

Aproximaciones a la destrucción Celular con Electroporación Irreversible con Métodos Dirigidos a la Membrana Celular

CHUNLAN JIANG,¹ ZHENPENG QIN,² Y JOHN BISCHOF^{1,2,3}

¹Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad de Minnesota, 111 Church St. SE, Minneapolis, MN 55455, EE.UU.;

²Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de Minnesota, Minneapolis, MN, EE.UU.; y ³Departamento de Cirugía Urológica, Universidad de Minnesota, Minneapolis, MN, EE.UU

(Recibido el 18 de junio de 2013; aceptado el 25 de julio de 2013; publicado en línea el 15 de agosto 2013)

El Editor Asociado Cheng Dong verificó la revisión de este artículo.

Extracto—La Electroporación Irreversible (EIR) es una tecnología prometedora para tratar cáncer maligno local utilizando impulsos eléctricos de alto voltaje cortos. Desafortunadamente, los estudios *en vivo* muestran que la EIR sufre de una incapacidad de destruir volúmenes grandes de tejido de cáncer sin la introducción de agentes citotóxicos y/o incrementar la dosis eléctrica aplicada a niveles peligrosos. Esta investigación tratará esta limitación apalancando los mecanismos objetivo membrana que incrementan la permeabilización de membrana letal. Los métodos que directamente modifican las propiedades de la membrana o que cambian la temporización de entrega del impulso se proponen que no se basen en agentes citotóxicos. Este trabajo muestra mejora significativa (67-75% de más destrucción de células *in vitro* y >100% el incremento de volumen de tratamiento) se puede lograr utilizando los enfoques de objetivo membrana para destrucción del cáncer EIR. Los métodos presentados son surfactantes (por ejemplo, DMSO) y de temporización de impulsos que son de costo bajo, no tóxico y fáciles de incorporar en el uso clínico existente. Además, cuando se necesitan, estos métodos también pueden combinarse con electroquimioterapia para mejorar más la eficacia del tratamiento de EIR.

Palabras clave—Electroporación irreversible, Tratamiento de cáncer, Aduvantes, DMSO, Temporización de impulso, Permeabilización de membrana.


INTRODUCCION

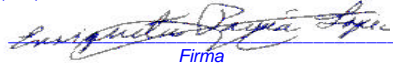
La electroporación, o electropermeabilización, es una tecnología prometedora que induce un incremento significativo de la conductividad y permeabilidad de la membrana de plasma al exponer las células a una serie corta, de impulsos eléctricos de alto voltaje.⁴⁵ Se ha utilizado ampliamente en biología molecular como un método para introducir moléculas extrañas,

incluyendo iones, tintes, anticuerpos, ARN y fragmentos de ADN, dentro de células vivas con esto respaldando los campos tales como la entrega de medicamento y transferencia de genes.^{16,28} Recientemente, Davalos y colaboradores⁵ propusieron el uso de la electroporación como un medio de destrucción de tejido blando, algunas veces llamado “ablación” en la comunidad médica. La prueba preclínica *in vitro*²⁷ y *in vivo*^{1,10,23} ha sido emprendida para respaldar esta nueva modalidad. A diferencia de la electroporación tradicional, en donde las células sólo se espera que estén permeabilizadas temporalmente y se recuperen después del tratamiento; la poración irreversible o letal es la meta en los usos de la terapia de cáncer. Por lo tanto, el término “electroporación irreversible” (EIR) se utiliza para distinguir este enfoque. Los beneficios que propone la EIR son que es más simple y rápida mientras que mantiene la naturaleza mínimamente invasiva de las terapias térmicas existentes (por ejemplo, RF y criocirugía). Los impulsos eléctricos de EIR normalmente se entregan por sondas con dimensiones milimétricas y toman sólo segundos para la entrega. En adición, los estudios *in vivo* han mostrado que la demarcación entre el tejido vivo y tratado (usualmente referido como la “zona de transición”) pueden ser más punzocortantes comparadas a las terapias térmicas.^{2,34} También se ha sugerido que la EIR puede destruir las células de tumor, mientras que conservan las estructuras de tejido tales como conductos mayores y vasos dentro de la región objetivo.³⁴ Al ser una terapia no térmica,^{6,25} la EIR está libre del efecto disipador de calor de sistemas vasculares locales, el cual ayuda a planeación clínica futura, ya que es menos dependiente en la perfusión (actualmente un aspecto limitante en las terapias térmicas,^{26,30}), haciendo de la EIR una candidata superior para tumores que se encuentren adyacentes a los vasos sanguíneos mayores o ductos.

Una amplia variedad de células,^{3,4,27,35,37,39} órganos,^{7,8,21,40} y modelos de animales,^{10,11,14,30,34,36} han sido utilizado para caracterizar la EIR en distintos tipos de cáncer. El ensayo clínico de primera fase en el hombre³¹ también ha sido efectuado en pacientes con carcinoma de células renales. Ningún aspecto de

Dirección de correspondencia con John Bischof, Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad de Minnesota, 111 Church St. SE, Minneapolis, MN 55455, EE.UU. Correo electrónico: bischof@umn.edu

 Traducción de original en INGLÉS.
Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA. COMUNICACION Y DESARROLLO. S. C.**
R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D",
Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx


Firma

seguridad fue notado con base en los registros hematológicos, de suero bioquímico y de ECG de los pacientes, a pesar de que los efectos a largo plazo permanecen a ser estudiados en ensayos clínicos más grandes. Ensayos clínicos más recientes han sido revisados en Golberg y Yarmush.¹⁹ Sin embargo, a pesar de los resultados alentadores informados, existen varias limitaciones con la técnica emergente, la cual puede presentar obstáculos a su uso clínico. Quizás el más crítico es la incapacidad de la EIR para destruir grandes volúmenes de tejido bajo un nivel de fuerza de campo eléctrico segura. De hecho, los tamaños de la lesión común informados en la literatura con sondas de aguja doble actualmente están muy por debajo de 1 cm^3 .^{8,14,15,23} Mientras que es posible agrandar el volumen del tratamiento incrementando el voltaje en el electrodo central, los campos eléctricos son extremadamente altos (mayores a 2500 V/cm) se necesitan y no son apropiados para uso clínico como nervios adyacentes y el tejido cardiovascular puede dañarse con tales campos altos.^{12,24} Al utilizar sondas múltiples es otra manera de incrementar el tamaño de la lesión. Teóricamente, con un perfil de sonda bien planeado, una lesión más grande y personalizada puede lograrse quedando en la geometría exacta del tumor objetivo meta. Sin embargo, las adiciones de sondas múltiples no sólo hacen el tratamiento más invasivo para el paciente, sino que incrementan la complejidad del procedimiento de operación, haciendo de la EIR un enfoque menos atractivo para el cirujano.

Existen varios enfoques para expandir el volumen de tejido que pueden tratarse por electroporación incluyendo la adición de agentes quimioterapéuticos o citotóxicos y los enfoques que incrementan la electroporación de la membrana. Al combinar la quimioterapia con la EIR también se ha defendido por varios grupos y se le refiere como "electroquimioterapias".^{20,36} Un método similar también fue propuesto recientemente por Frandsen y colaboradores¹³ utilizando inyección de calcio intratumoral directa seguida por electroporación, la cual llevó a eventos de calcio intracelular letales. Si bien estos estudios demostraron muerte celular mejorada, el enfoque fue mejorar la capacidad de medicamentos

quimioterapéuticos o agentes citotóxicos para entrar y destruir las células de cáncer más que mejorar la eficacia de la EIR por sí misma. Sin embargo, el propósito de este estudio es investigar la capacidad de incrementar la capacidad destructiva de EIR sin descansar en medicamentos citotóxicos. Específicamente, los mecanismos que modifican directamente las propiedades de la membrana (por ejemplo, tensión de línea y tensión de superficie, vea la Figura 1a) debe de reducir el umbral de voltaje para una permeabilización letal y por lo tanto incrementar la eficacia de la muerte celular y por lo tanto el volumen tratado después de dar la EIR. Dos métodos para lograr estos cambios se proponen en este estudio: (1) adición de surfactante (sulfóxido de dimetilo o DMSO) para directamente interactuar con los límites de la membrana con esto cambiando la tensión de la línea de la membrana y la tensión de la superficie (Fig. 1b) y (2) utilizar la temporización de impulso (por ejemplo, introducción y persistencia de defectos en los impulsos entre membranas, Fig. 1c). Los estudios experimentales fueron llevados a cabo en un modelo de cáncer de próstata humano (LNCaP Pro 5) bajo tanto condiciones in vitro (suspensión de célula) y en vivo (cámara de doblez de la piel dorsal), ambos con métodos de evaluación de viabilidad múltiple para evaluar y comparar los niveles de lesión con o sin mejora de EIR. Aquí, nosotros documentamos que dos enfoques no tóxicos proponemos (adyuvante surfactante y temporización de impulso) que puede de manera efectiva y muy alta mejorar el potencial destructivo de EIR in vitro y en vivo. Además, el mecanismo de mejora se muestra que está vinculado a la estabilidad de la membrana con esto permitiendo una reducción en la barrera de energía requerida para formación de poro irreversible.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de Células de Tumor

La línea de célula de cáncer de próstata (LNCaP Pro 5) fue cultivada como una monocapa adherente al Medio de Eagle

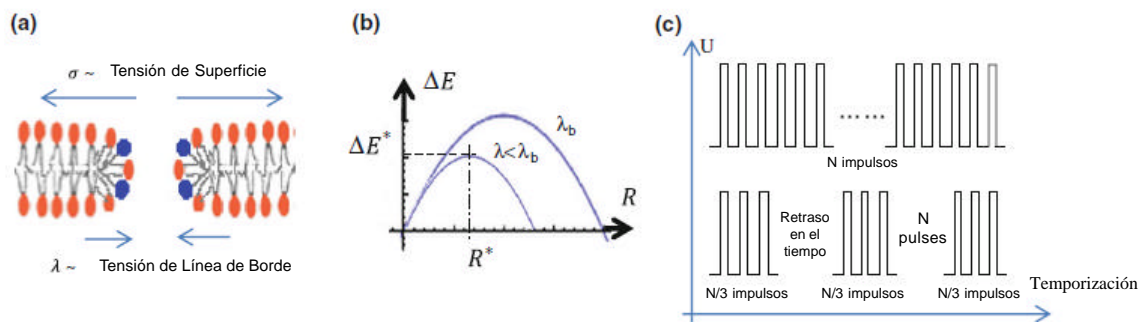


FIGURA 1. Reportado IRE estrategias de mejora: (a) los factores que compiten (tensión superficial y línea de borde tensión) durante la formación de poros, (b) modelo energético basado nucleación y radio de poro crítica y la energía, y (c) la ilustración de la forma de entrega de tiempo de pulso .



Traducción de original en INGLÉS.

Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**

R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca

Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México. petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Enriqueta Pavía López
Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators

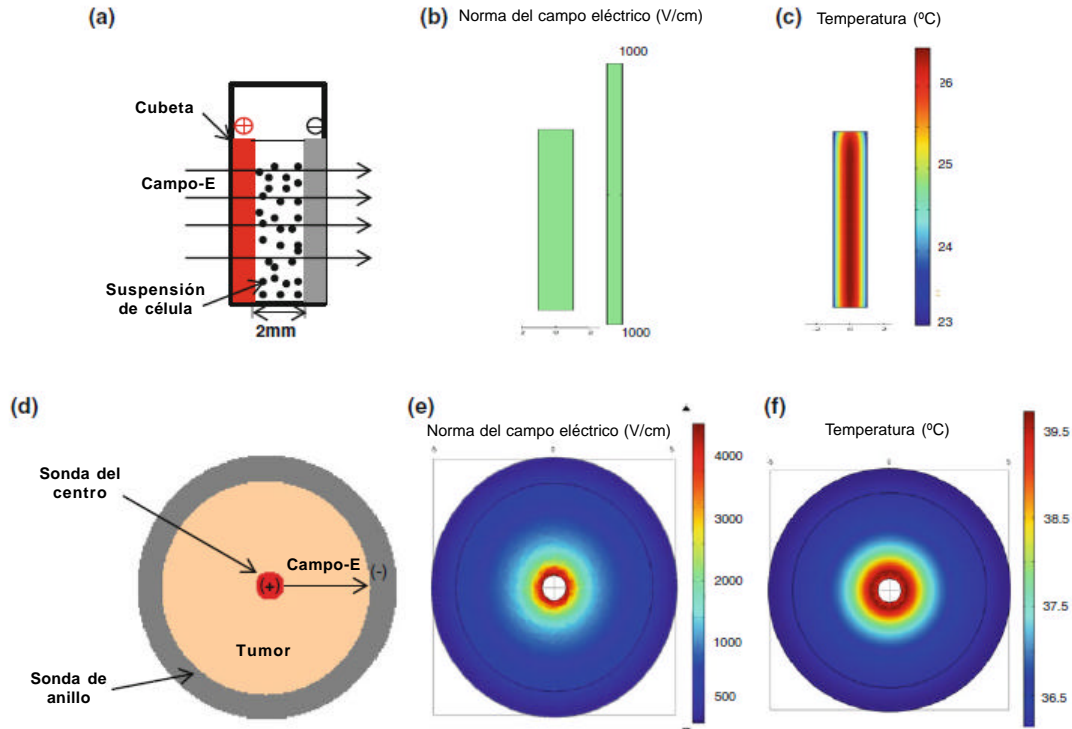


FIGURA 2. El ajuste experimental para el sistema EIR in vitro: (a) gráfica esquemática al sistema de cubeta de EIR, (b) distribución del campo eléctrico sobre la brecha de la cubeta con 200 V aplicado a lo largo de la brecha, (c) cambio de temperatura después del tratamiento de EIR con la línea base y el sistema de EIR en vivo: (d) la gráfica esquemática del perfil de superficie de la cámara, (e) distribución del campo eléctrico sobre la cámara con 500 V aplicada al electrodo del centro y (f) cambio de temperatura después del tratamiento con EIR de la línea base.

modificado por Dulbecco (DMEM)/F12 (BD Biosciences, CA) complementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (P4333, Sigma-Aldrich, MO) y 10^{-9} mol/L dihidrotestosterona (DHT) como se describe anteriormente.¹⁸ Cuando la confluencia fue >85% se alcanzó, las células estuvieron desprendidas agregando 0.05% de tripsina-EDTA (Invitrogen, CA) y después hecha en una suspensión celular simple.

Electroporación In Vitro

Para cada prueba de electroporación in vitro, 400 μ L de suspensión de célula preparada (0.5-0.6 millones de células/mL) fue pipeteado dentro de la brecha del electrodo (2 mm) en una cubeta de electroporación (FB102, Fischer Scientific), que después fue colocada en un campo eléctrico externo creado por un generador de impulso eléctrico (BTX ECM 830, Harvard apparatus), como se muestra en la Fig. 2a. La frecuencia del impulso es de 10 Hz a menos que se especifique otra cosa. El voltaje de salida y la corriente fueron supervisados por un osciloscopio (Tektronix TDS 2002).

Mejoras In Vitro

La mejora de DMSO fue lograda incubando primero la suspensión de la célula con DMSO a 1-15% de fracción del volumen (v/v) antes del tratamiento de EIR. Esta incubación duró 1 minuto para permitir suficiente difusión de las moléculas de DMSO dentro de la membrana de la célula mientras que mostró toxicidad mínima para las células comparada con los controles (información complementaria, S1). Para reducir el impacto de DMSO en conductividad eléctrica extracelular durante EIR o toxicidad después, la suspensión de la célula fue diluida por debajo de 1% v/v inmediatamente antes del procedimiento de EIR. Todos los grupos en la Fig. 5 fueron expuestos a un tren de 50 impulsos (200 V, 50 μ s por impulso).

Con la temporización del impulso, la energía total entregada (51 impulsos, 200 V y 50 μ s por impulso) fue la misma

¹Escogimos utilizar 51 impulsos en el método de temporización de impulso con objeto de que el mismo número de impulsos (17) se pudieran entregar en cada tren. La diferencia de dosis entre 51 y 50 impulsos en nuestros grupos de línea base es marginal.



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA. COMUNICACION Y DESARROLLO. S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Of. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
 petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Signature
 Firma

en todos los grupos de experimento. Sin embargo, 51 impulsos fueron divididos en 3 trenes de 17 impulsos con retrasos variados entre trenes (10 s, 30 s, 1 minutos y 2 minutos). La temporización del impulso del método de entrega se ilustra en la Figura 1c.

Ensayo de Viabilidad In Vitro

La viabilidad in vitro para los grupos experimental y de control fue evaluada utilizando un ensayo de CCK-8 con base de tetrazolio (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) que mide la actividad enzimática de la dehidrogenasa asociada con procesos metabólicos en células vivas. Las suspensiones de células fueron electroporadas como se describe arriba. Después de EIR, 100 μ L de alícuotas de suspensión de células fueron mezcladas con 10 μ L del reactivo CCK-8 en una placa de 96 pozos e incubado durante 4 horas a 37°C en la incubadora con 5% de CO₂. La absorción óptica de la muestra (Fig. 3a) después se lee en el espectrofotómetro (Synergy, BioTek Inc., VT) a una longitud de onda de 450 nm para determinar la viabilidad de acuerdo al protocolo normal como se delinea en el manual del fabricante. Los resultados de viabilidad fueron presentados como normalizados (o normalizado) valor de porcentaje con respecto a controles. La membrana de tinte (Hoechst, PI), la viabilidad de controles fue consistentemente $96 \pm 3\%$.

Sembrado y Crecimiento de Células de Tumor En Vivo

El sistema de tumor DSFC es un entorno controlado de dos dimensiones en el cual el crecimiento del tumor está restringido entre dos marcos de aluminio anodizado, separados por una distancia pequeña de 0.5 mm mantenida por separadores en los tornillos.¹⁷ Los marcos con diámetro de 10 mm viendo la ventana están implantados en la piel dorsal

del animal. Las cámaras de DSFC fueron implantadas en el ratón nudo (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) anteriormente descritos en Goel y colaboradores.¹⁷ En breve, la piel del lomo del ratón fue emparedada entre las cámaras. La piel viéndose desde lado fue retirada para exponer la dermis con microvasculatura del lado opuesto. Para una visualización clara, el exceso de fascia en la dermis fue retirada. Una microdeslizadora de vidrio de cuarzo fue utilizada para cubrir la vista lateral de la ventana para reducir la evaporación y mantener el tejido estéril durante el experimento. Todo uso de animal y protocolos de procedimiento experimental fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Minnesota.

Electroporación En Vivo

Para la electroporación en vivo, un electrodo de aguja (d = 1 mm) fue insertado a través del tumor y la piel en el centro de la ventana DSFC y un electrodo de anillo conectado al borde de la cámara (espesor = 1 mm y altura = 2.5 mm), como se muestra en la Fig. 2d y anteriormente se informó en Qin y colaboradores.³³ Una capa aislante fue colocada alrededor del electrodo de anillo para evitar la formación de arco. El voltaje aplicado y corriente fueron supervisados por el osciloscopio (Tektronix TDS 2002). La frecuencia de impulso es de 10 Hz a menos que se especifique otra cosa. Una cámara de infrarrojos (IR) también fue utilizada para registrar la temperatura de la superficie superior del tumor.

Mejoras En Vivo

Para la mejora de DMSO, 20 μ L de dilución de DMSO (5% v/v) en salina al 0.9% fue aplicada tópicamente sobre la superficie del tumor de DSFC. Esta concentración fue determinada

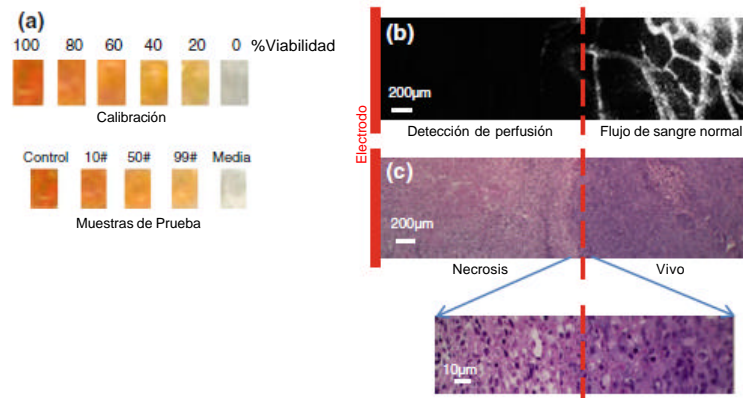


FIGURA 3. La evaluación de la lesión del sistema de EIR in vitro con el ensayo de viabilidad de células CCK-8 (a) y para la evaluación de la lesión del sistema de EIR in vivo por caracterización del defecto de perfusión desde la microscopia intravital (b) y la caracterización de necrosis de la imagen histológica (c).



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México. petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Enriqueta Pavía López
Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators

con base en nuestros mejores resultados de los experimentos in vitro (Fig. 5). La dilución se dejó en la ventana durante 6 minutos (vea la información complementaria, S2 para el cálculo del tiempo de difusión) para permitir la difusión dentro del volumen del tumor antes de la electroporación. La electroporación fue llevada a cabo en un tren de 50 impulsos (500 V, 50 μ s por impulso).

Para evaluar el impacto de la temporización del impulso, 51 impulsos EIR (500 V, 50 μ s por impulso) fue dividida en 3 trenes de 17 impulsos con retrasos de 30 segundos entre trenes. Este patrón de entrega fue determinado con base en nuestros mejores resultados desde los experimentos in vitro no sugiriendo beneficio posterior a los retrasos del impulso más prolongado (Fig. 5b).

Evaluación de Viabilidad En Vivo

El defecto de perfusión después ya sea de DMSO o la mejora de temporización de impulso fue visualizado por microscopia fluorescente intravital y registrado antes de los tratamientos e inmediatamente, 1 y 3 días después de los tratamientos. Los animales fueron sacrificados el día 3 y los tumores se tomaron para tinción histológica y evaluación. El defecto de perfusión (o estasis vascular) puede medirse por la fuga de fluorescencia dentro de un vaso después de inyección intravenosa de tinte fluorescente.³³ El defecto de perfusión de la microvasculatura de tumor (o control) electroporado fue visualizada después de 10 mg/mL 70-kDa dextran etiquetado-FITC fue administrado por inyección en la vena de cola. Los animales anestesiados se fijaron en un escenario designado especialmente para ratón la cual se montó en un microscopio de fluorescencia invertida (Figura 3b). El DSFC es radialmente transverso en cuatro direcciones perpendiculares (norte, sur, este y oeste) mientras que las ubicaciones radiales de estasis fueron notadas utilizando una escala de micrómetro fijada en el escenario con el centro de la cámara como origen. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente por nuestro grupo.^{18,33} Los animales fueron sacrificados 3 días después de EIR (o EIR más tratamiento de mejora) y los tumores fueron retirados y fijados en formalina tamponada al 10% durante 48 horas. Las muestras de tumor después fueron empotradas en parafina, seccionadas en 5 μ m y teñidas con tinte de hematoxilina-eosina (HyE). La sección del tumor total se le tomó imagen bajo estereomicroscopio con un campo amplio de vista (Leica MZ FL III fluorescencia estereomicroscópica) para examinar toda el área del tumor. Las imágenes se tomaron y después se procesaron utilizando la Imagen J para rastrear la región de necrosis demostrando destrucción (Fig. 3c).

Análisis de Datos y Estadísticas

Número de grupos de $n \geq 4$ y $n \geq 8$ fueron logrados para los cuatro experimentos in vitro y en vivo, respectivamente. Los resultados se presentan como valores promedio \pm desviaciones estándar. La prueba t de Student fue llevada a cabo entre los grupos experimental y de control en donde el valor $p \leq 0.01$ fue tomado para delinear el significado estadístico

entre grupos. Los parámetros de EIR utilizados en los modelos y condiciones experimentales de arriba se resumen en la Tabla 1.

Modelo de Poración de Membrana

Discutible, la mayor parte de la respuesta celular crítica a la EIR es la permeabilización de la membrana de la célula durante impulso eléctrico como se muestra en la Fig. 1. Estudios anteriores han mostrado que la probabilidad de ruptura de la membrana durante la electroporación está asociada muy de cerca con la dinámica de energía bajo un campo eléctrico externo.³⁸ La energía libre (ΔE) asociada con la formación de poro en la membrana de la célula puede modelarse con un modelo⁴⁶ de nucleación modificado como se describe en Eq. (1):

$$\Delta E(R, U) = 2\pi R * \lambda - \pi R^2 * (\sigma + aU^2). \quad (1)$$


La creación de poros de membrana durante EIR depende de la energía libre (ΔE) de formación de poro en la membrana de célula (vea Eq. (1)). Cuando el poro excede el radio crítico (R^*), la energía libre decreta como según se expande el poro, los cuales más adelante inducen a una ruptura de membrana y lleva a la muerte de la célula. En otras palabras, ΔE funciona como una barrera de energía para formación de poros. En donde un campo eléctrico externo se aplica a lo largo de la membrana celular ($U > 0$), la barrera de energía para tal poro crítico a desarrollar está decreta, la cual explica el por qué la electroporación puede incrementar grandemente la permeabilidad de la célula de la membrana.

Sin embargo, el incremento del voltaje de transmembrana no es el único enfoque para reducir la barrera de energía en este modelo. Como se muestra en Eq. (1), el decremento de la tensión de la línea del borde λ también puede alterar la energía libre de formación de poro (ΔE) y por lo tanto impactar grandemente el proceso de formación de poros. De acuerdo al modelo elástico de membrana por Karatekin y colaboradores,²² la tensión de la línea del borde de la membrana λ está influenciado por sus módulos doblantes k , el espesor de la membrana h , la fracción de inclusión θ de moléculas extrañas y la curvatura espontánea C_0 de las moléculas incluidas, como Eq. (2):

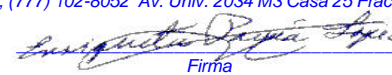
$$\lambda = \pi * k * \left(\frac{1}{h} - \theta * C_0 \right). \quad (2)$$

De manera interesante, los estudios anteriores han mostrado que la adición de ciertos surfactantes y péptidos pueden reducir el umbral de electroporación en sistemas de membrana artificial.^{41,42,44} Como ejemplo de este grupo surfactante está DMSO. Cuando se absorbió en las regiones de la cabeza del lípido bicapa, éstos pueden ayudar a mejorar la tensión de la línea del borde (λ) al decrementar el módulo de fusión (k) e introducir los grupos de curvatura positiva ($\theta * C_0$). Simulación dinámica molecular en Moldovan y colaboradores²⁹ ha demostrado que 11.3 mol % DMSO lleva a 90% de decremento en la tensión de la línea en membrana bicapa lípida moldeada,





Traducción de original en INGLÉS.
Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx


Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators

TABLA 1. Resumen de condiciones experimentales y resultados de mejora

| In vitro | Parámetros de impulso de EIR | | | | | Resultado | |
|---------------|------------------------------|----------------|---------------|--------|------------|-------------------------------|--|
| | Volt (V) | Campo-E (V/cm) | Duración (μs) | Número | Freq. (Hz) | Mejora (viabilidad de célula) | |
| Línea base | 200 | 1000 | 50 | 50 | 10 | (-50%) | |
| DMSO | 200 | 1000 | 50 | 50 | 10 | 75% de incremento (-10.42%) | |
| Temporización | 200 | 1000 | 50 | 3 x 17 | 10 | 67% de incremento (-13.48%) | |

| In vitro | Parámetros de impulso EIR | | | | | Resultados | |
|---------------|---------------------------|----------------|---------------|--------|------------|--|--|
| | Volt (V) | Campo-E (V/cm) | Duración (μs) | Número | Freq. (Hz) | Mejora (volumen de necrosis el día 3, mm3) | Mejora (volumen de defecto de perfusión el día 3, mm3) |
| Línea base | 500 | 50-4000 | 50 | 50 | 10 | (10.3) | (9.0) |
| DMSO | 500 | 50-4000 | 50 | 50 | 10 | 136% de incremento (24.3) | 120% de incremento (19.9) |
| Temporización | 500 | 50-4000 | 50 | 3 x 17 | 10 | 101% de incremento (20.9) | 107% de incremento (18.7) |

la cual puede causar una reducción significativa en el umbral de EIR (Fig. 1b).

Modelos Eléctricos y Térmicos

Las distribuciones del campo eléctrico en nuestros sistemas *in vitro* y *in vivo* fueron modeladas utilizando el programa de cómputo COMSOL Multiphysics. Para la cubeta de electroporación, el campo eléctrico se consideró homogéneo a lo largo de la brecha de 2 mm y generó un campo E de 1000 V/cm con impulsos de 200 V como se muestra en la Fig. 2b. La distribución del campo E en DSFC está determinada por la ecuación de Laplace (Ec. (3)):

$$\nabla \cdot (\Omega \cdot \nabla j) = 0, \quad (3)$$

en donde Ω es la conductividad eléctrica del tumor, j es el potencial eléctrico. Para el tejido homogéneo, el campo eléctrico calculado desde la Ecuación (3) se muestra en la Fig. 2e.

Cuando se descuida las pérdidas de calor, la energía de toda la corriente eléctrica va al calentamiento del tejido, lo cual se ilustra por:

$$SAR = \Omega \cdot |\nabla j|^2 \quad (4)$$

Utilizando la ecuación de biocalor instrumentada en COMSOL al agregar el término calentamiento (SAR en la ecuación (4)) desde el impulso eléctrico:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) + \rho_b \omega_b c_b \cdot (T_b - T) + q''' + SAR, \quad (5)$$

en donde r , c_p , y T son la densidad, capacidad de calor y temperatura del tejido, r_b , ω_b , c_b , y T_b son la densidad, tasa de flujo, capacidad de calor y temperatura de la sangre y q''' es el calor metabólico. En el caso *in vitro*, los términos de flujo de sangre y calor metabólico fueron programados en cero. Los parámetros utilizados en nuestros modelos se resumen en la Tabla 2. Este modelo permite el alza de temperatura al impulsar EIR para ser capturado como se muestra en las Figs. 2c y 2f.

Vale notar que la conductividad del tejido incrementará durante EIR debido al efecto de permeabilización de la electroporación que ha sido notado en el trabajo anterior de nuestro laboratorio.³³ No hemos elegido perseguir esto aquí con objeto de enfocar únicamente en el impacto de DMSO e impulsar la temporización sin confundir los efectos del cambio de conductividad. Ciertamente, un estudio más cuidadoso se garantiza en el futuro.

RESULTADOS

Mejora *in vitro*

Los resultados obtenidos con las estrategias de mejora propuestas fueron comparadas con una "electroporación de la línea de base". Específicamente, una dosis de línea base fue establecida la cual logró cerca del 50% de muerte de células después de EIR. Aquí nos basamos en la dosis en el número de impulsos mientras que se mantuvieron otros parámetros fijos. De hecho, el voltaje eléctrico, la duración del impulso y la frecuencia se fijaron a 200 V (sobre la brecha de la cubeta de 2 mm), 50 μs y 10 Hz y después el número de impulsos se incrementó de 10 a 99 veces. Esto mostró un decremento dependiente de la dosis en la viabilidad de la célula después de la electroporación (Fig. 4). Con base en estos datos escogimos 50 impulsos como nuestra dosis de línea base (por ejemplo, 50% de destrucción de células) después de EIR. El cambio de la viabilidad de la célula con adición de DMSO sol o fue insignificante cuando las concentraciones estuvieron por debajo del 5% v/v (información complementaria, S1). Sin embargo, cuando se combinaron con EIR pulsante, las viabilidades de células cayeron significativamente según la concentración de DMSO se incrementó (Fig. 5). Una mejora significativa de 75% de más muerte celular basada en la viabilidad de las células antes y después de impulsar EIR se encontró con la adición de 5% v/v de DMSO en nuestros conjuntos experimentales (Fig. 5, $n = 4$, prueba t de Student, $p = 0.01$).

Con la temporización de impulso, la dosis de EIR o energía total entregada fue similar (51 impulsos, 200 V y 50 μs por impulso), sin embargo los impulsos totales se espaciaron hacia afuera. La Figura 5b demuestra que esta temporización de impulso tuvo un impacto dramático y una mejora del 67% en la



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México. petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Enriqueta Pavía López
Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators

TABLA 2. Resumen de parámetros utilizados en nuestros modelos.

| Cantidad | Símbolo | Unidades | Valor |
|---|------------|------------------------------------|-------------------------|
| Conductividad eléctrica del tejido | Ω | S/m | 0.286 |
| Conductividad térmica del tejido | K | W/(m K) | 0.5 |
| Capacidad de calor del tejido | C_p | J/(kg K) | 3750 |
| Densidad de tejido | \hat{A} | kg/m ³ | 1000 |
| Temperatura de la sangre | T_b | C | 37 |
| Densidad de la sangre | r_b | kg/m ³ | 1000 |
| Capacidad de calor de la sangre | C_b | J/(kg K) | 3640 |
| Tasa de perfusión de la sangre | ω_b | kg/(m ³ s) | 0.5 |
| Calor metabólico | $q^{''}$ | W/m ³ | 16,900 |
| Coefficiente de transferencia de calor | h | W/(m ² K) | 50 |
| Temperatura del tumor inicial | T_0 | C | 37 |
| Temperatura ambiente | T_r | C | 25 |
| Potencial eléctrico de EIR | j | voltios | 200 ó 500 |
| Duración de impulso de EIR | td | μ s | 50 |
| Número de impulsos total de EIR | N | n/a | 50 |
| Frecuencia de EIR | f | Hz | 10 |
| Energía libre con formación de poro | ΔE | J | |
| Radio del poro | R | m | |
| Voltaje de transmembrana | U | voltios | |
| Tensión de la línea de la membrana | I | J/m | $1-6 \times 10^{-11}$ |
| Tensión de superficie de la membrana | s | J/m ² | $0.5-2 \times 10^{-3}$ |
| Coefficiente dieléctrico de lípido-agua | a | n/a | 0.043 |
| Módulo de flexión de la membrana | k | J | |
| Espesor de la membrana | h | m | |
| Fracción de inclusión de moléculas extrañas | θ | n/a | |
| Curvatura espontánea de las moléculas incluidas | C_0 | 1/m | |
| Constante de Boltzmann | k | m ² kg/s ² K | 1.38×10^{-23} |
| Temperatura absoluta | T_a | K | 298 |
| Número de Avogadro | N_A | n/a | 6.022×10^{23} |
| Radio de la molécula de agua | r_w | m | 0.957×10^{-10} |
| Viscosidad de la solución suspendiendo | η | P | 0.9×10^{-3} |
| Volumen molar del agua | v | m ³ /mol | 18×10^{-6} |
| Area de la superficie de la membrana | A_m | m ² | 2×10^{-6} |

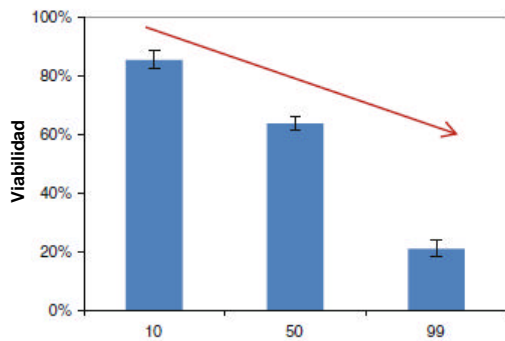


FIGURA 4. Resultados de viabilidad y la línea base después del tratamiento de EIR *in vitro*. Cada punto de datos representa el promedio $n = 4$ mediciones \pm Desviación Estándar.

muerte celular que se logró. De manera interesante, la introducción de los retrasos de tiempo también incrementó el tiempo para que el calor se difundiera, por lo tanto reduciendo el alza de temperatura máxima ($\Delta T_{m\acute{a}x}$) de 2.7° a menos de 1°.

Los retrasos de tiempo fueron variados de 10s, 30s, 1 min. y 2 min. y dieron resultados de mejora consistentes entre la línea base de EIR y el método de temporización (prueba *t* de Student, $p = 0.008$), a pesar de que no hubo diferencia significativa observada entre distintos tiempos de retraso. Después de demostrar que el DMSO y la temporización de impulso retrasado fueron capaces de mejorar significativamente *in vitro*, estos efectos también fueron probados en vivo con un modelo de tumor.

Mejora En Vivo

Con objeto de demostrar la mejora en vivo denuovo fue necesario establecer una dosis de electroporación de la línea base en el modelo de tumor de DSFC. Este se escogió con base en un de EIR previo conducido en nuestro laboratorio³³ con el mismo sistema experimental. Específicamente, escogimos 50 impulsos (500 V, 50 μ s por impulso) según la dosis de nuestro tratamiento base, ya que ésta da un nivel moderado de lesión de casi la mitad del radio de la cámara después de EIR (10.3 mm³ por histología y 8.7 mm³ por defecto de perfusión). Los resultados de la mejora por la histología se presentan en la Fig. 6, tanto para el tratamiento DMSO y temporización de impulso.



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA. COMUNICACION Y DESARROLLO. S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
 petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Signature
 Firma

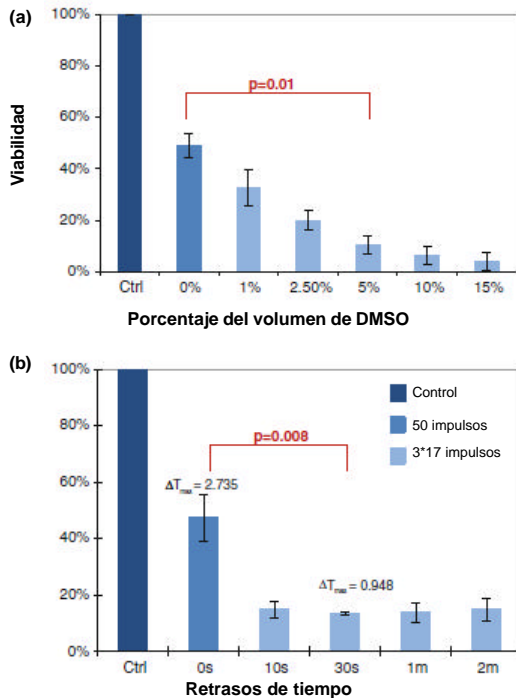


FIGURA 5. EIR *in vitro* con concentraciones variadas de DMSO (a) y temporización de impulso (b). Cada punto de datos representa el promedio de $n = 4$ mediciones \pm Desviación Estándar.

Específicamente, la Fig. 6a muestra que los tumores tratados con 5% v/v de DMSO desarrollaron una lesión necrótica de 24.3 mm³ comparadas con el nivel de la línea base (10.3 mm³), demostrando un aumento de 136% del volumen ($p = 0.001$ de la prueba t de Student). De manera similar, en la Fig. 6c, la temporización del impulso llevó a 20.9 mm³ de necrosis correspondiente a un incremento del 101% del volumen sobre la línea base ($p = 0.003$ desde la prueba t de Student).

Ningún defecto de perfusión fue observado en tumores vía de imagen intravital antes del tratamiento de EIR, con o sin uso de DMSO. Inmediatamente después del tratamiento de EIR, la perfusión de la sangre se bloqueó casi a lo largo de toda la cámara, con o sin mejora (Figs. 6b y 6d). Este efecto se informó antes de Deodhar y colaboradores⁷ y se creyó que estaba relacionado con la estimulación eléctrica en las células musculares lisas, también conocidas como el “efecto CMS”. En nuestro estudio, este bloque de perfusión aguda es temporal y reversible, como se revela por la recuperación rápida del defecto de perfusión por día 1 en todos los grupos experimentales.

En el día 1, el defecto de perfusión se estabilizó y pudo ser medido. La medición mejorada por defecto de perfusión fue similar con aquella medida por histología. De hecho, con

la adición de DMSO a EIR, el volumen de defecto de perfusión fue 139% mayor que la línea base el día 1 y 120% mayor el día 3. Para el método de temporización de impulso, el volumen de defecto de perfusión fue 111% mayor que la línea base el día 1 y 109% mayor el día 3. El radio del defecto de perfusión ligeramente incrementa del día 1 al día 3, sin embargo, la diferencia no es significativa ($p > 0.15$ por la prueba t de Student).

DEBATE

Una limitación notada de EIR es insuficiente volumen de tratamiento en tumores. En este trabajo, aplicamos enfoques objetivo meta de membrana aplicada para incrementar el volumen de tratamiento bajo dosis de EIR similar (voltaje de impulso, duración y número). Específicamente, demostramos que el uso directo de DMSO a concentraciones no tóxicas e introduciendo los retrasos de tiempo entre los trenes de impulso pudo incrementar tanto el potencial destructivo de EIR. Los resultados *in vitro* muestran 67-75% de mejoras en muerte celular. Además, la reproducibilidad del estudio in vivo muestra más de 100% de mejora en el volumen de tratamiento por dos métodos independientes ($p \leq 0.001$ de la prueba t de Student). De manera importante creemos que el mecanismo común de nuestros enfoques propuestos (DMSO y mejora por temporización de impulsos) están vinculados al cambio en la tensión de la línea en la membrana más que en la citotoxicidad. Esto puede argumentarse teóricamente abajo tanto para DMSO y temporización de impulso.

Para demostrar el impacto de la tensión de línea decremada al reducir el umbral de EIR, nosotros instrumentamos e implantamos el modelo de nucleación de Toner y Cravalho³⁸ y Weaver y Chizmadzhev⁴⁶ con la tasa de formación de poro crítico determinado por la Ecuación (6):

$$I(\Delta E^*) = 4kT_a N_A r_w * \left(\frac{\Delta E^*}{kT_a}\right)^{\frac{1}{2}} * \exp\left(-\frac{\Delta E^*}{kT_a}\right) / (3 * \sqrt{\pi} \eta v h^3), \quad (6)$$

en donde la energía de poro crítica ΔE^* se da en la Ecuación (7).

$$\Delta E^*(R^*, U) = \frac{\pi \lambda^2}{(\sigma + aU^2)}. \quad (7)$$

Los parámetros utilizados en nuestro modelo se resumen en la Tabla 2. En donde una gran población de células se exponen a la electroporación, la ocurrencia de desglose de membrana irreversible como resultado de las fluctuaciones aleatorias de los poros puede asumirse ser un proceso estocástico, con la probabilidad

$$P(U, t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t I(U) A_m dt\right). \quad (8)$$

Definimos primero U_{th} como el umbral de voltaje de transmembra que cuenta por la membrana completa



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México. petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Enriqueta Pavía López
Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators

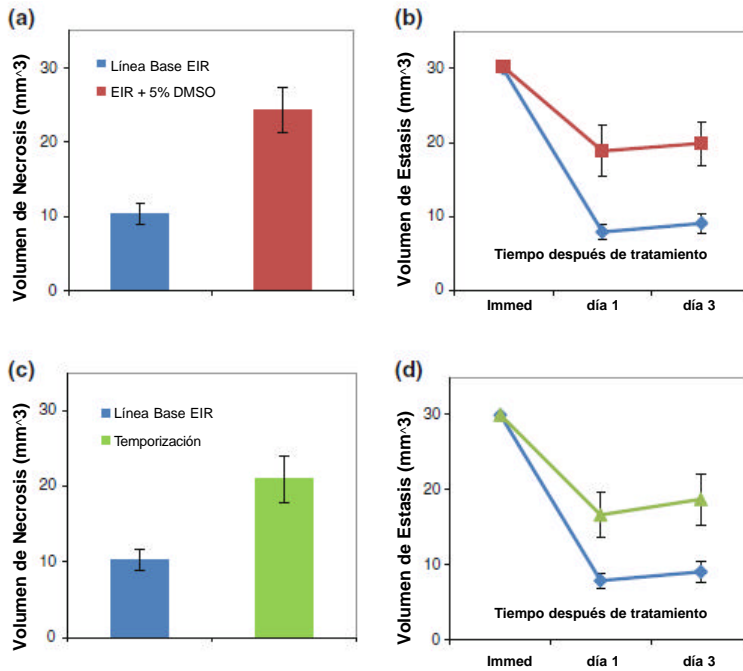


FIGURA 6. EIR *in vivo* con: 5% v/v de DMSO (a) y (b) e impulso de la mejora de temporización (c) y (d). Cada punto de datos representa el promedio de $n = 8$ mediciones \pm SE.

el desglose ($p < 0.99$), el impacto de la tensión de línea λ en U_{th} puede ser calculada desde la ecuación de arriba. Los valores de tensión de la línea de membrana informados en la literatura son 1×10^{-11} - 6×10^{-11} J/m³². De la figura 7a, en donde podemos ver la reducción de la tensión de la línea de la membrana tiene como impacto dramático en el umbral de EIR. Sobre una orden de magnitud de caída en U_{th} puede ser logrado al reducir λ de 5×10^{-11} a 1×10^{-11} J/m. En nuestro caso, la inclusión de 5% de v/v DMSO puede bajar la tensión de línea al mejorar 20%⁹. Por lo tanto, nuestra explicación propuesta para la mejora de DMSO es que la inclusión de las moléculas de DMSO en las membranas de células puede bajar la tensión de línea de borde por lo tanto decrementando la barrera de energía para el tamaño del crecimiento de poro, llevando a mejorar la ruptura de membrana y la lesión celular después de EIR.

Notablemente, la introducción de DMSO también reduce las tensiones de superficie de membrana. Sin embargo, el impacto de tensión de superficie en U_{th} es marginal comparado con la tensión de línea, como se muestra en la curva de sensibilidad de U_{th} a la tensión de superficie de membrana σ (Fig. 7b). Específicamente, menos de una caída de 1% de U_{th} fue inducida cuando σ estaba incrementando por una orden de magnitud (0.1×10^{-3} - 1×10^{-3} J/m²) comparado con más de una orden de magnitud de caída lograda por reducir λ para una magnitud. Por lo tanto, los cambios de tensión de superficie son insignificantes en nuestro modelado.

Similar al DMSO, la temporización de impulso también puede utilizarse para directamente impactar la poración de la membrana al reducir la tensión de la línea en recuperar poros. De hecho, mediciones experimentales y estimados teóricos de electroporación⁴³ revela que bajo el impulso eléctrico intenso, los defectos de membrana se originan dentro de μ s y pueden durar todo el tiempo del campo externo que se aplique (varios μ s de cientos de ms). Sin embargo, la temporización de recuperación de defecto de membrana es mucho más lenta una vez que se termina el impulsarla, generalmente es más prolongada de 1 s y puede tomar hasta minutos⁴⁶. La diferencia en las dos escalas de tiempo hace posible mejorar el efecto de matazón de EIR mediante la afinación de la temporización de impulso para apalancar estos poros recubiertos a la mitad.

Por lo menos dos factores de contribución pueden explicar el efecto de mejora de la temporización del impulso. Primero, los impulsos tempranos pueden llevar a la formación poros tanto reversibles e irreversibles en la membrana. Ya que el resellado completo de la membrana puede llevarse hasta minutos, la membrana de la célula permanecerá más susceptible a impulsos posteriores debido a que ambos condujeron espesor de membranas pulsando debido a que ambos redujeron los espesores de membrana desde los poros de recuperación tensión de línea reducida²² durante este período de recuperación. A pesar de los cálculos cualitativos no se dan aquí, el impacto dramático de reducir la línea de tensión fue demostrado en las ecuaciones (6) - (8) y Figs. 1 y 7 y pueden ayudar a explicar el significado




 Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
 petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx


 Firma

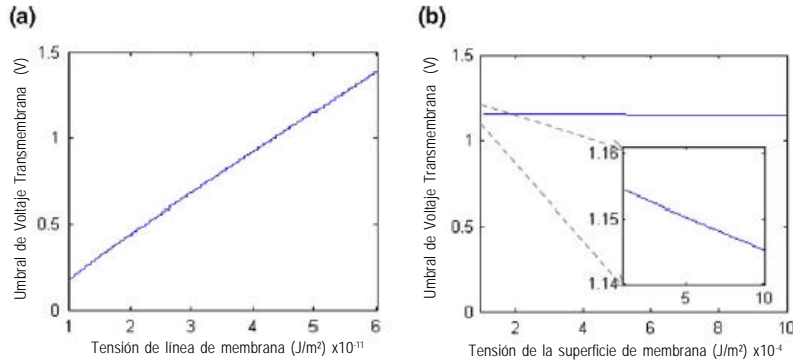


FIGURA 7. Impacto de la membrana (a) tensión de línea y (b) tensión de superficie en el umbral transmembra de EIR.

efecto de mejora de temporización de impulso. Segundo, extender el tiempo de apertura del poro también puede incrementar la lesión a la célula y la muerte debido a pérdida de iones, proteínas e incluso componentes de la célula críticos. Cuando los impulsos se entregan en un tren, sólo un período de recuperación se presenta después de la pulsación. Sin embargo, cuando los impulsos se entregan en varios trenes con segundos de retrasos en medio, el tiempo de exposición de poro total es la suma de todos los retrasos y el período de recuperación final. Por lo tanto, la lesión más secundaria puede ser causada debido a esta ampliación de tiempo de apertura de poro.

De manera importante, existe un potencial para la distribución de DMSO no uniforme en el tejido para afectar la mejora de EIR. En nuestro modelo DSFC, la conductividad del tejido local se supuso que estaba elevada homogéneamente como el líquido (salina + DMSO) se agregó tópicamente y se permitió que se difundiera a través de éste. Nosotros podemos argumentar que la distribución del campo eléctrico dentro del tumor pudo permanecer relativamente constante. Sin embargo, es posible que si la solución fuese inyectada localmente en el tejido, como en el caso de tumor sólido, podría haber variaciones de conductividad, lo cual podría cambiar el campo eléctrico en general. En adición, la prueba y la optimización de la frecuencia del impulso, tiempos de retraso entre impulsos y números de grupos de impulso en nuestro método de temporización de impulso valen la pena de un estudio posterior en el futuro.

CONCLUSION

En este estudio, dos enfoques de objetivo meta membrana fueron mostrados para incrementar el volumen de tratamiento de EIR para tumores malignos locales. Específicamente, el uso ya sea de surfactantes (por ejemplo, DMSO) o temporización de impulso para modificar las propiedades de la membrana también pueden grandemente mejorar la eficacia del tratamiento de EIR. Utilizando los métodos anteriores, 67-75% más de muerte celular *in vitro* y más del 100% incrementan el volumen de tratamiento *in vivo* y han sido activadas sin basarse en ninguno de los medicamentos citotóxicos o agentes. Debido a que

DMSO está comercialmente disponible y normalmente utilizado a concentraciones bajas (<10% v/v), este enfoque pudo fácilmente integrarse al procedimiento de ablación de EIR de corriente para incrementar la eficacia del tratamiento. En adición, al introducir los retrasos de temporización de impulso en EIR también incrementan el potencial destructivo de EIR sin la introducción de cualesquier agentes extraños en el cuerpo. Claramente las pruebas posteriores en sistemas de tumor avanzado (por ejemplo, tumores sólidos espontáneos e implantados) se necesitan para evaluar más cuidadosamente la eficacia de nuestros enfoques propuestos. No obstante, sugerimos que de la naturaleza simple y segura de estos enfoques de mejora comparados con los medicamentos citotóxicos puede ayudar en el refinamiento de los procesos de electroporación para cáncer.

MATERIAL COMPLEMENTARIO ELECTRONICO

La versión en línea de este artículo (doi: 10.1007/s 10439-013-0882-7) contiene materiales complementarios que estaban disponibles para los usuarios autorizados.

RECONOCIMIENTOS

Este estudio fue instrumentado e implantado por Ethicon Endo-Surgery Inc. Dimos las gracias a Peter Shires por su debate de ayuda. JCB fue respaldado por un McKnight Profesores Distinguidos y Carl y Janet Kuhmeyer Presidenta de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Minnesota.



Traducción de original en INGLÉS.
 Responsable de la traducción: **PET. CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavía López, Perito-Intérprete-Traductor, RFC PALE-540720-114, registrada ante el H. Tribunal Superior de Justicia del D.F. publicada en el Boletín Judicial del 16 de febrero de 1988, del 12 y 13 de febrero de 1991, 10 de febrero de 1992 del 1º de febrero de 1993 y en el del 31 de marzo de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLÉS, PORTUGUES Y ALEMÁN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLÉS Bol. 13 de julio, 2011 y del 7 de agosto, 2013. Tel. México 5343-6644 Fax 5343-8850, Cuernavaca (777) 311-1647, (777) 102-8052 Av. Univ. 2034 M3 Casa 25 Fracc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
 petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx

Enriqueta Pavía López
Firma

NUESTRO CAPITAL INTELECTUAL A SU SERVICIO Peritos-Expertos-Traductores

PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C. Polyglot-Expert-Translators