofabrication* 9:025017.
- [32] Stewart, M. 2016. In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* 538:183-192.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA) y es el resultado de los esfuerzos de redes dentro de la acción COST TD1104. Los experimentos se deben a los trabajos de los estudiantes de doctorado y postdoctorados que tengo / tuve el placer de dirigir y / o trabajar con: Muriel Golzio, Cécile Faurie, Emilie Phez, Jean-Michel Escoffre, Thomas Portet, Chloé Mauroy, Louise Chopinet, Elisabeth Bellard, Christelle Rosazza, Amar Tamra, Moinecha Madi, Luc Wasungu, Flavien Pillet, Laure Gibot y Nathalie Joncker.



Marie-Pierre Rols nació en Decazeville, la ciudad de los "gueules noires" del Duc Decazes, Francia, en 1962. Realizó una Maestría en Bioquímica, un Ph.D. en Biofísica celular y una habilitación para dirigir proyectos de investigación en la Universidad Paul Sabatier de Toulouse en 1984, 1989 y 1995, respectivamente. Actualmente es Directora de Investigación en el laboratorio IPBS-CNRS en Toulouse, líder del grupo de "biofísica celular" y jefa del Departamento de "Biología Estructural y Biofísica". Es miembro de la junta directiva de las sociedades SFNano, ISEBTT, BES y de LIA EBAM. Sus intereses de investigación se encuentran en los campos de electroporación de membranas en células y tejidos desde lo básico hasta el desarrollo de aplicaciones. Marie-Pierre Rols es autora de más de 150 artículos científicos publicados en revistas con referato.

Capítulo 5

Simulaciones de dinámica molecular de la electroporación de membranas lipídicas

Mounir Tarek

Teoría, Simulaciones y Modelado, CNRS- Université de Lorraine Francia

Resumen: Actualmente, los enfoques computacionales permiten seguir, a escala atómica, las perturbaciones locales de las membranas lipídicas cuando están sujetas a un campo eléctrico externo. Describimos aquí los métodos de simulación de dinámica molecular diseñados para realizar experimentos in silico de membranas sujetas campos eléctricos pulsados de megavoltios por metro y de nanosegundos de duración, y de membranas sujetas a desequilibrio de cargas, imitando por lo tanto la aplicación de pulsos de baja tensión y larga duración. A nivel molecular, los resultados muestran que los dos tipos de pulsos producen efectos similares: siempre que el potencial transmembrana que generan estos pulsos sea superior a un cierto umbral, se forman poros hidrofílicos estabilizados por grupos de cabeza de lípidos de la membrana en la escala de tiempo de nanosegundos a través del núcleo lipídico. Las simulaciones se utilizan además para caracterizar el transporte de especies cargadas a través de estos poros. Se cree que los resultados obtenidos capturan la esencia de varios aspectos de los fenómenos de electroporación en las membranas de las bicapas lipídicas, y podrían servir como una fuente adicional de información complementaria para el arsenal actual de herramientas experimentales.

Introducción

La electroporación perturba de forma transitoria o permanente la integridad de las membranas celulares [1–3]. Estas membranas consisten en un conjunto de lípidos, proteínas y carbohidratos que se autoorganizan en una delgada barrera que separa el interior celular del ambiente exterior [4]. Los principales componentes lipídicos de las membranas naturales son

los fosfolípidos que se organizan en una lámina de dos capas (una bicapa). La evidencia experimental sugiere que el efecto de un campo eléctrico externo aplicado a las células es producir poros acuosos específicamente en la bicapa lipídica [5–9]. Por lo tanto, la información sobre la secuencia de eventos que describe el fenómeno de electroporación puede obtenerse a partir de mediciones de corrientes eléctricas a través de bicapas lipídicas planas junto con la caracterización del transporte molecular dentro (o fuera) de células sometidas a pulsos de un campo eléctrico. Se puede resumir de la siguiente manera: los pulsos eléctricos largos e intensos inducen reordenamientos de los componentes de la membrana (agua y lípidos) que finalmente conducen a la formación de poros hidrofílicos acuosos [5–10] cuya presencia aumenta sustancialmente el transporte iónico y molecular a través de membranas impermeables [11].

En las membranas de los eritrocitos, se pueden observar poros grandes utilizando microscopía electrónica [12], pero en general, la observación directa de la formación de poros de tamaño nanométrico no es posible con las técnicas convencionales. Además, debido a la complejidad y heterogeneidad de las membranas celulares, es difícil describir y caracterizar su electroporación en términos de procesos resueltos a nivel atómico. Las simulaciones atómicas en general, y las simulaciones de dinámica molecular (DM) en particular, han demostrado ser efectivas para proporcionar información sobre la estructura y la dinámica de los modelos de sistemas de membranas lipídicas en general [13–18]. Recientemente se han realizado varias simulaciones de dinámica molecular para modelar el efecto del campo eléctrico en las membranas [19–23], proporcionando quizás el modelo molecular más completo del proceso de electroporación de la bicapa lipídica.

Simulaciones de dinámica molecular de membranas lipídicas

La dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) se refiere a una familia de métodos computacionales destinados a simular el comportamiento macroscópico a través de la integración numérica de las ecuaciones clásicas de movimiento de un sistema microscópico de muchos cuerpos. Las propiedades macroscópicas se expresan como funciones de coordenadas de partículas y / o momentos, que se calculan a lo largo de una trayectoria espacial de fase generada por la dinámica clásica [24, 25]. Cuando se realiza en condiciones correspondientes a escenarios de laboratorio, las simulaciones de MD pueden proporcionar una vista detallada de la estructura y la dinámica de un sistema macromolecular.

También se pueden utilizar para realizar "experimentos informáticos" que no se pueden realizar en el laboratorio, ya sea porque no representan un comportamiento físico o porque no se pueden lograr los controles necesarios.

Las simulaciones de MD requieren la elección de una función de energía potencial, es decir, términos por los cuales interactúan las partículas, generalmente denominado campo de fuerza. Los más utilizados en química y biofísica, por ejemplo, GROMOS [26] CHARMM [27] y AMBER [28], se basan en la mecánica molecular y un tratamiento clásico de las interacciones entre partículas que impide la disociación de enlaces y, por lo tanto, la simulación de reacciones químicas. Los campos de fuerza de MD clásicos consisten en una suma de fuerzas de uniones covalentes asociados con enlaces químicos, ángulos de enlace y enlaces dihédricos, y enlaces débiles asociados con fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas. Los parámetros asociados con estos términos están optimizados para reproducir cambios estructurales y conformacionales de los sistemas macromoleculares.

Los campos de fuerza convencionales solo incluyen cargas puntuales y potenciales de Coulomb de par aditivo, que impiden la descripción de efectos electrostáticos colectivos realistas, tales como transferencia de carga, excitaciones electrónicas o polarización electrónica, lo que a menudo se considera una limitación importante de los campos de fuerza clásicos. Debe tenerse en cuenta que se realizan esfuerzos constantes en el desarrollo de funciones potenciales que tratan explícitamente la polarización electrónica en los campos de fuerza empíricos [29–31], pero ninguno de estos campos de fuerza "polarizables" se utiliza ampliamente en las simulaciones a gran escala por ahora, las principales razones de ello son el aumento dramático del tiempo computacional de simulación y complicaciones adicionales con su parametrización. En esta perspectiva, los campos de fuerza clásicos proporcionan una descripción adecuada de las propiedades de los sistemas de membrana y permiten investigaciones semicuantitativas de las interacciones electrostáticas de membrana.

Las simulaciones de MD usan información (posiciones, velocidades o momentos y fuerzas) en un instante dado en el tiempo, t , para predecir las posiciones y momentos en un momento posterior, $t + \Delta t$, donde Δt es el paso de tiempo, del orden de un femtosegundo, considerado constante durante toda la simulación. Las soluciones numéricas a las ecuaciones de movimiento se obtienen así mediante la iteración de este paso elemental. Las simulaciones por computadora generalmente se realizan en un pequeño número de moléculas (decenas a cientos de miles de átomos), el tamaño del sistema está limitado, por supuesto, por la velocidad de ejecución de los

programas y la disponibilidad de capacidad de cálculo computacional. Para eliminar los efectos de borde e imitar un sistema macroscópico, las simulaciones de sistemas de fase condensada consideran un pequeño parche de moléculas confinadas en una celda de simulación central, y replican esta última utilizando condiciones de límite periódicas (PBC, por sus siglas en inglés) en las tres direcciones del espacio cartesiano. Para las membranas, por ejemplo, el sistema simulado correspondería a un pequeño fragmento de una película negra, un liposoma o pilas de lípidos orientadas a múltiples filamentos depositados sobre un sustrato [32,33].

Tradicionalmente, los fosfolípidos han servido como modelos para investigar *in silico* las propiedades estructurales y dinámicas de las membranas. Tanto desde una perspectiva teórica como experimental, las bicapas lipídicas de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés) zwitteriónica constituyen los sistemas mejor caracterizados [34-37]. Estudios más recientes han considerado una variedad de lípidos alternativos, con diferentes grupos de cabeza que pueden tener carga [38] [39-42], y más recientemente composiciones de bicapa mixtas [43-49]. A pesar de su simplicidad, las bicapas construidas a partir de lípidos de PC representan sistemas de prueba notables para probar la metodología de computación y obtener información adicional sobre las propiedades físicas de las membranas [14,17,50,51].

Modelado de electroporación de membranas

Los efectos de un campo eléctrico en una célula pueden describirse considerando esta última como una capa dieléctrica (membrana de la superficie celular) comprendida entre medios conductores (internos: citoplasma y externos: medios extracelulares). Cuando se aplican pulsos de campo relativamente bajo de microsegundos o milisegundos de duración a esta célula (colocándola, por ejemplo, entre dos electrodos y aplicando un pulso de voltaje constante), la corriente resultante provoca la acumulación de cargas eléctricas a ambos lados de la membrana celular. El tiempo requerido para cargar la membrana superficial depende de los parámetros eléctricos del medio en el que está suspendido. Para una célula esférica, se estima utilizando circuitos de Resistencia-Condensador (RC) en red equivalentes en la escala de tiempo de 100 ns [19,52-55]. También se obtuvo una constante de tiempo de carga en el rango de cientos de nanosegundos a partir de derivaciones basadas en la ecuación de Laplace (véase, por ejemplo, [56] para el análisis de primer orden en una vesícula esférica; [57] para el análisis de segundo orden; y [58] para el análisis de

segundo orden para dos vesículas esféricas concéntricas, es decir, modelando un orgánulo). Si, por otro lado, la duración del pulso es lo suficientemente corta en relación con la constante de tiempo de carga de la red resistiva-capacitiva formada por los fluidos conductores intracelulares y extracelulares y el dieléctrico de la membrana celular, que es el caso de los pulsos de nanosegundos, entonces la respuesta del sistema es principalmente dieléctrico y está vinculado a la polarización del agua en la interfase (ver más abajo).

Las simulaciones permiten realizar experimentos in silico bajo ambas condiciones, es decir, simular el sistema a campos eléctricos pulsados de megavoltios por metro y nanosegundos de duración, o imitar la aplicación de pulsos de baja tensión y larga duración por medio de la carga de los desequilibrios. A continuación, describiremos los resultados de tales simulaciones.

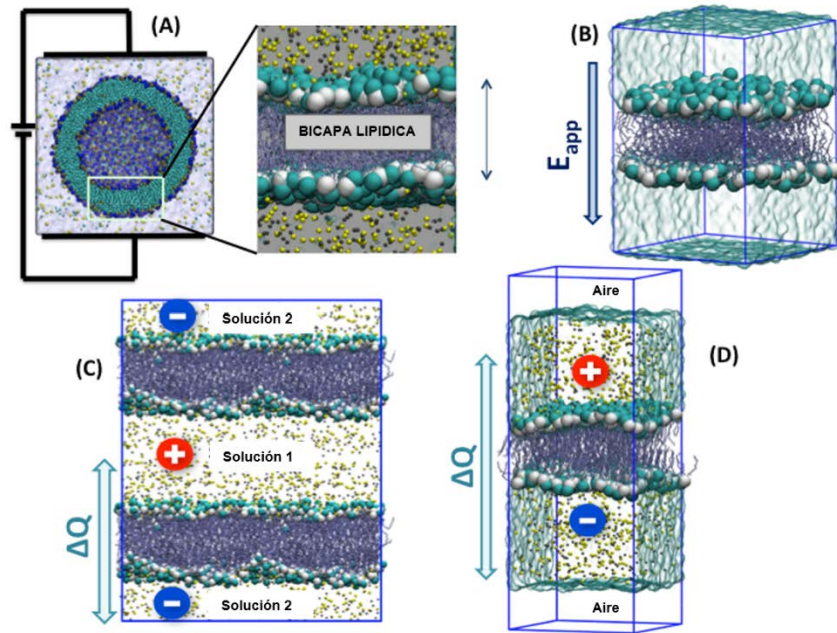


Figura 1. Protocolos para el modelado atómico de membranas celulares o liposomas de bicapas lipídicas (A) electroporación; (B) Protocolo nsPEFs: el sistema está modelado en ausencia de sal y sujeto a un campo eléctrico E_{app} perpendicular a la bicapa (eje z). Nótese que en algunos estudios también se consideraron los iones; (C) Protocolo μ s-msPEFs introducido en la configuración de doble bicapa: se establece un desequilibrio de carga ΔQ en cada bicapa y el esquema se implementa utilizando PBC clásicos. Para evitar que los iones migren

a través de las condiciones de límite periódicas, el cuadro de simulación (en azul) se extiende en la dirección perpendicular a la bicapa (eje z) para crear una losa de vacío en el protocolo de interfaz aire / agua (D).

Electroporación inducida por efecto directo de un campo eléctrico

En las simulaciones, es posible aplicar "directamente" un campo eléctrico constante $\vec{E}$ perpendicular al plano de la membrana (bicapas lipídicas). En la práctica, esto se hace agregando una fuerza $\vec{F} = q_i \vec{E}$ a todos los átomos que llevan una carga q_i [59–63]. Las simulaciones de MD que adoptan este enfoque se han utilizado para estudiar la electroporación de la membrana [19–23], la externalización de lípidos [64], para activar los canales de K^+ activados por voltaje [65] y para determinar las propiedades de transporte de los canales iónicos [66–69].

La consecuencia de tal perturbación proviene de las propiedades de la membrana y de las condiciones de configuración de las simulaciones: las membranas lipídicas puras exhiben distribuciones atómicas heterogéneas a través de la bicapa a las que están asociadas las cargas y las distribuciones de dipolos moleculares. Los grupos principales de fosfolípidos adoptan en general una orientación preferencial. Para las bicapas de PC hidratadas a temperaturas superiores a la transición de gel a cristal líquido, los dipolos de fosfatidilcolina apuntan en promedio a 30 grados de la membrana normal [70]. La organización de los grupos fosfato (PO_4^-), colina ($N(CH_3)_3^+$) y carbonilo ($C=O$) del grupo de cabeza lipídica dan lugar a un dipolo permanente y las moléculas de disolvente (agua) unidas a los grupos del grupo de cabeza lipídica tienden a orientar sus dipolos para compensar a estos últimos [71]. Las características electrostáticas de la bicapa pueden obtenerse a partir de estimaciones del perfil electrostático $\phi(z)$ que se deriva de la distribución de todas las cargas en el sistema. $\phi(z)$ se deriva de simulaciones MD usando la ecuación de Poisson y se expresa como la integral doble de $\rho(z)$, las distribuciones de densidad de carga molecular:

$$\Delta\phi(z) = \phi(z) - \phi(0) = -\frac{1}{\epsilon_0} \iint_0^z \rho(z'') dz'' dz' .$$

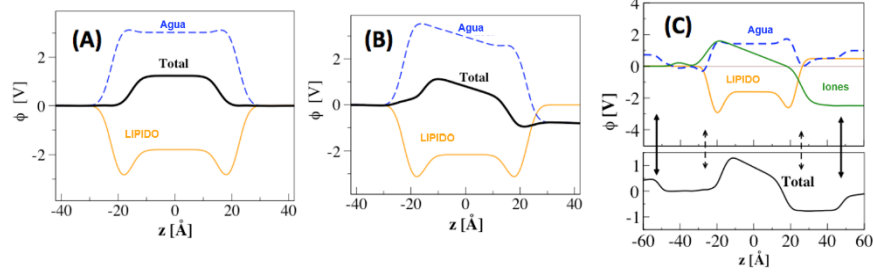


Figura 2. Perfiles de potencial electrostático $\phi(z)$ a lo largo de la normal de la membrana (eje z) de una bicapa lipídica POPC. Bicapa (A) en reposo, (B) sujeta a un campo eléctrico transversal (protocolo nsPEF) y (C) conjunto de bicapa lipídica con un desequilibrio de carga (protocolo μ s-msPEF). $z = 0$ representa el centro de la bicapa lipídica. Las contribuciones al perfil electrostático del agua (azul), lípidos (amarillo), iones (verde) se informan junto al total (negro). Las flechas punteadas en el panel C indican las posiciones de las interfaces lípido/agua y las flechas sólidas la posición de las interfaces agua/aire. Note que el voltaje U_m (diferencia de potencial entre los baños de agua superior e inferior) en el protocolo nsPEF se debe principalmente a la reorientación de los dipolos de agua, mientras que en el protocolo μ s-msPEF se debe principalmente a la distribución de cargas (iones).

Para bicapas lipídicas, la mayoría de las cuales se modelan sin tener en cuenta una concentración de sal, un campo eléctrico aplicado actúa específica y principalmente sobre los dipolos de agua interfaciales (pequeña polarización de un gran número de moléculas de agua). La reorientación de los grupos de cabeza de lípidos parece no verse afectada en escalas de tiempo muy cortas [21,72], y no excede algunos grados hacia la dirección del campo en una escala de tiempo más larga [22]. Por lo tanto, dentro de una escala de tiempo muy corta, típicamente pocos picosegundos [21], un campo transversal $\vec{E}$ induce un potencial TM global ΔV (cf. Fig. 2). Es muy importante tener en cuenta aquí que, debido a la configuración de la simulación MD (y el uso de PBC), $\vec{E}$ induce una diferencia de voltaje $\Delta V \approx |\vec{E}| \cdot L_z$ en todo el sistema, donde L_z es el tamaño de la caja de simulación en la dirección del campo. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 2, L_z es ~ 10 nm. El campo eléctrico ($0.1 \text{ V} \cdot \text{nm}^{-1}$) aplicado a la bicapa POPC induce $\Delta V \sim 1 \text{ V}$.

Las simulaciones de MD de bicapas lipídicas puras han demostrado que la aplicación de campos eléctricos de magnitud suficientemente alta conducen a la electroporación de la membrana, con una secuencia de poración bastante común: el campo eléctrico favorece bastante rápidamente (dentro de unos pocos cientos de picosegundos) la formación de defectos y

cordones de agua, en la profundidad del núcleo hidrofóbico [20]. Finalmente, los dedos de agua que se forman a ambos lados de la membrana se unen para formar canales de agua (a menudo denominados pre-poros o poros hidrofóbicos) que se extienden por la membrana. Dentro de los nanosegundos, unos pocos grupos de lípidos comienzan a migrar desde la interfaz agua-membrana al interior de la bicapa, estabilizando poros hidrofílicos (~ 1 a 3 nm de diámetro).

Todos los estudios de MD reportaron la expansión de los poros a medida que se mantuvo el campo eléctrico. Por el contrario, se demostró en un caso [21] que un poro hidrofílico podría volver a cerrarse en pocos nanosegundos cuando el campo aplicado se apagaba. La recuperación completa de la membrana, es decir, la migración del grupo de la cabeza de lípidos que forma el poro hidrofílico hacia la interfaz lípido / agua, siendo un proceso mucho más largo, no se observó. Más recientemente, los estudios sistemáticos del tiempo de la creación y la aniquilación de poros en función de la fuerza del campo han arrojado más luz sobre la dinámica compleja de los poros en las bicapas lipídicas simples [22,73]. Interesantemente, se ha mostrado que la adición de sal modula estas escalas de tiempo características [74].

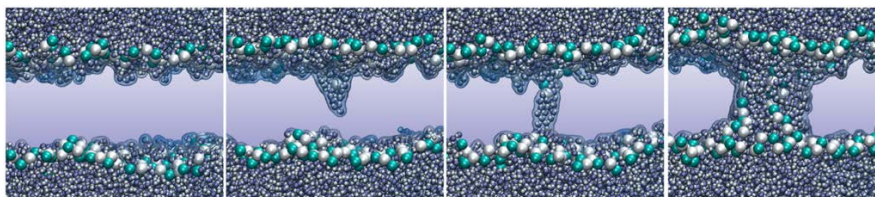


Figura 3. Evolución de los poros en una bicapa POPC: los grupos de cabeza de POPC se muestran como cuentas cian y blancas, las colas de lípidos no se muestran para mayor claridad. La creación de poros, en simulaciones MD, tiene lugar en el rango de nanosegundos.

Para los tamaños de los sistemas de MD típicos (128 lípidos; sección transversal de la membrana de 6 nm x 6 nm), la mayoría de las simulaciones mostraron la formación de un único poro a intensidades de campo altas. Para sistemas mucho más grandes, podría observarse la formación de poros múltiples con diámetros que varían de unos pocos a 10 nm [20,21]. Tales poros son, en principio, lo suficientemente anchos como para transportar iones y moléculas pequeñas. Hasta ahora se ha hecho un intento para investigar dicho transporte molecular bajo electroporación [21]. En esa simulación, se pudo seguir el transporte parcial de una cadena de ADN de 12 pares de bases a través de la membrana. La cadena se consideró difundida hacia el interior de la bicapa cuando se creó un poro debajo de

ella y se formó un complejo ADN / lípido estable en el que los grupos de cabeza de lípidos encapsulan la cadena. El proceso proporcionó apoyo al modelo de transferencia de genes propuesto por Golzio et al. [75] en el cual, un "paso de anclaje" que conecta el plásmido a las membranas de las células permeabilizadas tiene lugar durante la transferencia de ADN con la ayuda de pulsos eléctricos, y está de acuerdo con los últimos hallazgos del mismo grupo [76]. Más recientemente, (ver secciones a continuación) se demostró que incluso un solo pulso eléctrico de 10 ns de suficiente magnitud puede mejorar el transporte de ARNs pequeños a través de las membranas lipídicas [77].

El proceso de electroporación se lleva a cabo mucho más rápidamente con campos más altos, sin un cambio importante en las características de la formación de los poros. Los voltajes más bajos reportados para electroporar una bicapa lipídica de PC son ~ 2 V [22] [72]. Ziegler y Vernier [23] reportaron fuerzas mínimas de campo externo de poración para 4 lípidos de PC diferentes con diferentes longitudes de cadena y composición (número de insaturaciones). Los autores encontraron una correlación directa entre los campos mínimos de poración (que van desde $0,26 \text{ V}\cdot\text{nm}^{-1}$ a $0,38 \text{ V}\cdot\text{nm}^{-1}$) y el grosor de la membrana (desde $2,92 \text{ nm}$ a $3,92 \text{ nm}$). Tenga en cuenta que las estimaciones de los umbrales de electroporación de las simulaciones deben, en general, considerarse solo como indicativos, ya que están relacionados con la escala de tiempo que puede tomar la formación de los poros. Se "supone" que se alcanza un umbral de intensidad de campo cuando no se forma una ruptura de membrana dentro de la escala de tiempo de 100 ns.

Electroporación inducida por gradientes de concentración de sales iónicas

Independientemente de cómo se apliquen impulsos eléctricos de milisegundos de baja intensidad, el paso final es la carga de la membrana debido al flujo de iones. El desequilibrio de carga iónica resultante entre ambos lados de la bicapa lipídica localmente es el efecto principal que induce el potencial TM. En una configuración clásica de simulaciones de membrana, debido al uso de 3d-PBCs, el voltaje TM no puede controlarse a través de un desbalance de cargas Q_s a través de la bicapa, incluso cuando hay iones presentes en los electrolitos. Recientemente se han ideado varios protocolos de simulaciones de MD que pueden superar esta limitación (Fig. 1):

La configuración de doble bicapa:

Se demostró que los gradientes de potenciales TM pueden ser generados por un desequilibrio de carga a través de las bicapas lipídicas al considerar una célula unitaria de MD que consta de tres baños de agua salada separados por dos bicapas y 3d-PBCs [78] (cf. Fig. 1.C). El establecimiento de un desequilibrio de carga neta entre los dos baños independientes en el tiempo $t=0$ induce un voltaje TM por la dinámica iónica explícita.

La configuración de una bicapa simple:

Delemotte et al. [79] introdujo una variante de este método donde no se necesita la doble capa, evitando por lo tanto el costo excesivo de simular un sistema grande. El método consiste en considerar una bicapa única rodeada de baños de electrolitos, cada uno de ellos terminado por una interfaz aire / agua [43]. El sistema está configurado como se indica en la Fig. 1.D. Primero, una bicapa hidratada se equilibra a una concentración de sal dada usando condiciones de límite periódicas 3d (3d-PBCs). Después se crean interfaces aire agua a ambos lados de la membrana, y un mayor equilibrio se garantiza a volumen constante, manteniendo por lo tanto la separación entre los electrolitos superior e inferior. Un desbalance de cargas Q_s entre los dos lados de la bilapa se genera simplemente desplazando al tiempo $t=0$ un numero adecuado de iones de un lado al otro. En la medida en que las losas de agua sean más gruesas que 25-30 Å, la presencia de interfaces aire-agua no tiene incidencia en las propiedades de la bicapa lipídica y la membrana "se siente" como si estuviera incrustada en baños infinitos cuyas características son las modeladas de soluciones finitas.

La Fig. 2 muestra los perfiles de potencial electrostático a lo largo de la normal a la membrana generados en las simulaciones de MD de una bicapa POPC en contacto con baños de agua y sal 1M NaCl a diferentes desbalances de cargas Q_s , utilizando el método de la bicapa simple. Para todas las simulaciones, los perfiles computados en el estadio inicial, muestran valores meseta en las regiones acuosas y, para incrementos de Q_s , un incremento en la diferencia del potencial electrostatico entre los electrolitos indicativo de un potencial TM ΔV . Resulta muy interesante que los perfiles muestran claramente que, en contraste con el caso del campo eléctrico, donde el voltaje TM se debe principalmente a la reorientación del dipolo de agua, la mayor parte de la caída de voltaje en el método de desequilibrio de carga se debe a la contribución de los iones. De hecho, solamente el colapso del potencial electrostático por el desequilibrio de

cargas debido a la separación de las cargas por el núcleo lipídico de la membrana es reponsable de la mayor parte del ΔV .

Utilizando la configuración de desequilibrio de cargas, fue posible por primera vez demostrar directamente in silico que la bicapa lipídica simulada se comporta como un condensador [79,80]. Simulaciones con varios desbaances de cargas Q_s muestran una variación lineal del ΔV a partir del cual la capacitancia puede ser estimada como $C = Q_s \cdot \Delta V^{-1}$. Es esperable que los valores de capacitancia extraídos de las simulaciones dependan de la composición lipídica (cargada o no) y de los parámetros del campo de fuerza utilizados, y como tales constituyen una forma suplementaria de verificar la precisión de los parámetros del campo de fuerza lipídica utilizados en la simulación. Aquí, en el caso de las bicapas POPC en una solución 1M de NaCl, la última asciende a $0.85 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ lo cual está razonablemente de acuerdo con el valor generalmente asumido en la literatura, $1.0 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ [78,81] y con mediciones recientes para bicapas lipídicas planas POPC en una solución de KCl 100 mM ($0.5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Para voltajes TM inducidos suficientemente grandes, los tres protocolos conducen a la electroporación de la bicapa lipídica. Como en el caso del método de campo eléctrico, para ΔV por encima de 1.5-2.5 voltios, el proceso de electroporación comienza con la formación de dedos de agua que sobresalen dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana. En cuestión de nanosegundos, aparecen cordones de agua que unen a los dos lados de la membrana por el estrés provocado por la tensión inducida. Si las simulaciones se extienden más, los grupos de cabeza de lípidos migran a lo largo de un cordón y forman una vía de conexión hidrófila (Fig. 3). Debido a que las soluciones salinas se consideran explícitamente en estas simulaciones, la conducción de iones a través de los poros hidrofílicos se produjo después de la electroporación de las bicapas lipídicas. Se pudieron obtener detalles sobre el transporte iónico a través de los poros formados dentro del núcleo de la bicapa tras la electroporación.

Las simulaciones de MD del sistema de doble bicapa [82,83], y los resultados presentados aquí para la configuración de una sola bicapa muestran que tanto los cationes como los aniones se intercambian a través de los poros entre los dos baños, con un flujo general de cargas dirigido hacia un disminución del desequilibrio de carga. La translocación de iones a través de los poros de una región masiva a la otra dura desde decenas a cientos de picosegundos, y conduce a una disminución del desequilibrio de carga y, por lo tanto, al colapso de ΔV . Por lo tanto, para todos los sistemas, cuando el desequilibrio de carga alcanzó un nivel en el que el voltaje TM se redujo a un par de cientos de mV, los poros hidrofílicos se "cierran" en

el sentido de que no se produce más translocación iónica (Fig. 4.F). La topología final de los poros hacia el final de las simulaciones permanece estable durante períodos de tiempo superiores a la escala de 10 nanosegundos, lo que muestra, como se informó en simulaciones anteriores [21], que la recuperación completa de la estructura de la bicapa original requiere una escala de tiempo mucho más larga.

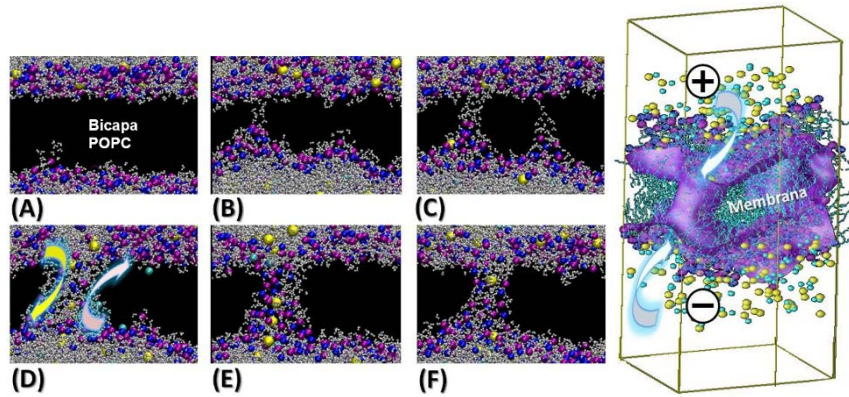


Figura 4. A la izquierda. Secuencia de eventos después de la aplicación de un voltaje TM a una bicapa lipídica POPC utilizando el método de desequilibrio de carga (paneles A a F). Obsérvese la migración de iones Na^+ (amarillo) y Cl^- (cian) a través de los poros hidrofílicos formados que están revestidos con átomos de grupo de cabeza de lípido fosfato (magenta) y nitrógeno (azul). El panel F representa el estado de un poro no conductor alcanzado cuando el intercambio de iones entre los dos baños redujo Q_s y, por lo tanto, ΔV a valores ≈ 200 mV. A la derecha puede verse la topología de los poros hidrofílicos de nanómetros de ancho formados bajo un ΔV transmembrana alto impuesta por el método de desequilibrio de cargas en la bicapa plana (A). Las flechas resaltan el flujo iónico posterior a través de los poros.

Tenga en cuenta que para mantener el ΔV constante, el modelador necesita mantener el desequilibrio de carga inicial "inyectando" cargas (iones) en los electrolitos a un ritmo equivalente a la tasa de translocación de iones a través del poro hidrofílico. Este protocolo es, en particular para la configuración de una sola bicapa, adecuado para realizar simulaciones a bajo voltaje constante (bajo voltaje, duración de ms) o condiciones de corriente constante, lo cual es adecuado para la comparación con experimentos realizados en condiciones similares [84].

Distribución interna del campo eléctrico y origen de la electroporación de membranas

Para determinar el mecanismo detallado de la creación de poros, es útil sondear la distribución de campo eléctrico a través de la bicapa, tanto en reposo como bajo el efecto de un voltaje TM. La Figura 5.A muestra los perfiles de potencial electrostático para una bicapa lipídica sujeta a campos eléctricos crecientes que generan potenciales TM que varían de 0 V a ~ 3 V. A 0 V, la bicapa lipídica está en reposo y los perfiles revelan, de acuerdo con el experimento [85], la existencia de una diferencia de potencial positiva entre el interior de la membrana y las fases acuosas adyacentes.

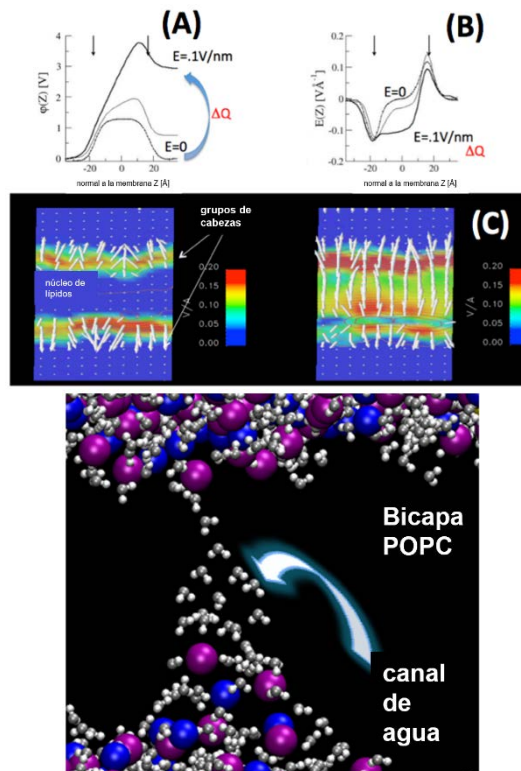


Figura 5. (A) Perfiles de potencial electrostático a través de una bicapa lipídica sujeta a campos eléctricos de 0 V/nm (línea punteada) 0,06 V/nm (línea delgada) y 0,30 V/nm (línea en negrita), o a un desequilibrio de carga ΔQ . (B) Perfiles de campo eléctrico correspondientes. (C) Mapas 2D (fuera del plano) de la distribución del campo eléctrico. La dirección y la intensidad del campo eléctrico local se muestran como flechas blancas. Nótese que a 0 mV, debido al potencial de

membrana en reposo, los campos eléctricos más grandes se encuentran en las interfaces entre lípidos y agua y están orientados hacia el disolvente, y no hay campo eléctrico en el centro de la bicapa. Cuando la bicapa esta sujeta a un potencial TM, un campo eléctrico neto aparece en la región hidrocarbonada. Esto último promueve la orientación de los dipolos y la penetración de las moléculas de agua (panel derecho) al interior de la bicapa.

En reposo, el cambio de voltaje a través de las interfaces de lípidos y agua da lugar localmente a grandes campos eléctricos (en el presente caso, hasta $1,5 \text{ V.nm}^{-1}$) orientados hacia la masa de agua, mientras que, en el centro de la bicapa, el campo eléctrico local es nulo (Fig. 5.B, C). Cuando se aplican campos eléctricos externos de magnitudes respectivamente de $0,06$ y $0,30 \text{ V.nm}^{-1}$, la reorientación de las moléculas de agua da lugar a potenciales TM de $\sim 0,75$ y 3 V , respectivamente. Las figuras 5.B y C revelan la incidencia de dicha reorganización en el campo eléctrico local tanto en la región interfacial como dentro del núcleo de la bicapa. En particular, uno observa que el campo en el núcleo de la membrana ha aumentado a un valor $\sim 1 \text{ V.nm}^{-1}$ para el ΔV más alto impuesto.

Para el método de desequilibrio de carga, la imagen general es similar, donde nuevamente, los voltajes TM creados dan lugar a grandes campos eléctricos dentro del núcleo de la membrana, orientados perpendicularmente a la bicapa.

Cualitativamente, en ambos métodos, la cascada de eventos después de la aplicación del voltaje TM que tiene lugar en la membrana, es una consecuencia directa de dicha distribución de campo. De hecho, las moléculas de agua inicialmente restringidas a la región interfacial, ya que se filtran al azar dentro del núcleo de la membrana, están sujetas a un campo eléctrico alto y, por lo tanto, están inclinadas a orientar su dipolo a lo largo de este campo local. Estas moléculas pueden entonces fácilmente unirse por puentes de hidrógeno entre sí, lo que resulta en la creación de filas individuales de moléculas de agua. Tales dedos sobresalen a través del núcleo hidrofóbico de ambos lados de la membrana. Finalmente, estos dedos se juntan para formar canales de agua (a menudo denominados pre-poros o poros hidrófobos) que atraviesan la membrana. A medida que se mantiene el voltaje TM, estos cordones de agua parecen ser capaces de superar la barrera de energía libre asociada a la formación de una sola fila de moléculas de agua que atraviesan la bicapa (se estima que es $\sim 108 \text{ kJ/mol}$ en ausencia de campo eléctrico externo) [86]. A medida que se mantiene el estrés eléctrico, el grupo de cabezas de lípidos migra a lo largo de los cordones de agua estables y participa en la formación de "poros hidrofílicos" más grandes, capaces de conducir iones y moléculas más grandes a medida que se expanden.

Ziegler et al. [23] han demostrado claramente que la orientación de los grupos de lípidos (dipolos) no es un factor determinante en el proceso de EP. La suposición general de que los grupos principales de lípidos tienen un papel marginal en la formación de los electroporos, es consistente con los estudios sobre el electrodo en el octano [20] y en placas de vacío [87]: estos trabajos han demostrado que, como en las bicapas lipídicas, las columnas de agua pueden formarse en cualquier sistema de agua/bajo dieléctrico/agua sujeto a campos eléctricos altos.

La evidencia experimental muestra que los poros se cierran cuando se desconecta el PEF. La cinética de este proceso determina cuánto tiempo puede durar la fuga, o la transferencia, a las células objetivo. Las simulaciones de MD indican que este proceso se inicia con un colapso del poro (cierre) debido a una fuga rápida de agua hacia el exterior, seguido de una reorganización mucho más lenta que conduce a que los grupos de lípidos se vuelvan a dividir hacia las láminas hidrofílicas externas. La cinética de sellado es independiente de la magnitud de los campos eléctricos de iniciación de poros. En general, la recuperación completa de la estructura de la bicapa original requiere una escala de tiempo mucho más larga [21,87,88], que abarca desde nanosegundos hasta cientos de nanosegundos, y depende de manera crítica de la estructura de la bicapa [89]. Nótese que la adición de sal a los sistemas sometidos al protocolo nsPEF ha demostrado modular las escalas de tiempo características de todo el ciclo de vida de los poros [88,90].

MODELOS DE BICAPAS COMPLEJAS: UMBRALES DE EP Y CARACTERÍSTICAS DEL PORO

Umbrals de electroporación

Desde las simulaciones pioneras [21,91], que consideraron las bicapas lipídicas simples de 1,2-dioloil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) y dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), se han modelado una variedad de bicapas lipídicas para comprender los aspectos clave que pueden modular sus umbrales de electroporación. El aumento del umbral de EP tras la adición de colesterol [92-94] se estudió utilizando los protocolos de campo E [95] y de desequilibrio de carga [93]. Para el primero, un aumento constante del umbral de EP coincide con un aumento en la concentración de colesterol: fue necesario un campo eléctrico dos veces mayor para la electroporación de las bicapas con la adición de 50 mol% de colesterol. En

condiciones de μ s-msPEFs, se mostró que el umbral de EP se nivelaba por encima del 30 mol% de colesterol. En general, el aumento del umbral de EP se ha relacionado con el aumento de la rigidez de la bicapa [92,94].

En una serie de estudios[96,97], el grupo de Tarek investigó el efecto sobre el umbral de EP de los enlaces éster y éter, de colas ramificadas (fitanoil) y de grupos voluminosos (glucosil-myo y myo inositol). Los autores han descubierto que el umbral de EP de una bicapa lipídica depende no solo de las propiedades "eléctricas" de la membrana, es decir, su potencial dipolar o la capacidad de la membrana, sino también de la naturaleza de las colas hidrofóbicas de los lípidos. Los autores indican que existe una correlación entre la presión lateral en la interfaz agua / lípidos y el umbral de EP. Sugieren que un aumento de la presión lateral (en la membrana lipídica ramificada en comparación con las bicapas lipídicas simples) dificulta la difusión local de las moléculas de agua hacia el interior del núcleo hidrofóbico, lo que reduce la probabilidad de formación de poros, aumentando así el umbral de electroporación.

Comparando específicamente los lípidos de Archeal (grupos de cabeza de glucosil-myo y myo inositol) con el lípido de PC normal, los umbrales de electroporación más altos para el primero se atribuyeron [96,97] a la fuerte red de enlaces de hidrógeno que estabiliza las interacciones cabeza-grupo. Asimismo, Gurtovenko et al. [98] informaron un umbral de EP más alto para las bicapas lipídicas de fosfatidiletanolamina (PE) en comparación con las bicapas lipídicas de fosfatidilcolina (PC). Este efecto se relacionó con la unión de hidrógeno entre lípidos que tiene lugar en la bicapa de PE, lo que conduce a una interfase agua / lípidos más densa y cadenas de lípidos de hidrocarburos más ordenados. Considerando una bicapa asimétrica, compuesta por láminas de lípidos de PC y PE, los autores observaron que la característica de electroporación inicial, es decir, la formación de la columna de agua también es asimétrica, con pasos iniciales que tienen lugar principalmente en una de las capas de la bicapa de PC. Estudiando membranas de composición más complejas, Piggot et al. [99] informaron que la membrana celular de *S. aureus*, bacteria Gram-positiva, es menos resistente a la poración que la membrana externa de *E. coli*, bacteria Gram-negativa (EcOM). El umbral de EP más alto del EcOM se relacionó con la movilidad reducida de las moléculas de lipopolisacárido que se encuentran en la capa externa. Factores adicionales, como el colesterol, la presencia de impurezas y otros compuestos, pueden modificar las propiedades de permeación de los modelos de membrana al actuar sobre su estabilidad.

Características de los poros

Los resultados de MD apoyan la hipótesis de que después de la aplicación de un alto potencial transmembrana, la membrana celular se permeabiliza por la formación de poros hidrofílicos conductores estabilizados por los grupos de cabeza de los lípidos. Las propiedades de los lípidos juegan un papel determinante en el tiempo de vida de los electroporos y en sus características estructurales (por ejemplo, tamaño, forma y morfología) [87]. Otros estudios, considerando varias bicapas lipídicas, desafiaron la morfología del poro estándar. Tarek et al. señalaron que un proceso de EP particular en el que puede ser posible que grandes columnas de agua conductoras de iones de larga vida no estén estabilizadas por grupos de lípidos [93,97,100]. Estos poros conductores "hidrofóbicos" se originan a partir de restricciones de una naturaleza diferente en la bicapa lipídica. El primer informe [100] se centró en una bicapa de palmitoil-oleil-fosfatidilserina (POPS) caracterizada por grupos de cabezas cargados negativamente. Cuando este sistema estaba sujeto a un desequilibrio de carga lo suficientemente alto como para electroporar la bicapa, la migración de lípidos a lo largo de la columna de agua se ve obstaculizada en gran medida (Fig. 5, segundo panel [100]). Se sacaron conclusiones similares para las bicapas lipídicas de PC que contienen más del 30mol% de colesterol [93] o para los lípidos Arqueales [97] (Fig. 5). Esta peculiar morfología se atribuyó a la repulsión de los grupos de cabezas cargados negativamente en el primer caso [100], al efecto de condensación del colesterol en el segundo [93], y al impedimento estérico de los grupos de cabezas voluminosos junto con las colas ramificadas en el último [97].

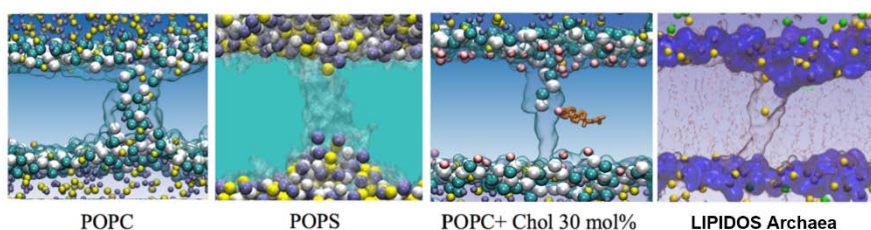


Figura 6. Diversas morfologías de poros conductores reveladas por simulaciones de MD. Nótese que aparte de los lípidos zwitteriónicos POPC, los poros formados en POPS, un lípido cargado negativamente, con la adición de colesterol, o en los lípidos complejos de Archaea (grupos de cabeza similares al azúcar), los electroporos no se estabilizan por los grupos de cabezas de lípidos.

Estabilización de los poros

Cuando se consideran las características de los electroporos (por ejemplo, tamaño, conductancia y transporte de moléculas) uno esperaría que el poro esté en un estado energéticamente favorable, es decir, uno que corresponda a una configuración estable. Para comprender si el poro puede considerarse en un estado estable para un voltaje TM dado y caracterizar su tamaño y conductancia, los dos procedimientos de MD (introducidos en secciones anteriores) deben mejorarse. En efecto, el principal inconveniente de estos dos protocolos, como se usan habitualmente, reside en la imposibilidad de mantener un poro estable. En el método del campo eléctrico, el poro tiende a expandirse, lo que lleva a la ruptura de la bicapa cuando alcanza las dimensiones de la caja de la celda de simulación. El protocolo de desequilibrio de cargas, por otro lado, tiene un inconveniente importante: el desequilibrio no se restablece durante la simulación. Por lo tanto, en los estudios realizados tanto con los esquemas de simple como de doble bicapa, el desequilibrio de carga impuesto al principio disminuye significativamente dentro de varias decenas o cientos de ps (dependiendo del tamaño del sistema) de la EP debido a un intercambio de iones a través del poro. La disminución del desequilibrio de cargas da como resultado una caída del voltaje TM, que finalmente conduce al colapso de los poros y al sellado.

Cuando se usa el protocolo nsPEF, se demostró que la disminución de la intensidad del campo eléctrico después de la creación de poros resulta en su estabilización [22]. Usando la misma estrategia, Fernández et al. [95] podían modular el tamaño del poro y demostraron que depende solo de la fuerza del campo eléctrico estabilizador. Más recientemente, nuestro grupo [101] utilizó un esquema para mantener un desequilibrio de carga constante, refinando así el enfoque de μ s-msPEF para obtener poros estables de tamaño controlado. El protocolo utilizado es idéntico al procedimiento propuesto por Kutzner et al. [84] para estudiar el transporte en canales iónicos utilizando el esquema de doble capa. En este procedimiento, denominado "intercambio", se estima frecuentemente el número de iones en los dos baños de solución y, si este último difiere de la configuración inicial, se produce un evento de "intercambio": una molécula de agua se intercambia por un ion del baño de la otra solución (consulte el material complementario para obtener más información). Nótese que para superar la limitación de simular la bicapa en el conjunto NVT (volumen constante), el procedimiento de intercambio se puede combinar con el conjunto NP γ T (tensión superficial constante) para mantener la tensión superficial de la bicapa constante (nulo) e imitar, por lo tanto, las condiciones experimentales [101].

Caracterización de los poros

Kramar et al. llevaron a cabo un primer intento de vincular la evidencia experimental de la conductancia de poros y la estimación del radio utilizando una técnica lineal de corriente ascendente combinada con simulaciones de MD realizadas en condiciones similares [102]. Sus hallazgos sugieren que la apertura y cierre de un solo poro con una conductancia bajo la escala de 100 nS sería posible para un diámetro de poro de ~ 5 nm.

Investigaciones más sistemáticas, utilizando los protocolos modificados nsPEF [95,103] y μ s-msPEF [101] permitieron caracterizar mejor la conductancia de los electroporos. Para las simulaciones realizadas bajo los dos protocolos y cuando se aplican voltajes TM por debajo del umbral de EP, el poro formado podría estabilizarse a diferentes radios durante decenas de ns. Curiosamente, los radios de los poros y la conductancia de los poros variaron casi linealmente con el voltaje aplicado. Además, se descubrió que los poros eran más selectivos para los cationes que para los aniones [101,103,104]. Esta selectividad surge de la naturaleza de las moléculas de los lípidos que constituyen el poro: los grupos fosfato cargados negativamente que forman las paredes del poro atraen iones de sodio, lo que dificulta su paso a través de la bicapa, pero también hace que el interior del poro sea electrostáticamente desfavorable para otros iones de sodio. [105] Esto sugiere que el transporte a través de electroporos es sensible al tipo de solutos, mostrando una afinidad diferente por las diferentes especies cargadas.

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS

Aunque numerosas moléculas están implicadas en la EP y/o afectadas por sus aplicaciones (por ejemplo, fármacos, material genético, colorantes, etc.), muy pocas han sido investigadas con simulaciones de MD. Además de unos pocos estudios en los que se reportó el fenómeno de flip-flop de lípidos PC zwitteriónicos mediado por electroporos [106-108], la mayoría de las simulaciones se refieren a especies cargadas para las cuales el transporte implica electroforesis [21,77,109]. A continuación, discutimos los resultados obtenidos usando los dos protocolos de simulación. Los nsPEF pueden inducir la externalización de fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés), un fosfolípido generalmente confinado a la capa interna de la membrana plasmática que puede desencadenar varias funciones de reconocimiento, unión y señalización. Los estudios de MD de las bicapas de PS [19,110] mostraron cómo la externalización de PS es un evento

mediado por poros que ocurre exclusivamente con una deriva electroforética.

Hace una década, Tarek [21] informó sobre la primera simulación de MD sobre el transporte de una cadena doble de ADN corta utilizando campos eléctricos de alta intensidad. Se demostró que la absorción se produjo solo en presencia del poro por deriva electroforética. Desde entonces, hasta donde sabemos, solo se han publicado dos estudios de MD sobre el transporte de moléculas bajo nsPEFs. En 2012, Breton et al. [77] mostraron que un solo pulso eléctrico de alto voltaje de 10 ns puede permeabilizar las vesículas unilamelares gigantes (GUV) y permite la entrega de un ARNsi bicatenario (carga $-42e$, 13,89 kDa) a través del poro formado, por electroforesis (Fig. 7 [77]). Al comparar la evidencia experimental con las simulaciones de MD, pudieron mostrar en particular que: (i) después de la aplicación de un campo eléctrico, el ARNsi es empujado hacia los grupos de cabeza de lípidos formando un complejo que permanece estable incluso cuando se desactiva el pulso; (ii) no se detecta transporte para campos eléctricos aplicados por debajo del umbral EP; (iii) cuando el E_{app} está por encima del umbral EP (E_{th}), el ARNsi se extrae electroforéticamente a través del electroporo y se transloca, dentro de una escala de tiempo de 10 ns; (iv) si el E_{app} se apaga antes de la transición completa, el poro colapsa alrededor de la molécula quedando, por lo tanto, atrapada.

Recientemente, Salomone et al. [109] utilizaron una combinación de nsPEF y péptidos quiméricos (CM18-Tat11) como vectores de transfección eficientes para el ADN plasmídico utilizando vesículas endocíticas. Para proporcionar detalles moleculares sobre los procesos que tienen lugar, los autores modelaron el péptido y sus fragmentos. De simulaciones de MD ellos reportaron que, cuando está sujeto a campos eléctricos altos, Tat11, un pequeño péptido catiónico (residuos 47-57 de la proteína Tat VIH-1; $+8e$ carga, 1,50 kDa) puede translocarse a través de una bicapa electroporada en pocos nanosegundos sin interactuar con los grupos de cabeza de fosfolípidos. Por el contrario, el péptido anfipático CM18, incluso cuando se encuentra cerca de un poro preformado, permanece anclado a los grupos de cabeza de los lípidos y no se transloca durante un pulso de campo eléctrico alto de 12 ns.

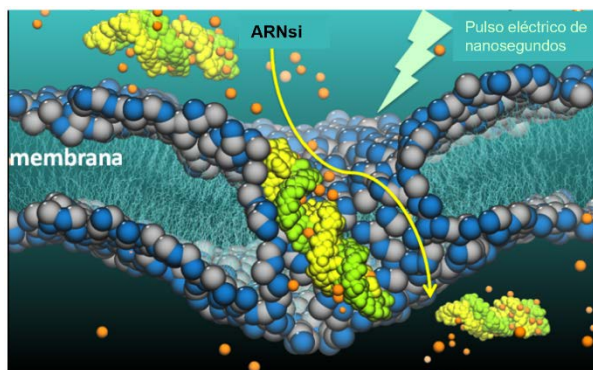


Figura 7. Un solo pulso eléctrico de alto voltaje de 10 ns puede permeabilizar las vesículas lipídicas y permitir la transferencia de ARNsi al citoplasma. La combinación de experimentos y simulaciones de dinámica molecular nos ha permitido proporcionar los mecanismos moleculares detallados de dicho transporte y proporcionar una guía práctica para el diseño de protocolos destinados a utilizar la electrotransferencia de ARNsi con pulsos de nanosegundos en aplicaciones médicas y biotecnológicas [77].

μs-msPEFs

A continuación, presentamos los últimos resultados de simulaciones de MD de la captación de moléculas a través de bicapas lipídicas sujetas a μs-msPEFs. Centramos nuestra atención en Tat11 y la doble cadena de ARNsi para comparar su mecanismo de transporte con el que se informa utilizando los nsPEFs [77,109]. Estos datos han sido reportados en [111].

Transporte de ARNsi

En 2011 Paganin-Gioanni et al. [76] investigaron la captación de ARNsi por las células de melanoma murino, cuando se sometieron a pulsos eléctricos (1 Hz de frecuencia de repetición) utilizando microscopía confocal de fluorescencia de lapso. Se observó una transferencia directa al citoplasma celular del ARNsi cargado negativamente a través de la membrana plasmática exclusivamente en el lado que mira hacia el cátodo. Observando que cuando se agrega después de la electropulsación, el ARNsi era ineficiente para silenciar los genes porque no penetraba en la célula, los autores concluyeron que el transporte de ARNsi tiene lugar durante el pulso eléctrico y se debe a la electroforesis a través de los electroporos. El mismo grupo informó también que los pulsos de 0,17 kV/cm – 5 ms, llamados pulsos de EGT, son más efectivos en términos de silenciamiento que los

pulsos de HV más intensos y menos duraderos (1,3 kV/cm – 0,1 ms). Por otro lado, mostraron que un procedimiento de doble pulso, que consiste en un HV seguido de un pulso largo por debajo del umbral de EP, no aumenta la eficiencia de la transfección. En conjunto, su evidencia sugiere que, para msPEF, los factores clave para una entrega eficiente son el voltaje por encima del umbral EP y la duración del pulso.

Para investigar la transferencia de ARNsi a las células en condiciones similares a los experimentos μ s-msPEFs, hemos realizado un conjunto de simulaciones en las que el sistema estaba sujeto a varios voltajes (ver Tabla 1). Primero electroporamos un parche de bicapa sometándolo a un desequilibrio de alta carga. Una vez que el poro era lo suficientemente grande (valor arbitrario de ~ 2 nm de radio) bajamos ΔQ s para estabilizarlo a diferentes radios como en [101]. Estas configuraciones se usaron luego para comenzar las simulaciones con ARNsi colocado cerca de la boca del poro y continuaron al voltaje deseado.

Tabla 1. Radio de poro R y tiempo de cruce t_c estimado en voltajes TM específicos (U_m) para las dos moléculas consideradas. El radio del poro (diámetro) se estima como la distancia mínima de lípido a lípido a lo largo de la luz del poro.

Sistema	t_s (ns)	U_m (V)	R (nm)	t_c (ns)
POPC_1024+ARNsi	100	0.16 ± 0.16	2.0 ± 0.6	> 100
	35	0.55 ± 0.19	3.3 ± 0.2	32.5
POPC_1024+Tat11	40	0.43 ± 0.16	1.6 ± 0.2	32.8
	14	0.70 ± 0.24	2.0 ± 0.1	11.3

t_s - tiempo de simulación; U_m - potencial transmembrana creado por el desequilibrio de carga; R - radio de poro mínimo mantenido por una U_m dada (ver SM); t_c : tiempo de cruce de la molécula a través del electroporo.

Para los voltajes transmembrana más bajos U_m , el ARNsi se acercó a la boca de poro grande (~ 4 nm de diámetro) y luego comenzó a deslizarse a través de ella mientras interactuaba con los grupos de lípidos que la recubren. Sin embargo, la translocación completa del ARNip no se produjo dentro de las primeras 100 ns de la ejecución. En una ejecución completamente independiente, repetimos la simulación manteniendo un voltaje más alto, es decir, 0,55 V. La aproximación del ARNsi, la entrada en los poros y el deslizamiento en estas condiciones (Fig. 7) fueron similares a la ejecución de voltaje más bajo. Sin embargo, a 0,55 V a pesar de su anclaje a los grupos de cabeza de los lípidos, ocurrió una translocación completa del baño de agua superior al inferior en ~ 30 ns. Dos factores contribuyeron probablemente a esta aceleración. En comparación con las

condiciones anteriores, no solo la fuerza electroforética que tira del ARNip es realmente mayor, sino que el tamaño de poro también aumenta bajo este voltaje más alto.

En conjunto, las simulaciones que imitan los experimentos de μ s-msPEFs demuestran que la translocación de ARNsi a través del poro conducido por la aplicación de voltajes TM superiores a 0,5 V tiene lugar en la escala de tiempo de nanosegundos, como se informó para los nsPEFs. Notablemente, tanto en simulaciones realizadas bajo campo eléctrico o como bajo desequilibrio de cargas, el ARNsi permanece anclado a la capa inferior de la membrana después de la translocación, sin difundirse hacia el interior de la solución en grandes cantidades, incluso si se mantiene el voltaje.

Los experimentos realizados en células de melanoma de ratón que aplican pulsos de ms de largo evidenciaron que ajustar la duración del pulso es esencial para una captación eficaz de ARNsi. De hecho, los autores encontraron más efectiva la clase de pulsos EGT (0,17 kV/cm, 5 ms) que la HV (1,3 kV/cm, 0,1 ms). No se realizó una medición directa del voltaje TM durante estos experimentos y los autores suponen que está alrededor de 0,25 V, ya que se observó que el valor umbral de EP siempre es de aproximadamente 0,20 mV para muchos sistemas celulares diferentes [112]. Corroborado por nuestros hallazgos, se puede especular que el transporte de ARNsi cuando está sujeto a pulsos más largos podría facilitarse mediante la formación de una población de poros con diámetros más grandes. Esta población de poros más grandes permitiría que los ARNsi fluyan a través del poro y accedan directamente al citoplasma, aumentando la eficiencia del transporte.

Transporte de Tat11

La translocación para Tat11 difiere del ARNsi altamente cargado porque no se producen interacciones específicas entre este péptido y los grupos de lípidos durante el proceso, lo que resulta en una absorción más rápida. Bajo un voltaje TM $U_m \sim 0,70$ V, la molécula, inicialmente paralela a la membrana y ubicada cerca de la abertura del poro, primero gira para alinear su dipolo a lo largo del campo eléctrico local (Fig. 10, $t = 0$ ns), luego se desplaza a través del centro del poro con un radio de 2 nm (Fig. 10, $t = 8$ ns), en la misma escala de tiempo informada por el procedimiento nsPEFs [109]. El Tat11 llega al baño inferior donde se difunde libremente (Fig. 8, $t = 12$ ns). A U_m más bajos ($\sim 0,43$ V) Tat11 se transloca en 32.8 ns (ver Tabla 1), presumiblemente como consecuencia de una mayor resistencia del poro (el radio del poro disminuye a 0,4 nm) y de una reducción de la deriva electroforética.

Considerando un parche de 256 lípidos y aplicando un campo eléctrico que genera 1,6 V a través de la bicapa, Salomone et al. [109] informaron que Tat11 se transloca a través de un electroporo dentro de los 10 ns. Esto parece inconsistente con nuestros resultados, ya que uno debería esperar que bajo nuestras condiciones, es decir, sujeto a un voltaje U_m de $\sim 0,43$ V, el tiempo necesario para el transporte Tat11 debería ser mucho más largo. De hecho, si se considera solo la proporción de electroforesis, la translocación de Tat11 debería ser tres veces más lenta con el voltaje más bajo. Además, una segunda inconsistencia concierne a los tamaños de los poros creados. De hecho, en [109] el poro creado tiene un radio de $\sim 1,7$ nm, mucho más pequeño de lo esperado a partir de nuestros resultados: generamos un poro de radio $\sim 1,6$ nm bajo $U_m \sim 0,43$ V (Tabla 1). Recientemente hemos reportado efectos de tamaño en las simulaciones de la electroporación de las bicapas lipídicas, y mostramos específicamente que los parches de 256 lípidos son demasiado pequeños para estudiar la electroporación: los poros generados en las simulaciones de MD que utilizan dichos parches son mucho más pequeños que los generados con parches más grandes (1024 lípidos).

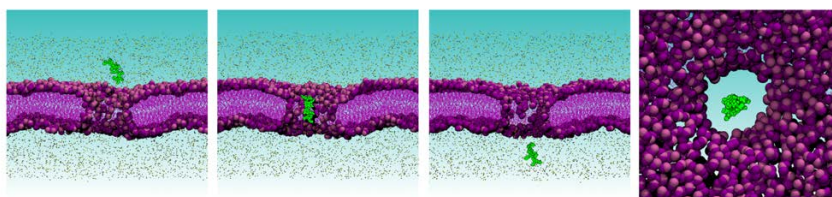


Figura 8. El proceso de transporte Tat11 en tres fotogramas correspondientes a 0, 8 y 12 ns. En el panel derecho, la vista superior claramente no muestra interacciones entre la molécula y las paredes de los poros. Los grupos de cabeza de POPC se muestran como cuentas de color malva y violeta, las colas como líneas moradas; los iones de sodio y cloruro están coloreados en amarillo y gris; Tat11 es verde (adaptado de [111]).

A pesar de estas discrepancias, es muy interesante observar que tanto al aplicar un campo eléctrico como un desequilibrio de cargas, la translocación de una molécula pequeña cargada como Tat11 ocurre en la escala de decenas de nanosegundos.

Discusión y perspectivas futuras

Un objetivo actual para mejorar nuestra comprensión de la EP es el desarrollo de una descripción microscópica integral del fenómeno, lo que no es una tarea fácil debido a las dimensiones a nanoescala del electroporo y la escala de tiempo corta (nanosegundos) de la creación de los mismos, que representan un desafío para la observación experimental directa. Por estas razones, las simulaciones de dinámica molecular se han vuelto extremadamente importantes para estudiar la EP a nivel atómico. En la última década, se han llevado a cabo una gran cantidad de simulaciones de MD para modelar el efecto de los campos eléctricos en las membranas, proporcionando quizás el modelo molecular más completo del proceso de EP de las bicapas lipídicas.

Nuestra investigación de la electrotransferencia de pequeñas moléculas cargadas, ARNsi (-42e) y Tat11 (+ 8e) a través de un modelo de membrana celular sujeto a campos eléctricos pulsados de microsegundos (μ s-msPEFs) proporcionó una nueva visión. Para voltajes transmembrana de unos pocos cientos de milivoltios, informamos para ARNsi de una translocación cruzada completa de un lado de la bicapa al otro dentro en varias decenas de nanosegundos a pesar de su fuerte anclaje con los grupos de cabeza de los fosfolípidos zwitteriónicos. Tat11, por otro lado, se transporta (dentro de ~ 10 ns) sin ninguna interacción con el poro. Curiosamente, para ambas moléculas, encontramos que el proceso de transporte tiene lugar en la misma escala de tiempo (nanosegundos) que con pulsos mucho más cortos (nsPEFs) informados previamente. Es importante destacar que los experimentos se realizan en células, mientras que nuestra investigación se refiere a las bicapas lipídicas. En las células, también se debe considerar el citoesqueleto y las posibles interacciones con las moléculas, por ejemplo, con el ARNsi, en su camino hacia el citosol, ralentizando el proceso de translocación.

En resumen, hemos diseñado protocolos de MD adecuados para la caracterización del transporte de especies no cargadas y cargadas impulsadas por μ s-msPEF que pueden ayudar a arrojar luz sobre el mecanismo de absorción de fármacos a través de las membranas celulares. Se espera que los estudios sistemáticos realizados con este protocolo en presencia de otros fármacos relevantes (por ejemplo, bleomicina) o colorantes (por ejemplo, yoduro de propidio, YO-PRO, etc.) amplíen drásticamente nuestra comprensión del mecanismo de absorción, y por lo tanto proporcionen información adicional que conduzca a mejoras en las técnicas experimentales y en su efectividad terapéutica.

Vale la pena mencionar otro aspecto que también debe considerarse al estudiar el efecto del campo eléctrico en las células. Hace más de una década se sugirió que las membranas pueden oxidarse con la electroporación. La evidencia experimental indica, en efecto, que los campos eléctricos pulsados pueden aumentar el grado en que se produce la peroxidación de la cadena de acilo lipídico. En particular, se ha demostrado que la aplicación de campos eléctricos externos altera la composición de fosfolípidos y las propiedades de los liposomas, las vesículas y células [113-119]. Se sabe que la presencia de lípidos oxidados dentro de las biomembranas modifica sus propiedades físicas y, en particular, su permeabilidad [120-123]. Por lo tanto, no podemos descartar que la captación bajo los experimentos de PEF pueda tener lugar, al menos parcialmente, a través de la difusión a través de bicapas lipídicas oxidadas/permeabilizadas y no únicamente a través de los electroporos. Las simulaciones en esta línea deberían mejorar nuestra caracterización del electro-transporte de moléculas a través de membranas conducidas por campos eléctricos.

Referencias

- [1] N. Eberhard, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, *Electroporation and electrofusion in cell biology*. New York: Plenum Press, 1989.
- [2] J. A. Nickoloff, *Animal cell electroporation and electrofusion protocols*, vol. 48. Totowa, NJ: Humana Press, 1995.
- [3] S. Li, *Electroporation protocols: preclinical and clinical gene medicine*, vol. 423. Totowa, NJ.: Humana press, 2008.
- [4] R. B. Gennis, *Biomembranes: molecular structure and function*. Heidelberg: Spring Verlag, 1989.
- [5] I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko, and M. P. Tarasevich, "Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 104, no. C, pp. 37–52, 1979.
- [6] R. Benz, F. Beckers, and U. Zimmerman, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes - Charge-pulse relaxation study," *J. Membr. Biol.*, vol. 48, pp. 181–204, 1979.
- [7] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, no. 2. Elsevier Science S.A., pp. 135–160, 1996.
- [8] J. C. Weaver, "Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 10, pp. 754–768, 2003.
- [9] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, and J. A. Evans, "Membrane electroporation theories: A review," *Medical and Biological Engineering and*

- Computing*, vol. 44, no. 1–2. pp. 5–14, 2006.
- [10] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valic, and D. Miklavcic, “Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, pp. 642–652, 2006.
 - [11] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, and T. J., “Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporabilized cells,” *Biophys. J.*, vol. 95, pp. 2837–2848, 2008.
 - [12] D. C. Chang, “Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy,” in *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Orlando, Florida: Academic Press, 1992, pp. 9–27.
 - [13] D. P. Tieleman, S.-J. Marrink, and H. J. C. Berendsen, “A Computer Perspective of Membranes: Molecular Dynamics Studies of Lipid Bilayer Systems,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1331, no. 3, pp. 235–270, 1997.
 - [14] D. J. Tobias, K. Tu, and M. L. Klein, “Assessment of all-atom potentials for modeling membranes: Molecular dynamics simulations of solid and liquid alkanes and crystals of phospholipid fragments,” *J. Chim. Phys.*, vol. 94, pp. 1482–1502, 1997.
 - [15] L. R. Forrest and M. S. P. Sansom, “Membrane simulations: bigger and better,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 10, pp. 174–181, 2000.
 - [16] S. E. Feller, “Molecular dynamics simulations of lipid bilayers,” *Curr. Opin. Coll. In.*, vol. 5, pp. 217–223, 2000.
 - [17] C. Chipot, M. L. Klein, M. Tarek, and S. Yip, “Modeling lipid membranes,” in *Handbook of Materials Modeling*, S. Yip, Ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2005, pp. 929–958.
 - [18] S. J. Marrink, A. H. de Vries, and D. P. Tieleman, “Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves,” *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, vol. 1788, pp. 149–168, 2009.
 - [19] Q. Hu, S. Viswanadham, R. P. Joshi, K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, and P. F. Blackmore, “Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 71, no. 3, p. 31914, 2005.
 - [20] D. P. Tieleman, “The molecular basis of electroporation,” *BMC Biochem.*, vol. 5, no. 1, p. 10, Jan. 2004.
 - [21] M. Tarek, “Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 6. pp. 4045–4053, 2005.
 - [22] R. A. Böckmann, B. L. de Groot, S. Kakorin, E. Neumann, and H. Grubmüller, “Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, pp. 1837–1850, 2008.
 - [23] M. J. Ziegler and P. T. Vernier, “Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers,” *J. Phys Chem. B*, vol. 112, pp. 13588–13596, 2008.
 - [24] M. P. Allen and D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*. Oxford: Clarendon Press, 1987.

- [25] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, Second Edi. Prentice Hall, 2001.
- [26] L. D. Schuler, X. Daura, and W. F. van Gunsteren, "An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase," *J. Comp. Chem.*, vol. 22, pp. 1205–1218, 2001.
- [27] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorcikiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, pp. 3586–3616, 1998.
- [28] D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V Stanton, A. L. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, R. J. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G. L. Seibel, and U. C. Singh, *AMBER6*. San Francisco: University of California, 1999.
- [29] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. and Mackerell, "CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-Like Molecules Compatible With the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields," *J. Comp. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010.
- [30] A. Warshel, M. Kato, and A. V Pisiakov, "Polarizable force fields: history, test cases, and prospects," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, pp. 2034–2045, 2007.
- [31] T. A. Halgren and W. Damm, "Polarizable force fields," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, pp. 236–242, 2001.
- [32] E. Lindahl and O. Edholm, "Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations," *Biophys. J.*, vol. 79, pp. 426–433, 2000.
- [33] S. J. Marrink and A. E. Mark, "Effect of undulations on surface tension in simulated bilayers.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, pp. 6122–6127, 2001.
- [34] S.W. Chiu, M. Clark, E. Jakobsson, S. Subramaniam, and H. L. Scott, "Optimization of hydrocarbon chain interaction parameters: Application to the simulation of fluid phase lipid bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, pp. 6323–6327, 1999.
- [35] T. Rög, K. Murzyn, and M. Pasenkiewicz-Gierula, "The dynamics of water at the phospholipid bilayer: A molecular dynamics study," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 352, pp. 323–327, 2002.
- [36] L. Saiz and M. L. Klein, "Computer simulation studies of model biological membranes," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, pp. 482–489, 2002.
- [37] S. E. Feller, K. Gawrisch, and A. D. MacKerell, "Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, pp. 318–326, 2002.
- [38] M. L. Berkowitz and M. J. Raghavan, "Computer simulation of a water/membrane interface," *Langmuir*, vol. 7, pp. 1042–1044, 1991.

-
- [39] K. V. Damodaran and K. M. Merz, "A comparison of dmpe and dlpe based lipid bilayers," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 1076–1087, 1994.
 - [40] J. J. L. Cascales, J. G. de la Torre, S. J. Marrink, and H. J. C. Berendsen, "Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane," *J. Chem. Phys.*, vol. 104, pp. 2713–2720, 1996.
 - [41] P. Mukhopadhyay, L. Monticelli, and D. P. Tieleman, "Molecular dynamics simulation of a palmitoyl-oleoyl phosphatidylserine bilayer with Na⁺ Counterions and NaCl," *Biophys. J.*, vol. 86, pp. 1601–1609, 2004.
 - [42] S. W. Chiu, S. Vasudevan, E. Jakobsson, R. J. Mashl, and H. L. Scott, "Structure of sphingomyelin bilayers: A simulation study," *Biophys. J.*, vol. 85, pp. 3624–3635, 2003.
 - [43] A. S. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz, "Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl," *Biophys. J.*, vol. 84, pp. 3743–3750, 2003.
 - [44] R. Y. Patel and P. V. Balaji, "Characterization of symmetric and asymmetric lipid bilayers composed of varying concentrations of ganglioside GM1 and DPPC," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 3346–3356, 2008.
 - [45] M. Dahlberg and A. Maliniak, "Molecular dynamics simulations of cardiolipin bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 11655–11663, 2008.
 - [46] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, "Effect of NaCl and KCl on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipid membranes: Insight from atomic-scale simulations for understanding salt-induced effects in the plasma membrane," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 1953–1962, 2008.
 - [47] R. Vacha, M. L. Berkowitz, and P. Jungwirth, "Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: Water permeation and ion effects," *Biophys. J.*, vol. 96, pp. 4493–4501, 2009.
 - [48] T. Rog, H. Martinez-Seara, N. Munck, M. Oresic, M. Karttunen, and I. Vattulainen, "Role of cardiolipins in the inner mitochondrial membrane: Insight gained through atom-scale simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, pp. 3413–3422, 2009.
 - [49] Z. Li, R. M. Venable, L. A. Rogers, D. Murray, and R. W. Pastor, "Molecular dynamics simulations of PIP2 and PIP3 in lipid bilayers: Determination of ring orientation, and the effects of surface roughness on a poisson-boltzmann description," *Biophys. J.*, vol. 97, pp. 155–163, 2009.
 - [50] M. Tarek, D. J. Tobias, S. H. Chen, and M. L. Klein, "Short wavelength collective dynamics in phospholipid bilayers: a molecular dynamics study," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, p. 238101, 2001.
 - [51] C. Anézo, A. H. de Vries, H. D. Höltje, D. P. Tieleman, and S. J. Marrink, "Methodological issues in lipid bilayer simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, pp. 9424–9433, 2003.
 - [52] S. J. Beebe and K. H. Schoenbach, "Nanosecond pulsed electric fields: A new stimulus to activate intracellular signaling," *J. Biomed. Biotech.*, vol. 4, pp. 297–300, 2005.
 - [53] Z. Vasilkoski, A. T. Esser, T. R. Gowrishankar, and J. C. Weaver, "Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore

- creation,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 74, no. 2, 2006.
- [54] R. Sundararajan, “Nanosecond electroporation: another look,” *Mol. Biotech.*, vol. 41, pp. 69–82, 2009.
- [55] J. Deng, K. H. Schoenbach, E. Stephen Buescher, P. S. Hair, P. M. Fox, and S. J. Beebe, “The Effects of Intense Submicrosecond Electrical Pulses on Cells,” *Biophys. J.*, vol. 84, no. 4, pp. 2709–2714, Apr. 2003.
- [56] H. Pauly and H. P. Schwan, “Über Die Impedanz Einer Suspension Von Kugelformigen Teilchen Mit Einer Schale - Ein Modell Fur Das Dielektrische Verhalten Von Zellsuspensionen Und Von Proteinlosungen,” *Z Naturforsch B*, vol. 14, no. 2, pp. 125–131, 1959.
- [57] T. Kotnik, D. Miklavcic, and T. Slivnik, “Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields - a method for theoretical analysis and its application ,” *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 45, no. 1, pp. 3–16, 1998.
- [58] T. Kotnik and D. Miklavcic, “Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields,” *Biophys J*, vol. 90, no. 2, pp. 480–491, 2006.
- [59] Q. Zhong, Q. Jiang, P. B. Moore, D. M. Newns, and M. L. Klein, “Molecular dynamics simulation of a synthetic ion channel,” *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 3–10, 1998.
- [60] Y. Yang, D. Henderson, P. Crozier, R. L. Rowley, and D. D. Busath, “Permeation of ions through a model biological channel: effect of periodic boundary condition and cell size. ,” *Molec. Phys*, vol. 100, pp. 3011–3019, 2002.
- [61] D. P. Tieleman, J. H. C. Berendsen, and M. S. P. Sansom, “Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane water interfaces,” *Biophys. J.*, vol. 80, pp. 331–346, 2001.
- [62] P. S. Crozier, D. Henderson, R. L. Rowley, and D. D. Busath, “Model channel ion currents in NaCl extended simple point charge water solution with applied-field molecular dynamics,” *Biophys. J.*, vol. 81, pp. 3077–3089, 2001.
- [63] B. Roux, “The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations,” *Biophys J*, vol. 95, pp. 4205–4216, 2008.
- [64] P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, W. V Chang, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman, “Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 19, pp. 6288–6289, 2006.
- [65] W. Treptow, B. Maigret, C. Chipot, and M. Tarek, “Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: a model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel,” *Biophys. J.*, vol. 87, pp. 2365–2379, 2004.
- [66] A. Aksimentiev and K. Schulten, “Imaging a-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map,” *Biophys. J.*, vol. 88, pp. 3745–3761, 2005.
- [67] F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten, “Dynamics of K⁺ ion conduction through Kv1.2. ,” *Biophys. J.*, vol. 91, pp. L72–L74, 2006.
- [68] M. Sotomayor, V. Vasquez, E. Perozo, and K. Schulten, “Ion conduction through MscS as determined by electrophysiology and simulation,” *Biophys. J.*,

- vol. 92, pp. 886–902, 2007.
- [69] C. Chimere, L. Movileanu, S. Pezeshki, M. Winterhalter, and U. Kleinekathofer, “Transport at the nanoscale: temperature dependence of ion conductance,” *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, vol. 38, pp. 121–125, 2008.
 - [70] D. J. Tobias, “Electrostatic calculations: recent methodological advances and applications to membranes,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, pp. 253–261, 2001.
 - [71] K. Gawrisch, D. Ruston, J. Zimmerberg, V. Parsegian, R. Rand, and N. Fuller, “Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces,” *Biophys. J.*, vol. 61, pp. 1213–1223, 1992.
 - [72] P. T. Vernier and M. J. Ziegler, “Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 45, pp. 12993–12996, 2007.
 - [73] Z. A. Levine and P. T. Vernier, “Life cycle of an electropore: Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation,” *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 27–36, 2010.
 - [74] Z. A. Levine and P. T. Vernier, “Calcium and phosphatidylserine inhibit lipid electropore formation and reduce pore lifetime,” *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 10, pp. 599–610, 2012.
 - [75] M. Golzio, J. Teissie, and M.-P. Rols, “Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, pp. 1292–1297, 2002.
 - [76] a Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, and M. Golzio, “Direct visualization at the single-cell level of ARNsi electrotransfer into cancer cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 26, pp. 10443–10447, 2011.
 - [77] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, and M. Tarek, “Transport of ARNsi through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: an experimental and computational study,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 34, pp. 13938–13941, Aug. 2012.
 - [78] J. N. Sachs, P. S. Crozier, and T. B. Woolf, “Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients,” *J. Chem. Phys.*, vol. 121, pp. 10847–10851, 2004.
 - [79] L. Delemotte, F. Dehez, W. Treptow, and M. Tarek, “Modeling membranes under a transmembrane potential,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 18, pp. 5547–5550, 2008.
 - [80] L. Delemotte and M. Tarek, “Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation,” *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 9, pp. 531–543, 2012.
 - [81] B. Roux, “Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein,” *Biophys. J.*, vol. 73, pp. 2980–2989, 1997.
 - [82] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, “Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge Imbalance: Atomistic Molecular Dynamics Study,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 50, pp. 17570–17571, 2005.

-
- [83] S. K. Kandasamy and R. G. Larson, "Cation and anion transport through hydrophilic pores in lipid bilayers," *J. Chem. Phys.*, vol. 125, p. 74901, 2006.
- [84] Kutzner C, Grubmüller H, de Groot BL, and Z. U., "Computational electrophysiology: the molecular dynamics of ion channel permeation and selectivity in atomistic detail," *Biophys J*, vol. 101, pp. 809–817, 2011.
- [85] Y. A. Liberman and V. P. Topaly, "Permeability of biomolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions," *Biophys. USSR*, vol. 14, p. 477, 1969.
- [86] S. J. Marrink, F. Jähnig, and H. J. Berendsen, "Proton transport across transient single-file water pores in a lipid membrane studied by molecular dynamics simulations," *Biophys J*, vol. 71, pp. 632–647, 1996.
- [87] M.-C. Ho, Z. A. Levine, and P. T. Vernier, "Nanoscale, Electric Field-Driven Water Bridges in Vacuum Gaps and Lipid Bilayers," *J. Membr. Biol.*, vol. 246, no. 11, pp. 793–801, May 2013.
- [88] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 27–36, Jul. 2010.
- [89] W. F. D. Bennett and D. P. Tieleman, "The importance of membrane defects-lessons from simulations.," *Acc. Chem. Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 2244–51, 2014.
- [90] U. Pliquet, R. P. Joshi, V. Sridhara, and K. H. Schoenbach, "High electrical field effects on cell membranes.," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 275–282, 2007.
- [91] D. P. Tieleman, H. Leontiadou, A. E. Mark, and S. J. Marrink, "Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 21, pp. 6382–6383, 2003.
- [92] S. Koronkiewicz and S. Kalinowski, "Influence of cholesterol on electroporation of bilayer lipid membranes: chronopotentiometric studies," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1661, no. 2, pp. 196–203, Mar. 2004.
- [93] M. Casciola, D. Bonhenry, M. Liberti, F. Apollonio, and M. Tarek, "A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: comparison of electroporation protocols.," *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 11–17, Dec. 2014.
- [94] S. Kakorin, U. Brinkmann, and E. Neumann, "Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles," *Biophys. Chem.*, vol. 117, no. 2, pp. 155–171, 2005.
- [95] M. L. Fernández, M. Risk, R. Reigada, and P. T. Vernier, "Size-controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 2, pp. 325–330, 2012.
- [96] A. Polak, D. Bonhenry, F. Dehez, P. Kramar, D. Miklavčič, and M. Tarek, "On the electroporation thresholds of lipid bilayers: molecular dynamics simulation investigations.," *J. Membr. Biol.*, vol. 246, no. 11, pp. 843–850, Nov. 2013.
- [97] A. Polak, M. Tarek, M. Tomšič, J. Valant, N. P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, and D. Miklavčič, "Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations," *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 18–26, 2014.
- [98] A. A. Gurtovenko and A. S. Lyulina, "Electroporation of asymmetric phospholipid membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 33, pp. 9909–9918, 2014.

-
- [99] T. J. Piggot, D. A. Holdbrook, and S. Khalid, "Electroporation of the E. coli and S. aureus membranes: Molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 45, pp. 13381–13388, 2011.
 - [100] F. Dehez, L. Delemotte, P. Kramar, D. Miklavčič, and M. Tarek, "Evidence of conducting hydrophobic nanopores across membranes in response to an electric field," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 13, pp. 6752–6757, 2014.
 - [101] M. Casciola, M. A. Kasimova, L. Rems, S. Zullino, F. Apollonio, and M. Tarek, "Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance," *Bioelectrochemistry*, vol. 109, pp. 108–116, 2016.
 - [102] P. Kramar, L. Delemotte, A. Maček Lebar, M. Kotulska, M. Tarek, and D. Miklavčič, "Molecular-level characterization of lipid membrane electroporation using linearly rising current," *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 10, pp. 651–659, Oct. 2012.
 - [103] M. C. Ho, M. Casciola, Z. A. Levine, and P. T. Vernier, "Molecular dynamics simulations of ion conductance in field-stabilized nanoscale lipid electropores," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 39, pp. 11633–11640, 2013.
 - [104] H. Leontiadou, A. E. Mark, and S.-J. Marrink, "Ion transport across transmembrane pores," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 12, pp. 4209–4215, Jun. 2007.
 - [105] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, "Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 6, pp. 1878–1890, 2007.
 - [106] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, "Molecular mechanism for lipid flip-flops," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 48, pp. 13554–13559, 2007.
 - [107] A. A. Gurtovenko, J. Anwar, and I. Vattulainen, "Defect-Mediated Trafficking across Cell Membranes: Insights from in Silico Modeling," 2010.
 - [108] V. Sridhara and R. P. Joshi, "Numerical study of lipid translocation driven by nanoporation due to multiple high-intensity, ultrashort electrical pulses," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 3, pp. 902–909, 2014.
 - [109] F. Salomone, M. Breton, I. Leray, F. Cardarelli, C. Boccardi, D. Bonhenry, M. Tarek, L. M. Mir, and F. Beltram, "High-yield nontoxic gene transfer through conjugation of the CM 18-Tat11 chimeric peptide with nanosecond electric pulses," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 7, pp. 2466–2474, 2014.
 - [110] P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman, "Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers- in cells and in silico," *Phys. Biol.*, vol. 3, pp. 233–247, 2006.
 - [111] M. Casciola and M. Tarek, "A molecular insight into the electro-transfer of small molecules through electropores driven by electric fields," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2016.
 - [112] J. Teissie and M. P. Rols, "An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell-Membrane Electroporabilization," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 409–413, 1993.
 - [113] L. C. Benov, P. A. Antonov, and S. R. Ribarov, "Oxidative damage of the

- membrane-lipids after electroporation,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 13, no. 2, pp. 85–97, Apr. 1994.
- [114] B. Gabriel and J. Teissie, “Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 223, no. 1, pp. 25–33, Jul. 1994.
- [115] M. Maccarrone, M. R. Bladergroen, N. Rosato, and A. F. Agro, “Role of Lipid Peroxidation in Electroporation-Induced Cell Permeability,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 209, no. 2, pp. 417–425, Apr. 1995.
- [116] M. Maccarrone, N. Rosato, and A. F. Agro, “Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 206, no. 1, pp. 238–245, Jan. 1995.
- [117] Y. Zhou, C. K. Berry, P. A. Storer, and R. M. Raphael, “Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1298–1306, Feb. 2007.
- [118] O. N. Pakhomova, V. A. Khorokhorina, A. M. Bowman, R. Rodaitė-Riševičienė, G. Saulis, S. Xiao, and A. G. Pakhomov, “Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 527, no. 1, pp. 55–64, Nov. 2012.
- [119] M. Breton, M. Amirkavei, and L. M. Mir, “Optimization of the Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with Unsaturated Phospholipids,” *J. Membr. Biol.*, vol. 248, no. 5, pp. 827–835, Oct. 2015.
- [120] P. Jurkiewicz, A. Olżyńska, L. Cwiklik, E. Conte, P. Jungwirth, F. M. Megli, and M. Hof, “Biophysics of Lipid Bilayers Containing Oxidatively Modified Phospholipids: Insights from Fluorescence and EPR Experiments and from MD Simulations,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 10, pp. 2388–2402, 2012.
- [121] P. T. Vernier, Z. A. Levine, Y.-H. Wu, V. Joubert, M. J. Ziegler, L. M. Mir, and D. P. Tieleman, “Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane,” *PLoS One*, vol. 4, no. 11, p. e7966, Jan. 2009.
- [122] L. Beranova, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof, and P. Jungwirth, “Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations,” *Langmuir*, vol. 26, no. 9, pp. 6140–6144, May 2010.
- [123] S. Kalghatgi, C. S. Spina, J. C. Costello, M. Liesa, J. R. Morones-Ramirez, S. Slomovic, A. Molina, O. S. Shirihai, and J. J. Collins, “Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 192, p. 192ra85, 2013.

Agradecimientos

Las simulaciones presentadas en este trabajo se beneficiaron del acceso a los recursos de HPC del Centre Informatique National de l’Enseignement Supérieur (CINES) FRANCIA. Los autores desean agradecer las discusiones muy fructíferas y esclarecedoras con Damijan

Miklavčič, Luis Mir y Thomas Vernier. Investigación realizada en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA). M.T agradece el apoyo de la Agencia Nacional Francesa de Investigación, bajo la subvención (ANR-10_, BLAN-916-03-INTCELL), y *el apoyo del subproyecto "Contrat Plan État-Region Lorraine 2015-2020" MatDS.*



Mounir Tarek nació en Rabat-Marruecos. Realizó el doctorado en Física en la Universidad de París en 1994. Es investigador principal (Directeur de Recherches) en el CNRS. Durante los últimos años, trabajó en simulaciones moleculares de vanguardia a gran escala de membranas lipídicas y proteínas TM que prueban su estructura y dinámica.

Capítulo 6

Estrés eléctrico y permeabilización de membrana a nanoescala y multiescala

P. Thomas Vernier

Frank Reidy Research Center for Bioelectrics, Old Dominion University,
Norfolk, VA, Estados Unidos.

Introducción

Para utilizar los diversos *efectos* de los campos eléctricos en los sistemas biológicos, debemos comprender las **causas** de dichos efectos. En particular, queremos conocer los detalles de las **interacciones** entre los campos eléctricos y las estructuras biomoleculares. Al observar escalas de tiempo muy cortas (nanosegundos) y eventos únicos (estímulos no repetitivos), reducimos el número de perturbaciones a mayor escala y nos concentramos en perturbaciones reversibles. El análisis se realiza principalmente en el dominio del tiempo, pero el contenido espectral del pulso puede ser importante para algunas aplicaciones.

Por supuesto, algunos *efectos* importantes de la electropulsación pueden ser consecuencia de procesos irreversibles impulsados por exposiciones de campo eléctrico más largas (microsegundos, milisegundos). Los estudios de pulso corto pueden ayudar a diseccionar estos procesos.

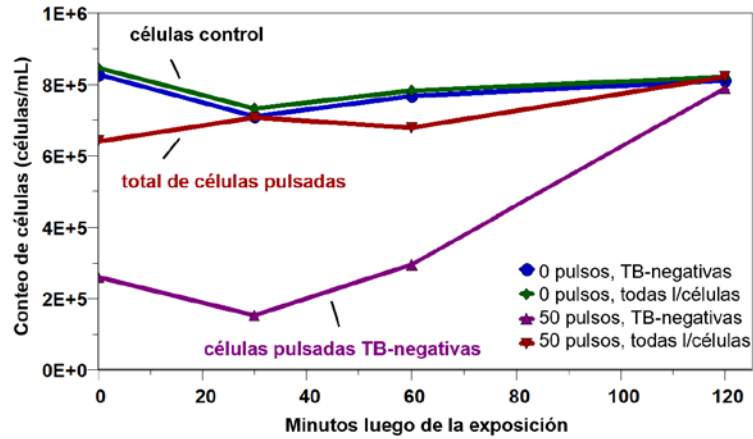


Figura 1. Los linfoblastos Jurkat T nanoelectropulsados se recuperan durante las 2 horas siguientes desde la permeabilización inicial con azul de tripán (TB) después de la exposición a 50, 20 ns, 4 pulsos de MV/m a 20 Hz.

Aunque el modelado es necesariamente un componente importante de las investigaciones bioeléctricas, las observaciones experimentales son fundamentales, y para realizar experimentos bioeléctricos utilizando pulsos de **nanosegundos**, uno debe ser capaz de generar y monitorear con precisión los estímulos eléctricos apropiados, un desafío de ingeniería no trivial. Discutiremos causas y efectos aquí, desde **perspectivas científicas e ingenieriles**, utilizando datos experimentales y simulaciones. Es común en la ingeniería eléctrica, y cada vez más en biología, atacar un problema con una combinación de herramientas de modelado y experimentales. En la bioelectricidad de nanosegundos, las observaciones (in vitro e in vivo) dan lugar a modelos (moleculares y continuos), que conducen a la realización de experimentos, que ajustan y calibran los modelos, que retroalimentan nuevamente a la validación empírica. Este ciclo de retroalimentación reduce las investigaciones de un espacio de parámetros muy grande a los rangos críticos de valores para las variables clave.

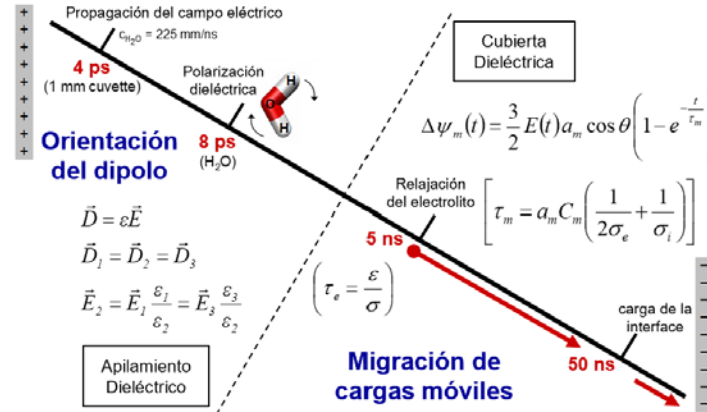


Figura 2. Línea de tiempo que representa la secuencia de eventos después de la polarización eléctrica de un tejido biológico o suspensión acuosa de células. Las propiedades dieléctricas del sistema son importantes en el régimen de subnanosegundos. Durante tiempos más largos, la distribución de los campos y potenciales está dominada por la migración de especies cargadas.

Bioelectricidad de nanosegundos

De la teoría hace ya tiempo aceptada que modela a la célula como una cubierta dieléctrica [1–4] surgió la noción de que los pulsos eléctricos por debajo de los microsegundos podrían "saltar" la membrana celular, depositando la mayor parte de su energía dentro de la célula en lugar de en la membrana plasmática, la cual es objetivo de los pulsos más largos. Esta idea fue investigada experimentalmente a partir de finales de la década de 1990, y aparentemente confirmada [5–6]. Aunque un informe inicial indicó que la ruptura conductiva de membranas conducida por un campo eléctrico puede ocurrir en tan solo 10 ns [7], y un análisis teórico demostró que los pulsos con amplitudes de campo superiores a aproximadamente 1 MV/m producirán potenciales permeabilizadores transmembrana dentro de aproximadamente 2 ns [8], y un modelo bien fundamentado predijo "poración en todas partes" en el régimen de nanosegundos [9], los procedimientos utilizados para detectar la electroporación de la membrana plasmática (y la pérdida de integridad de la membrana en general) produjeron resultados negativos para pulsos con duraciones menores que la constante de tiempo de carga de una célula pequeña en medios típicos (<100 ns).

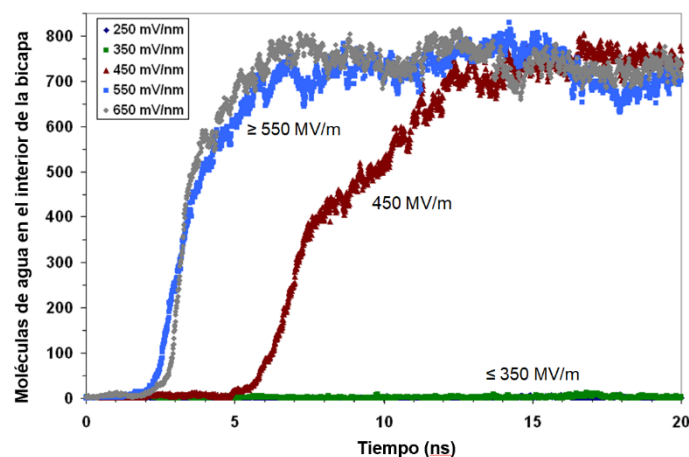


Figura 3. Intrusión de agua impulsada por el campo eléctrico en una bicapa lipídica simulada.

Además de resaltar las limitaciones de los métodos experimentales tradicionales para observar la permeabilización de la membrana, esta aparente discrepancia entre el modelo teórico y los experimentos en diferentes puntos de observación se debe a las deficiencias en el propio modelo de la cubierta dieléctrica, cuando se estudia en escalas de tiempo por debajo del tiempo de carga de la membrana (de una célula). Los efectos de frecuencias más altas asociados con las propiedades dieléctricas de los medios acuosos de alta permitividad y las membranas biológicas de baja permitividad [10-13] son insignificantes para las condiciones de electroporación que se estudian con mayor frecuencia (pulsos μ s, kV/m), pero para pulsos de nanosegundos no pueden ser ignorados.

Varias líneas de evidencia experimental indican que los pulsos eléctricos de nanosegundos causan cambios en la integridad y organización de la membrana celular.

Permeabilización y azul de tripán. Mientras que permanecen negativos al yoduro de propidio, el volumen celular de los linfoblastos Jurkat T expuestos a una serie de 50 pulsos de 20 ns, de 4 MV/m aumenta y se vuelven permeables al azul de tripán (TB, por sus siglas en inglés) (Figura 1). Con el transcurso del tiempo tras la exposición al pulso, estas células débilmente positivas para TB vuelven a ser impermeables al TB. Observaciones similares han sido reportadas para células de melanoma murino B16 expuestas a pulsos de sub-nanosegundos (800 ps) con campos muy altos [14].

Potenciales transmembrana permeabilizadores de nanosegundos. Las imágenes de fluorescencia con una tinción sensible al potencial de membrana indican que se generan potenciales transmembrana permeabilizadores durante la exposición a los nanoelectropulsos [15].

Externalización de PS inducida por nanoelectropulsos. La pérdida de la asimetría en la distribución de fosfolípidos de membrana como resultado de la externalización de fosfatidilserina (PS) ocurre inmediatamente después de la exposición a nanoelectropulsos [16], de manera consistente con la reorganización de la membrana impulsada directamente por campos eléctricos de nanosegundos y por un mecanismo en el que los poros de diámetro nanométrico proporcionan un camino de baja energía para la difusión facilitada electroforéticamente de PS desde la cara citoplasmática de la membrana plasmática a la cara externa de la misma [8].

Las simulaciones vinculan la externalización de PS y la nanoporación. En las simulaciones de electroporación de dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés), los poros hidrofílicos aparecen dentro de unos pocos nanosegundos [17], y la PS migra electroforéticamente a lo largo de las paredes de los poros hacia el lado de la membrana que mira hacia el ánodo [18–19], lo que constituye una réplica in silico de observaciones experimentales en células vivas [20].

Nanoelectropermeabilización. La primera evidencia directa de nanoelectropermeabilización se obtuvo al monitorear la afluencia de YO-PRO-1 (YP1) [21], un indicador más sensible de permeabilización de la membrana que el yoduro de propidio (PPD) [22]. Evidencia directa adicional proveniente de experimentos con patch-clamp, que revelan aumentos duraderos en la conductancia de la membrana después de la exposición a pulsos de 60 ns [23–25].

Activación de células excitables eléctricamente con pulsos de nanosegundos. Las células excitables eléctricamente proporcionan un entorno altamente sensible para la biología de nanoelectropulsos. Las células cromafines suprarrenales [26] y los cardiomiocitos [27] reaccionan fuertemente a un solo pulso de 4 ns, y se ha demostrado que fibras musculares responden a un estímulo de 1 ns [28].

La bioelectricidad de nanosegundos y el modelo de apilamiento dieléctrico. La Figura 2 representa una línea de tiempo de eventos en una suspensión acuosa de células vivas y electrolitos entre dos electrodos después de que se aplica un pulso eléctrico. Los dipolos de agua se reorientan dentro de aproximadamente 8 ps. El campo también altera el equilibrio electro-difusivo entre las especies cargadas y el agua que los hidrata, con una constante de tiempo que varía de 0.5 a 7 ns, dependiendo de las propiedades de los medios. Los pulsos más cortos que el tiempo de relajación del electrolito no generan (a menos que el campo sea muy alto)

suficiente carga interfacial para producir potenciales transmembrana permeabilizadores. El modelo de corteza dieléctrica en este régimen puede reemplazarse por un modelo de apilamiento dieléctrico más simple, en el que el campo eléctrico local depende solo del campo eléctrico externo (aplicado) y la permitividad dieléctrica de cada componente del sistema.

Nanoelectropermeabilización y modelos continuos. Las simulaciones de MD en la actualidad proporcionan las únicas ventanas disponibles a escala molecular sobre la formación de electroporos en bicapas lipídicas. Los modelos actuales funcionan razonablemente bien, pero las simulaciones de electroporación aún contienen muchos supuestos y simplificaciones. Para validar estos modelos, buscamos intersecciones entre conjuntos moleculares de todos los átomos, representaciones continuas de suspensiones y tejidos celulares y observaciones experimentales de células y organismos completos. Por ejemplo, un modelo continuo destacado supone una relación exponencial entre el potencial transmembrana y varios índices de formación de electroporos [29]. Los resultados de MD en la Figura 3, que muestran la intrusión de agua en el interior de la membrana en función del campo eléctrico aplicado, demuestran cualitativamente esta misma relación no lineal entre campo y la poración. El desafío es lograr una congruencia cuantitativa de los coeficientes.

Experimentos y modelos de nanosegundos

Experimentos y modelos moleculares de permeabilización de membranas. La Figura 4 muestra una respuesta simple y directa de las células a la exposición al pulso: hinchazón [25, 30, 31]. La electropermeabilización de la membrana celular da como resultado un desequilibrio osmótico que es contrarrestado por la entrada de agua en la célula y un aumento en el volumen celular. Este fenómeno, iniciado por interacciones electrofísicas con constituyentes celulares básicos (iones, agua y fosfolípidos) en una escala de tiempo mucho más corta (unos pocos nanosegundos) de lo que generalmente consideran los electrofisiólogos y los biólogos celulares, proporciona una conexión simple, directa y bien definida entre simulaciones y sistemas experimentales. Al correlacionar la cinética observada de permeabilización e hinchazón con las tasas de formación de poros y el transporte de iones y agua obtenidos de simulaciones moleculares y representaciones continuas, estamos mejorando la precisión y aplicabilidad de los modelos.

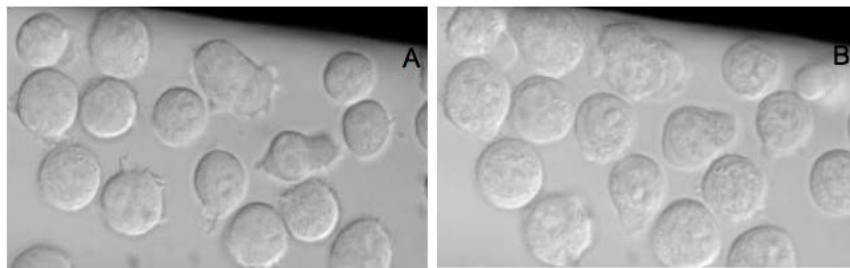


Figura 4. Imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) de linfoblastos Jurkat T antes (A) y 30 s después (B) de la exposición a pulsos eléctricos de 5 ns, 10 MV/m (30 pulsos, 1 kHz). Obsérvese la hinchazón, la formación de ampollas y la granulación intracelular y la expansión de las vesículas, resultado del desequilibrio osmótico causado por la electropemeabilización de la membrana celular.

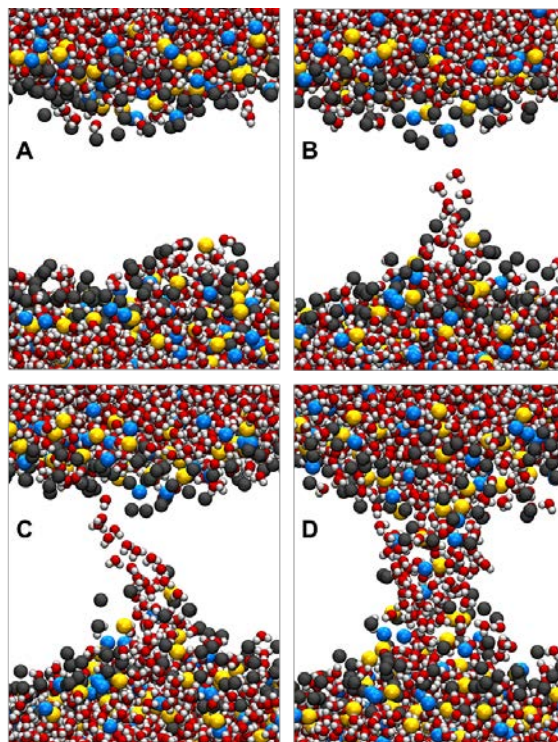


Figura 5. Secuencia de creación de electroporos. (A) Representación de dinámica molecular de una bicapa lipídica POPC. Las pequeñas esferas rojas y blancas en la parte superior e inferior del panel son átomos de oxígeno e hidrógeno en el agua. Las esferas doradas y azules son los grupos de cabeza fósforo y nitrógeno, respectivamente, y las esferas grises son oxígenos de acilo fosfolípidos. Para mayor claridad, no se muestran los átomos de las cadenas de hidrocarburos en el interior de la bicapa. En presencia de un campo eléctrico permeabilizador, aparece una intrusión de agua (B) y se extiende a través de la bicapa (C). Los grupos principales siguen al agua para formar un poro hidrofílico (D). La secuencia de formación del poro, desde el inicio del puente de agua hasta la formación del poro revestido de grupos de cabeza de fosfolípidos, toma menos de 5 ns.

Dinámica molecular y modelos de macroescala (continuum). La Figura 5 muestra los pasos principales en la formación de un nanoporo impulsada por el campo eléctrico en una porción de una simulación MD típica de una bicapa de fosfolípidos. Es parte de un esquema más amplio para el desarrollo (y la disolución) paso a paso de los defectos eléctricamente conductores que contribuyen al menos en parte a lo que llamamos una membrana permeabilizada [32]. Estas simulaciones moleculares nos permiten realizar experimentos virtuales en un amplio espacio de

parámetros actualmente inaccesibles para la observación directa en la práctica. Aunque todavía no podemos alinear la energética y la cinética detalladas que se pueden extraer de las simulaciones MD con los resultados de laboratorio, es posible comparar los datos MD con las predicciones de los modelos a macroescala utilizados para describir la electroporación.

La Figura 6 muestra cómo el tiempo de iniciación de los poros (tiempo entre la aplicación del campo eléctrico permeabilizador y la aparición de una columna de agua que abarca la membrana (Fig. 5C)) varía con la magnitud del campo eléctrico en las simulaciones de MD [32]. El valor del campo eléctrico en el interior de la membrana, extraído de las simulaciones integrando la densidad de carga en todo el sistema, se utiliza como una cantidad normalizadora.

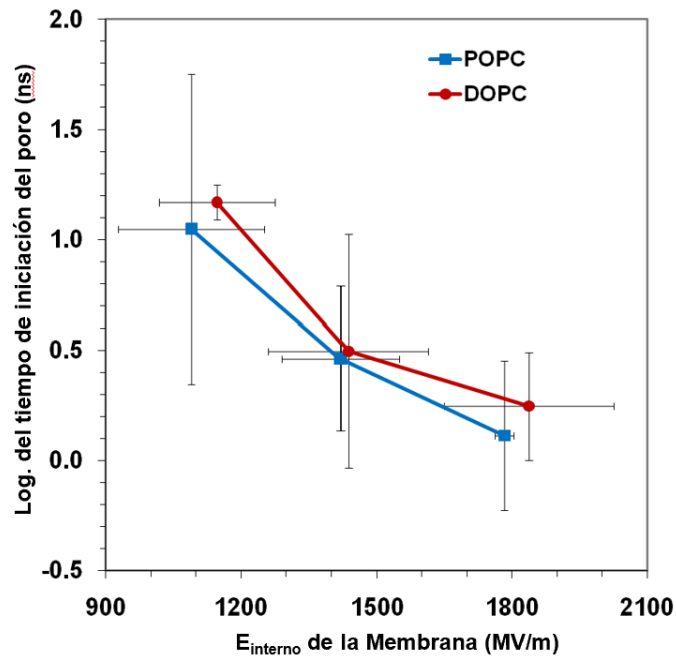


Figura 6. El tiempo de iniciación de los electroporos es una función no lineal de la magnitud del campo eléctrico de poración. El tiempo de inicio de poros (tiempo requerido para formar el puente de agua que se muestra en la figura 1C) depende exponencialmente del campo eléctrico aplicado, expresado aquí como el campo eléctrico observado en el interior de la bicapa lipídica en simulaciones de dinámica molecular. Las barras de error son errores estándar de la media de al menos tres simulaciones independientes. Los datos son de las Tablas 4 y 5 de [32].

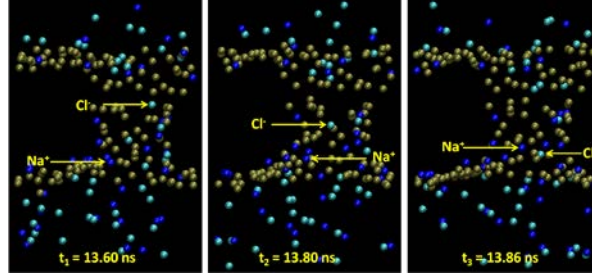


Figura 7. Iones de sodio y cloruro migrando a través de un nanoporo lipídico en presencia de un campo eléctrico externo.

Este campo interno de la membrana resulta de la interacción del campo externo aplicado con el agua de la interfaz y los dipolos de los grupos de cabeza de los lípidos, que también crean el gran potencial dipolo encontrado en el interior de la membrana incluso en ausencia de un campo aplicado [33]. La disminución no lineal en el tiempo de iniciación de los poros con el aumento del campo eléctrico puede interpretarse como una disminución de la energía de activación para la formación de las estructuras de iniciación de poros descritas anteriormente. Podemos utilizar resultados de simulación como los de la Fig. 6 para conciliar representaciones de dinámica molecular con modelos continuos, y en última instancia, ambos para experimentar. Por ejemplo, la relación entre el campo eléctrico y la tasa de creación de poros se describe en el modelo de poro estocástico de Krassowska-Weaver en la siguiente expresión,

$$K_{pore} = Ae^{-E(r,V_m)/k_B T}, \quad (1)$$

donde K_{pore} es la velocidad de creación de poros, A es una constante de velocidad, $E(r,V_m)$ es la energía de un poro con radio r al potencial transmembrana V_m , y k_B y T son la constante de Boltzmann y la temperatura absoluta [29, 34-36]. Uno de nuestros objetivos es conciliar la tasa de creación de poros en (1) con nuestros tiempos de inicio de poros simulados, conciliando los dos modelos. También estamos en el proceso de validar la expresión del modelo de poro estocástico para la densidad de poro,

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\beta(\Delta\psi_m^2)} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}}\right), \quad (2)$$

donde N and N_{eq} son poros por unidad de área, valores instantáneos y de equilibrio, α y β son parámetros empíricos del modelo de electroporación, y $\Delta\psi_m$ es el potencial transmembrana.

Se requiere potencia de cálculo no solo para permitir simulaciones de sistemas más grandes. La gran variabilidad en el tiempo de inicio del poro indicado por las barras de error en la Fig. 6 significa que las simulaciones independientes de cada condición deben repetirse muchas veces para garantizar resultados válidos. (Se ha publicado una sorprendente cantidad de conclusiones en la literatura existente sobre la base de simulaciones únicas).

Debido a la complejidad de todas las estructuras, sistemas y procesos que comprenden la membrana permeabilizada de una célula viva (el electroporoma), una comprensión analítica integral de la vida útil de la permeabilización (¿poro?) sigue siendo un desafío importante tanto para los modelos como para los enfoques experimentales.

Mejores modelos pueden contribuir también a nuestra comprensión de los problemas prácticos en bioelectricidad. Por ejemplo, a pesar de años de estudio, persiste la controversia con respecto a los efectos, o la falta de efectos, de las exposiciones a bajos niveles de campos electromagnéticos de radiofrecuencia (RF) [37,38]. Parte de la razón del fracaso para establecer la certeza sobre este tema surge de la dificultad de realizar experimentos con un número suficiente de variables y un número suficiente de muestras para generar conjuntos de datos confiables. Con herramientas de simulación precisas, perfeccionadas por la reconciliación con los experimentos, podemos explorar el gran espacio de variables y estadístico en el que pueden producirse efectos biofísicos sospechosos, reduciendo el rango de objetivos experimentales y centrándonos en los sistemas en los que los efectos son más probables y sus mecanismos más claros.

Experimentos y modelos moleculares de conductancia iónica. Los primeros y más directos indicadores de la permeabilización de la membrana por campo eléctrico son los cambios en las propiedades eléctricas, incluido un aumento en la conductancia de iones [39,40]. Los datos de trabajo experimental cuidadoso pueden interpretarse como valores medidos correspondientes a la conductancia de un solo poro [41-44]. Al combinar modelos continuos de electroporación con estos datos experimentales y con valores establecidos para las movilidades y afinidades electroforéticas de iones entre iones y fosfolípidos, podemos sacar conclusiones sobre la geometría de los poros y su densidad en un área. Pero la inaccesibilidad (hasta ahora) de los electroporos de membrana para la observación directa y la manipulación de su estructura física nos impide cerrar definitivamente la brecha entre el modelo y el experimento.

Un método desarrollado recientemente para estabilizar electroporos en simulaciones de dinámica molecular de bicapas de fosfolípidos [45] permite la extracción de la conductancia iónica de estos sistemas modelo y, por lo tanto, proporciona una conexión nueva e independiente entre modelos y

experimentos, en este caso de los modelos atómicamente detallados de los electroporos lipídicos construidos con dinámica molecular. La figura 7 muestra uno de estos poros estabilizados con iones impulsados por campos eléctricos que lo atraviesan.

Aunque la magnitud de la conductancia medida en estas simulaciones depende en gran medida de la exactitud de los modelos de iones y agua y sus interacciones con la interfaz de la bicapa de fosfolípidos (y hay mucho margen para mejorar en esta área), los resultados iniciales son consistentes con las expectativas tanto de modelos continuos como observaciones experimentales.

Excitación por pulsos de nanosegundos

Nanoelectroestimulación de células neurosecretoras y neuromusculares. La aplicación de campos eléctricos pulsados en la clínica, particularmente de electroquimioterapia y electrotransferencia génica, son bien conocidas y descritas en detalle en otras partes de este curso. Observamos aquí una posible aplicación biomédica específicamente de pulsos eléctricos de nanosegundos, la activación y modulación de la actividad de procesos neurosecretores y neuromusculares, un área que permanece relativamente inexplorada. La sensibilidad de las células eléctricamente excitables a los nanoelectropulsos aumenta la posibilidad de que dispositivos de muy baja energía puedan construirse para diferentes fines (los pulsos de nanosegundos y de megavolts por metro sean de alta potencia pero de baja energía total debido a su breve duración): Para la regulación cardíaca (marcapasos y desfibriladores implantados), para la activación muscular remota (daño del nervio espinal), y para la modulación neurosecretora (manejo del dolor). La Figura 8 demuestra la activación funcional de una célula cromafín suprarrenal después de un solo pulso de 5 ns de 5 MV/m [46,47].

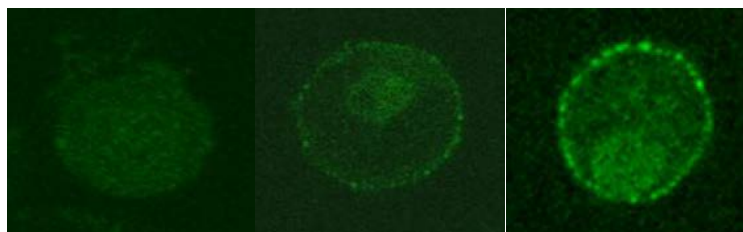


Figura 8. Marcaje inmunocitoquímico de dopamina- β -hidroxilasa (D β H) usando un anticuerpo anti-D β H junto con un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia. D β H se externaliza por fusión exocitótica de vesículas con la membrana plasmática. Panel izquierdo, control. Panel central, 2 minutos después del tratamiento con el estimulante farmacológico DMPP. Panel derecho, 2 minutos después de un solo pulso de 5 ns de 5 MV/m.

Agradecimientos

Colaboraron con sus apreciaciones Francesca Apollonio, Delia Arnaud-Cormos, Maura Casciola, Gale Craviso, Rumiana Dimova, M. Laura Fernández, Wolfgang Frey, Julie Gehl, Martin Gundersen, Loree Heller, Richard Heller, Volker Knecht, Malgorzata Kotulska, Philippe Leveque, Zachary Levine, Micaela Liberti, Carmela Marino, Caterina Merla, Damijan Miklavčič, Lluís Mir, Andrei Pakhomov, Olga Pakhomova, Uwe Pliquet, Ramon Reigada, Marcelo Risk, Marie-Pierre Rols, Stefania Romeo, Maria Rosaria Scarfi, Aude Silve, Esin Sözer, Mounir Tarek, Justin Teissié, Peter Tieleman, Mayya Tokman, Jim Weaver y Olga Zeni (y muy importante para mí pero demasiados para nombrarlos son los miembros de sus respectivos grupos de investigación), y contribuyeron con su experiencia en modelaje y experimentación Maura Casciola, Federica Castellani, Ming- Chak Ho, Zachary Levine, Paolo Marracino, Stefania Romeo, Esin Sözer y Yu-Hsuan Wu. Los fondos provienen del Centro de Investigación Frank Reidy para Bioelectricidad de la Universidad Old Dominion y la Oficina de Investigación Científica de la Fuerza Aérea (FA9550-15-1-0517, FA9550-14-1-0123). Los recursos informáticos fueron proporcionados por el Centro de Computación de Alto Rendimiento y Comunicaciones de la USC (<http://www.usc.edu/hpcc/>) y la Computación de Alto Rendimiento de la Universidad Old Dominion (<http://www.odu.edu/hpc/>).

Referencias

- [1] Sher, L. D., E. Kresch, and H. P. Schwan. 1970. On the possibility of nonthermal biological effects of pulsed electromagnetic radiation. *Biophys. J.* 10:970-979.
- [2] Drago, G. P., M. Marchesi, and S. Ridella. 1984. The frequency dependence of an analytical model of an electrically stimulated biological structure. *Bioelectromagnetics* 5:47-62.
- [3] Plonsey, R., and K. W. Altman. 1988. Electrical stimulation of excitable cells - a model approach. *Proceedings of the IEEE* 76:1122-1129.
- [4] Schoenbach, K. H., R. P. Joshi, J. F. Kolb, N. Y. Chen, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, and S. J. Beebe. 2004. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the IEEE* 92:1122-1137.
- [5] Hofmann, F., H. Ohnismus, C. Scheller, W. Strupp, U. Zimmermann, and C. Jassoy. 1999. Electric field pulses can induce apoptosis. *J. Membr. Biol.* 169:103-109.

-
- [6] Schoenbach, K. H., S. J. Beebe, and E. S. Buescher. 2001. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22:440-448.
 - [7] Benz, R., and U. Zimmermann. 1980. Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 597:637-642.
 - [8] Vernier, P. T., Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, and M. A. Gundersen. 2004. Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* 86:4040-4048.
 - [9] Gowrishankar, T. R., and J. C. Weaver. 2006. Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supra-electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:643-653.
 - [10] Grosse, C., and H. P. Schwan. 1992. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63:1632-1642.
 - [11] Gowrishankar, T. R., and J. C. Weaver. 2003. An approach to electrical modeling of single and multiple cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:3203-3208.
 - [12] Kotnik, T., and D. Miklavcic. 2000. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47:1074-1081.
 - [13] Timoshkin, I. V., S. J. MacGregor, R. A. Fouracre, B. H. Crichton, and J. G. Anderson. 2006. Transient electrical field across cellular membranes: pulsed electric field treatment of microbial cells. *Journal of Physics D-Applied Physics* 39:596-603.
 - [14] Schoenbach, K. H., S. Xiao, R. P. Joshi, J. T. Camp, T. Heeren, J. F. Kolb, and S. J. Beebe. 2008. The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36:414-422.
 - [15] Frey, W., J. A. White, R. O. Price, P. F. Blackmore, R. P. Joshi, R. Nuccitelli, S. J. Beebe, K. H. Schoenbach, and J. F. Kolb. 2006. Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophys. J.* 90:3608-3615.
 - [16] Vernier, P. T., Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, and M. A. Gundersen. 2004. Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. *FEBS Lett.* 572:103-108.
 - [17] Tieleman, D. P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem* 5:10.
 - [18] Hu, Q., R. P. Joshi, and K. H. Schoenbach. 2005. Simulations of nanopore formation and phosphatidylserine externalization in lipid membranes subjected to a high-intensity, ultrashort electric pulse. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 72:031902.
 - [19] Vernier, P. T., M. J. Ziegler, Y. Sun, W. V. Chang, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman. 2006. Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential. *J. Am. Chem. Soc.* 128:6288-6289.
 - [20] Vernier, P. T., M. J. Ziegler, Y. Sun, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman. 2006. Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers - in cells and in silico. *Physical Biology* 3:233-247.
 - [21] Vernier, P. T., Y. Sun, and M. A. Gundersen. 2006. Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol.* 7:37.
 - [22] Idziorek, T., J. Estaquier, F. De Bels, and J. C. Ameisen. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185:249-258.
 - [23] Pakhomov, A. G., J. F. Kolb, J. A. White, R. P. Joshi, S. Xiao, and K. H. Schoenbach. 2007. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics* 28:655-663.

-
- [24] Pakhomov, A. G., R. Shevin, J. A. White, J. F. Kolb, O. N. Pakhomova, R. P. Joshi, and K. H. Schoenbach. 2007. Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch. Biochem. Biophys.* 465:109-118.
- [25] Pakhomov, A. G., A. M. Bowman, B. L. Ibey, F. M. Andre, O. N. Pakhomova, and K. H. Schoenbach. 2009. Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385:181-186.
- [26] Vernier, P. T., Y. Sun, M. T. Chen, M. A. Gundersen, and G. L. Craviso. 2008. Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells. *Bioelectrochemistry* 73:1-4.
- [27] Wang, S., J. Chen, M. T. Chen, P. T. Vernier, M. A. Gundersen, and M. Valderrabano. 2009. Cardiac myocyte excitation by ultrashort high-field pulses. *Biophys. J.* 96:1640-1648.
- [28] Rogers, W. R., J. H. Merritt, J. A. Comeaux, C. T. Kuhnel, D. F. Moreland, D. G. Teltschik, J. H. Lucas, and M. R. Murphy. 2004. Strength-duration curve for an electrically excitable tissue extended down to near 1 nanosecond. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 32:1587-1599.
- [29] DeBruin, K. A., and W. Krassowska. 1998. Electroporation and shock-induced transmembrane potential in a cardiac fiber during defibrillation strength shocks. *Ann. Biomed. Eng.* 26:584-596.
- [30] F. M. Andre, M. A. Rassokhin, A. M. Bowman, and A. G. Pakhomov, "Gadolinium blocks membrane permeabilization induced by nanosecond electric pulses and reduces cell death," *Bioelectrochemistry*, vol. 79, pp. 95-100, Aug 2010.
- [31] O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, S. Xiao, and A. G. Pakhomov, "Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1808, pp. 792-801, Dec 20 2010.
- [32] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation," *J Membr Biol*, vol. 236, pp. 27-36, Jul 2010.
- [33] R. J. Clarke, "The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 89-90, pp. 263-81, Jan 29 2001.
- [34] I. P. Sugar and E. Neumann, "Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation," *Biophys Chem*, vol. 19, pp. 211-25, May 1984.
- [35] S. A. Freeman, M. A. Wang, and J. C. Weaver, "Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation," *Biophys J*, vol. 67, pp. 42-56, Jul 1994.
- [36] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores," *Biochim Biophys Acta*, vol. 940, pp. 275-87, May 24 1988.
- [37] J. M. S. McQuade, J. H. Merritt, S. A. Miller, T. Scholin, M. C. Cook, A. Salazar, O. B. Rahimi, M. R. Murphy, and P. A. Mason, "Radiofrequency-radiation exposure does not induce detectable leakage of albumin across the blood-brain barrier," *Radiation Research*, vol. 171, pp. 615-621, May 2009.
- [38] N. D. Volkow, D. Tomasi, G. J. Wang, P. Vaska, J. S. Fowler, F. Telang, D. Alexoff, J. Logan, and C. Wong, "Effects of cell phone radiofrequency signal exposure on brain glucose metabolism," *JAMA*, vol. 305, pp. 808-13, Feb 23 2011.
- [39] Stämpfli, R., and M. Willi. 1957. Membrane potential of a Ranvier node measured after electrical destruction of its membrane. *Experientia* 13:297-298.

- [40] Coster, H. G. L. 1965. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". *Biophys. J.* 5:669-686.
- [41] Chernomordik, L. V., S. I. Sukharev, S. V. Popov, V. F. Pastushenko, A. V. Sokirko, I. G. Abidor, and Y. A. Chizmadzhev. 1987. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim. Biophys. Acta* 902:360-373.
- [42] Kalinowski, S., G. Ibrón, K. Bryl, and Z. Figaszewski. 1998. Chronopotentiometric studies of electroporation of bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1369:204-212.
- [43] Melikov, K. C., V. A. Frolov, A. Shcherbakov, A. V. Samsonov, Y. A. Chizmadzhev, and L. V. Chernomordik. 2001. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys. J.* 80:1829-1836.
- [44] Koronkiewicz, S., S. Kalinowski, and K. Bryl. 2002. Programmable chronopotentiometry as a tool for the study of electroporation and resealing of pores in bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1561:222-229.
- [45] Fernandez, M. L., M. Risk, R. Reigada, and P. T. Vernier. 2012. Size-controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423:325-330.
- [46] G. L. Craviso, P. Chatterjee, G. Maalouf, A. Cerjanic, J. Yoon, I. Chatterjee, and P. T. Vernier, "Nanosecond electric pulse-induced increase in intracellular calcium in adrenal chromaffin cells triggers calcium-dependent catecholamine release," *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 16, pp. 1294-1301, Oct 2009.
- [47] G. L. Craviso, S. Choe, P. Chatterjee, I. Chatterjee, and P. T. Vernier, "Nanosecond electric pulses: a novel stimulus for triggering Ca^{2+} influx into chromaffin cells via voltage-gated Ca^{2+} channels," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 30, pp. 1259-65, Nov 2010.



P. Thomas Vernier es Profesor de Investigación en el Centro de Investigación Frank Reidy de Bioelectricidad en la Universidad Old Dominion y Profesor de Investigación Adjunto en el Departamento de Ingeniería Eléctrica Ming Hsieh en la Universidad del Sur de California. Su experiencia industrial y de investigación incluye el análisis por microscopía ultravioleta del metabolismo de la S-adenosilmetionina en la levadura *Rhodotorula glutinis*, biología molecular de la restricción del huésped sensible a la temperatura de virus bacterianos en *Pseudomonas aeruginosa*, monitoreo de gases ambientales de bajo nivel, registro de datos de instrumentación de banda ancha, y modelado de dispositivos semiconductores y su caracterización física y eléctrica. Actualmente se enfoca en los efectos de campos eléctricos de nanosegundos y megavoltios por metro en sistemas biológicos, combinando observaciones experimentales con simulaciones de dinámica molecular y en la integración de sensores celulares y biomoleculares, nanotubos de carbono y puntos cuánticos en los procesos de fabricación comercial de circuitos electrónicos integrados.

Vernier realizó doctorado en Ingeniería Eléctrica en la Universidad del Sur de California en 2004, y es miembro de la American Chemical Society, la American Society for

Microbiology, la Bioelectromagnetics Society, la Biophysical Society, la European BioElectromagnetics Association y el Institute of Electrical and Electronics Engineers.

Capítulo 7

Electrotransferencia génica in vivo

Maja Čemažar

Instituto de Oncología, Liubliana, Eslovenia.

Resumen: La electrotransferencia génica consiste en la administración de ácidos nucleicos (ADN, oligonucleótidos de ARN, etc.) seguida de la aplicación de pulsos eléctricos al tejido específico para permitir la introducción de ácidos nucleicos a las células y, en consecuencia, la acción terapéutica del material genético administrado. Debido al tamaño de los ácidos nucleicos, los parámetros eléctricos de la electrotransferencia génica varían mucho dependiendo del tejido a transfectar, del nivel y duración de expresión deseado, así como del daño tisular acompañado. Además de la optimización de parámetros eléctricos para una aplicación específica, el diseño de moléculas de ADN o ARN plasmídico también puede influir en el resultado terapéutico. Los estudios iniciales sobre electrotransferencia génica se centraron principalmente en la evaluación de parámetros eléctricos para la transferencia eficiente de genes a diferentes tejidos, como la piel, los músculos, el hígado y tumores, utilizando diversos genes indicadores que codifican proteínas fluorescentes, como la luciferasa y la galactosidasa. El campo terapéutico de la electrotransferencia génica se divide principalmente en dos: vacunación con ADN y terapia génica contra el cáncer. Las vacunas de ADN contra las enfermedades infecciosas y el cáncer, por un lado, y las terapias genéticas antiangiogénicas e inmunomoduladoras contra el cáncer, por el otro, son las áreas predominantes de investigación. Además, hay registrados un número cada vez mayor de ensayos clínicos de administración de ADN plasmídico por medio de electrotransferencia, especialmente en EE. UU. Las perspectivas de la electrotransferencia de genes terapéuticos contra el cáncer se encuentran principalmente en diferentes combinaciones con terapias locales estándar, como la radioterapia o la electroquimioterapia, con el objetivo de convertir estos tratamientos locales en sistémicos. Además, gran parte del trabajo preclínico se dedica a la optimización de los ADN plasmídicos terapéuticos, el desarrollo de nuevos electrodos y la evaluación de parámetros eléctricos, lo que conducirá a una mejor planificación y diseño de ensayos clínicos.

Introducción

La aplicación in vitro de electroporación para la introducción de ADN en las células fue evaluada y probada en 1982 por Neumann et al [1], 6 años antes del uso de la electroporación para la administración de fármacos quimioterapéuticos antitumorales (electroquimioterapia) en las células tumorales [2]. Sin embargo, los estudios in vivo surgieron lentamente y el primer estudio in vivo fue realizado en 1991 por Titomirov et al [3], evaluando la utilidad de los pulsos de decaimiento exponencial para la entrega de genes a la piel del ratón. Más tarde, la transfección del cerebro, el hígado, el músculo y tumores utilizando diferentes genes reporteros se demostró con éxito utilizando diferentes tipos de pulsos eléctricos [3–7]. Debido a las propiedades fisicoquímicas y al tamaño de los ácidos nucleicos en comparación con los fármacos quimioterapéuticos pequeños, el mecanismo de entrada de los ácidos nucleicos es diferente al de las moléculas pequeñas. En tejidos, otros parámetros relacionados con sus características también influyen en la eficiencia de la transfección, como son el tamaño, la forma y la organización de las células, la presencia de matriz extracelular y la heterogeneidad del mismo (presencia de diferentes tipos de células en un tejido particular). Además, la construcción del plásmido y su administración también pueden influir en el nivel de transfección, así como en su duración. Por lo tanto, una gran cantidad de estudios en el campo de electrotransferencia génica in vivo se dedicaron a la evaluación de diferentes parámetros de pulsos eléctricos para diferentes tipos de tejido, así como para diferentes aplicaciones (Figura 1). Actualmente, el uso terapéutico de la electrotransferencia génica se centra principalmente en dos campos: vacunación con ADN y terapia génica contra el cáncer [8,9].

Electrotransferencia preclínica de genes reporteros

Los genes reporteros utilizados en estudios preclínicos sobre electrotransferencia génica codifican principalmente diferentes proteínas fluorescentes o luciferasa. Ambos permiten visualizar la transfección de tejidos (expresión génica en las células de los tejidos) in vivo utilizando diferentes tipos de procedimientos de imágenes in vivo, ya sea de todo el cuerpo o a nivel celular [10,11]. La mayoría de los estudios se realizaron en músculos y piel, ya que estos tejidos son fácilmente accesibles y, por lo tanto, representan un tejido objetivo obvio para la vacunación de ADN. Además de la fácil accesibilidad para el electrotransferencia génica, las

células musculares tienen una vida larga y pueden producir cantidades relativamente altas de proteínas terapéuticas que también se liberan al torrente sanguíneo, actuando sistémicamente. Por otro lado, la piel también representa un gran tejido objetivo, no solo por su fácil accesibilidad, sino principalmente por las numerosas células inmunes presentes en la piel que pueden provocar una respuesta inmune efectiva necesaria para la vacunación de ADN [12,13] (Figura 2).

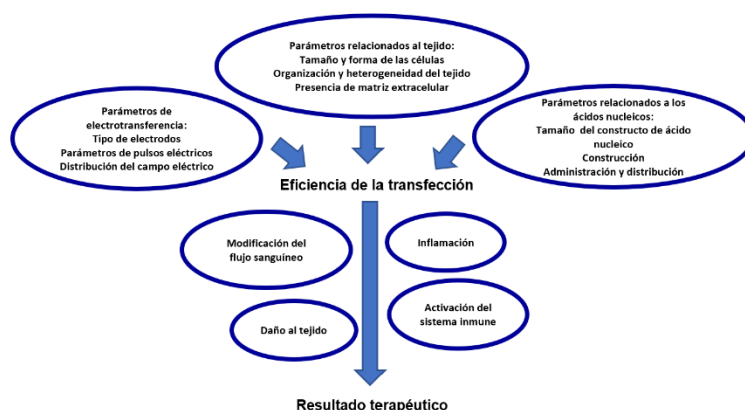


Figura 1. Diferentes parámetros pueden influir en la eficiencia de la transfección y el resultado terapéutico de la electrotransferencia génica.

Como se mencionó en la introducción, se utilizaron numerosos parámetros de pulsos eléctricos diferentes, ya sean pulsos cortos (aproximadamente 100 μ s) de alto voltaje (en el rango de aproximadamente 1000 V) o largos (hasta 100 ms) de bajo voltaje (hasta unos 100 V). Por otra parte, incluso se probó una combinación de pulsos, de alto y bajo voltaje, que mostró una mejor transfección en la piel y en los músculos en comparación con usar un solo tipo de pulsos [14-16]. En los tumores, la combinación de pulsos de bajo y alto voltaje no resultó en una mejor transfección [18]. Además, se evaluó la influencia de la orientación y la polaridad de los pulsos eléctricos en tumores, quedando demostrado que se obtiene una mayor eficiencia de transfección solo cambiando la orientación del electrodo, pero no la polaridad del pulso [19].

Los principales tipos de electrodos utilizados en los estudios fueron los de placas o los agujas y, más recientemente, también se utilizaron distribuciones de electrodos no invasivos [15,19,20]. Otros tipos de electrodos que se probaron para electrotransferencia génica fueron los electrodos en espátula para la transfección de genes al músculo [22] y otros tipos de electrodos no invasivos, como electrodos sin aguja, meandros y de

contacto para la transfección en la piel [21–24]. La selección del electrodo es muy importante para la distribución adecuada del campo eléctrico en el tejido, que es un requisito previo para la transferencia de genes eficaz [24, 25].

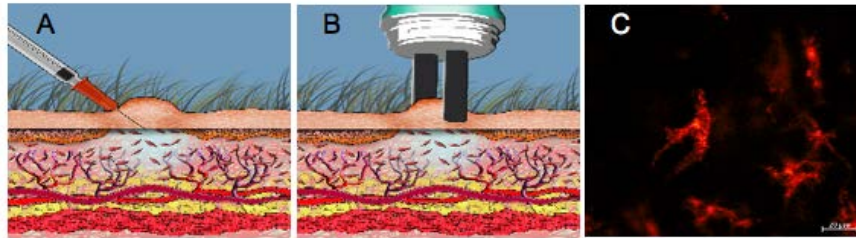


Figura 2. Electrotransferencia génica en la piel. A. Inyección de ADN plasmídico por vía subcutánea. Se formará una burbuja en la piel. B. Si se utilizan electrodos de placa, se colocan de manera que la burbuja quede comprendida entre las dos placas. C. Microscopía confocal intravital de células en piel de ratón que expresa proteína fluorescente DsRED a una profundidad de 30 μm .

Además de los parámetros eléctricos, el tipo de ácido nucleico utilizado para electrotransferencia también puede afectar la eficiencia de la transfección. A saber, se demostró que un ARNsí más pequeño puede atravesar más fácilmente la membrana plasmática en comparación con las moléculas de ADN plasmídico más grandes, sin embargo, la duración de la expresión (o efecto) es más corta [26–28]. Por lo tanto, el ADN plasmídico sigue siendo el más utilizado en estudios de electrotransferencia génica. Para mejorar la seguridad y el resultado de la transferencia de ADN plasmídico mediante electroporación, así como para minimizar el daño tisular no deseado, se construyeron y evaluaron plásmidos con promotores específicos para el tejido, desprovistos del gen de resistencia a antibióticos y con restos bacterianos mínimos o nulos [29–32].

Debido al tamaño del ADN plasmídico y la presencia de nucleasas en la sangre y también en los tejidos, la vía de administración más adecuada de ADN plasmídico es la inyección local. La distribución del ADN plasmídico en diferentes tejidos tiene un marco temporal diferente, por lo tanto, también es muy importante el momento entre la inyección del ADN plasmídico y la aplicación de pulsos eléctricos. Para el músculo se demostró que debería ser lo antes posible, mientras que, para tumores, dependiendo del tipo histológico, puede ser hasta 30 minutos después de la inyección del plásmido [33–35]. Se puede lograr una distribución mejorada y, en consecuencia, una mejor eficiencia de transfección también mediante el

pretratamiento de músculos y tumores con enzimas degradantes de la matriz extracelular, como la hialuronidasa y la colagenasa [36,37].

In vitro, se demostró que el tamaño, la orientación y la forma de las células influyen en la permeabilización de las membranas celulares y, por lo tanto, también en la eficiencia de la transfección. Lo mismo también es válido in vivo. Los tejidos con una estructura más organizada, como el músculo, son más fáciles de transfectar que el tejido altamente heterogéneo, como los tumores [16]. Además, en los tumores con células grandes se obtuvo una mayor eficiencia de transfección en comparación con los tumores con células más pequeñas [38-41].

La importancia de una cuidadosa selección del ADN plasmídico y de los parámetros eléctricos para una aplicación específica, fue reforzada recientemente por experimentos que demuestran que la electrotransferencia génica de plásmidos desprovistos de gen terapéutico puede inducir la regresión completa de tumores y que los sensores de ADN citosólico que activan la respuesta inmune innata se regulan de manera ascendente después de la electrotransferencia génica [42]. La inflamación y la inducción de la respuesta inmune se demostró también para la transfección en tejido muscular y en la piel [41-43].

Electrotransferencia génica preclínica y clínica de genes terapéuticos

Los estudios preclínicos que utilizan genes terapéuticos se enfocaron principalmente a la evaluación de la electrotransferencia génica para la vacunación de ADN o el tratamiento de diversas enfermedades, como el cáncer, donde las terapias se dirigen directamente a las células tumorales o tienen como objetivo aumentar la respuesta inmune del organismo contra dichas células.

En general, la terapia génica se puede realizar utilizando dos enfoques diferentes. El primero es la terapia génica ex vivo, donde las células, incluidas las células madre, se extraen del paciente, se transfectan in vitro con el plásmido o el vector viral, se seleccionan, amplifican y luego se reinyectan nuevamente en el paciente. El otro enfoque es la terapia génica in vivo, donde el ADN exógeno se administra directamente al tejido diana del huésped para la liberación local de la molécula, por ejemplo, directamente al tumor o al tejido peritumoral, y para la liberación sistémica, se realiza la transfección en el músculo esquelético según el tipo de moléculas y la intención del tratamiento [45].

La electrotransferencia génica se utilizó por primera vez para la vacunación con ADN en 1996 [46]. Actualmente, se están realizando numerosos estudios, que utilizan electrotransferencia génica principalmente en músculos y piel para la vacunación de ADN contra enfermedades infecciosas, artritis, esclerosis múltiple e inflamación. Además, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos contra enfermedades infecciosas, como el VIH y la hepatitis. La electrotransferencia génica de ADN plasmídico provocó la estimulación de ambos brazos del sistema inmune adaptativo, humoral y celular [8,9].

En la terapia génica contra el cáncer, la electrotransferencia génica directamente en el tumor facilita la producción intratumoral local de proteínas terapéuticas, lo que permite una concentración terapéutica suficiente y, por lo tanto, el resultado terapéutico. Esto es especialmente importante en el caso de las citoquinas, donde las altas concentraciones sistémicas están asociadas con una toxicidad severa.

La primera prueba de electrotransferencia génica intratumoral para el tratamiento del cáncer se realizó en 1999, 3 años después del primer estudio de vacunación con ADN, en un modelo murino de melanoma [47]. Desde entonces, una variedad de genes terapéuticos, que codifican principalmente citoquinas, pero también proteínas supresoras de tumores, moléculas de ARNsi contra diversos objetivos, como los oncogenes, se han probado en numerosos modelos animales de tumores. En general, los resultados de los estudios preclínicos indican que la electrotransferencia génica intratumoral permite una expresión transgénica eficiente con suficiente producción de proteínas terapéuticas, lo que puede conducir a una regresión tumoral completa y, en algunos casos, a la inducción de inmunidad antitumoral a largo plazo en los animales tratados.

Algunos de los efectos antitumorales más significativos hasta la fecha en la terapia génica contra el cáncer se han logrado con el empleo de inmunoterapia no específica activa, es decir, el uso de citoquinas. La electrotransferencia génica de genes que codifican diferentes citoquinas, ha mostrado resultados prometedores en ensayos preclínicos en diferentes modelos animales de tumores. Los genes de citoquinas que mostraron el mayor potencial para la terapia contra el cáncer son interleucina (IL) -2, IL-12, IL-18, interferón (IFN) α y GM-CSF [47-52]. Actualmente, la terapia más avanzada está utilizando IL-12, que juega un papel importante en la inducción de la respuesta inmune celular a través de la estimulación de la diferenciación de linfocitos T, la producción de IFN- γ y la activación de células natural killer [54]. El efecto antitumoral de la electrotransferencia del gen de la IL-12 ya se ha establecido en varios modelos tumorales, por ejemplo, en melanoma, linfoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de vejiga, adenocarcinoma mamario y hepatocarcinoma [53].

Los resultados de los estudios preclínicos muestran que, además de la regresión del tumor en sitios primarios y distantes, la electrotransferencia con el gen de la IL-12 también promueve la inducción de memoria antitumoral a largo plazo y de inmunidad terapéutica, suprime la diseminación metastásica y aumenta el tiempo de supervivencia de los animales de experimentación [53]. A nivel preclínico, la electrotransferencia génica con genes suicida en tumores también se empleó contra el cáncer, el reemplazo de terapias oncogénicas, la introducción de genes supresores de tumores de tipo salvaje, etc. [47,54-56]. Otro enfoque en la terapia génica del cáncer, que actualmente se está investigando ampliamente, se basa en la inhibición de la angiogénesis de los tumores. El concepto básico de la terapia génica antiangiogénica es la transfección de células con genes, que codifican inhibidores de la angiogénesis tumoral. Se demostró que la electrotransferencia de plásmidos que codifican factores antiangiogénicos (angiostatina y endostanina) es efectiva en la inhibición del crecimiento tumoral y la diseminación metastásica de diferentes tumores [57-59]. Recientemente, se evaluó el enfoque de interferencia de ARN, utilizando una molécula de ARNsi contra endoglin, que es un coreceptor del factor de crecimiento transformante y se produce en exceso en células endoteliales activadas y también en ciertas células tumorales. La electrotransferencia génica de moléculas de ARNsi o de shARN contra la endoglin dio como resultado un efecto vascular dirigido en tumores mamarios, así como un efecto antitumoral y antivascular en tumores de melanoma que expresan un alto nivel de endoglin [60,61].

El tejido muscular, además de en la vacunación con ADN, se usa también como tejido diana debido a la posibilidad de alta producción y secreción de proteínas terapéuticas. La electrotransferencia génica al músculo se evaluó con el objetivo de tratar diversas enfermedades musculares, para la secreción local de factores angiogénicos o neurotróficos o para la secreción sistémica de diferentes proteínas terapéuticas, como la eritropoyetina, factores de coagulación, citoquinas, anticuerpos monoclonales, etc. [62-64] En la terapia génica contra el cáncer, la electrotransferencia génica del ADN plasmídico que codifica las citoquinas IL-12, IL-24 y factores antiangiogénicos se evaluó con resultados alentadores.

Los estudios clínicos sobre electrotransferencia génica con ADN plasmídico que codifica la citocina IL-12 en pacientes con melanoma, así como en pacientes veterinarios, son prometedores para un mayor desarrollo de esta terapia [65,66]. En un estudio clínico en humanos, 24 pacientes con metástasis subcutáneas de melanoma maligno fueron tratados 3 veces. La respuesta a la terapia se observó en nódulos tumorales tratados y distantes no tratados. En el 53% de los pacientes se observó una respuesta sistémica que resultó en una respuesta clasificada (según criterios de la OMS) como

enfermedad estable o como respuesta objetiva. El principal efecto adverso fue dolor transitorio después de la aplicación de pulsos eléctricos. En las biopsias posteriores al tratamiento, se observó necrosis tumoral e infiltración de células inmunes. Este primer ensayo clínico en humanos tratados con electrotransferencia del gen IL-12 en el melanoma metastásico demostró que esta terapia es segura y efectiva [66]. En oncología veterinaria, 8 perros con mastocitoma fueron tratados con electrotransferencia del gen IL-12. Se obtuvo un buen efecto antitumoral local con una reducción significativa del tamaño de los tumores tratados, que oscila entre el 15% y el 83% (media del 52%) del volumen inicial del tumor. Además, se observó un cambio en la estructura histológica de los nódulos tratados como una reducción en el número de mastocitos malignos y la infiltración de células inflamatorias de los tumores tratados. Además, se detectó la liberación sistémica de IL-12 e IFN- γ en perros tratados, sin ningún efecto secundario local o sistémico [67].

Una vez más, los datos sugieren que la terapia intratumoral con electrotransferencia del gen IL-12 podría usarse para controlar la enfermedad local y sistémica.

Por ejemplo, los resultados de la electrotransferencia intramuscular del gen IL-12 en pacientes caninos indican que es un procedimiento seguro, que puede provocar la expresión sistémica de hIL-12 y posiblemente desencadenar la respuesta de IFN- γ en pacientes tratados, lo que lleva periodos prolongados libres de enfermedad y supervivencia de los animales tratados [68].

Perspectivas

En oncología, los tratamientos ablativos locales son muy efectivos, sin embargo, carecen de un componente sistémico. Por lo tanto, se dedica mucho esfuerzo al desarrollo de tratamientos, que actuarían sistémicamente o que agregarían un componente sistémico al tratamiento local. Con el avance del conocimiento en inmunología tumoral, se desarrollaron nuevas terapias inmunomoduladoras para el tratamiento del cáncer y actualmente se combinan con el tratamiento estándar con gran éxito. La vacunación con ADN y las terapias de genes inmunoestimuladores con citoquinas tienen como objetivo estimular la inmunidad antitumoral y, por lo tanto, son buenos candidatos para combinarse con las terapias locales [68,69].

Varios estudios que combinan la electroquimioterapia o la radioterapia con electrotransferencia génica se han probado preclínicamente. La terapia inmunogénica más prometedora que ya alcanzó ensayos clínicos en

oncología veterinaria y humana es la electrotransferencia génica de IL-12. En los estudios preclínicos, la electrotransferencia del gen IL-12 se combinó con electroquimioterapia y radioterapia en diferentes modelos tumorales. La electrotransferencia intramuscular de genes de IL-12 combinada con electroquimioterapia con cisplatino aumentó el porcentaje de respuestas completas de fibrosarcomas SA-1 al 60% en comparación con el 17% de respuesta completa después de la electroquimioterapia sola [71]. Cuando se combinó con radioterapia, incluso se obtuvo una respuesta completa del 100% de los tumores LPB [72]. La electrotransferencia intratumoral del gen IL-12 resultó en un factor modificador de la dosis de radiación de ~ 2.0 [73].

Clínicamente, solo se realizaron algunos estudios en perros con tumores espontáneos, combinando electroquimioterapia (con bleomicina o cisplatino) y la electrotransferencia del gen IL-12 con aplicación intratumoral o peritumoral [73-76]. Los resultados de estos estudios clínicos son muy prometedores y se esperan más estudios prometedores también en oncología humana.

La electrotransferencia génica tiene un gran potencial para su desarrollo, lo que podría conducir a nuevos ensayos clínicos tanto en la vacunación con ADN como en la aplicación de terapia génica. El diseño del plásmido es crucial para la síntesis y el efecto apropiado de la proteína terapéutica, por lo tanto, la investigación se centra en la optimización de los codones, el uso de varios promotores (específicos de tejido e inducibles), la incorporación de diversos motivos inmunoestimuladores en la secuencia del plásmido y el uso de plásmidos desprovistos del gen de resistencia a antibióticos cumpliendo con las exigencias de las agencias reguladoras. Además, factores físicos como la temperatura elevada, también pueden conducir a un electrotransferencia de genes mejorada. Se evalúan nuevos tipos de electrodos, como microagujas y conjuntos de electrodos no invasivos con parámetros cuidadosamente seleccionados de pulsos eléctricos, que conducirán a un electrotransferencia de genes eficiente con mínimos efectos secundarios y molestias para los pacientes.

Referencias

- [1] E. Neumann, M. Schaefferidder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider, "GENE-TRANSFER INTO MOUSE LYOMA CELLS BY ELECTROPORATION IN HIGH ELECTRIC-FIELDS," *Embo J.*, vol. 1, no. 7, pp. 841-845, 1982.
- [2] S. Orłowski, J. Belehradek J., C. Paoletti, and L. M. Mir, "Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs," *Biochem Pharmacol*, vol. 37, no. 24, pp. 4727-4733, 1988.

- [3] A. V. Titomirov, S. Sukharev, and E. Kistanova, "In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1088, no. 1, pp. 131–134, 1991.
- [4] T. Nishi, K. Yoshizato, S. Yamashiro, H. Takeshima, K. Sato, K. Hamada, I. Kitamura, T. Yoshimura, H. Saya, J. Kuratsu, and Y. Ushio, "High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation.," *Cancer Res*, vol. 56, no. 5, pp. 1050–1055, 1996.
- [5] R. Heller, M. Jaroszeski, A. Atkin, D. Moradpour, R. Gilbert, J. Wands, and C. Nicolau, "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver.," *FEBS Lett*, vol. 389, no. 3, pp. 225–228, 1996.
- [6] M. P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, and J. Teissie, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma.," *Nat Biotechnol*, vol. 16, no. 2, pp. 168–171, 1998.
- [7] L. M. Mir, M. F. Bureau, R. Rangara, B. Schwartz, and D. Scherman, "Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle.," *C R Acad Sci III*, vol. 321, no. 11, pp. 893–899, 1998.
- [8] H. Aihara and J. Miyazaki, "Gene transfer into muscle by electroporation in vivo.," *Nat Biotechnol*, vol. 16, no. 9, pp. 867–870, 1998.
- [9] L. Lambrecht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr  at, and G. Vandermeulen, "Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 2, pp. 295–310, 2016.
- [10] R. Heller and L. C. Heller, "Gene electrotransfer clinical trials.," *Adv. Genet.*, vol. 89, pp. 235–62, 2015.
- [11] E. Kinnear, L. J. Caproni, and J. S. Tregoning, "A Comparison of Red Fluorescent Proteins to Model DNA Vaccine Expression by Whole Animal In Vivo Imaging.," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0130375, 2015.
- [12] A. Gothelf, J. Eriksen, P. Hojman, and J. Gehl, "Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice.," *Gene Ther.*, vol. 17, no. 7, pp. 839–45, Jul. 2010.
- [13] A. Gothelf and J. Gehl, "Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives," *Curr Gene Ther*, vol. 10, no. 4, pp. 287–299, 2010.
- [14] C. Trollet, D. Scherman, and P. Bigey, "Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 423, pp. 199–214, 2008.
- [15] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, M. P. Rols, and J. Teissie, "Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand?," *Curr Pharm Des*, vol. 12, no. 29, pp. 3817–3825, 2006.
- [16] F. M. Andre, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M. P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie, and L. M. Mir, "Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin," *Hum. Gene Ther.*, vol. 19, no. 11, pp. 1261–1271, 2008.
- [17] N. Pavselj and V. Pr  at, "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse.," *J. Control. Release*, vol. 106, no. 3, pp. 407–15, Sep. 2005.
- [18] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, P. Hojman, S. Kranjc, S. Mesojednik, M. P. Rols, and J. Teissie, "Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 635–644, 2009.

- [19] V. Todorovic, U. Kamensek, G. Sersa, and M. Cemazar, "Changing electrode orientation, but not pulse polarity, increases the efficacy of gene electrotransfer to tumors *in vivo*," *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 119–127, 2014.
- [20] R. Heller, Y. Cruz, L. C. Heller, R. A. Gilbert, and M. J. Jaroszeski, "Electrically mediated delivery of plasmid DNA to the skin, using a multielectrode array," *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 357–62, Mar. 2010.
- [21] S. Kos, T. Blagus, M. Cemazar, U. Lampreht Tratar, M. Stimac, L. Prosen, T. Dolinsek, U. Kamensek, S. Kranjc, L. Steinstraesser, G. Vandermeulen, V. Pr  at, and G. Sersa, "Electrotransfer parameters as a tool for controlled and targeted gene expression in skin," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 5, no. 8, p. e356, Aug. 2016.
- [22] M. Don  , M. Sandri, K. Rossini, I. Dell'Aica, M. Podhorska-Okolow, and U. Carraro, "Functional *in vivo* gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 312, no. 4, pp. 1132–8, Dec. 2003.
- [23] L. Zhang, E. Nolan, S. Kreitschitz, and D. P. Rabussay, "Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive *in vivo* electroporation," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1572, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2002.
- [24] S. Babiuk, M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, L. Baizer, R. Stout, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera, and L. Babiuk, "Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin," *Mol. Ther.*, vol. 8, no. 6, pp. 992–8, Dec. 2003.
- [25] L. Daugimont, N. Baron, G. Vandermeulen, N. Pavselj, D. Miklavcic, M. C. Jullien, G. Cabodevila, L. M. Mir, and V. Pr  at, "Hollow microneedle arrays for intradermal drug delivery and DNA electroporation," *J Membr Biol*, vol. 236, no. 1, pp. 117–125, 2010.
- [26] S. Maz  res, D. Sel, M. Golzio, G. Pucihar, Y. Tamzali, D. Miklavcic, and J. Teissié, "Non invasive contact electrodes for *in vivo* localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery," *J Control Release*, vol. 134, no. 2, pp. 125–131, 2009.
- [27] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, and D. Miklavcic, "Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation," *Biomed Eng Online*, vol. 12, p. 16, 2013.
- [28] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissié, and M. Golzio, "Direct visualization at the single-cell level of ARNsi electrotransfer into cancer cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 26, pp. 10443–10447, 2011.
- [29] J.-M. Escoffre, A. Debin, J.-P. Reynes, D. Drocourt, G. Tiraby, L. Hellaudais, J. Teissie, and M. Golzio, "Long-lasting *in vivo* gene silencing by electrotransfer of shRNA expressing plasmid," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 7, no. 2, pp. 109–16, Apr. 2008.
- [30] K. E. Broderick, A. Chan, F. Lin, X. Shen, G. Kichaev, A. S. Khan, J. Aubin, T. S. Zimmermann, and N. Y. Sardesai, "Optimized *in vivo* transfer of small interfering RNA targeting dermal tissue using *in vivo* surface electroporation," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 1, p. e11, 2012.
- [31] C. Marie, G. Vandermeulen, M. Quiviger, M. Richard, V. Pr  at, and D. Scherman, "pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells," *J. Gene Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 323–32, Apr. 2010.

- [32] G. Vandermeulen, H. Richiardi, V. Escriou, J. Ni, P. Fournier, V. Schirmacher, D. Scherman, and V. Pr  at, "Skin-specific promoters for genetic immunisation by DNA electroporation.," *Vaccine*, vol. 27, no. 32, pp. 4272–7, Jul. 2009.
- [33] N. Tesic and M. Cemazar, "In vitro targeted gene electrotransfer to endothelial cells with plasmid DNA containing human endothelin-1 promoter," in *Journal of Membrane Biology*, 2013, vol. 246, no. 10, pp. 783–791.
- [34] S. Chabot, J. Orio, M. Schmeer, M. Schleef, M. Golzio, and J. Teiss  , "Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery.," *Gene Ther.*, vol. 20, no. 1, pp. 62–8, Jan. 2013.
- [35] G. Tevz, S. Kranjc, M. Cemazar, U. Kamensek, A. Coer, M. Krzan, S. Vidic, D. Pavlin, and G. Sersa, "Controlled systemic release of interleukin-12 after gene electrotransfer to muscle for cancer gene therapy alone or in combination with ionizing radiation in murine sarcomas," *J Gene Med*, vol. 11, no. 12, pp. 1125–1137, 2009.
- [36] M. Cemazar, D. Pavlin, S. Kranjc, A. Grosel, S. Mesojednik, and G. Sersa, "Sequence and time dependence of transfection efficiency of electrically-assisted gene delivery to tumors in mice," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 3, no. 1, 2006.
- [37] S. Mesojednik, D. Pavlin, G. Sersa, A. Coer, S. Kranjc, A. Grosel, G. Tevz, and M. Cemazar, "The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 14, no. 17, 2007.
- [38] J. M. McMahon, E. Signori, K. E. Wells, V. M. Fazio, and D. J. Wells, "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage.," *Gene Ther*, vol. 8, no. 16, pp. 1264–1270, 2001.
- [39] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, P. Hojman, S. Kranjc, S. Mesojednik, M. P. Rols, and J. Teiss  , "Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 635–644, 2009.
- [40] S. Mesojednik, D. Pavlin, G. Sersa, A. Coer, S. Kranjc, A. Grosel, G. Tevz, and M. Cemazar, "The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 14, no. 17, pp. 1261–1269, 2007.
- [41] M. Cemazar, G. Sersa, J. Wilson, G. M. Tozer, S. L. Hart, A. Grosel, and G. U. Dachs, "Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector," *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, no. 4, 2002.
- [42] K. Znidar, M. Bosnjak, M. Cemazar, and L. C. Heller, "Cytosolic DNA Sensor Upregulation Accompanies DNA Electrotransfer in B16.F10 Melanoma Cells," *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 5, no. 6, e322. doi: 10.1038/mtna.2016.34.pp. 399-406, 2016.
- [43] Semenova N, Bosnjak M, Markelc B, Znidar K, **Cemazar** M, Heller L. Multiple cytosolic DNA sensors bind plasmid DNA after transfection. *Nucleic Acids Res*. 2019. pii: gkz768. doi: 10.1093/nar/gkz768
- [44] P. Chiarella, E. Massi, M. De Robertis, A. Sibilio, P. Parrella, V. M. Fazio, and E. Signori, "Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration.," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 8, no. 11, pp. 1645–57, Nov. 2008.
- [45] J. J. Drabick, J. Glasspool-Malone, A. King, and R. W. Malone, "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are

- significantly enhanced by in vivo electroporation.,” *Mol. Ther.*, vol. 3, no. 2, pp. 249–55, Feb. 2001.
- [46] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, and D. Miklavčič, “Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, pp. 295–320, Jul. 2014.
 - [47] M. Nomura, Y. Nakata, T. Inoue, A. Uzawa, S. Itamura, K. Nerome, M. Akashi, and G. Suzuki, “In vivo induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule,” *J. Immunol. Methods*, vol. 193, no. 1, pp. 41–9, Jul. 1996.
 - [48] G. L. Niu, R. Heller, R. Catlett-Falcone, D. Coppola, M. Jaroszeski, W. Dalton, R. Jove, and H. Yu, “Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 20, pp. 5059–5063, 1999.
 - [49] F. M. Andre and L. M. Mir, “Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects,” *Curr Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 267–280, 2010.
 - [50] T. Dolinsek, B. Markelj, G. Sersa, A. Coer, M. Stimac, J. Lavrencak, A. Brozic, S. Kranjc, and M. Cemazar, “Multiple Delivery of ARNsi against Endoglin into Murine Mammary Adenocarcinoma Prevents Angiogenesis and Delays Tumor Growth,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, 2013.
 - [51] L. Heller, C. Pottinger, M. J. Jaroszeski, R. Gilbert, and R. Heller, “In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumor immunity,” *Melanoma Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 577–583, 2000.
 - [52] S. L. Li, X. J. Zhang, and X. Q. Xia, “Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 10, pp. 762–768, 2002.
 - [53] L. Heller, V. Todorovic, and M. Cemazar, “Electrotransfer of single-stranded or double-stranded DNA induces complete regression of palpable B16.F10 mouse melanomas,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 20, no. 12, pp. 695–700, 2013.
 - [54] M. Cemazar, T. Jarm, and G. Sersa, “Cancer electrogene therapy with interleukin-12,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 300–311, 2010.
 - [55] G. Trinchieri, “Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 133–146, 2003.
 - [56] L. C. Heller and R. Heller, “In vivo electroporation for gene therapy,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, no. 9, pp. 890–897, 2006.
 - [57] J. M. Escoffre, J. Teissié, and M. P. Rols, “Gene transfer: how can the biological barriers be overcome?,” *J Membr Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 61–74, 2010.
 - [58] M. Cemazar and G. Sersa, “Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues,” *Curr Opin Mol Ther.*, vol. 9, no. 6, pp. 554–562, 2007.
 - [59] T. Cichoń, L. Jamroz, J. Glogowska, E. Missol-Kolka, and S. Szala, “Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: inhibition of primary tumor growth and metastatic spread,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, no. 9, pp. 771–7, Oct. 2002.
 - [60] M. Uesato, Y. Gunji, T. Tomonaga, S. Miyazaki, T. Shiratori, H. Matsubara, T. Kouzu, H. Shimada, F. Nomura, and T. Ochiai, “Synergistic antitumor effect of antiangiogenic factor genes on colon 26 produced by low-voltage electroporation,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, no. 9, pp. 625–32, Sep. 2004.

- [61] J. M. Weiss, R. Shivakumar, S. Feller, L.-H. Li, A. Hanson, W. E. Fogler, J. C. Frattoloni, and L. N. Liu, "Rapid, in vivo, evaluation of antiangiogenic and antineoplastic gene products by nonviral transfection of tumor cells.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, no. 5, pp. 346–53, May 2004.
- [62] N. Tesic, U. Kamensek, G. Sersa, S. Kranjc, M. Stimac, U. Lamprecht, V. Preat, G. Vandermeulen, M. Butinar, B. Turk, and M. Cemazar, "Endoglin (CD105) Silencing Mediated by shRNA Under the Control of Endothelin-1 Promoter for Targeted Gene Therapy of Melanoma," *Mol. Ther. Acids*, vol. 4, 2015.
- [63] T. Dolinsek, G. Sersa, L. Prosen, M. Bosnjak, M. Stimac, U. Razborsek, and M. Cemazar, "Electrotransfer of plasmid DNA encoding an anti-mouse endoglin (CD105) shRNA to B16 melanoma tumors with low and high metastatic potential results in pronounced anti-tumor effects," *Cancers (Basel)*, vol. 8, no. 1, 2015.
- [64] J. M. McMahon and D. J. Wells, "Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status.," *BioDrugs*, vol. 18, no. 3, pp. 155–65, 2004.
- [65] P. Lefesvre, J. Attema, and D. van Bekkum, "A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer.," *BMC Mol. Biol.*, vol. 3, p. 12, Aug. 2002.
- [66] N. Perez, P. Bigey, D. Scherman, O. Danos, M. Piechaczyk, and M. Pelegrin, "Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation.," *Genet. Vaccines Ther.*, vol. 2, no. 1, p. 2, Mar. 2004.
- [67] A. I. Daud, R. C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A. I. Riker, V. K. Sondak, P. N. Munster, D. M. Sullivan, K. E. Ugen, J. L. Messina, and R. Heller, "Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 36, pp. 5896–5903, 2008.
- [68] D. Pavlin, M. Cemazar, A. Cor, G. Sersa, A. Pogacnik, and N. Tozon, "Electrocytogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors," *Radiol Oncol*, vol. 45, no. 1, pp. 31–39, 2011.
- [69] D. Pavlin, M. Cemazar, G. Sersa, and N. Tozon, "IL-12 based gene therapy in veterinary medicine.," *J. Transl. Med.*, vol. 10, p. 234, 2012.
- [70] G. Sersa, J. Teissie, M. Cemazar, E. Signori, U. Kamensek, G. Marshall, and D. Miklavcic, "Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer.," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 64, no. 10, pp. 1315–27, Oct. 2015.
- [71] C. Y. Calvet and L. M. Mir, "The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 165–77, Jun. 2016.
- [72] A. Sedlar, T. Dolinsek, B. Markelc, L. Prosen, S. Kranjc, M. Bosnjak, T. Blagus, M. Cemazar, and G. Sersa, "Potentiation of electrochemotherapy by intramuscular IL-12 gene electrotransfer in murine sarcoma and carcinoma with different immunogenicity," *Radiol. Oncol.*, vol. 46, no. 4, 2012.
- [73] S. Kranjc, G. Tevz, U. Kamensek, S. Vidic, M. Cemazar, and G. Sersa, "Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regimen in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model," *Radiat Res*, vol. 172, no. 6, pp. 677–685, 2009.
- [74] A. Sedlar, S. Kranjc, T. Dolinsek, M. Cemazar, A. Coer, and G. Sersa, "Radiosensitizing effect of intratumoral interleukin-12 gene electrotransfer in murine sarcoma," *BMC Cancer*, vol. 13, 2013.

- [75] J. Cutrera, M. Torrero, K. Shiomitsu, N. Mauldin, and S. Li, "Intratumoral bleomycin and IL-12 electrochemogenetherapy for treating head and neck tumors in dogs.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 423, pp. 319–25, Jan. 2008.
- [76] J. Cutrera, G. King, P. Jones, K. Kicenuik, E. Gumpel, X. Xia, and S. Li, "Safety and efficacy of tumor-targeted interleukin 12 gene therapy in treated and non-treated, metastatic lesions.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 15, no. 1, pp. 44–54, Jan. 2015.
- [77] S. D. Reed, A. Fulmer, J. Buckholz, B. Zhang, J. Cutrera, K. Shiomitsu, and S. Li, "Bleomycin/interleukin-12 electrochemogenetherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs," *Cancer Gene Ther.*, vol. 17, no. 8, pp. 571–578, 2010.
- [78] M. Cemazar, J. Ambrozic Avgustin, D. Pavlin, G. Sersa, A. Poli, A. Krhac Levacic, N. Tesic, U. Lamprecht Tratar, M. Rak, and N. Tozon, "Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours," *Vet Comp Oncol.* vol. 15, no. 2, pp. 641-654, Jun 2017.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por becas de investigación de la Agencia Eslovena de Investigación y se llevó a cabo en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA) y la Acción COST TD1104.



Maja Čemažar realizó su doctorado en ciencias médicas básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Liubliana en 1998. Fue investigadora y doctora postdoctoral en el Gray Cancer Institute, Reino Unido, de 1999 a 2001. Fue investigadora asociada en el Instituto de Farmacología y Biología Estructural en Toulouse, Francia en 2004. Actualmente, trabaja en el Departamento de Oncología Experimental, Instituto de Oncología de Liubliana y enseña biología celular y tumoral en varios cursos en la Universidad de Liubliana y la Universidad de Primorska, Eslovenia. Sus principales intereses de investigación

están en el campo de la electrotransferencia genética con ADN plasmídico que codifica diferentes genes terapéuticos inmunomoduladores y antiangiogénicos. En 2006 recibió el Premio de la República de Eslovenia por sus importantes logros en investigación científica y desarrollo en el campo de la oncología experimental. Es autora de más de 170 artículos en revistas revisadas por pares.

Capítulo 8

Electrotransferencia de vacunas de ADN

Véronique Prétat and Gaëlle Vandermeulen

University of Louvain, Bruselas, Bélgica

Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN son una estrategia atractiva para inducir memoria inmune. Los plásmidos bacterianos se construyen y optimizan para expresar *in vivo* una proteína que inducirá una respuesta inmune. Los estudios preclínicos han demostrado que los antígenos que codifican el ADN plasmídico proporcionan protección en animales pequeños y, en menor medida, en animales grandes para una amplia gama de enfermedades, por ejemplo, infecciones virales y bacterianas, así como vacunas terapéuticas contra el cáncer. Varias vacunas de ADN han sido autorizadas para uso veterinario o están en ensayos clínicos para uso humano.

Las vacunas de ADN comprenden varios elementos clave. Se inserta un promotor previo a la secuencia del antígeno de interés para impulsar la expresión en células de mamíferos tras el cual se sitúa una señal de poliadenilación. La producción de ADN plasmídico requiere la presencia de un origen de replicación y de un marcador específico capaz de seleccionar bacterias que contienen plásmidos después de la transformación y durante el proceso de amplificación. El uso de genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección para la producción de plásmidos plantea problemas de seguridad con las autoridades reguladoras, por lo que ha surgido una nueva generación de esqueletos de plásmidos desprovistos de estos genes.

Las vacunas de ADN son atractivas debido a su estabilidad, bajo costo, fácil producción y capacidad para inducir una respuesta inmune amplia. Al permitir la expresión *in vivo* del antígeno por las células transfectadas, las

vacunas de ADN aseguran una semejanza más cercana al antígeno que las proteínas recombinantes, ya que presentan la glucosilación de mamíferos y otras modificaciones postraduccionales. Son capaces de estimular los tres brazos de inmunidad adaptativa: anticuerpos, células T auxiliares (Th) y linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) y contribuyen a la estimulación de la inmunidad innata. El perfil de seguridad de las vacunas de ADN generalmente se considera bueno y no se ha informado ni de integración observable del ADN en el genoma del huésped ni de autoinmunidad en ensayos clínicos en humanos.

Varios estudios demostraron la robustez plásmidos de ADN que codifican antígenos patógenos y tumorales que provocan una respuesta inmune. Las vacunas de ADN inducen una respuesta predominantemente Th1, una respuesta CTL y anticuerpos, pero se ha demostrado que tanto la ruta de administración como el método de administración influyen en el tipo y la magnitud de la respuesta inmune. Para provocar respuestas de CTL, el antígeno debe estar presente en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). La proteína es producida directamente por la APC transfectada o la alcanza a través de la endocitosis que ella misma hace cuando la proteína es producida por otras células transfectadas (presentación cruzada). Los péptidos derivados de la degradación de proteínas se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) clase I o clase II. La asociación de péptidos a MHC clase I estimula CTL mientras que la unión a MHC clase II estimula las células Th. Aunque las vacunas de ADN se desarrollaron inicialmente para introducir el antígeno en la ruta de procesamiento de MHC de clase I para inducir CTL, también se ha demostrado que generan respuestas protectoras de anticuerpos: una proteína transmembrana o secretada puede activar las células B para la producción de anticuerpos.

En los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar su inmunogenicidad y potencial clínico basándose en el uso de electroporación, optimización de codones de las construcciones de plásmidos o administración conjunta de adyuvantes.

Administración de vacunas de ADN por electroporación

Incluso si las vacunas de ADN plasmídico desnudo inyectadas en el músculo pueden inducir una respuesta inmune, generalmente se induce una respuesta de magnitud relativamente baja en especies de gran tamaño.

La electroporación resuelve dos limitaciones de la pobre inmunogenicidad de las vacunas de ADN. (i) Al inducir una permeabilización transitoria de la membrana y al promover la electroforesis del ADN cargado negativamente, facilita la absorción de ADN en las células huésped. De este modo, la expresión del antígeno se potencia fuertemente, generalmente en dos órdenes de magnitud, en el músculo o la piel. (ii) Al crear un bajo nivel de inflamación en el sitio de inyección / electroporación, mejora el reclutamiento de APC.

En consecuencia, la administración de vacunas de ADN mediada por electroporación mejora hasta 100 veces la respuesta inmune provocada en comparación con la inyección del ADN solamente. Es una estrategia útil para aumentar la respuesta humoral y celular en animales pequeños y grandes, incluidos los primates. Una revisión de los estudios preclínicos indica que la vacunación de ADN mediada por electroporación induce respuestas celulares duraderas y robustas caracterizadas por la inducción de CTL, interferón e interleucina-2 por las células T CD4 + y CD8 +. Los anticuerpos generalmente son detectables. La combinación con adyuvante (por ejemplo: Estimulación de TLR-9 por CpG o interleucina-12) aumenta la potencia de la vacunación con ADN.

Se han investigado dos órganos principales para la inmunización con ADN por electroporación. La piel es un órgano inmunocompetente con muchas APC residentes, por ejemplo, las células de Langerhans cubren aproximadamente el 20% de la superficie de la piel, es de fácil acceso y la expresión de proteínas se limita a unas pocas semanas. Por otro lado, el músculo induce una expresión a largo plazo y más fuerte de la proteína codificada por el plásmido, pero contiene pocas APC. La mayoría de los estudios preclínicos indican que se observa una respuesta humoral más fuerte después de la electrotransferencia de ADN intramuscular que intradérmica.

Varias vacunas de ADN mediadas por electroporación se encuentran actualmente en ensayos clínicos como vacunas terapéuticas contra el cáncer (por ejemplo, contra melanoma o cáncer de próstata) y enfermedades infecciosas crónicas (por ejemplo, VIH, VHC). Datos de estudios que aún no se han completado sugieren que la vacunación mediada por electroporación es bien tolerada y mejora la potencia de las vacunas de ADN. Los electroporadores también se han optimizado para mejorar la respuesta inmune y/o mejorar la comodidad del paciente al recibir el tratamiento.

Lecturas Recomendados

Vacunas de ADN

- [1] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):313-29. Review
- [2] Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, Pr  at V. New Generation of Plasmid Backbones Devoid of Antibiotic Resistance Marker for Gene Therapy Trials. *Mol Ther*. 2011;19(11):1942-9. Review
- [3] Lopes A, Vandermeulen G, Pr  at V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Apr 5;38(1):146. Review

Vacunas de ADN administradas por electroporación

- [4] Todorova B, Adam L, Culina S, Boisgard R, Martinon F, Cosma A, Ustav M, Kortulewski T, Le Grand R, Chapon C. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Sci Rep*. 2017 Jun 23;7(1):4122.
- [5] Sardesai NY, Weiner DB. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(3):421-9. Review.
- [6] Broderick KE, Humeau LM. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Feb;14(2):195-204. Review
- [7] Vandermeulen G, Staes E, Vanderhaeghen ML, Bureau MF, Scherman D, Pr  at V. Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release*. 2007;124(1-2):81-7.
- [8] Vandermeulen G, Vanvarenberg K, De Beuckelaer A, De Koker S, Lambricht L, Uyttenhove C, Reschner A, Vanderplasschen A, Grooten J, Pr  at V. The site of administration influences both the type and the magnitude of the immune response induced by DNA vaccine electroporation. *Vaccine*. 2015 Jun 22;33(28):3179-85.

Ensayos clínicos con vacunas de ADN administradas por electroporación

- [9] Lambricht L, Lopes A, Kos S, Sersa G, Pr  at V, Vandermeulen G. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(2):295-310.
- [10] El-Kamary SS, Billington M, Deitz S, Colby E, Rhinehart H, Wu Y, Blackwelder W, Edelman R, Lee A, King A. Safety and tolerability of the Easy VaxTM clinical epidermal electroporation system in healthy adults. *Mol Ther*. 2012;20(1):214-20.
- [11] Yang FQ, Yu YY, Wang GQ, Chen J, Li JH, Li YQ, Rao GR, Mo GY, Luo XR, Chen GM. A pilot randomized controlled trial of dual-plasmid HBV DNA vaccine mediated by in vivo electroporation in chronic hepatitis B patients under lamivudine chemotherapy. *J Viral Hepat*. 2012;19(8):581-93.

- [12] Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, Hannaman D, Gardiner DF, Dugin DP, Boente-Carrera M, Vittorino R, Caskey M, Andersen J, Huang Y, Cox JH, Tarragona-Fiol T, Gill DK, Cheeseman H, Clark L, Dally L, Smith C, Schmidt C, Park HH, Kopycinski JT, Gilmour J, Fast P, Bernard R, Ho DD. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One*. 2011;6(5):e19252.
- [13] Chudley L, McCann K, Mander A, Tjelle T, Campos-Perez J, Godeseth R, Creak A, Dobbyn J, Johnson B, Bass P, Heath C, Kerr P, Mathiesen I, Dearnaley D, Stevenson F, Ottensmeier C. DNA fusion-gene vaccination in patients with prostate cancer induces high-frequency CD8(+) T-cell responses and increases PSA doubling time. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 May 22.

Optimización de métodos de transfección

- [14] Lin F, Shen X, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, Yan J, Kobinger GP, Bello A, Khan AS, Broderick KE, Sardesai NY. Optimization of electroporation-enhanced intradermal delivery of DNA vaccine using a minimally invasive surface device. *Hum Gene Ther Methods*. 2012;23(3):157-68.
- [15] Hallengard D, Bråve A, Isagulants M, Blomberg P, Enger J, Stout R, King A, Wahren B. A combination of intradermal jet-injection and electroporation overcomes in vivo dose restriction of DNA vaccines. *Genet Vaccines Ther*. 2012;10(1):5.
- [16] Kos S, Vanvarenberg K, Dolinsek T, Cemazar M, Jelenc J, Prémat V, Sersa G, Vandermeulen G. Gene electrotransfer into skin using noninvasive multi-electrode array for vaccination and wound healing. *Bioelectrochemistry*. 2017 Apr;114:33-41.

Capítulo 9

Electroquimioterapia desde el laboratorio hasta el paciente: principios, mecanismos y aplicaciones

Gregor Serša

Institute of Oncology Liubliana, Eslovenia

Resumen: La electroquimioterapia consiste en la administración de un fármaco quimioterapéutico seguido de la aplicación de pulsos eléctricos al tumor, para facilitar la captación del fármaco en las células. Actualmente solo se utilizan dos quimioterapéuticos en electroquimioterapia, la bleomicina y el cisplatino, para los cuales resulta difícil el transporte a través de la membrana plasmática sin electroporación de por medio. Además de estos dos fármacos, también se usa calcio, tratamiento que se denomina electroporación con calcio. Los estudios preclínicos establecieron los parámetros del tratamiento, la ruta de administración del fármaco y demostraron su efectividad en varios modelos experimentales de tumores. Basada en los mecanismos de acción conocidos, la electroquimioterapia se ha probado con éxito en la clínica y ahora es un tratamiento estándar de tumores cutáneos y metástasis. La electroquimioterapia como plataforma tecnológica se está comenzando a utilizar para el tratamiento de tumores más grandes y profundos. Con nuevos electrodos y nuevos electroporadores, se están realizando ensayos clínicos para el tratamiento de tumores primarios y metástasis hepáticas y pancreáticas, metástasis óseas, sarcomas de tejidos blandos, así como metástasis cerebrales, tumores de esófago y de recto.

Introducción

La electroquimioterapia consiste en la administración de un fármaco quimioterapéutico seguido de la aplicación de pulsos eléctricos al tumor, para facilitar la absorción del fármaco en las células. Los protocolos de electroquimioterapia se optimizaron en función de estudios preclínicos in

vitro e in vivo, y se esclarecieron los mecanismos básicos, como la electroporación de las células, el atrapamiento de fármacos en el tumor (por el fenómeno de bloqueo vascular), el efecto disruptor vascular y la implicación de la respuesta inmune. En base a todos estos datos, la electroquimioterapia con bleomicina y cisplatino se llevó rápidamente a ensayos clínicos. Hasta hoy, la electroquimioterapia se ha extendido en Europa a 160 centros oncológicos. En la línea de tiempo del desarrollo de la electroquimioterapia, los hitos de su desarrollo son: el primer estudio multicéntrico (ESOPE), y las primeras pautas de procedimiento estandarizadas (SOP, por sus siglas en inglés), el desarrollo de nuevos electrodos, y finalmente la inclusión en las guías para el tratamiento de tumores en diferentes países de Europa (Fig.1). Varias revisiones sobre electroporación y sus aplicaciones en biomedicina y práctica clínica han sido publicadas [1–4].

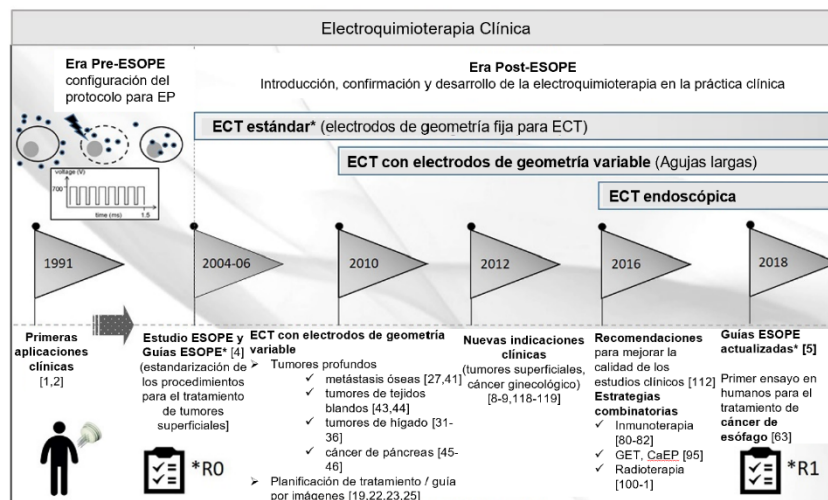


Figura 1. Desarrollo y cronograma de la electroquimioterapia clínica. Leyenda: EP = electroporación; ESOPE = Procedimientos operativos estándar europeos de electroquimioterapia; GET = electrotransferencia de genes; Tx = tratamiento. Con permiso de (4).

ESTUDIOS PRECLINICOS

Estudios in vitro

La electroporación demostró ser efectiva para facilitar el transporte de diferentes moléculas a través de la membrana plasmática para en estudios bioquímicos y farmacológicos. Sin embargo, cuando se usan quimioterapéuticos, este transporte facilitado aumenta la acumulación intracelular de fármacos con el objetivo de aumentar su citotoxicidad. La electroporación solo puede facilitar el transporte de un fármaco a través de la membrana celular cuando es poco o nada penetrante. Los candidatos adecuados para la electroquimioterapia se limitan a aquellos fármacos que son hidrofílicos y/o carecen de un sistema de transporte en la membrana. Se probaron varios fármacos quimioterapéuticos *in vitro* para su posible aplicación en combinación con electroporación. Entre los fármacos probados, solo dos fueron identificados como candidatos potenciales para la electroquimioterapia de pacientes con cáncer. El primero es la bleomicina, que es hidrofílica y tiene un transporte muy restringido a través de la membrana celular, pero su citotoxicidad puede potenciarse varias veces por electroporación. Unos pocos cientos de moléculas internalizadas de bleomicina son suficientes para matar la célula. El segundo es el cisplatino, cuyo transporte a través de la membrana celular también se ve obstaculizado. Los primeros estudios sugirieron que el cisplatino se transporta a través de la membrana plasmática principalmente por difusión pasiva, mientras que estudios recientes han demostrado que los transportadores que controlan la homeostasis intracelular de cobre están significativamente involucrados en la entrada (Ctr1) y la salida (ATP7A y ATP7B) del cisplatino [5]. La electroporación de la membrana plasmática permite un mayor flujo y acumulación de fármaco en las células, lo que resulta en un aumento de la citotoxicidad del cisplatino hasta 80 veces [6–8]. Estos datos preclínicos prometedores obtenidos *in vitro* en varias líneas celulares diferentes han allanado el camino para probar estos dos fármacos *in vivo* en diferentes modelos tumorales. Recientemente se ha demostrado que el calcio es un fármaco adecuado para la electroquimioterapia. Su citotoxicidad aumenta, el método se llama electroporación con calcio [9].

Estudios in vivo

La bleomicina y el cisplatino se probaron en un protocolo de electroquimioterapia en modelos animales *in vivo* (Fig. 2). Se realizaron amplios estudios en diferentes modelos animales con diferentes tipos de tumores, ya sea transplantados o espontáneos [6–8,10].

En estos estudios, se determinaron diferentes factores que controlan la efectividad antitumoral:

- ❖ Los fármacos pueden administrarse por *diferentes vías*, pueden inyectarse o bien de forma intravenosa o bien intratumoralmente. El requisito previo es que, en el momento de la aplicación de los pulsos eléctricos al tumor, una cantidad suficiente de fármaco esté presente en el mismo. Por lo tanto, después de la administración intravenosa del fármaco en pequeños animales de laboratorio (por ejemplo, 4 mg/kg de cisplatino o 0,5 mg/kg de bleomicina), solo se necesitan unos pocos minutos para alcanzar la concentración máxima de fármaco en los tumores. Después de la administración intratumoral, este intervalo es aún más corto y la aplicación de pulsos eléctricos debe seguir a la administración del medicamento lo antes posible (dentro del primer minuto) [6–8].
- ❖ Se puede lograr una buena efectividad antitumoral mediante una buena electroporación del tejido. La electroporación de la membrana plasmática se obtiene si la célula se expone a un campo eléctrico suficientemente alto. Esto depende de la *distribución del campo eléctrico en el tejido* que está controlada por la geometría del electrodo y la composición del tejido. La distribución del campo eléctrico en el tejido y por lo tanto la electroporación pueden mejorarse rotando el campo eléctrico. Los tumores superficiales pueden tratarse eficazmente con electrodos de placa, mientras que, para las partes más profundas del tumor, la distribución adecuada del campo eléctrico se garantiza mediante el uso de electrodos de aguja [11-13].
- ❖ La efectividad antitumoral depende de la *amplitud, número, frecuencia y duración de los pulsos eléctricos aplicados*. Varios estudios en los que se usaron electrodos de placa paralela para tumores superficiales mostraron que se necesita una relación de voltaje sobre distancia superior a 1000 V/cm para la electroporación del tumor y que por encima de 1500 V/cm se produjeron cambios irreversibles en los tejidos normales adyacentes al tumor. Para otros tipos de electrodos, la distribución del campo eléctrico y, por lo tanto, también la amplitud necesaria de los pulsos eléctricos, deben determinarse mediante cálculos numéricos. Las frecuencias de repetición de los pulsos para la electroquimioterapia son de 1 Hz o 5 kHz con el mismo efecto si la concentración del fármaco presente en el tumor es lo suficientemente alta. El número mínimo de pulsos utilizados es 4; la mayoría de los estudios utilizan 8 pulsos eléctricos de 100 μ s [12,14-16].

Todos los experimentos realizados in vivo en animales proporcionaron datos suficientes para demostrar que la electroquimioterapia con bleomicina o cisplatino es efectiva en el tratamiento de tumores sólidos, utilizando concentraciones de fármacos que no tienen o tienen un efecto antitumoral

mínimo sin la aplicación de pulsos eléctricos. Un solo tratamiento por electroquimioterapia ya induce una regresión parcial o completa de los tumores, mientras que el tratamiento con bleomicina o cisplatino solo o la aplicación de pulsos eléctricos solo tiene un efecto antitumoral mínimo o nulo.

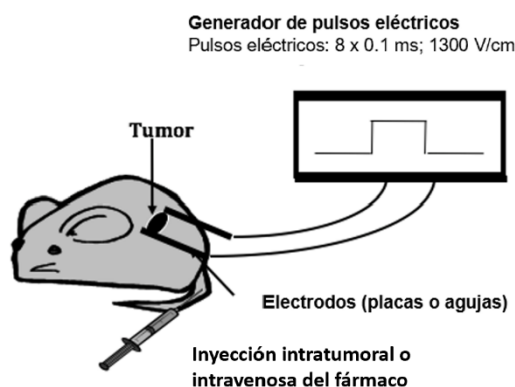


Figura 2. Protocolo de electroquimioterapia de tumores experimentales presentado esquemáticamente. El fármaco se inyecta por vía intravenosa o intratumoral a dosis que generalmente no ejercen un efecto antitumoral. Después de un intervalo que permite la suficiente acumulación del fármaco en los tumores, se aplican pulsos eléctricos al tumor mediante electrodos de placa o aguja. Los electrodos se colocan de tal manera que todo el tumor queda abarcado entre los electrodos, proporcionando una buena distribución del campo eléctrico en los tumores para una electroporación óptima todas las células tumorales.

Mecanismos de acción

El mecanismo principal de la electroquimioterapia es la electroporación de las células presentes en los tumores lo que aumenta la efectividad del fármaco al permitir que éste alcance el objetivo intracelular. Esto se demostró en estudios que midieron la acumulación de fármaco intratumoral y la cantidad de fármaco unido al ADN. Básicamente, las cantidades de bleomicina y cisplatino en los tumores electroporados fueron hasta 2-4 veces mayores que en aquellos sin aplicación de pulsos eléctricos [6-8]. Además de la electroporación de membrana, que facilita el transporte del fármaco y su acumulación en la célula, se describieron otros mecanismos que intervienen en la efectividad antitumoral de la electroquimioterapia. La aplicación de pulsos eléctricos a los tejidos induce una reducción transitoria, pero reversible, del flujo sanguíneo [17,18]. La restauración del flujo

sanguíneo en el tejido normal es mucho más rápida que en los tumores [19,20]. El bloqueo vascular en el tumor induce el atrapamiento del fármaco en su interior, proporcionando más tiempo para que el fármaco actúe.

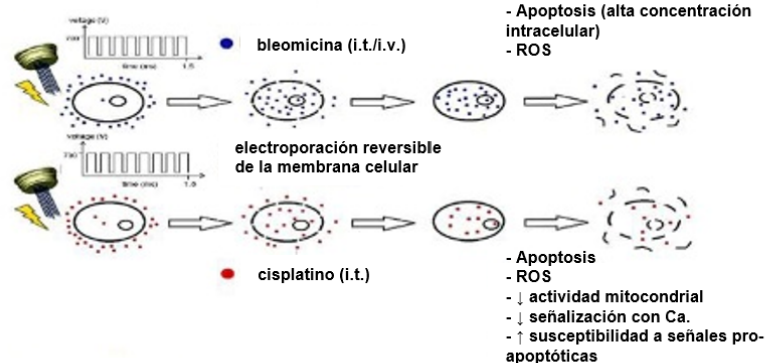
El efecto citotóxico de la electroquimioterapia no se limita solo a las células tumorales. La electroquimioterapia también actúa sobre las células del estroma, incluidas las células endoteliales de los vasos tumorales, que sufren la muerte celular [20]. En consecuencia, por la acción disruptiva vascular de la electroquimioterapia, se produce una cascada de muerte de células tumorales debido a la hipoxia de larga duración en los vasos afectados. Esto representa otro mecanismo más involucrado en la efectividad antitumoral de la electroquimioterapia, es decir, un efecto disruptor vascular [21-23]. Esta acción disruptiva vascular de la electroquimioterapia es importante en situaciones clínicas donde los tumores hemorrágicos necesitan ser tratados [24].

Se observó una diferencia en la efectividad antitumoral de la electroquimioterapia entre animales experimentales inmunocompetentes e inmunodeficientes, lo que indica la implicación de la respuesta inmune en la eficacia antitumoral [25]. Debido al desprendimiento masivo de antígenos tumorales en los organismos después de la electroquimioterapia, la inmunidad sistémica puede inducirse y regularse por un tratamiento adicional con modificadores de la respuesta biológica como IL-2, IL-12, GM-CSF y TNF- α [25-30].

En resumen, el protocolo de electroquimioterapia se optimizó en estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, y además se dilucidaron los mecanismos básicos. Además de la electroporación de las células, también se demostró el bloqueo vascular que conduce al atrapamiento del fármaco en los tumores, un efecto disruptor vascular y la implicación de la respuesta inmune. Sobre la base de todos estos datos, la electroquimioterapia con bleomicina y cisplatino progresó rápidamente a ensayos clínicos y ahora se utiliza de forma rutinaria en oncología humana y veterinaria.

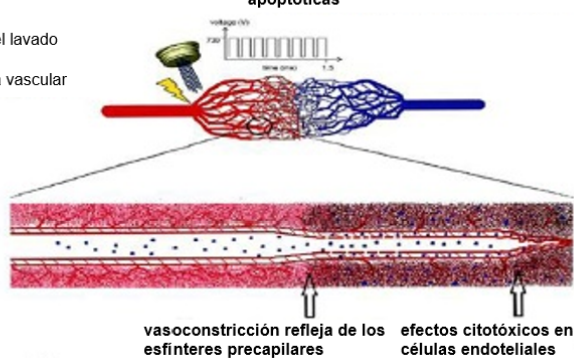
1. Efecto citotóxico directo:

Cortes simple y doble cadena del ADN



2. Efecto anti-vascular:

- INMEDIATO: vascular-lock (↓ el lavado de la quimioterapia)
- RETRASADO acción disruptiva vascular



3. Efectos en el sistema inmune:

- Liberación de DAMPS
- Maduración de células dendríticas
- Linfocitos T citotóxicos CD3/CD8+

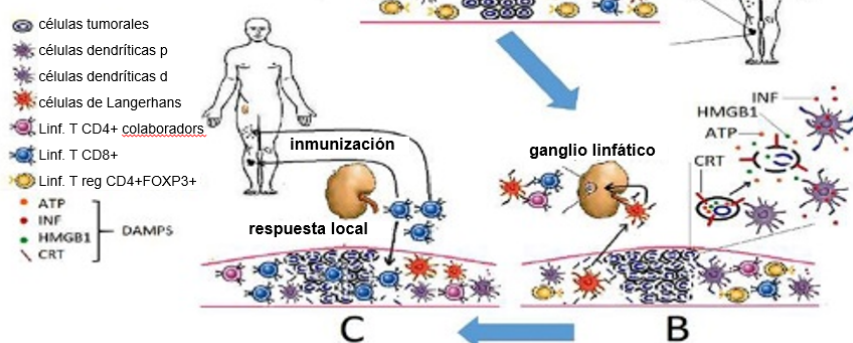


Figura 3: Mecanismos básicos de la electroquimioterapia; efecto citotóxico directo e indirecto, disrupción vascular e inmunomodulación. Con permiso de [3].

Estudios clínicos

El primer estudio clínico se publicó en 1991 realizado sobre los nódulos tumorales en cabeza y cuello [31], al que posteriormente siguieron varios otros [2]. Estos estudios clínicos demostraron la efectividad antitumoral de la electroquimioterapia con bleomicina o cisplatino, administrados por vía intravenosa o intratumoral. Además de haberse demostrado la respuesta en nódulos de melanoma cutáneo o subcutáneo únicos o múltiples, también se demostró en nódulos de cáncer de mama, cabeza y cuello, así como en sarcoma de Kaposi, hipernefroma, condrosarcoma y carcinoma de células basales. Sin embargo, estos estudios clínicos se realizaron con protocolos de tratamiento ligeramente variables, diferentes electrodos y diferentes generadores electroporadores. Por lo tanto, era necesario un estudio prospectivo multi institucional, el cual fue realizado por un consorcio de cuatro centros de cáncer reunidos en el proyecto ESOPE financiado por el 5º Programa Marco de la Comisión Europea. En este estudio, se evaluó la respuesta al tratamiento después de la electroquimioterapia según el tipo de tumor, el fármaco utilizado, la vía de administración y el tipo de electrodos [32]. Los resultados de este estudio se pueden resumir de la siguiente manera:

- Se logró una tasa de respuesta objetiva del 85% (tasa de respuesta completa del 73,7%), independientemente de la histología tumoral y el fármaco o la vía de administración utilizada.
- A los 150 días después del tratamiento, la tasa de control local fue del 88% con bleomicina administrada por vía intravenosa, del 73% con bleomicina administrada por vía intratumoral y del 75% con cisplatino administrado por vía intratumoral, lo que demuestra que los tres enfoques fueron igualmente efectivos para el control local de la enfermedad.
- Los efectos secundarios fueron menores y tolerables (contracciones musculares y dolor).

Los resultados del estudio ESOPE confirmaron los resultados previamente informados sobre la efectividad del tratamiento y se prepararon procedimientos operativos estándar (SOP, por sus siglas en inglés) para la electroquimioterapia [33].

El estudio ESOPE sentó las bases para la introducción de la electroquimioterapia en Europa. Después de los resultados alentadores del estudio ESOPE, varios centros oncológicos comenzaron a utilizar la electroquimioterapia e informaron los resultados de sus estudios. Colectivamente, los resultados fueron nuevamente similares a los reportados en el estudio ESOPE. Sin embargo, se informaron algunos

avances en el tratamiento. Predominantemente se informó que los tumores de más de 3 cm de diámetro pueden tratarse con éxito mediante electroquimioterapia en sucesivas sesiones de electroquimioterapia [34,35]. En general, la electroquimioterapia proporciona un beneficio a los pacientes, especialmente mejorando su calidad de vida [35].

Uso clínico y procedimientos de tratamiento para electroquimioterapia

En base a todos estos reportes, la electroquimioterapia ha sido reconocida como una opción de tratamiento para el melanoma diseminado, y además ha sido incluida en muchas guías nacionales e internacionales para el tratamiento de este tipo tumoral [36].

El uso clínico de esta terapia y sus ventajas se pueden resumir de la siguiente manera:

- Efectiva en el tratamiento de tumores cutáneos o subcutáneos de diferente histología.
- Tratamiento paliativo que proporciona una mejoría en la calidad de vida del paciente.
- Tratamiento de elección para tumores refractarios a tratamientos convencionales.
- Tratamiento citorreductor antes de la resección quirúrgica para preservar función en órganos.
- Tratamiento de metástasis hemorrágicas.

El tratamiento resulta en la erradicación completa del tumor en una sola sesión en la mayoría de los casos. Cuando es necesario, el tratamiento puede repetirse a intervalos de 4 a 8 semanas con igual efectividad antitumoral. El tratamiento tiene un buen resultado estético, no dejando cicatrices en el tejido tratado.

En resumen, la electroquimioterapia ha sido reconocida como un tratamiento válido; más de 160 centros han comenzado a utilizarla y han reportado resultados positivos. Hasta ahora, la efectividad de la terapia se basa en ensayos clínicos de casos, y se necesitan más estudios controlados y aleatorizados para la traducción de esta tecnología en una práctica clínica más amplia y habitual. Para una mayor aceptación de la electroquimioterapia en la comunidad médica, se ha dado el primer paso importante, que es su inclusión recientemente en las directrices NICE, para

el tratamiento de metástasis cutáneas de melanoma, para carcinoma de células basales y para el carcinoma células escamosas.

Recientemente, todos los estudios publicados hasta 2012 sobre electroquimioterapia en el tratamiento de nódulos superficiales se analizaron en una revisión sistemática y un metanálisis [37]. El análisis de datos confirmó que la electroquimioterapia tuvo una efectividad significativamente ($p < 0.001$) mayor (en más del 50%) que la bleomicina o el cisplatino solo, donde solo el 8% de los tumores obtenían una respuesta completa. Tras una sesión de electroquimioterapia, el tratamiento puede repetirse con una efectividad similar. La efectividad general de la electroquimioterapia fue del 84,1% de respuestas objetivas (RO), de estas el 59,4% fueron respuestas completas (RC).

Basándose en la amplia aceptación de la electroquimioterapia como técnica efectiva de ablación local, el grupo de expertos que ha estado involucrado en la preparación de las primeras SOP, ha preparado una versión actualizada [38]. Se describen indicaciones, posibles efectos secundarios y procedimientos para la ejecución segura y efectiva de la terapia. La elección de la administración del fármaco y la anestesia depende del tamaño y la cantidad de nódulos tumorales a tratar (Fig. 4).

	Considerar anestesia local / inyección local de la droga	Considerar anestesia general / inyección intravenosa de la droga
Tamaño del tumor	≤ 3 cm	> 3 cm
Número de tumores	≤ 7	> 7
Región adecuada para anestesia local	Sí	No

Figura 4. Decisión sobre la estrategia de tratamiento basada en el número y el tamaño de los tumores a tratar. Con permiso de [38].

Nuevas aplicaciones clínicas de la electroquimioterapia

En base a la experiencia clínica de que la electroquimioterapia se puede usar de manera efectiva en el tratamiento del cáncer con diferentes histologías, cuando se ejecuta adecuadamente, el tratamiento podría usarse también para el tratamiento de tumores profundos. Un requisito previo para

ello es un mayor desarrollo de la tecnología para alcanzar y tratar eficazmente los tumores ubicados en los músculos, el hígado, los huesos, el esófago, el recto, el cerebro u otros órganos internos.

Los primeros informes ya se han publicado en el tratamiento de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal (Fig. 5) [39], carcinoma hepatocelular [40], tumores pancreáticos, metástasis óseas y tumores colorrectales [4]. Estos tratamientos se han llevado a cabo durante la cirugía abierta, sin embargo, las perspectivas futuras están en el tratamiento percutáneo. Algunos intentos ya se han publicado como reportes de casos [41-43].

Una nueva indicación clínica importante en el tratamiento son los tumores de cabeza y cuello. En esta indicación se encuentra el mayor número de tumores tratados recientemente [44,45]. La electroquimioterapia también está ganando importancia en el tratamiento del carcinoma basocelular, donde se obtienen las respuestas completas más altas (> 90%) [44].

El futuro de la electroquimioterapia también está en el tratamiento combinado con inmunoterapia. La electroquimioterapia induce la muerte celular inmunológica, que puede servir como inmunización in situ para la combinación con inhibidores de puntos de control inmunitario. Este concepto ya se está verificando en la clínica [26,46]. Otro enfoque es también combinarlo con terapia génica, por ejemplo, con electrotransferencia génica de un plásmido que codifica la IL12 [47]. Este concepto ya se ha probado preclínicamente, y espera la verificación en oncología humana.

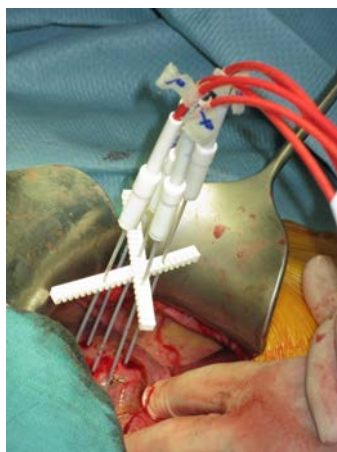


Figura 5. Electroquimioterapia de metástasis hepáticas. Se insertaron electrodos en el tumor y alrededor del tumor en tejido hepático sano y se conectaron al

generador de pulso eléctrico. Se administraron pulsos eléctricos entre los pares de electrodos de acuerdo con la planificación previa del tratamiento.

Conclusión

La electroquimioterapia es una de las aplicaciones biomédicas de la electroporación. Su desarrollo ha alcanzado la aplicación clínica y es un ejemplo de medicina traslacional exitosa. Sin embargo, su desarrollo aún no está terminado; los nuevos desarrollos técnicos ciertamente permitirán más usos clínicos y, finalmente, un beneficio para los pacientes. Otra aplicación de la electroporación aún está en espera de tal traslación, la terapia génica basada en electrotransferencia génica.

Referencias

- [1] Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16(1):295–320.
- [2] Miklavcic D, Mali B, Kos B, Heller R, Sersa G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online.* 2014;13(1):29.
- [3] Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, Marconato R, Valpione S, Imarisio I, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors - Current status: Basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. *Semin Oncol.* 2019 Apr;46(2):173–91.
- [4] Campana LG, Edhemovic I, Soden D, Perrone AM, Scarpa M, Campanacci L, et al. Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. *Eur J Surg Oncol.* 2019 Feb;45(2):92–102.
- [5] Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol Pharmacol.* 2010 Jun;77(6):887–94.
- [6] Mir LM. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry.* 2001 Jan;53(1):1–10.
- [7] Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(4):437–47.
- [8] Mir LM. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl.* 2006 Nov 1;4(11):38–44.
- [9] Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Tramm T, Eriksen J, Gehl J. Direct Therapeutic Applications of Calcium Electroporation to Effectively Induce Tumor Necrosis. *Cancer Res.* 2012 Mar 15;72(6):1336–41.
- [10] Vásquez JL, Ibsen P, Lindberg H, Gehl J. In vitro and in vivo experiments on electrochemotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 2015 Mar;193(3):1009–15.

- [11] Miklavcic D, Beravs K, Semrov D, Cemazar M, Demsar F, Sersa G, et al. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys J*. 1998;74(5):2152–8.
- [12] Miklavcic D, Corovic S, Pucihar G, Pavselj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer, Suppl*. 2006;4(11):45–51.
- [13] Corovic S, Al Sakere B, Haddad V, Miklavcic D, Mir LM. Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2008;7(5):393–400.
- [14] Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(2):232–40.
- [15] Miklavcic D, Pucihar G, Pavlovic M, Ribarič S, Mali M, Maček-Lebar A, et al. The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*. 2005;65(2):121–8.
- [16] Sersa G, Kranjc S, Scancar J, Krzan M, Cemazar M. Electrochemotherapy of mouse sarcoma tumors using electric pulse trains with repetition frequencies of 1 Hz and 5 kHz. *J Membr Biol*. 2010;236(1):155–62.
- [17] Sersa G, Cemazar M, Parkins CS, Chaplin DJ. Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer*. 1999;35(4):672–7.
- [18] Bellard E, Markelc B, Pelofy S, Le Guerroué F, Sersa G, Teissie J, et al. Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electroporation. *J Control Release*. 2012 Nov 10;163(3):396–403.
- [19] Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2002 Jan;1569(1–3):51–8.
- [20] Cemazar M, Parkins CS, Holder AL, Chaplin DJ, Tozer GM, Sersa G. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *Br J Cancer*. 2001 Feb 15;84(4):565–70.
- [21] Jarm T, Cemazar M, Miklavcic D, Sersa G. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(5):729–46.
- [22] Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer a, Podkrajsek M, Sentjurc M, et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer*. 2008;98(2):388–98.
- [23] Markelc B, Bellard E, Sersa G, Pelofy S, Teissie J, Coer A, et al. In vivo molecular imaging and histological analysis of changes induced by electric pulses used for plasmid DNA electrotransfer to the skin: a study in a dorsal window chamber in mice. *J Membr Biol*. 2012 Sep 27;245(9):545–54.
- [24] Gehl J, Geertsens PF. Palliation of haemorrhaging and ulcerated cutaneous tumours using electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl*. 2006 Nov 1;4(11):35–7.
- [25] Serša G, Miklavcic D, Čemazar M, Belehradek J, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochemistry Bioenerg*. 1997;43:279–83.

-
- [26] Calvet CY, Mir LM. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy [Internet]. Vol. 35, Cancer metastasis reviews. Springer; 2016 [cited 2016 May 19]. p. 165–77.
- [27] Sersa G, Cemazar M, Menart V, Gaberc-Porekar V, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy is increased by TNF- α on SA-1 tumors in mice. *Cancer Lett.* 1997;116:85–92.
- [28] Mir LM, Roth C, Orlowski S, Quintin-Colonna F, Fradelizi D, Belehradek J, et al. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J Immunother.* 1995 Jan;17(1):30–8.
- [29] Heller L, Pottinger C, Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity. *Melanoma Res.* 2000;10(6):577–83.
- [30] Cemazar M, Todorovic V, Scancar J, Lamprecht U, Stimac M, Kamensek U, et al. Adjuvant TNF- α therapy to electrochemotherapy with intravenous cisplatin in murine sarcoma exerts synergistic antitumor effectiveness. *Radiol Oncol.* 2015 Mar;49(1):32–40.
- [31] Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orlowski S, Poddevin B, Belehradek J, et al. [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III.* 1991;313(13):613–8.
- [32] Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer, Suppl.* 2006;4(11):3–13.
- [33] Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the CliniporatorTM by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer, Suppl.* 2006;4(11):14–25.
- [34] Campana LG, Mocellin S, Basso M, Puccetti O, De Salvo GL, Chiarion-Sileni V, et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(1):191–9.
- [35] Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M, Illengo M, Rissone M, et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(8):2215–22.
- [36] Testori a., Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild a., et al. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol.* 2009;20(SUPPL. 4):22–9.
- [37] Mali B, Jarm T, Snoj M, Sersa G, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Jan;39(1):4–16.
- [38] Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol (Madr).* 2018 Jul 3;57(7):874–82.
- [39] Edhemovic I, Breclj E, Gasljevic G, Marolt Music M, Gorjup V, Mali B, et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol.* 2014 Sep 1;110(3):320–7.

- [40] Djokic M, Cemazar M, Popovic P, Kos B, Dezman R, Bosnjak M, et al. Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study. *Eur J Surg Oncol*. 2018 May 1;44(5):651–7.
- [41] Tarantino L, Busto G, Nasto A, Nasto RA, Tarantino P, Fristachi R, et al. Electrochemotherapy of cholangiocellular carcinoma at hepatic hilum: A feasibility study. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Oct;44(10):1603–9.
- [42] Cornelis FH, Korenbaum C, Ben Ammar M, Tavolaro S, Nouri-Neuville M, Lotz JP. Multimodal image-guided electrochemotherapy of unresectable liver metastasis from renal cell cancer. *Diagn Interv Imaging*. 2019 May;100(5):309–11.
- [43] Cornelis FH, Ben Ammar M, Nouri-Neuville M, Matton L, Benderra MA, Gligorov J, et al. Percutaneous Image-Guided Electrochemotherapy of Spine Metastases: Initial Experience. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2019 Aug 22;
- [44] Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, Occhini A, Plaschke CC, Groselj A, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *Eur J Cancer*. 2016 Aug;63:41–52.
- [45] Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, Grau JJ, de Bree R, Sersa G, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer*. 2017 Dec;87:172–81.
- [46] Sersa G, Teissie J, Cemazar M, Signori E, Kamensek U, Marshall G, et al. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Oct;64(10):1315–27.
- [47] Milevoj N, Tratar UL, Nemec A, Brožič A, Žnidar K, Serša G, et al. A combination of electrochemotherapy, gene electrotransfer of plasmid encoding canine IL-12 and cytoreductive surgery in the treatment of canine oral malignant melanoma. *Res Vet Sci*. 2019 Feb;122:40–9.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por una beca de investigación de la Agencia Eslovena de Investigación y se llevó a cabo en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA) y fue el resultado del esfuerzo del trabajo de la red de la Acción COST TD1104 (www.electroporation.net).



Gregor Sersa, graduado de la Facultad de Biotecnología de la Universidad de Liubliana en 1978, donde actualmente es profesor de biología molecular. Está empleado en el Instituto de Oncología de Liubliana como Jefe del Departamento de Oncología Experimental. Su campo de interés específico es el efecto del campo eléctrico sobre las células tumorales y los tumores como sistema de administración de fármacos y genes en diferentes enfoques terapéuticos. Además del trabajo experimental, participa activamente en la educación de estudiantes de pregrado y posgrado en la Universidad de Liubliana.

Capítulo 10

Electroquimioterapia en la práctica clínica; Lecciones del desarrollo y la implementación, y perspectivas futuras

Julie Gehl

Clinical Oncology at the University of Copenhagen, Dinamarca.

Resumen: En solo dos décadas, la electroquimioterapia se ha desarrollado desde un tratamiento experimental hasta una terapia estándar. Este documento describe este desarrollo y también detalla cómo se puede implementar una nueva tecnología para beneficiar a los pacientes. La electroquimioterapia es una tecnología que implica el uso de pulsos eléctricos y quimioterapia. Por lo tanto, el desarrollo de esta tecnología ha requerido que especialistas en biología, ingeniería y medicina se unan para conseguirlo. Este documento describe el desarrollo de equipos, así como los procedimientos operativos estándar, para el tratamiento con electroquimioterapia. Este capítulo también se ocupa de compartir conocimientos sobre el uso de la tecnología y garantizar el acceso de los pacientes.

Desarrollo de la electroquimioterapia

Los estudios iniciales sobre la organización de la membrana celular, y sobre la deformación de esta membrana por fuerzas eléctricas, se realizaron particularmente durante los años sesenta y setenta. En 1977 se describió la ruptura de los eritrocitos en un artículo en Nature [1], y otro artículo muy influyente fue el estudio de Neumann de 1982 [2], que demuestra el electrotransferencia de ADN, que ahora es uno de los métodos de laboratorio más utilizados en biología molecular.

Un campo muy activo en la terapia contra el cáncer en los años setenta y ochenta fue la resistencia del cáncer a los fármacos, y había un gran

optimismo en que comprender la resistencia a la terapia en última instancia podría conducir a una cura para el cáncer. Se descubrieron diferentes sistemas de resistencia celular importantes, por ejemplo, el transportador de múltiples fármacos glicoproteína p, que permite a las células cancerosas exportar quimioterapia [3]. En este contexto, la electroporación era una nueva tecnología que permitía eludir la resistencia basada en la membrana, simplemente formando un canal a través de la membrana celular, permitiendo el ingreso de fármacos no permeables.

Se publicaron varios estudios sobre el aumento de la citotoxicidad por electroporación [4,5] in vitro, y también in vivo [6], principalmente del grupo de Lluís Mir en el Institut Gustave-Roussy. También fue aquí donde, en un período de tiempo notablemente corto, se reportó el primer estudio clínico, cuyos resultados preliminares en francés fueron publicados en 1991 y la publicación final fue realizada en 1993 [7]. Unos años más tarde [8], surgieron los primeros estudios provenientes de los EE. UU., así como los estudios provenientes de Eslovenia [9] y Dinamarca [10].

Con el deseo de crear electroporadores para uso clínico, que pudieran realizar tanto terapia génica como electroquimioterapia, que el usuario pudiera adaptar para realizar desarrollos propios, y que fuera un instrumento útil para el médico tratante, es decir, mostrando registros de voltaje y corriente del tratamiento, se formó el consorcio Cliniporator. Este consorcio europeo desarrolló y probó el Cliniporator [11,12].

Un consorcio europeo posterior, llamado ESOPE (Procedimientos Operativos Estándar Europeos para Electroquimioterapia) se propuso obtener la aprobación del Cliniporator para uso clínico, producir electrodos para él, probar el sistema en un protocolo clínico, así como hacer procedimientos operativos estándar concluyentes.

Cuatro grupos entraron en el estudio clínico, de los cuales tres tenían experiencia previa con electroquimioterapia. Y los métodos utilizados diferían entre esos tres centros.

En Francia, se usó un electrodo hexagonal, con 7,9 mm entre electrodos y una secuencia de disparo que permite que cada uno de los siete electrodos se active por pares 8 veces, un total de 96 pulsos entregados a alta frecuencia, con un voltaje de 1,3 kV/cm (relación entre voltaje y distancia de electrodos). Los pacientes fueron sedados, se administró bleomicina por vía intravenosa y el procedimiento se realizó en un quirófano [7].

En los estudios eslovenos, los pacientes fueron tratados con cisplatino por vía intratumoral y con electrodos de placa con 1,3 kV/cm, sin anestesia. Los pulsos se administraron como dos trenes de cuatro pulsos [9].

En Dinamarca utilizamos bleomicina intratumoral, un electrodo de matriz lineal de dos hileras opuestas de agujas activadas entre sí utilizando 1,2 kV/cm, 8 pulsos a 1 Hz. Se utilizó anestesia local con lidocaína [10].

En otras palabras, hubo acuerdo sobre el propósito general, pero tres enfoques diferentes. El estudio ESOPE [13] reunió estos tres enfoques, y en el aspecto técnico, se fabricaron los tres electrodos, la conclusión final de los diferentes métodos y electrodos se definieron en conjunto.

Los procedimientos operativos estándar [14] son muy detallados, lo que permite a un médico sin experiencia previa implementar inmediatamente el procedimiento. Se describe cómo administrar el fármaco y los pulsos, cómo tomar decisiones de tratamiento y cómo evaluar la respuesta y cómo realizar el seguimiento.

Los procedimientos operativos estándar, junto con la disponibilidad de equipos certificados, marcaron un cambio dramático en el uso de la electroquimioterapia. Cuando se publicaron los procedimientos operativos estándar en 2006, solo unos pocos centros europeos utilizaban esta técnica, pero después de la publicación de los procedimientos estandarizados, el número de centros aumentó rápidamente y hoy supera los 140. Se estima que este número continuará creciendo, y también que los electroporadores que ahora se encuentran en varias instituciones se utilizarán cada vez más también para nuevas indicaciones.

Implementación

En un mundo ideal, los nuevos desarrollos en la terapia contra el cáncer están disponibles de inmediato para los pacientes. Pero la experiencia muestra que, desde el desarrollo de la tecnología y la aparición de los primeros resultados, todavía hay un camino bastante largo por recorrer para que el paciente pueda recibir el tratamiento desarrollado. En primer lugar, el equipamiento necesario debe estar presente en la institución, junto con cirujanos expertos y oncólogos capacitados para brindar el tratamiento. La configuración logística debe estar desplegada, y esto incluye la disponibilidad de tiempo en las salas de operaciones y el apoyo de enfermería competente. Los pacientes necesitan saber que el tratamiento es una opción de tratamiento posible para su patología. Como la electroquimioterapia es una opción para pacientes que padecen diferentes tipos de cáncer, requiere un trabajo continuo para dirigirse a especialistas en los diferentes campos. La información disponible en Internet puede ser un recurso importante para los pacientes, así como para los profesionales.

Varios países tienen diferentes mecanismos de aprobación para nuevos tratamientos, y la aprobación puede ser un asunto que requiere mucho tiempo. La agencia nacional más reconocida es el Instituto Nacional de Excelencia en Salud y Atención (NICE, por sus siglas en inglés) en el Reino Unido, que tiene un escrutinio riguroso de las nuevas tecnologías y donde los documentos centrales están disponibles gratuitamente. NICE tiene guías para la electroquimioterapia para metástasis cutáneas y cánceres primarios de piel, respectivamente [15,16]. Estas recomendaciones nacionales, así como la integración de la electroquimioterapia en pautas específicas (ver, por ejemplo, [17]) son muy importantes para mejorar la accesibilidad al tratamiento.

Investigación

Un punto clave es que los procedimientos operativos estándar son una base muy importante, pero deben continuar ampliándose con experiencia más detallada y desarrollos posteriores. Varios grupos han publicado más estudios sobre electroquimioterapia, ampliando la base de conocimientos y respondiendo preguntas específicas de importancia clínica [18-26].

Además, la electroquimioterapia ahora se está desarrollando para una serie de nuevas indicaciones, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, cáncer en mucosas, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón (primario y secundario), cáncer ginecológico, sarcomas, metástasis óseas, así como metástasis cerebrales. Para cada una de estas indicaciones, deberán desarrollarse procedimientos operativos estándar que permitan la difusión del tratamiento.

Referencias

- [1] Kinosita K, Tsong TY. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 1977;268:438-41.
- [2] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982;1(7):841-45.
- [3] Skovsgaard T, Nissen NI. Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacol Ther* 1982;18(3):293-311.
- [4] Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *JpnJCancer Res* 1987;78(0910-5050 SB - M SB - X):1319-21.

-
- [5] Orlowski S, Belehradek Jr J, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporability of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology* 1988;37(24):4727-33.
- [6] Mir LM, Orlowski S, Belehradek J, Jr., Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991;27(1):68-72.
- [7] Belehradek M, Domenge C, Lubinski B, Orlowski S, Belehradek Jr J, Mir LM. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 1993;72(12):3694-700.
- [8] Heller R. Treatment of cutaneous nodules using electrochemotherapy. [Review] [32 refs]. *Journal of the Florida Medical Association* 1995;82(2):147-50.
- [9] Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Jancar B, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *European Journal of Cancer* 1998;34(8):1213-18.
- [10] Gehl J, Geertsens PF. Efficient palliation of hemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000;10(6):585-9.
- [11] Andre FM, Gehl J, Sersa G, Preat V, Hojman P, Eriksen J, et al. Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electroporation in Muscle, Liver, Tumor, and Skin. *Human Gene Therapy* 2008;19(11):1261-71.
- [12] Hojman P, Gissel H, Andre F, Cournil-Henrionnet C, Eriksen J, Gehl J, et al. Physiological effect of high and low voltage pulse combinations for gene electroporation in muscle. *HumGene Ther* 2008(1557-7422 (Electronic)).
- [13] Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Ejc Supplements* 2006;4(11):3-13.
- [14] Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements* 2006;4(11):14-25.
- [15] National Institute for Health and Care Excellence. Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin and melanoma. <http://publications.nice.org.uk/electrochemotherapy-for-metastases-in-the-skin-from-tumours-of-non-skin-origin-and-melanoma-ipg446> 2013.
- [16] (NICE) NfHaCE. Electrochemotherapy for primary basal cell carcinoma and primary squamous cell carcinoma. www.nice.org.uk 2014.
- [17] Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51(14):1989-2007.
- [18] Matthiessen LW, Chalmers RL, Sainsbury DC, Veeramani S, Kessel G, Humphreys AC, et al. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2011;50:621-29.
- [19] Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW, Moss T, Kamby C, Gehl J. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial. *Acta Oncologica* 2012;51(6):713-21.

- [20] Campana LG, Valpione S, Falci C, Mocellin S, Basso M, Corti L, et al. The activity and safety of electrochemotherapy in persistent chest wall recurrence from breast cancer after mastectomy: a phase-II study. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134:1169-78.
- [21] Campana LG, Bianchi G, Mocellin S, Valpione S, Campanacci L, Brunello A, et al. Electrochemotherapy treatment of locally advanced and metastatic soft tissue sarcomas: results of a non-comparative phase II study. *World JSurg* 2014;38:813-22.
- [22] Campana LG, Mali B, Sersa G, Valpione S, Giorgi CA, Strojan P, et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. *BrJ Oral Maxillofac Surg* 2014.
- [23] Curatolo P, Mancini M, Clerico R, Ruggiero A, Frascione P, Di Marco P, et al. Remission of extensive merkel cell carcinoma after electrochemotherapy. *Arch Dermatol* 2009;145(4):494-5.
- [24] Curatolo P, Quaglino P, Marengo F, Mancini M, Nardo T, Mortera C, et al. Electrochemotherapy in the treatment of Kaposi sarcoma cutaneous lesions: a two-center prospective phase II trial. *Ann Surg Oncol* 2012;19(1):192-8.
- [25] Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M, Illengo M, Rissone M, et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2215-22.
- [26] Quaglino P, Matthiessen LW, Curatolo P, Muir T, Bertino G, Kunte C, et al. Predicting patients at risk for pain associated with electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2015;54(3):298-306.



Julie Gehl dirige el Centro de Electrotransferencia Experimental de fármacos y genes del Departamento de Oncología del Hospital Herlev de la Universidad de Copenhague. El centro realiza investigaciones tanto preclínicas como clínicas sobre el uso de electrotransferencia en la administración de fármacos y genes. Julie Gehl es médica especialista en Oncología. La Dra. Gehl tiene un extenso registro de publicaciones, es investigadora principal con gran experiencia y ha guiado a numerosos doctores y estudiantes de doctorado.

Capítulo 11

Desarrollo de equipos y electrodos

Damijan Miklavčič, Matej Reberšek

Universidad de Liubliana, Facultad de Ingeniería Electrónica, Liubliana, Eslovenia

Resumen: Desde los primeros informes sobre la electroporación, han surgido numerosas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas basadas en ésta. Los equipos generadores de pulsos necesarios se caracterizan por la forma de los pulsos que pueden entregar y sus características tales como la amplitud y duración del pulso. Además, los electrodos son la importante "conexión" entre las células / tejidos y el generador de pulsos. La geometría de los electrodos junto con las propiedades de la muestra de células / tejidos determinan la potencia de salida y la energía necesarias que los electroporadores deben proporcionar. La elección del electroporador, es decir el generador de pulsos, depende de la aplicación biotecnológica y biomédica para la que se va a utilizar, pero está inherentemente vinculada también a la elección de los electrodos.

Introducción

Desde los primeros informes sobre la electroporación (tanto irreversible como reversible), se han desarrollado varias aplicaciones y la lista de aplicaciones que se basan en la electroporación aumenta constantemente. Los primeros generadores de pulsos eran simples en su construcción y entregaban pulsos exponencialmente decrecientes, de hasta varios miles de voltios. Además, los electrodos eran muy simples en su diseño: generalmente se usaban electrodos de placas paralelas con un par de milímetros de distancia entre ellos, y las células en suspensión se colocaban entre ellas [1]. Más tarde, se desarrollaron nuevos generadores de pulso que podían / pueden proporcionar casi todas las formas de pulso, y también los

electrodos que se pueden comprar son extremadamente diversos [2–6]. Es importante tener en cuenta que, en la actualidad, con mayor frecuencia se utilizan dispositivos que generan pulsos rectangulares.

La amplitud de los pulsos y su duración dependen en gran medida de la aplicación biotecnológica/biomédica. Para la electroquimioterapia, suelen necesitarse varios pulsos de 1000 V de 100 μ s de duración. Para una transferencia de genes efectiva, se utilizan pulsos más largos, típicamente pulsos de 5-20 ms, pero de amplitud más baja, o una combinación de pulsos cortos de alta amplitud seguidos de pulsos de baja amplitud y más larga duración. Para otras aplicaciones, como la ablación de tejidos mediante electroporación irreversible o la esterilización de agua o alimentos líquidos, se necesitan pulsos de varios miles de voltios. Además de la amplitud y duración del pulso, un parámetro importante a tener en cuenta es también la potencia y la energía que debe proporcionar el generador.

La energía que debe proporcionarse se rige por el voltaje, la corriente y la duración del pulso y / o el número de pulsos. La corriente, si se establece el voltaje, está gobernada por la carga, y esto está determinado por la geometría de la carga, y la carga está determinada por la geometría de la muestra de tejido / célula y por su conductividad eléctrica. La geometría del tejido a exponer a pulsos eléctricos está determinada principalmente por la forma de los electrodos, la distancia entre ellos, la profundidad de penetración / inmersión del electrodo en la muestra. La conductividad eléctrica de la suspensión de tejidos / células depende del tipo de tejido o de las propiedades de la muestra de células y puede aumentar considerablemente mientras los tejidos / células están expuestos a pulsos eléctricos de amplitud suficiente.

En base a las consideraciones anteriores, ningún generador de impulsos se ajustará a todas las aplicaciones y a todas las necesidades de un investigador [7]. Se puede necesitar de un generador de pulsos especializado que solo proporcione los pulsos para una aplicación biotecnológica o biomédica específica, o de un generador de pulsos de propósito general que permita generar "casi" todo lo que el investigador pueda encontrar interesante en su investigación. Independientemente de la elección que se realice, debe seleccionarse el generador en función de los electrodos que se van a utilizar [8-10].

Aplicaciones terapéuticas y tecnológicas de la electroporación

Hoy en día la electroporación se usa ampliamente en diversas aplicaciones biológicas, médicas y biotecnológicas [11-16]. La ablación de tejidos basada en electroporación irreversible tiene menos de una década de antigüedad, pero su eficacia es prometedora, especialmente en el tratamiento de tejidos no malignos. La electroporación irreversible también se usa en el campo del tratamiento de aguas, donde la eficacia del tratamiento químico se mejora con la electroporación, y en la conservación de alimentos donde la electroporación ha demostrado, en algunos casos, ser tan efectiva como la pasteurización [17]. En contraste, las aplicaciones basadas en electroporación reversible están actualmente más extendidas y establecidas en diferentes protocolos experimentales y / o prácticos. Probablemente el más importante de ellos es la introducción de una cantidad definida de moléculas pequeñas o grandes en el citoplasma a través de la membrana plasmática. Además, una ligera variación de los parámetros del campo eléctrico da como resultado una aplicación donde las moléculas se pueden insertar directamente en la membrana plasmática o las células se pueden fusionar de manera efectiva.

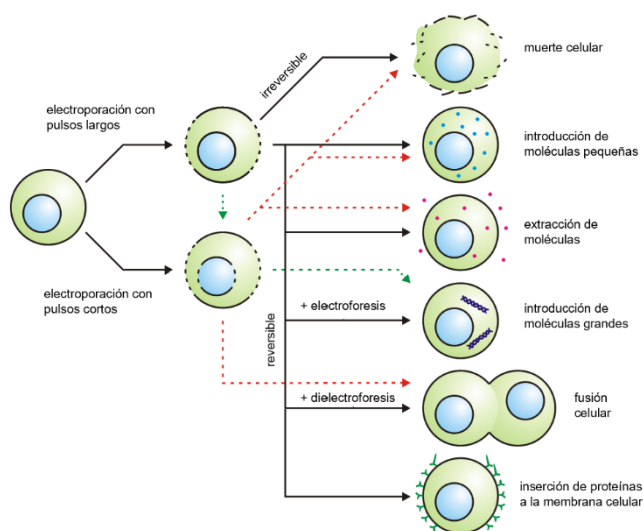


Figura 1. La exposición de una célula a un campo eléctrico puede provocar la permeabilización de la membrana celular o su destrucción. En este proceso, los parámetros del campo eléctrico juegan un papel importante. Si estos parámetros están dentro de cierto rango, la permeabilización es reversible; por lo tanto, se puede usar en aplicaciones como la introducción de moléculas pequeñas o grandes

en el citoplasma, la inserción de proteínas en la membrana celular o la fusión celular.

Electroquimioterapia

La aplicación más representativa de la introducción de moléculas pequeñas a través de la membrana electroporada es la electroquimioterapia. Se demostró en varios estudios preclínicos y clínicos, tanto en humanos como en animales, que la electroquimioterapia se puede utilizar como tratamiento local del cáncer [18]. En la mayoría de las ocasiones se aplican varios pulsos cortos rectangulares de 100 μ s de duración con amplitudes de hasta 1000 V. El número de pulsos que normalmente se entregan es 8. Estos se pueden entregar a una frecuencia de 1 Hz o 5 kHz [19]. Se desarrollaron nuevas tecnologías para el tratamiento de tumores profundos, donde se administran pulsos de 3000 V, 50 A y 100 μ s [20]. Se han reportado avances recientes en el tratamiento de metástasis hepáticas, metástasis óseas y sarcoma de tejidos blandos [20–23]. Recientemente se demostró que la electroquimioterapia in vitro es posible con pulsos de electroporación bipolares de alta frecuencia que tienen 1-1-1 μ s de largo (pulso positivo - pausa - pulso negativo - pausa) y que tienen una amplitud 2.5 veces mayor que la de los pulsos de 100 μ s [23].

Ablación de tejidos por electroporación irreversible no térmica

La ablación de tejido indeseable mediante el uso de electroporación irreversible se ha sugerido recientemente como un método mínimamente invasivo para la eliminación de tumores, pero también podría usarse para la ablación de tejido cardíaco en reemplazo de la ablación térmica por radiofrecuencia u otras técnicas de ablación de tejidos [12], [24] [25]. De manera similar, como en la electroquimioterapia, se utilizan pulsos de 50 o 100 μ s con amplitudes de hasta 3000 V [26]. Sin embargo, el número de pulsos aplicados al tejido objetivo es considerablemente mayor. Si en la electroquimioterapia se administran 8 pulsos, aquí se usan 90 o más pulsos. La frecuencia de repetición de los pulsos debe ser baja de 1 o 4 Hz para evitar un calentamiento excesivo [27]. Para evitar la contracción muscular durante la IRE, se sugirió utilizar pulsos de electroporación de alta frecuencia H-FIRE [28]. La duración de los pulsos H-FIRE es de alrededor

de 1 μ s y se usan amplitudes alrededor de 2 veces mayores que para los pulsos de 50 o 100 μ s.

Electrotransferencia génica

Material genético exógeno puede ser introducido en las células mediante el uso de métodos no virales como la electroporación [29]. La electrotransfección se puede lograr usando: pulsos de decaimiento exponencial; pulsos de onda cuadrada con señales de RF superpuestas; o solo pulsos largos de onda cuadrada de hasta 20 ms y con amplitudes que oscilan entre 200 y 400 V [30]. Aunque todavía no se ha llegado a un consenso, se puede afirmar que en la transfección génica generalmente se usan pulsos más largos que en la electroquimioterapia, con pocas excepciones [31]. Además, se describieron dos funciones distintas de los pulsos eléctricos. En experimentos donde varios pulsos cortos de alto voltaje (por ejemplo, $8 \times 100 \mu$ s de 1000 V) fueron seguidos por pulsos largos de bajo voltaje (por ejemplo, 1×100 ms de 80 V) [32], se demostró que los pulsos cortos de alto voltaje están permeabilizando la membrana, mientras que los pulsos más largos de menor voltaje tienen un efecto electroforético sobre el ADN que facilita la interacción del plásmido con la membrana [33].

Electrofusión

Hasta ahora, hemos presentado aplicaciones de la electroporación que se utilizan para introducir diferentes moléculas, ya sea en el citosol o en la membrana plasmática celular. Pero la electroporación de la membrana plasmática celular también puede provocar la fusión de las células. Este proceso se ha denominado electrofusión. Los primeros informes de electrofusión in vitro de células se remontan a la década de 1980. En estos informes se ha demostrado que la fusión entre dos células puede producirse solo si las células están en contacto antes o inmediatamente después de la electroporación. El contacto entre las células se puede lograr ya sea mediante la conexión dielectroforética de las células vecinas, que es seguida por la electroporación, o por centrifugación de la suspensión celular después de la exposición al campo eléctrico. En ambos casos, las células deben permeabilizarse de forma reversible, de lo contrario pierden viabilidad y no hay electrofusión [34]. La electrofusión in vitro es posible debido a la alta posibilidad de movimiento celular mientras que las células en los tejidos

están más o menos fijas, sin embargo, también se ha observado electrofusión in vivo en los tumores de melanoma B16, así como en la fusión de células a tejidos [35, 36]. La electrofusión de células de diferentes tamaños se puede lograr mediante campos eléctricos pulsados de nanosegundos [37].

Electroextracción

La electroporación se puede utilizar para extraer sustancias (por ejemplo, jugo, azúcar, pigmentos, lípidos y proteínas) de tejidos o células (por ejemplo, frutas, remolacha azucarera, microalgas, vino y levadura). La electroextracción puede ser más eficiente en energía y capacidad de extracción, y más rápida que los métodos de extracción clásicos (presión, desnaturalización térmica y fermentación) [38–42]. Recientemente se realizó una evaluación económica de la producción de bioenergía basada en microalgas [43]. Se elaboraron recomendaciones sobre la información clave que se deberá informar en los estudios biotecnológicos, debido a la variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios [44].

Electropasteurización y esterilización

La electroporación irreversible puede usarse en aplicaciones donde se requiere la destrucción de microorganismos, es decir, procesamiento de alimentos y tratamiento de aguas [45]. Aún así, el uso de electroporación irreversible en estas aplicaciones significa que la sustancia bajo tratamiento está expuesta a un campo eléctrico limitado, ya que es deseable que no ocurran cambios en la sustancia tratada (por ejemplo, cambio del sabor de los alimentos) y que no surjan subproductos (por ejemplo, los causados por la electrólisis). Esta es una de las razones por las cuales se utilizan pulsos cortos (en comparación con aplicaciones médicas) en el rango de 1-3 μ s. Los sistemas a escala industrial de exposición por lotes o de flujo continuo pueden requerir generadores de gran potencia con amplitudes de hasta 40 kV y corrientes máximas de pico de hasta 500 A. Aunque tanto los procesos por lotes y de flujo continuo se encuentran a escala industrial, el flujo continuo se considera superior ya que permite el tratamiento de grandes volúmenes. Tal modo de operación requiere un funcionamiento constante lo que precisa de una mayor potencia de salida de los generadores de pulsos [13], [46].

Distribución del campo eléctrico in vivo

En la mayoría de las aplicaciones de permeabilización de tejidos se requiere exponer el volumen de tejido a intensidades de campo eléctrico (E) entre los dos "umbrales", es decir, requieren elegir de antemano una configuración de electrodo y parámetros de pulso adecuados para la electroporación de tejido efectiva [47]. Por lo tanto, la distribución del campo eléctrico en el tejido debe estimarse antes del tratamiento, lo que se puede lograr combinando los resultados de las pruebas rápidas o la monitorización in situ [48] con modelos de distribución del campo eléctrico [49-53]. Sin embargo, el modelado de la distribución del campo eléctrico en el tejido es dificultoso debido a las propiedades heterogéneas del tejido y, por lo general, a la compleja geometría. Los modelos analíticos solo pueden emplearse para geometrías simples. Por lo general, se desarrollan para problemas 2D y tejidos con propiedades eléctricas homogéneas. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, las técnicas de modelado numérico son más aceptables ya que pueden usarse para modelar geometrías 3D y propiedades complejas de tejidos. Para ese propósito, se aplican principalmente el método de elementos finitos y el método de diferencias finitas. Ambos métodos numéricos se han aplicado y validado con éxito mediante la comparación de la distribución de campo eléctrico calculada y la medida. Además, se construyeron modelos numéricos avanzados, que tienen en cuenta el aumento de la conductividad del tejido debido a la electroporación de tejidos o células. Estos modelos avanzados describen la distribución de E en función de la conductividad σ (E). De esta forma, los modelos representan los cambios de conductividad del tejido por electroporación de acuerdo con la distribución de las intensidades de campo eléctrico [54, 55].

Electrodos para aplicaciones in vitro e in vivo

La efectividad de la electroporación en un entorno in vitro, in vivo o clínico depende de la distribución del campo eléctrico dentro de la muestra tratada. A saber, el parámetro más importante que rige la permeabilización de la membrana celular es el campo eléctrico local al que está expuesta la célula [47]. Para lograr esto, tenemos que usar un conjunto apropiado de electrodos y un dispositivo de electroporación: un electroporador, que genera las señales de voltaje o corriente requeridas. Aunque ambas partes del equipo mencionado son importantes y necesarias para una electroporación efectiva, el electroporador tiene un papel sustancialmente

más importante ya que debe ser capaz de entregar la señal requerida a su salida cargada por la impedancia de la muestra entre electrodos.

Hoy en día existen numerosos tipos de electrodos que pueden usarse para electroporación en cualquiera de las aplicaciones existentes [56-60]. Según la geometría, los electrodos se pueden clasificar en varios grupos: electrodos de placas paralelas, conjuntos de agujas, electrodos de alambre, electrodos de pinzas, electrodos coaxiales, etc. (Fig.2). Cada grupo comprende varios tipos de electrodos que se pueden a su vez dividir según las aplicaciones, dimensiones, material del electrodo, etc. En cualquier caso, la selección del tipo de electrodo juega un papel importante en la caracterización de la carga que está conectada a la salida del electroporador. Durante el diseño del electroporador, la caracterización de la carga representa el punto de partida y representa un problema de ingeniería considerable, porque las características eléctricas de la sustancia entre los electrodos (por ejemplo, suspensión celular, tejido, etc.) varían de un experimento a otro e incluso durante el curso del experimento. En general, la carga entre electrodos tiene un componente resistivo y uno capacitivo. El valor de cada componente está definido por la geometría y el material de los electrodos y por las propiedades eléctricas y químicas de la muestra tratada. En condiciones *in vitro*, estos parámetros que influyen en la impedancia de la carga pueden controlarse bien ya que el tamaño y la geometría de la muestra se conocen, especialmente si se usan cubetas. Además, mediante el uso de medios celulares especialmente preparados, las propiedades eléctricas y químicas se definen o pueden medirse. Por otro lado, en condiciones *in vivo*, el tamaño y la geometría aún se pueden controlar hasta cierto punto, pero las propiedades eléctricas y químicas solo se pueden estimar, especialmente si se utilizan electrodos de aguja que penetran a través de diferentes tejidos. Sin embargo, incluso si logramos definir de manera confiable estas propiedades durante el desarrollo del dispositivo, es prácticamente imposible predecir cambios en las propiedades eléctricas y químicas de la muestra debido a la exposición a los pulsos eléctricos de alto voltaje [61-63]. Además del aumento de la conductividad eléctrica de la muestra debido a la electroporación de las membranas celulares, los pulsos eléctricos también causan efectos secundarios como el calentamiento Joule y la contaminación electrolítica de la muestra [64], lo que conduce a una mayor conductividad de la muestra [65].

Pulsos eléctricos

Para una mejor comprensión y lectura crítica de varios reportes sobre fenómenos de electroporación y aplicaciones basadas en electroporación, se deben detallar completamente los parámetros del pulso. Los pulsos eléctricos nunca son "cuadrados" o "rectangulares", sino que se caracterizan por su tiempo de subida, duración / ancho, tiempo de caída y frecuencia de repetición de pulso. El tiempo de subida y el tiempo de caída se determinan como el tiempo necesario para subir del 10% al 90% de la amplitud, o bajar del 90% al 10% de la amplitud, respectivamente. El ancho de pulso se define con mayor frecuencia como el tiempo entre el 50% de amplitud en la subida y el 50% de amplitud en la caída. La frecuencia de repetición de pulso es la inversa de la suma del ancho del pulso y la pausa entre dos pulsos consecutivos. Estos pueden parecer triviales cuando se trata de pulsos de 1 ms, pero se convierten en un problema cuando se trata de pulsos de nanosegundos o incluso de picosegundos [66]. El daño de la membrana celular y la absorción de iones se pueden reducir significativamente cuando se utilizan pulsos bipolares de nanosegundos en lugar de monopoles [67]. Se han investigado otras formas de pulso que no sean "rectangulares" con respecto a la eficiencia de electroporación [68]. Se sugirió que la exposición de las células a amplitudes de pulso superiores a una amplitud y duración críticas dadas parecen determinar el nivel de electroporación de membrana independientemente de la forma del pulso. Los impulsos de decaimiento exponencial son difíciles de considerar como tales, pero se usaron predominantemente en los años 80 para el electrotransferencia de genes. Su forma era conveniente ya que la primera parte del pulso, es decir el pico, actúa como la parte permeabilizante, y la cola del pulso actúa como una parte electroforética que empuja el ADN a través de la membrana celular [32].

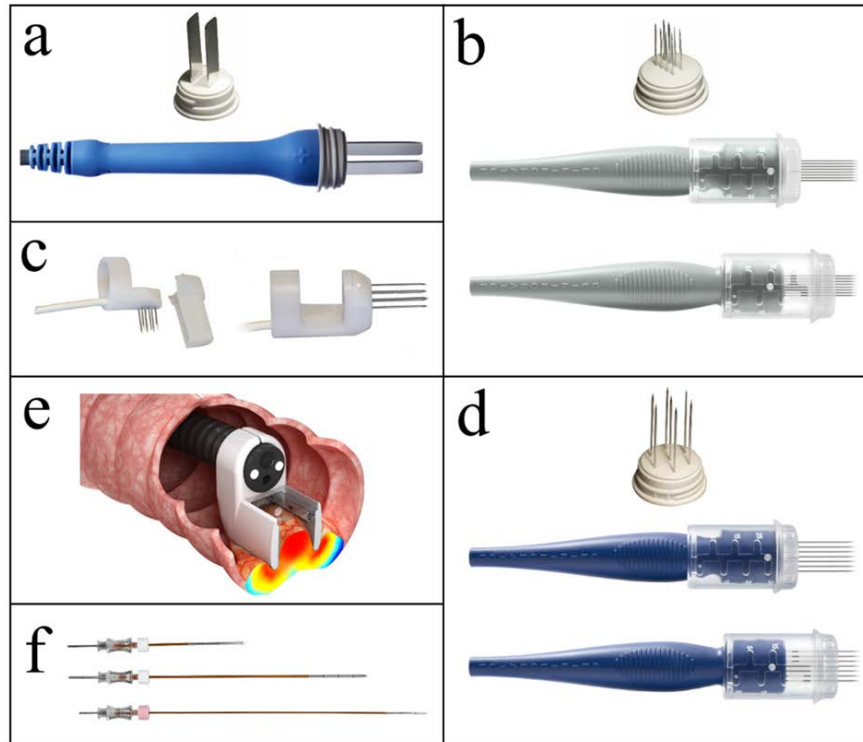


Figura 2. Ejemplos de electrodos disponibles comercialmente para electroporación. Los electrodos pertenecen al siguiente grupo: (a): electrodos de placa paralela, (b): conjuntos de agujas, (c): electrodos tipo dedo, (d): conjuntos de agujas, (e): electrodo endoluminal y (f): conjunto de electrodos de agujas independientes. Los electrodos (a), (b), (c) y (d) son producidos por IGEA, Italia, y se utilizan para aplicaciones clínicas de electroquimioterapia y electrotransferencia génica [31].

Electroporadores – Los generadores de pulso necesarios

El electroporador es un dispositivo electrónico que genera señales, generalmente ondas cuadradas o pulsos de decaimiento exponencial, necesarios para la electroporación [1]. Los parámetros de la señal entregada a los electrodos con la muestra tratada varían de una aplicación a otra. Por lo tanto, al investigar el fenómeno de la electroporación y para el desarrollo de tecnologías y tratamientos basados en electroporación, es importante que el electroporador pueda entregar señales con el rango más amplio posible de parámetros eléctricos. Sin embargo, si se usa solo para una aplicación

específica, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes con electroquimioterapia, el generador de pulsos tiene que proporcionar los parámetros de pulso exactamente necesarios de manera confiable. Además, el electroporador debe ser seguro y fácil de operar y debe ofrecer algunas posibilidades de mejoras funcionales. Los electroporadores clínicos utilizados en electroquimioterapia de tumores profundos o en ablación de tejido no térmico también están equipados con algoritmos de sincronización con el ECG que minimizan la posible influencia de la aplicación del pulso eléctrico en la función cardíaca [69].

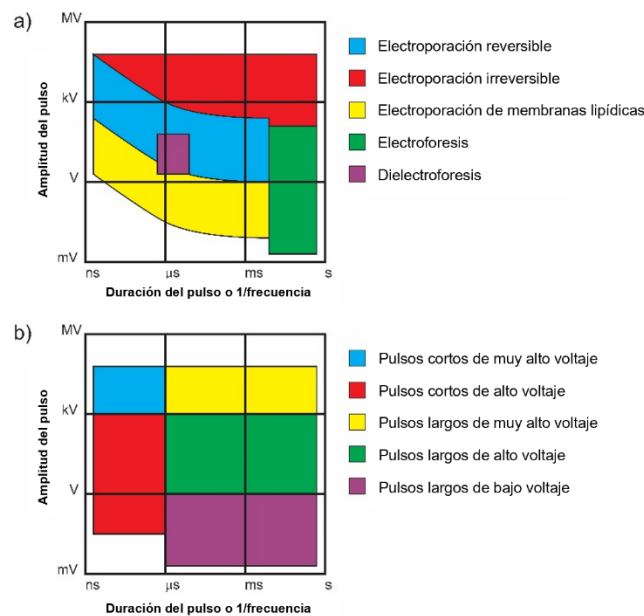


Figura 3. Áreas de amplitud y duración de los pulsos eléctricos que se utilizan en la investigación de la electroporación y los efectos relacionados (a). Cinco áreas diferentes de generación de pulsos de electroporación (b). Para amplificar o generar pulsos de electroporación de muy alto voltaje (más de unos pocos kV) se utilizan descargadores de chispa y elementos similares, para generar pulsos de alto voltaje (unos pocos V a unos pocos kV) se utilizan transistores de alto voltaje y para bajo voltaje se utilizan amplificadores operacionales. Los pulsos de nanosegundos (cortos) se generan con diferentes técnicas que los pulsos de más de 1 μ s. Publicado originalmente en Técnicas avanzadas de electroporación en biología y medicina por Reberšek y Miklavčič 2010 [3].

En principio, los electroporadores se pueden dividir en varios grupos según las aplicaciones biológicas, pero desde el punto de vista eléctrico solo

existen dos tipos de electroporadores: dispositivos con salida de voltaje (la salida es una señal de voltaje $U(t)$) y dispositivos con salida de corriente (la salida es una señal corriente $I(t)$). Ambos tipos de dispositivos tienen sus ventajas y desventajas, pero un punto definitivamente habla a favor de los dispositivos con salida de voltaje. Por ejemplo, si realizamos experimentos *in vitro* con electrodos de placa paralelos con lados de placa sustancialmente más grandes que la distancia entre ellos, la intensidad de campo eléctrico E que se aplica a la muestra se puede aproximar por la relación voltaje/distancia U/d , donde d es la distancia del electrodo y U la amplitud de la señal aplicada obtenida de un electroporador con salida de voltaje. Por otro lado, si se usa un electroporador con salida de corriente, la misma aproximación podría usarse solo si se realiza una medición adicional de la diferencia de voltaje entre electrodos o si la impedancia Z de la muestra es conocida, medida o aproximada y la diferencia de voltaje entre electrodos se estima utilizando la ley de Ohm $U = I \cdot Z$. Sin embargo, hay varios electroporadores disponibles en el mercado que cumplen con diferentes rangos de parámetros y pueden usarse en diferentes aplicaciones. Puc et al. [70] presentaron una lista de electrodos y electroporadores disponibles en el mercado en 2004, actualizada en 2010 [3] y en 2017 [71].

Para estar seguros de que los pulsos aplicados son adecuados, tenemos que medir el voltaje y la corriente aplicados durante la entrega del pulso.

En aplicaciones de nanosegundos, el tiempo de subida del pulso es a veces más corto que la longitud eléctrica (el tiempo en que una señal eléctrica viaja a través de la línea) entre la fuente y la carga. En este caso, la impedancia de la carga y la línea de transmisión tienen que coincidir con la impedancia del generador, de modo que no haya fuertes reflejos del pulso y, en consecuencia, prolongaciones del mismo.

En base a los estudios reportados en la literatura, es muy difícil extraer un consejo general sobre cómo diseñar experimentos o tratamientos con electroporación. En principio, podemos decir que la amplitud de pulso (relación voltaje-distancia) debería estar típicamente en el rango de 200 V/cm hasta 2000 V/cm. Las duraciones de pulso deberían estar en el rango de cientos de microsegundos para moléculas más pequeñas y desde varios milisegundos hasta varias decenas de milisegundos para macromoléculas como el ADN plasmídico (en el último caso, debido a la duración muy larga del pulso, la amplitud de pulso óptima puede ser incluso inferior a 100 V/cm). Si existe alguna posibilidad de obtener un equipo que genera pulsos bipolares o tiene la posibilidad de cambiar la orientación del campo eléctrico en la muestra, estos tipos de pulsos / electroporadores deben usarse porque los pulsos bipolares producen un umbral de poración más bajo, una mayor absorción, reducen el desgaste de electrolitos y la contaminación electrolítica de la muestra, y se obtiene una viabilidad

similar en comparación con pulsos unipolares de la misma amplitud y duración. También se puede obtener una mejor permeabilización o eficiencia de transfección génica y supervivencia cambiando la orientación del campo en la muestra utilizando circuitos especiales de conmutación que conmutan los pulsos de electroporación entre los electrodos [56, 58, 71]. Los pulsos de electroporación bipolares de alta frecuencia cortos HF-EP también se investigaron ya que mitigan la estimulación nerviosa/muscular y la distribución del campo eléctrico de dichos pulsos en el tejido es más homogénea [72-74], pero estos pulsos pueden estar cerca del "efecto de cancelación"[74]. Sin embargo, el desarrollo de electroporadores de alta frecuencia es mucho más difícil y aún no existen electroporadores de alta frecuencia comerciales, por lo tanto, desafortunadamente, la investigación de HF-EP se limita a solo unos pocos grupos [75], [76].

Sin embargo, esta descripción general de los parámetros eléctricos solo debe considerarse como un punto de partida para el diseño de experimentos o tratamientos. Los valores óptimos de los parámetros también dependen en gran medida del tipo de célula utilizada, de la molécula a introducir y de las condiciones experimentales específicas. Las características del pulso óptimas o al menos eficientes en el tejido/muestra determinarán la arquitectura del generador de pulsos que de necesitará, ya sea un generador de Marx, Blumlein u otro [7].

Conclusiones

La electroporación se ha estudiado ampliamente hasta ahora, y se han desarrollado varias aplicaciones. La electroquimioterapia se ha demostrado como un tratamiento local efectivo de tumores sólidos y es la aplicación terapéutica más madura en este momento. Sin embargo, la electroporación para la transfección génica se ha usado durante mucho tiempo *in vitro*. Representa una alternativa a la clásica transfección viral, que resulta viable también para la transfección génica *in vivo*. Las aplicaciones clínicas y la expansión de la electroquimioterapia y la ablación de tejidos se han visto obstaculizadas por la falta de electroporadores adecuados y su certificación en Europa (CE Medical Device) y la aprobación limitada de la FDA en EE. UU. Cliniporator (IGEA, S.R.L. Carpi, Italia) fue certificado en la Unión Europea como un dispositivo médico y se ofrece en el mercado junto con procedimientos operativos estándar para electroquimioterapia de tumores cutáneos y subcutáneos. NanoKnife (AngioDynamics, Queensbury, EE. UU.) fue certificado en la Unión Europea y aprobado por la FDA para la ablación quirúrgica de tejidos blandos. Algunos electroporadores ahora

están disponibles bajo licencia para propósitos de evaluación clínica: Cellectra, Elgen, Medpulser, Cliniporator VITAE, BetaTech, DermaVax, EasyVax, Ellisphere, TriGrid [4].

El desarrollo de nuevas aplicaciones garantiza un mayor desarrollo de generadores de pulsos y electrodos. Sin embargo, según las consideraciones anteriores, un solo generador de pulso no se ajustará a todas las aplicaciones y a todas las necesidades de los investigadores. Se puede buscar un generador de pulsos especializado que solo proporcione los pulsos para su aplicación biotecnológica o biomédica específica, o un generador de pulso de propósito general que permita generar "casi" todo lo que el investigador pueda encontrar interesante/necesario en su investigación. Independientemente de la elección, esto tiene que estar relacionado también con la elección de los electrodos y la conductividad del tejido/muestra a electroporar.

Referencias

- [1] M. Reberšek, D. Miklavčič, C. Bertacchini, and M. Sack, "Cell membrane electroporation-Part 3: the equipment," *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, vol. 30, no. 3, pp. 8–18, 2014.
- [2] K. Flisar, M. Puc, T. Kotnik, and D. Miklavcic, "Cell membrane electroporation with arbitrary pulse waveforms," *IEEE Eng Med Biol Mag*, vol. 22, no. 1, pp. 77–81, Feb. 2003.
- [3] M. Reberšek and D. Miklavčič, "Concepts of Electroporation Pulse Generation and Overview of Electric Pulse Generators for Cell and Tissue Electroporation," in *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, A. G. Pakhomov, D. Miklavčič, and M. S. Markov, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2010, pp. 323–339.
- [4] L. G. Staal and R. Gilbert, "Generators and Applicators: Equipment for Electroporation," in *Clinical Aspects of Electroporation*, S. T. Kee, J. Gehl, and E. W. Lee, Eds. New York: Springer, 2011, pp. 45–65.
- [5] G. A. Hofmann, "Instrumentation and electrodes for in vivo electroporation," in *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery*, M. J. Jaroszeski, R. Heller, and R. Gilbert, Eds. Totowa: Humana Press, 2000, pp. 37–61.
- [6] E. Pirc, M. Reberšek, and D. Miklavčič, "Dosimetry in electroporation based technologies and treatments," in *Dosimetry in bioelectromagnetics*, M. S. Markov, Ed. London: Taylor & Francis, In press.
- [7] M. Reberšek and D. Miklavčič, "Advantages and Disadvantages of Different Concepts of Electroporation Pulse Generation," *Automatica*, vol. 52, no. 1, pp. 12–19, Mar. 2011.
- [8] M. Reberšek *et al.*, "Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro," *Biomed Eng Online*, vol. 6, p. 25, 2007.
- [9] P. Kramar, D. Miklavcic, and A. M. Lebar, "A system for the determination of planar lipid bilayer breakdown voltage and its applications," *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, vol. 8, no. 2, pp. 132–138, 2009.

- [10] J. M. Sanders, A. Kuthi, Yu-Hsuan Wu, P. T. Vernier, and M. A. Gundersen, "A linear, single-stage, nanosecond pulse generator for delivering intense electric fields to biological loads," *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 16, no. 4, pp. 1048–1054, Aug. 2009.
- [11] S. Haberl, J. Teissié, W. Frey, and D. Miklavčič, "Cell Membrane Electroporation – Part 2: The Applications," *IEEE Electrical Insulation Magazine*, vol. 29, no. 1, pp. 19–27, Feb. 2013.
- [12] C. Jiang, R. V. Davalos, and J. C. Bischof, "A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 62, no. 1, pp. 4–20, Jan. 2015.
- [13] S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, and D. Miklavčič, "Electroporation in Food Processing and Biorefinery," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 247, no. 12, pp. 1279–1304, Dec. 2014.
- [14] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, and D. Miklavčič, "Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 16, no. 1, pp. 295–320, Jul. 2014.
- [15] T. Kotnik, W. Frey, M. Sack, S. Haberl Meglič, M. Peterka, and D. Miklavčič, "Electroporation-based applications in biotechnology," *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 8, pp. 480–488, Aug. 2015.
- [16] A. Golberg *et al.*, "Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 9, no. 1, Dec. 2016.
- [17] M. Morales-de la Peña, P. Elez-Martínez, and O. Martín-Belloso, "Food Preservation by Pulsed Electric Fields: An Engineering Perspective," *Food Engineering Reviews*, vol. 3, no. 2, pp. 94–107, Mar. 2011.
- [18] D. Miklavčič, B. Mali, B. Kos, R. Heller, and G. Serša, "Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice," *Biomedical engineering online*, vol. 13, no. 1, p. 29, 2014.
- [19] B. Mali, T. Jarm, M. Snoj, G. Sersa, and D. Miklavcic, "Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis," *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 39, no. 1, pp. 4–16, Jan. 2013.
- [20] I. Edhemovic *et al.*, "Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases: Electrochemotherapy of Liver Metastases," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 110, no. 3, pp. 320–327, Sep. 2014.
- [21] D. Miklavčič *et al.*, "Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors," *Med Biol Eng Comput*, vol. 50, no. 12, pp. 1213–1225, Dec. 2012.
- [22] A. Gasbarrini, W. K. Campos, L. Campanacci, and S. Boriani, "Electrochemotherapy to Metastatic Spinal Melanoma: A Novel Treatment of Spinal Metastasis?," *Spine*, vol. 40, no. 24, pp. E1340–1346, Dec. 2015.
- [23] M. Scuderi, M. Rebersek, D. Miklavcic, and J. Dermol-Cerne, "The use of high-frequency short bipolar pulses in cisplatin electrochemotherapy in vitro," *Radiology and Oncology*, vol. 53, no. 2, pp. 194–205, Jun. 2019.
- [24] J. Lavee, G. Onik, P. Mikus, and B. Rubinsky, "A novel nonthermal energy source for surgical epicardial atrial ablation: irreversible electroporation," *Heart Surg Forum*, vol. 10, no. 2, pp. E162–167, 2007.

-
- [25] P. G. Wagstaff *et al.*, “Irreversible electroporation: state of the art,” *Onco Targets Ther.*, vol. 9, pp. 2437–2446, Apr. 2016.
 - [26] C. Bertacchini, P. M. Margotti, E. Bergamini, A. Lodi, M. Ronchetti, and R. Cadossi, “Design of an irreversible electroporation system for clinical use,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 6, no. 4, pp. 313–320, Aug. 2007.
 - [27] R. E. Neal, P. A. Garcia, J. L. Robertson, and R. V. Davalos, “Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible Electroporation Treatment Planning,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 59, no. 4, pp. 1076–1085, Apr. 2012.
 - [28] C. B. Arena *et al.*, “High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction,” *Biomed Eng Online*, vol. 10, p. 102, Nov. 2011.
 - [29] L. Lambrecht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr  at, and G. Vandermeulen, “Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery,” *Expert Opin Drug Deliv.*, vol. 13, no. 2, pp. 295–310, 2016.
 - [30] A. Gothelf and J. Gehl, “What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines,” *Hum Vaccin Immunother.*, vol. 8, no. 11, pp. 1694–1702, Nov. 2012.
 - [31] R. Heller, Y. Cruz, L. C. Heller, R. A. Gilbert, and M. J. Jaroszeski, “Electrically mediated delivery of plasmid DNA to the skin, using a multielectrode array,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 357–362, Mar. 2010.
 - [32] S. Satkauskas *et al.*, “Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporabilization and DNA electrophoresis,” *Mol. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 133–140, Feb. 2002.
 - [33] M. Kandu  er, D. Miklav  i  , and M. Pavlin, “Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses — An in vitro study,” *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 2, pp. 265–271, Feb. 2009.
 - [34] M. Usaj, K. Flisar, D. Miklav  ic, and M. Kanduser, “Electrofusion of B16-F1 and CHO cells: The comparison of the pulse first and contact first protocols,” *Bioelectrochemistry*, vol. 89, pp. 34–41, Feb. 2013.
 - [35] H. Mekid and L. M. Mir, “In vivo cell electrofusion,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1524, no. 2–3, pp. 118–130, Dec. 2000.
 - [36] R. Heller and R. J. Grasso, “Reproducible layering of tissue culture cells onto electrostatically charged membranes,” *Journal of Tissue Culture Methods*, vol. 13, no. 1, pp. 25–29.
 - [37] L. Rems, M. U  aj, M. Kandu  er, M. Reber  sek, D. Miklav  i  , and G. Pucihar, “Cell electrofusion using nanosecond electric pulses,” *Scientific Reports*, vol. 3, Nov. 2013.
 - [38] M. Zakhartsev, C. Momeu, and V. Ganeva, “High-Throughput Liberation of Water-Soluble Yeast Content by Irreversible Electroporation (HT-irEP),” *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 12, no. 2, pp. 267–275, Jan. 2007.
 - [39] M. Sack *et al.*, “Electroporation-Assisted Dewatering as an Alternative Method for Drying Plants,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 36, no. 5, pp. 2577–2585, Oct. 2008.
 - [40] M. Sack *et al.*, “Research on Industrial-Scale Electroporation Devices Fostering the Extraction of Substances from Biological Tissue,” *Food Engineering Reviews*, vol. 2, pp. 147–156, Mar. 2010.
 - [41] E. Pu  rtolas, G. Salda  a, S. Cond  n, I. Álvarez, and J. Raso, “Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric

- fields during aging in bottle,” *Food Chemistry*, vol. 119, no. 3, pp. 1063–1070, Apr. 2010.
- [42] S. Haberl, M. Jarc, A. Štrancar, M. Peterka, D. Hodžić, and D. Miklavčič, “Comparison of Alkaline Lysis with Electroextraction and Optimization of Electric Pulses to Extract Plasmid DNA from *Escherichia coli*,” *The Journal of Membrane Biology*, Jul. 2013.
- [43] A. L. Gonçalves, M. C. M. Alvim-Ferraz, F. G. Martins, M. Simões, and J. C. M. Pires, “Integration of Microalgae-Based Bioenergy Production into a Petrochemical Complex: Techno-Economic Assessment,” *Energies*, vol. 9, no. 4, p. 224, Mar. 2016.
- [44] J. Raso *et al.*, “Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Aug. 2016.
- [45] J. R. Beveridge, S. J. MacGregor, L. Marsili, J. G. Anderson, N. J. Rowan, and O. Farish, “Comparison of the effectiveness of biphasic and monophasic rectangular pulses for the inactivation of micro-organisms using pulsed electric fields,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 30, no. 4, pp. 1525–1531, Aug. 2002.
- [46] S. Toepfl, “Pulsed electric field food processing industrial equipment design and commercial applications,” *Stewart Postharvest Review*, vol. 8, no. 2, pp. 1–7, 2012.
- [47] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavcic, and M. Tarek, “Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon,” *IEEE Electrical Insulation Magazine*, vol. 28, no. 5, pp. 14–23, Oct. 2012.
- [48] M. Kranjc *et al.*, “In Situ Monitoring of Electric Field Distribution in Mouse Tumor during Electroporation,” *Radiology*, vol. 274, no. 1, pp. 115–123, Jan. 2015.
- [49] D. Miklavcic, K. Beravs, D. Semrov, M. Cemazar, F. Demsar, and G. Sersa, “The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues,” *Biophys J*, vol. 74, no. 5, pp. 2152–2158, May 1998.
- [50] N. Pavselj, Z. Bregar, D. Cukjati, D. Batiuskaite, L. M. Mir, and D. Miklavcic, “The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 8, pp. 1373–1381, Aug. 2005.
- [51] D. Sel, D. Cukjati, D. Batiuskaite, T. Slivnik, L. M. Mir, and D. Miklavcic, “Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporeabilization,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 5, pp. 816–827, May 2005.
- [52] D. Miklavcic, S. Corovic, G. Pucihar, and N. Pavselj, “Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy,” *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, no. 11, pp. 45–51, Nov. 2006.
- [53] D. Miklavcic *et al.*, “Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy,” *Biomed Eng Online*, vol. 9, no. 10, pp. 1–12, 2010.
- [54] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, and D. Miklavcic, “Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation,” *Biomedical engineering online*, vol. 12, no. 1, p. 16, 2013.
- [55] J. Langus, M. Kranjc, B. Kos, T. Šuštar, and D. Miklavčič, “Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue,” *Sci Rep*, vol. 6, p. 26409, May 2016.
- [56] R. A. Gilbert, M. J. Jaroszeski, and R. Heller, “Novel electrode designs for electrochemotherapy,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1334, no. 1, pp. 9–14, Feb. 1997.

- [57] S. Mazères *et al.*, "Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery," *J Control Release*, vol. 134, no. 2, pp. 125–131, Mar. 2009.
- [58] M. Reberšek, S. Čorović, G. Serša, and D. Miklavčič, "Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 26–31, Nov. 2008.
- [59] J. Čemažar, D. Miklavčič, and T. Kotnik, "Microfluidic devices for manipulation, modification and characterization of biological cells in electric fields - a review," *Informacije MIDEM*, vol. 43, no. 3, pp. 143–161, Sep. 2013.
- [60] P. F. Forde *et al.*, "Preclinical evaluation of an endoscopic electroporation system," *Endoscopy*, vol. 48, no. 5, pp. 477–483, May 2016.
- [61] M. Pavlin *et al.*, "Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension," *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 6, pp. 4378–4390, Jun. 2005.
- [62] D. Cukjati, D. Batiuskaite, F. André, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 501–507, May 2007.
- [63] M. Kranjc, F. Bajd, I. Serša, and D. Miklavčič, "Magnetic resonance electrical impedance tomography for measuring electrical conductivity during electroporation," *Physiological Measurement*, vol. 35, no. 6, pp. 985–996, Jun. 2014.
- [64] M. Phillips, L. Rubinsky, A. Meir, N. Raju, and B. Rubinsky, "Combining Electrolysis and Electroporation for Tissue Ablation," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 14, no. 4, pp. 395–410, Aug. 2015.
- [65] I. Lackovic, R. Magjarevic, and D. Miklavcic, "Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer," *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 16, no. 5, pp. 1338–1347, 2009.
- [66] K. Mitsutake, A. Satoh, S. Mine, K. Abe, S. Katsuki, and H. Akiyama, "Effect of pulsing sequence of nanosecond pulsed electric fields on viability of HeLa S3 cells," *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 19, no. 1, pp. 337–342, 2012.
- [67] B. L. Ibey *et al.*, "Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporomeabilization and killing cells than monopolar pulses," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 443, no. 2, pp. 568–573, Jan. 2014.
- [68] T. Kotnik, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Cell membrane electroporomeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part II. Reduced electrolytic contamination," *Bioelectrochemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 91–95, Aug. 2001.
- [69] B. Mali *et al.*, "Electrochemotherapy of colorectal liver metastases-an observational study of its effects on the electrocardiogram," *Biomedical engineering online*, vol. 14, no. Suppl 3, p. S5, 2015.
- [70] M. Puc, S. Čorović, K. Flisar, M. Petkovšek, J. Nastran, and D. Miklavčič, "Techniques of signal generation required for electroporomeabilization: Survey of electroporomeabilization devices," *Bioelectrochemistry*, vol. 64, no. 2, pp. 113–124, Sep. 2004.
- [71] E. Pirc, M. Reberšek, and D. Miklavčič, "Dosimetry in Electroporation-Based Technologies and Treatments," in *Dosimetry in Bioelectromagnetics*, M. Markov, Ed.

- 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487–2742: CRC Press, 2017, pp. 233–268.
- [72] M. Reberšek, M. Kanduđer, and D. Miklavčič, “Pipette tip with integrated electrodes for gene electrotransfer of cells in suspension: a feasibility study in CHO cells,” *Radiology and Oncology*, vol. 45, no. 3, pp. 204–208, 2011.
 - [73] M. B. Sano *et al.*, “Bursts of Bipolar Microsecond Pulses Inhibit Tumor Growth,” *Scientific Reports*, vol. 5, p. 14999, Oct. 2015.
 - [74] D. C. Sweeney, M. Reberšek, J. Dermol, L. Rems, D. Miklavčič, and R. V. Davalos, “Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 11, pp. 2689–2698, Nov. 2016.
 - [75] V. Novickij *et al.*, “High-frequency submicrosecond electroporator,” *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, pp. 1–7, Feb. 2016.
 - [76] A. Grainys, V. Novickij, and J. Novickij, “High-power bipolar multilevel pulsed electroporator,” *Instrumentation Science & Technology*, vol. 44, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2016.

Agradecimientos

Esta investigación fue en parte apoyada por la Agencia Eslovena de Investigación y por los Programas Marco de la Comisión Europea a través de varios financiamientos. La investigación se realizó en el ámbito del Laboratorio Europeo Asociado EBAM (LEA).



Damijan Miklavčič nació en Liubiana, Eslovenia, en 1963. Realizó una Maestría y un Doctorado en Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubiana en 1991 y 1993, respectivamente. Actualmente es profesor y jefe del Laboratorio de Biocibernética de la Facultad de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Liubiana.

Sus áreas de investigación son la ingeniería biomédica y el estudio de la interacción de los campos electromagnéticos con los sistemas biológicos. En los últimos años se ha centrado en los aspectos de ingeniería de la electroporación como base de la administración de fármacos a las células en modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*. Su investigación incluye experimentación biológica, modelado numérico y desarrollo de hardware para electroquimioterapia, electroporación irreversible, administración transdérmica de fármacos y electrotransferencia génica.

Matej Reberšek, nació en Liubliana, Eslovenia, en 1979. Realizó el doctorado en ingeniería eléctrica en la Universidad de Liubliana, Eslovenia. Es Profesor Asistente e Investigador Asociado en el Laboratorio de Biocibernética, en la Facultad de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Liubliana. Sus principales intereses de investigación están en el campo de la electroporación, especialmente el diseño de dispositivos de electroporación y la investigación de respuestas biológicas a diferentes parámetros de pulso eléctrico.



Capítulo 12

Electroporación y electropermeabilización - Armando el rompecabezas

Lluís M Mir

Vectorology and Anticancer Therapies, UMR 8203, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gustave-Roussy, 114, Rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif Cédex, Francia.

Laboratorio Europeo Asociado (LEA) en los campos eléctricos pulsados en Biología y Medicina (LEA EBAM).

Hasta ahora, se han utilizado dos enfoques genéricos principales para detectar la permeabilización celular después de la aplicación de pulsos eléctricos a células o tejidos. Estos se basan o bien en la detección de cambios eléctricos del tejido / células (mediciones de bioimpedancia o simplemente determinaciones de conductancia) o en intercambios moleculares a través de la membrana (difusión o electrotransferencia de marcadores, como pequeñas moléculas fluorescentes, compuestos radiactivos, plásmidos que codifican para genes reporteros, etc.). El segundo enfoque, basado en el transporte de una especie molecular dada, depende mucho de las características fisicoquímicas del marcador utilizado (peso molecular, carga neta, rendimiento de fluorescencia, interacciones merker-target (si las hay), modo de transporte [1], etc.)

Los modelos construidos para describir los fenómenos que ocurren en la membrana celular (incluso en las membranas artificiales, ya sean membranas artificiales planas o membranas de vesículas de diferentes tamaños y composiciones) se han basado principalmente en los principios físicos que podrían explicar el transporte de moléculas a través de la

membrana. La información proporcionada por las mediciones de bioimpedancia, aunque es muy útil en términos prácticos, ha aportado una contribución limitada a la comprensión de estos fenómenos. Sin embargo, en los fenómenos de transporte hay parámetros no relacionados con las características estructurales de la membrana antes, durante y después de los pulsos. De hecho, como ya se mencionó, hay un impacto del tamaño de las moléculas, su carga, el gradiente de concentración entre el interior y el exterior, la sensibilidad de su detección dentro de las células, etc. Hay una serie de ejemplos, cualquiera sea la duración de los pulsos, pulsos de nanosegundos o pulsos de microsegundos, que se pueden reportar. En este contexto, es importante resaltar que la penetración de iones de calcio se puede detectar a amplitudes de campo eléctrico para las cuales muchos otros marcadores de electropermeabilización aún no revelan la electropermeabilización de las células. Esto permite manipular el contenido de calcio citosólico en condiciones donde la supervivencia celular está bastante bien protegida [2,3].

Recientemente se han aplicado varias técnicas nuevas para explorar los cambios en la membrana misma, independientemente de cualquier fenómeno de transporte. Algunas de estas técnicas provienen de tecnologías que no se utilizaron previamente para analizar los efectos de los pulsos eléctricos en las bicapas lipídicas o las membranas celulares.

Por un lado, el uso de vesículas unilamelares gigantes (compuestas de una especie lipídica definida y con el tamaño de una célula animal) ha permitido analizar los cambios químicos que ocurren en las bicapas lipídicas durante la administración de los pulsos [4]; la dinámica molecular ha comenzado a dar las explicaciones para que ocurran estas reacciones. Es importante tener en cuenta que estos dos enfoques (experimental e in silico) restringen su análisis a la parte lipídica de las membranas celulares complejas.

Por otro lado, al usar células en cultivo, los métodos ópticos no lineales están introduciendo nuevas piezas al rompecabezas. La microespectroscopía Raman espontánea ha traído nueva información sobre las modificaciones de las proteínas que podrían ocurrir durante (o tal vez después) del suministro de los pulsos eléctricos [5]. Los microscopios confocales Raman han aportado información espacial y dinámica sobre los cambios en los espectros de Raman que reflejan cambios en las proteínas [6].

Debido a que los objetos biológicos están sumergidos en medios a base de agua, se deben usar microscopios confocales Raman para eliminar la contribución no resonante de del agua. La microspectroscopía Raman coherente, como la microspectroscopía de dispersión Raman anti-Stokes coherente, parece más atractiva debido a la mejora de la señal causada por

la "coherencia" proporcionada por el uso de dos láseres afinados en consecuencia. La mejora de la señal con respecto a la señal Raman espontánea puede alcanzar un factor $\times 10^8$. La microespectroscopía de dispersión Raman anti-Stokes coherente nos ha proporcionado recientemente información sobre los cambios en el agua interfacial (las pocas capas de moléculas de agua organizadas en la superficie de las membranas) e incluso del agua intersticial. Después de la entrega de pulsos, se ha registrado una pérdida importante de la señal de agua interfacial, lo que significa que las alteraciones de la estructura de la membrana consecutivas a la aplicación de pulsos también afectan el agua que rodea la membrana (trabajo a enviar para publicación). Por lo tanto, estamos adquiriendo información sobre los cambios que ocurren en las membranas independientemente de cualquier fenómeno de transporte. Esta información ahora debe ser introducida en los modelos que describen tentativamente los fenómenos que ocurren en las membranas, para continuar mejorando el conocimiento de la electroporación / electroporación de las células, así como de objetos biológicos incluso mucho más pequeños [7].

Sin embargo, hay otro nivel de perturbaciones que también debe tenerse en cuenta, para el cual la información se acumula rápidamente: las reacciones celulares al estrés causado por la entrega de pulsos eléctricos. Corresponde al conjunto de los aspectos biológicos vinculados a la aplicación de pulsos eléctricos, con cinéticas que pueden ser de ordenes de magnitud mayor que la duración de los pulsos e incluso que la duración de la recuperación de la impermeabilidad de las células a los marcadores de electroporación clásicos.

La construcción de cualquier modelo nuevo se está por lo tanto volviendo increíblemente compleja. Esto solo refleja la complejidad de los fenómenos que se han presentado en la escuela de Tecnologías y Tratamientos Basados en Electroporación. Los modelos viscosos, elásticos y viscoelásticos de la ruptura eléctrica de las membranas se han quedado atrás. Los modelos que describen la generación de poros estables también son insuficientes hoy en día. Están surgiendo modelos que incluyen varios términos para explicar la evolución de la permeabilidad y la conductividad de las membranas celulares [8]. Se espera que puedan dar pistas sobre las muchas preguntas que aún están sin resolver. Por ejemplo, considerando la "electroporación irreversible", aún se desconoce cuál es el evento "irreversible" ...

Todos los aspectos desarrollados aquí arriba serán discutidos en el marco de un nuevo modelo de los fenómenos que ocurren en las membranas de las células expuestas a los pulsos eléctricos. Se presentará este modelo y se dará la terminología para un uso correcto de los términos que se han utilizado

indistintamente hasta ahora. Por lo tanto, se establecerá una distinción entre "electroporación" y "electropermeabilización" en el contexto de la "electropulsación" de las células, como parte de un rompecabezas que colectivamente queremos armar.

Referencias Recientes

(Las referencias anteriores pueden encontrarse en las siguientes publicaciones):

- [1] A. Azan, F. Gaillière, L.M. Mir and M. Breton. Cell Membrane Electropulsation: Chemical Analysis of Cell Membrane Modifications and Associated Transport Mechanisms. In: *Advances in Anatomy*, Vol. 227, Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy, eds. J. Kulbaka and S. Satkauskas. ISBN : 978-3-319-56894-2
- [2] H. Hanna, A. Denzi, M. Liberti, F.M. Andre and L.M. Mir. Electropermeabilization of inner and outer membranes of cells with microsecond pulsed electric fields: Quantitative study with calcium ions. *Scientific Reports* in press 2017
- [3] H. Hanna, F.M. Andre and L.M. Mir. Electrical control of calcium oscillations in mesenchymal stem cells using microsecond pulsed electric fields. *Stem cell research and therapy*, vol 8, art 91, 2017, DOI: 10.1186/s13287-017-0536-z
- [4] M. Breton and L. M. Mir. Investigation of the Chemical Mechanisms Involved in the Electropulsation of Membranes at the Molecular Level. *Bioelectrochemistry* 119 (2018) e7966; doi:10.1016/j.bioelechem.2017.09.005
- [5] A. Azan, V. Untereiner, C. Gobinet, G. D. Sockalingum, M. Breton, O. Piot and L. M. Mir. Demonstration of Protein Involvement in Living Cell Electropulsation using Confocal Raman Microspectroscopy. *Scientific Reports* 7. 297–306, 2017. doi:10.1038/srep40448.
- [6] A. Azan, V. Untereiner, L. Descamps, C. Merla, C. Gobinet, M. Breton, O. Piot and L. M. Mir. Comprehensive Characterization of the Interaction between Pulsed Electric Fields and Live Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Analytical Chemistry* in press 2017.
- [7] A. Denzi, E. della Valle, G. Esposito, L. M. Mir, F. Apollonio and Micaela Liberti. Technological and Theoretical Aspects for Testing Electroporation on Liposomes. *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 5092704, 10 pages, 2017. doi:10.1155/2017/5092704.
- [8] D.Voyer, A. Silve, L. M. Mir, R. Scorretti and C. Poignard. Dynamic modeling of tissue electroporation. *Bioelectrochemistry* in press 2017



Lluís M. Mir nació en Barcelona, España, en 1954. Realizó una Maestría en Bioquímica en 1976 en la Ecole Normale Supérieure, París, y el Doctorado (D.Sc.) en Biología Celular en 1983. En 1978 ingresó en el CNRS como Agregado de Investigaciones en el Laboratorio de Farmacología Básica y Toxicología, Toulouse. En 1983 fue ascendido a Encargado de Investigación en el CNRS, y en 1985 se trasladó al Laboratorio de Oncología Molecular del Instituto CNRS Gustave-Roussy y Univ. Paris Sud, Villejuif. En 1989 se trasladó al Laboratorio de Farmacología Molecular (Villejuif), y en 2002 al Laboratorio de Vectorología y Transferencia Genética (Villejuif). En 1999, fue ascendido a Director de Investigaciones en el CNRS.

Lluís M. Mir fue uno de los pioneros en la investigación de la electroporación (electroporación) y las aplicaciones de esta técnica para la electroquimioterapia antitumoral y la electrotransferencia de ADN. Es autor de 193 artículos en revistas revisadas por pares, 21 capítulos en libros y más de 500 presentaciones en reuniones nacionales e internacionales, y como disertante invitado en conferencias, reuniones y seminarios internacionales. Recibió el Premio a las aplicaciones médicas de electricidad del Institut Electricité Santé en 1994, el Premio Anual de Cancerología de la Ligue contre le Cancer (comité Val-de-Marne) en 1996, el Premio de Investigación de Rhône-Poulenc- Rorer en 1998, la medalla de la CNFRS bajo los auspicios de la Academia de Ciencias de Francia en 2012, el Premio Frank Reidy en Bioelectricidad en 2015 y la Medalla de oro Balthazar van der Pol de la Unión Internacional de Ciencias de Radio en 2017. Es Senador Honorario de la Universidad de Liubiana (2004). También es miembro del Instituto Americano de Ingeniería Biológica y Médica. Ha sido profesor visitante de las Universidades de Berkeley (EE. UU.), Bielefeld (Alemania) y Jerusalén (Israel). Es el director del laboratorio de Vectorología (UMR 8203 del CNRS, Université Paris-Sud e Institut Gustave-Roussy), y también es el fundador y codirector del Laboratorio Europeo Asociado de Electroporación en Biología y Medicina del CNRS, en conjunto con las Universidades de Liubiana, Primorska, Toulouse y Limoges, el Instituto de Oncología de Liubiana y el Institut Gustave-Roussy.



Este libro contiene la última y más actualizada información sobre electroporación, electropermeabilización y campos eléctricos pulsantes. Proporciona un abordaje conciso al tema incluyendo aspectos básicos y sus aplicaciones biomédicas, que cualquiera que este interesado este campo debe comprender para tener éxito en su aplicación.