



Electroporación irreversible: evolución de una técnica de laboratorio en oncología de intervención

Amy R. Deipolyi, Alexander Golberg, Martin L. Yarmush, Ronald S. Arellano, Rahmi Oklu

EXTRACTO

La electroporación involucra aplicar impulsos de campo eléctrico a las células llevando a la alteración o destrucción de las membranas de la célula. La electroporación irreversible (EIR (IRE)) crea defectos permanentes en las membranas de las células e induce a la muerte de la célula. Mediante la EIR llegando al objetivo meta directamente a tumores, la ablación no térmica percutánea es posible. El historial de la EIR, la evolución de conceptos, teoría, usos biológicos y datos clínicos referentes a su seguridad y eficacia son los que se tratan.

Un número de modalidades están disponibles para ablación de tumor percutáneo. Estos métodos en primera instancia incluyen las técnicas térmicas, tales como crioablación, radiofrecuencia o ablación de microondas, los cuales involucran enfriamiento o calentamiento en tejido para inducir la muerte celular. Debido a que estos métodos dependen de la lesión térmica, estos llevan cierto riesgo al entorno extracelular adyacente. En consecuencia, al tratar los tumores adyacentes a las estructuras vasculares críticas es un reto que potencialmente limita la agresividad de la ablación intentada.

En años recientes, la electroporación surgió como un nuevo método de ablación de tumor. La electroporación, también conocida como electropermeabilización, involucra la aplicación de impulsos cortos de campos eléctricos fuertes a las células y tejidos. Los campos eléctricos externos incrementan el potencial transmembrana, cargando la membrana como un capacitor moviendo iones desde la solución que le rodea. Al aplicar los campos eléctricos a las células se pensó en inducir la formación de poros, los cuales son responsables del efecto de permeabilización; sin embargo, un daño irreversible más extenso de los campos mayores se utiliza para ablandar las células de tumor (Fig. 1). Al utilizar electrodos pequeños (~ 1 mm de diámetro) colocados cerca del objetivo meta y cortos, los impulsos de campo eléctrico repetitivos, la electroporación irreversible (EIR) no térmica parece ofrecer una ventaja sobre otros métodos de ablación que involucran calentamiento del tejido. Mientras que la electroporación se ha estudiado y utilizado durante décadas en el laboratorio y la industria alimenticia, no ha sido aplicada al campo de la oncología de intervención hasta recientemente. Hoy en día, los ensayos en humanos utilizando electroporación para tratar una variedad de tumores están en camino. Esta revisión describe la evolución de la técnica desde el banco al lado de la cama y subraya los retos restantes para normalizar su uso en la ablación del tumor.

Historial de la Ciencia de electroporación

La observación más temprana de un fenómeno que se asemeja a la electroporación puede ser trazado a los 1700s. La primera descripción de la electroporación irreversible (EIR) (IRE) puede haber sido efectuada en 1754 por Nollet, quien aplicó chispas eléctricas a la piel del humano y del animal y notó puntos rojos resultantes. Durante el siglo 18 hubo un interés en incremento en el efecto de la electricidad en sistemas biológicos, la mayoría de los cuales se enfocaron en espasmos y contracción inducidos por corrientes eléctricas aplicadas a médulas espinales de los animales y a preparaciones de músculo nervio (1). En los 1800s, un informe del uso de descarga de alto voltaje para purificar el agua del río fue la primera en describir el efecto bactericida de la EIR (IRE), a pesar de que el mecanismo no se entendió en ese momento. Durante el siglo diecinueve hubo otros informes de electricidad utilizada en medicina. Por ejemplo, la hemólisis debida a la aplicación de impulsos de electricidad fue informada, pero los mecanismos subyacentes de electroporación no fueron conocidos.

147

Del Departamento de Imagen, División de Radiología de Intervención (A.R.D., R.S.A., R.O. . rokl@mgd.harvard.edu) y el Centro de Ingeniería en Medicina (A.G., M.L.Y., R.O.), Hospital General de Massachusetts, Escuela Médica de Harvard, Boston, EUA.

Recibido el 20 de julio del 2013; revisión solicitada el 29 de agosto del 2013; revisión recibida el 22 de septiembre; aceptada el 26 de septiembre del 2013.

Publicado en línea el 10 de enero del 2014.
DOI 10.5152/dir.2013.13304

 Traducción de original en INGLES.
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 Fjacc. Veranda, Cuernavaca
Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Of. "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

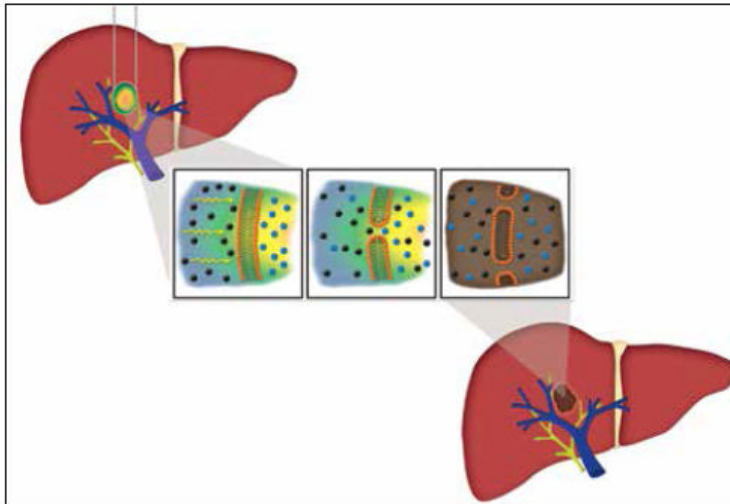


Figura 1. Ilustración de electroporación irreversible en un tumor del hígado. El panel izquierdo demuestra el hígado conteniendo un tumor ovoido rodeándolo dos sondas de electroporación irreversible lineales. La vista ampliada de tumor revela movimiento de la corriente eléctrica (flechas amarillas) a lo largo de una membrana celular que lleva a la rotura de la integridad de la membrana celular, la pérdida de gradientes celulares y la muerte de la célula. La imagen en el panel derecho muestra un tumor ablandado, retratando su vasculatura y ductos adyacentes preservados.

No fue sino hasta el siglo veinte que el fenómeno de la electroporación se caracterizó como que induce permeabilidad de membrana incrementada o que los efectos térmicos y no térmicos de la energía eléctrica fueron resueltos. Algunas de las primeras observaciones distinguieron los efectos de las quemaduras eléctricas de lesiones eléctricas no térmicas debido a la iluminación, las cuales ahora se piensa que son causadas por electroporación (2). Adicionalmente, durante el principio de los 1900s, el concepto de membrana celular como capa dieléctrica fue avanzada. En 1925, un estudio estimó con precisión el espesor de la membrana de la célula, evaluando las propiedades eléctricas de los glóbulos rojos sanguíneos. Por lo tanto, la primera mitad del siglo veinte se dieron dos hallazgos principales que avanzaron el entendimiento de electroporación: 1) la demostración que las membranas son estructuras dieléctricas y 2) que la electricidad genera tanto efectos térmicos como biológicos no térmicos.

Durante los 1950s y los 1960s, el proceso de electroporación involucrando la permeabilización de las membranas de células fue elucidado, en primera instancia en experimentos en nervios y en estudios relacionados con la esterilización de alimentos. Por ejemplo, Stämpfli y Huxley describieron la

Electroporación reversible e Irreversible de las membranas del nervio de la rana, evaluando el efecto de alterar las características del impulso eléctrico aplicado a la membrana y midiendo los cambios consecuentes en la resistencia de la membrana, comparando la membrana a un capacitor (1). En paralelo, desde la observación inicial del efecto bactericida de electricidad en el agua del río en 1898, la investigación sobre purificación del agua y alimentos continuó. En los 1960s, la instalación comercial utilizando impulsos eléctricos para proporcionar inactivación bacteriana no térmica estuvo disponible (1). Este esfuerzo culminó en el trabajo seminal de Sale y Hamilton, quienes elucidaron el efecto bactericida no térmico de los impulsos eléctricos, descritos en las variables de impulso óptimas utilizadas para lograr este efecto y demostraron la fisiología subyacente de los cambios en la conformación de la membrana y permeabilidad (1).


Durante los 1900s tardíos, la electroporación reversible se volvió tecnología de primera en las ciencias médicas y biológicas. A principios de los 1980s, se vio la introducción de la electroporación para inducir fusión de células (electro-fusión) y la transferencia de ADN dentro de las células (electrotransferencia). Un documento temprano describió la aplicación de impulsos eléctricos cortos

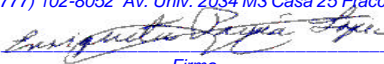
a células de lioma de ratón deficientes en el gen de cinasa timidina, permitiendo la toma de ADN plásmido conteniendo el gen de cinasa timidina simple de herpes y produciendo transformantes estables (3). El estudio postuló el modelo de electroporación en donde los cambios en los lípidos de la membrana causaron permeabilidad de célula incrementada y por lo tanto movimiento transmembrana. La electrotransferencia de ADN puede ser llevada a cabo en líneas de células bacteriana y eucariótica y circunvenio-na la necesidad para los métodos de entrega viral de ADN.

La electrofusión y la electrotransferencia de ADN desde hace mucho han sido establecidos como usos de laboratorio de electroporación reversible. En el laboratorio, la electroporación se lleva a cabo con electroporadores de escritorio de mano o de banca. Estos instrumentos están designados para crear campos eléctricos en soluciones de células. Las suspensiones de células se pipetea dentro de cubetas de vidrio o plástico con dos electrodos de aluminio de cualquier lado. La aplicación de electrotransferencia ha sido expandida más allá del ADN a la introducción de las enzimas, anticuerpos y partículas, incluyendo virus y otros reactivos bioquímicos dentro de las células para ensayos intracelulares.

Durante los 1990s, las técnicas de laboratorio para la transfección del gen dentro de las células y la entrega del gen dentro de los tejidos biológicos fueron desarrolladas y pulido. Temprana, la electroporación llevó a la muerte celular en una gran parte de las células tratadas. Debido a esto, la electroporación fue inicialmente limitada a transformación bacteriana. Con el paso de unas cuantas décadas, un número de avances han mejorado la eficiencia de la electroporación y sus usos. Tales avances incluyen la determinación y mantenimiento de parámetros de impulso óptimo, en particular con el uso de electroporador de onda cuadrada, que puede proporcionar control cuidadoso preciso de la amplitud y duración (4).

Estos descubrimientos iniciales inspiraron el uso más tarde de electroporación reversible para inducir permeabilidad celular en moléculas grandes, tales como el uso de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer y para inducir permeabilidad en la piel, mejorando el medicamento transdérmico (1). El uso de electroporación para mejorar la toma de medicamentos antitumorales (electroquimioterapia) fue desarrollada además llevando a ensayos clínicos, como


 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

se describe a continuación. De manera interesante, en los 1990s tardíos, hubo informes de muerte celular debido a EIR (IRE), que no llegó sólo desde la necrosis, sino también desde la apoptosis, lo cual pudo haber sido la primera sugerencia de que la electroporación pudo ofrecer ventajas como una técnica ablativa.

Principios fisiológicos de la electroporación subyacente

Actualmente, la hipótesis de poro acuoso transitorio es la explicación favorecida para los efectos fisiológicos de la electroporación y la simulación dinámica molecular reciente respalda esta teoría (5). Por esta hipótesis, la electroporación conlleva a la creación de los poros de nanoescala o defectos en la membrana celular. Suponiendo que los poros hidrofóbicos de membrana estén creados aleatoria y espontáneamente debido a movimiento térmico de moléculas fosfolípidas, la ubicación y tamaño de los poros varía aleatoriamente. De acuerdo a la química física de superficie clásica, la energía de formación de un sólo poro de radio r se expresa como $\Delta W_p(r) = 2\gamma\pi r^2 + \pi r^2 \Gamma$ (6). Esta expresión indica que la ausencia de un campo eléctrico externo, la energía de formación del poro para un sólo poro $\Delta W(r)$ es la diferencia entre la energía ganada en la formación del borde externo del poro (γ) y la reducción de energía debido a la pérdida del corte del parche circular desde la membrana cuando el poro se creó ($\pi r^2 \Gamma$). Esta noción se deriva del trabajo de Deryagin y Gutop sobre estabilidad de película de jabón propuesta en los 1960s (6). La constante Γ representa la energía por longitud en el borde del poro; Γ es la energía por área de una membrana libre de poro plana.

La energía de formación de poro por definición representa la barrera de energía de activación que las fluctuaciones térmicas deben superar para generar un poro hidrofóbico en la ausencia de un voltaje de transmembrana. La barrera de energía de activación es lo suficientemente alta, tal que no hay ruptura de las células frecuentemente. Sin embargo, estos poros espontáneos es probable que permitan la emergencia de sitios en donde ocurre la translocación de fosfolípidos fisiológicos. Si el radio del núcleo hidrofóbico (r) excede un valor crítico r_c (0.3 a 0.5 nm) éste supera la barrera de energía y se vuelve un poro hidrofílico, el cual se supone que es el responsable del inicio de la elec-

tróporación. Después de que se forma un poro hidrofílico, las moléculas de agua pasan dentro del espacio de la intermembrana durante el proceso de transformación del poro. Por lo tanto, la electroporación crea un entorno nanohidrofílico en una ubicación rípicamente hidrofóbica. Los lípidos cercanos entonces se reorientan para formar estructuras más estables generando un poro hidrofílico estable. Varias técnicas matemáticas se utilizan para modelar el efecto de impulsos eléctricos en membranas de célula. La mayoría lo más simple, la célula se puede modelar según la esfera compuesta de capas concéntricas incluyendo el citoplasma interior, la vaina de la membrana y el espacio extracelular. Los voltajes transmembrana y la distribución de potencial pueden estimarse resolviendo la ecuación de Laplace para cada espacio, con la membrana suponiendo ser no conductiva. La diferencia del potencial transmembrana ΔV_{MP} puede ser estimada por la ecuación, $\Delta V_{MP} = 1.5 \times r \times E_{ext} \cos \theta$, en donde r es el radio de la célula; E_{ext} es la resistencia del campo eléctrico externo y θ , es el ángulo polar relativo a la dirección del campo eléctrico. Si un potencial de transmembrana crítica se alcanza (-1 V), la polaridad de la membrana de la célula es temporalmente invertida, induciendo el arreglo rápido local de la morfología de lípido de la membrana y creando un poro. Modelos matemáticos más complejos pueden ser utilizados para células no esféricas para estimar el tamaño del poro y la probabilidad de que los poros son temporales y se curan o son permanentes.

Los poros conductivos pueden ya sea curar como una electroporación reversible o expandirse en tamaño, como una EIR. Ya sea que el proceso sea reversible o irreversible, depende del tamaño del defecto crítico en la membrana se alcance. Esto se piensa ser determinado por tensiones mecánicas locales, energía del borde bicapa de membrana y la naturaleza del campo aplicado. Los parámetros ajustables del campo eléctrico aplicado incluyen amplitud de impulso, duración y frecuencia. Más allá de los parámetros de impulsos eléctricos utilizados, el tipo de célula, la edad de la célula, morfología y tamaño determinan cómo responden las células a los impulsos eléctricos. De hecho, las células de Jurkat, una línea inmortalizada de células de linfocito T están listas electroporadas, ya sea de leucemia promielocítica humana (HL-60) las células no lo son (7). Se necesita más investigación para entender qué paráme-


tros de célula son los determinantes más fuertes de la eficiencia de la electroporación y si estas variables pueden ser explotadas a las células neoplásticas objetivo meta.

Comparado con otras técnicas de ablación, la EIR es no térmica (8,9), cuando se designa apropiadamente. Sin embargo, los campos eléctricos aplicados pueden involucrar fluctuaciones térmicas que pueden llevar al calentamiento del tejido. Esto se conoce como el efecto de Joule después de la primera ley de Joule, la cual expresa que el calor generado por fluir la corriente a través de un conductor como una función de la fuerza y el tiempo de que la corriente es aplicada como la resistencia del conductor. Cuando se utiliza como una técnica de ablación, los efectos térmicos de electroporación son minimizados de manera ideal con la meta específica de las células objetivo meta y evitar el calentamiento no específico de tejido normal que le rodea. Al aplicar impulsos más cortos minimiza la probabilidad de efecto térmico y permite la ablación no térmica específica de la célula.

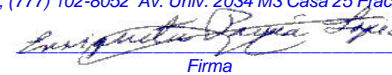
Usos clínicos de electroporación reversible

La electroporación reversible tiene múltiples usos en pacientes humanos. Un área activa bajo investigación es la entrega mejorada de medicamentos para incrementar la toma celular siguiendo la administración local o intravenosa. Por ejemplo, la electroquimioterapia se utiliza para incrementar la toma de bleomicina y cisplatina, a la cual las membranas del plasma son impermeables de manera relativa. Los impulsos eléctricos son entregados con electrodos de aguja o placa. El tejido blando expandible endoscópico y los electrodos de perno para hueso también han sido utilizados (4). El primer ensayo clínico de electroquimioterapia en pacientes con cáncer escamoso de cabeza y cuello demostró efectos anti-tumor claros de bleomicina; este tratamiento fue bien tolerado (10). Un ensayo similar fue informado en 1993, involucrando el tratamiento de metástasis de cabeza y cuello (11) y estudios posteriores han informado sobre el uso de bleomicina para metástasis de melanoma y carcinomas en célula basal (12, 13). Varios otros ensayos clínicos están en camino investigando la eficacia y tolerabilidad de electroquimioterapia (14).

En adición a los agentes de quimioterapia, la entrega intracelular de otros medicamentos y compuestos también puede ser mejorada con electroporación. Moléculas, in-



Traducción de original en INGLES.
 Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavia 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, INGLES, PORTUGUES Y ALEMAN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLES 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 Fjacc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx



Firma

cluyendo oligonucleótidos, iones, tintes y rastreadores radioactivos, pueden ser entregados con aplicaciones clínicas prometedoras (4). La electroporación también puede ser aplicada a barreras con base de lípido en tejidos humanos, generando nuevos trayectos acuosos y por lo tanto facilitando la entrega de medicamento local. Por ejemplo, el estrato córneo de la piel y otras monocapas de tejido en las cuales las células se conectan por uniones apretadas son barreras basadas en lípidos que pueden ser el objetivo meta con los impulsos eléctricos. El transporte transdérmico de compuestos grandes, tales como lidocaína, insulina, heparina y vacunas, por lo tanto es posible (15).

La electrotransferencia del gen también tiene usos clínicos potenciales en pacientes humanos. En la fase de ensayo I, interleucina plásmida (IL)-12 electroporación fue llevada en 24 pacientes de melanoma metastásicos, demostrando que los niveles de proteína IL-12 y el grado de necrosis de tumor incrementara proporcionalmente a las dosis de plásmido en biopsias post-tratamiento. La mayoría de los pacientes demostró una respuesta clínica (16).

Mecanismos de muerte de células en EIR

Se piensa que el mecanismo primario de la muerte celular de EIR es la apoptosis (muerte de células programada) en contraste a la necrosis coagulativa (muerte por isquemia o infarto), lo cual es un mecanismo primario en radiofrecuencia y ablación de microondas. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto de la célula muerta después de la EIR es desconocido y ambas necrosis y apoptosis es muy probable que ocurran. Inicialmente, se pensó que la poración de la membrana, la cual lleva a incrementar la permeabilidad, fue el disparador primario de la muerte celular. Después del uso del campo eléctrico, el transporte molecular transmembrana mejorado con descarga de membrana rápida induce a la célula a intentar recuperar su potencial de membrana al conducir pequeños iones, incluyendo sodio y cloro a través de los poros transitorios. Las células bajo tensión química u osmótica grave de transporte molecular excesivo puede entonces ser sometido a lisis. Adicionalmente, si uno o más poros críticos expandidos, la membrana puede destruir, llevar a disolución completa la celda.

Nuevos estudios han mostrado que la apoptosis después de la aplicación de campos eléctricos puede ocurrir sin for-

mación de poro, a pesar de que cuando los poros están inducidos, los marcadores apoptóticos parecen ser más rápidos (7). Impulsos eléctricos cortos inducen a una liberación de calcio intracelular, la mayoría es probable que por poración de la membrana retículo endoplásmica, mientras que a su vez, puede iniciar la apoptosis. Los impulsos eléctricos también pueden incrementar la permeabilidad mitocondrial, liberando citocromo c, la cual es una proteína pequeña involucrada en la iniciación de la apoptosis. Finalmente, los impulsos eléctricos pueden causar daño al ADN y niveles elevados de especies de oxígeno reactivo, induciendo apoptosis mediada por tensión oxidante.

Los informes en los trayectos que llevan a la muerte de células son contradictorios. De hecho, un estudio informó activación de caspasa-3 extensiva 24 horas después de EIR de carcinoma hepatocelular de la rata, sugiriendo apoptosis (17), mientras que otra no detectó ninguna célula positiva de caspasa-3 en el área tratada de carcinoma pancreático (18). Informes contradictorios pueden reflejar diferencias en el modelo de tumor utilizado, entre otros factores experimentales.

En resumen, los mecanismos propuestos de muerte de célula apoptótica debido a EIR incluyen ruptura de la célula desde la expansión del poro y tensión osmótica / química, la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplásmico, liberación de citocromo c de la mitocondria y tensión oxidante. Las células permeabilizadas irreversiblemente que pasan por la apoptosis después son retiradas por el sistema inmune y la EIR puede potenciar una reacción inmune al tejido abladido, mejorando el efecto del tratamiento. Sin embargo, la cuestión de si los efectos de la EIR en la membrana de la célula sirven como un evento final, ya sea que estas también induzcan muerte de células programada a largo plazo aún está abierta para estudio posterior.

Efecto biológico de EIR en animales vivos


La capacidad de la EIR para inducir muerte de células no térmicas y el objetivo meta de la membrana celular es la motivación primaria detrás aplicando esta tecnología a la ablación del tumor. Numerosos experimentos en mamíferos vivos han demostrado características específicas de la ablación de la zona de ablación de EIR que la hace única entre las modalidades de ablación disponibles.

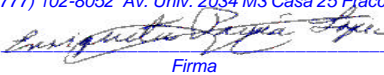
Debido a la especificidad relativa de la membrana celular, la EIR ha mostrado en estudios animales para ahorrar

andamios de tejido, en contraste a otras modalidades que causan ablación térmica. Por ejemplo, los estudios experimentales examinando los cambios histológicos después de EIR llevada a cabo en las arterias carótidas de la rata mostró que a cuatro semanas postablación, la matriz conectiva vascular permaneció intacta. El número de células de músculo liso vascular de pared arterial decrementó, pero ninguna trombosis, necrosis o aneurisma estuvo presente (19). Los estudios de ablación de electroporación irreversible en el hígado del cerdo demostraron la total ablación del tejido hasta los márgenes del vaso sanguíneo pueden lograrse sin comprometer la integridad estructural o funcionalidad de vasos sanguíneos, ductos biliares o tejido conectivo, todos los cuales permanecen intactos (20, 21). Histológicamente algunos han sugerido que la EIR produce una zona de ablación con demarcaciones más punzocortantes que las que se pueden observar en ambos micro y macroscópicamente, habilitando mejor evaluación post-tratamiento, comparada con otras modalidades de ablación (22). Sin embargo, el modelo matemático y datos experimentales recientes muestran que la EIR tiene una naturaleza probabilística y el diseño cuidadoso se requiere para incluir todo el tumor en la zona abladida.

Las zonas de ablación de EIR parecen ser independientes del flujo sanguíneo y por lo tanto no son susceptibles al efecto disipador de calor, un fenómeno que surge en las técnicas de ablación térmicas (radiofrecuencia, microondas) en donde el calor se disipa por el flujo sanguíneo en los vasos adyacentes. La eficacia de la ablación térmica se disminuye por tumores adyacentes a los vasos grandes, muy probablemente debido al efecto disipador de calor (23, 24). En consecuencia, el efecto disipador de calor frío en la crioterapia ha sido informado para lesiones adyacentes a los vasos sanguíneos (25). En contraste, la EIR ha mostrado que creó más ablaciones de tumor perivascular completas aún cuando un vaso grande atraviesa la zona de ablación (22).

Los hallazgos de imagen de EIR en lesiones del hígado se han descrito en modelos animales. En la imagen de ultrasonido (US), las áreas tratadas se vuelven hiperecóticas con la formación mínima de burbujas de aire hiperecótico observadas en las técnicas de ablación térmica (20). La tomografía computarizada mejorada (TC) con contraste inmediato demuestra una zona de hipomejora de ablación. Para tumores perivasculares, estrechamiento venoso

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


Firma

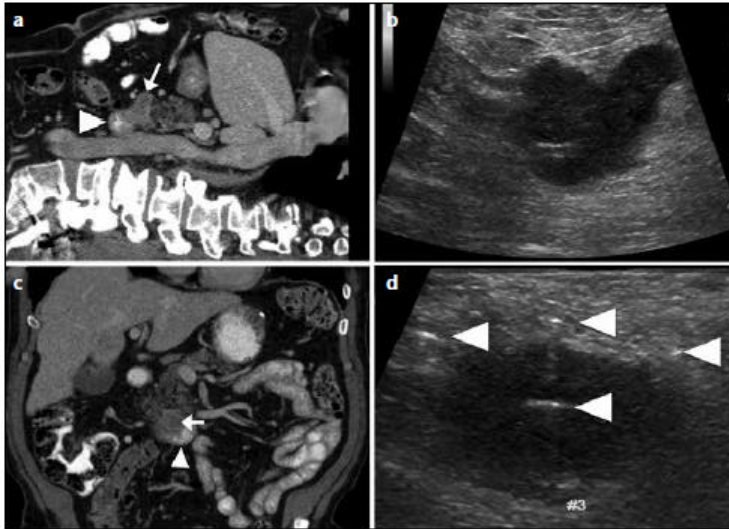


Figura 2. a-d Electroporación irreversible (EIR) de adenocarcinoma pancreático irresectable avanzado localmente. La imagen de TC mejorada por contraste, reformateada sagital del abdomen (ab) revela un adenocarcinoma pancreático (flecha) entrando al duodeno (punta de flecha). Imagen US sagital intraoperatoria correspondiente (b) muestra el adenocarcinoma pancreático hipocóico. La imagen de TC mejorada de contraste reformateada coronal del abdomen (c) muestra adenocarcinoma pancreático (flecha) y el duodeno adyacente (punta de flecha). Imagen de US coronal intraoperatorio (d) muestra el adenocarcinoma pancreático con cuatro sondas de EIR en el lugar (punta de flecha), antes de la ablación.

hepático ligero puede observarse en los vasos que atraviesan la lesión, pero estos de otra manera permanecen patentes (26). La imagen de tomografía computarizada 48 horas después de la EIR muestra que las zonas de ablación del hígado hipotenuadas centralmente con hiperatenuación ligera rodeando la zona de ablación; periaablación arterial, pero no venosa, la mejora también se observa (27). Los hallazgos de imagen de resonancia magnética son similares, con una señal T1 centralmente baja y la mejora periférica.

Uso de la electroporación para ablación de tumor percutáneo

El concepto de utilizar EIR para ablación de tumor fue formalmente introducida menos que hace una década en papel teórico utilizando el análisis matemático para mostrar que la EIR puede ablandar un volumen grande comparable a otras modalidades de ablación sin efectos térmicos en detrimento (8). Como se mencionó arriba, la electroporación ha sido utilizada desde los 1960s en la industria de alimentos para inactivación microbiana (28). Sorprendentemente, no fue sino hasta que el documento teórico publicado en el 2005 que la conexión entre EIR y la ablación del tumor se hizo.

El primer uso de EIR en pacientes humanos fue llevada a cabo para cáncer de próstata (29). En este estudio, 16 pacientes fueron tratados utilizando cuatro electrodos, de manera separada 1.0-1.5 cm y aplicando 90 impulsos de 70-100 como duración de 1500 V y 10 Hz. Todos los pacientes toleraron el producto bien, con no impotencia postprocedimiento o incontinencia y no informó complicaciones. Las biopsias postoperatorias llevadas a cabo tres semanas después de la ablación demostraron ningún cáncer residual. En un paciente, un micro-foco de cáncer se encontró fuera del área tratada (29).


Otro ensayo clínico temprano fue un solo centro, no aleatorizado, de estudio de compañero cohorte en Australia que incluyó 38 pacientes con tumores de hígado, riñón o pulmón avanzados, con 69 tumores en total tratados (30). Los tratamientos típicamente utilizados unipolares o electrodos bipolares, con 90 impulsos de 70 μ s de voltaje alto (1500-3000 V) de corriente directa (25-45 A) entregados en nueve conjuntos de 10 impulsos para el sitio de tratamiento. La ablación de tumor completa fue observada en 66% de los tumores, con tumores de riñón y de pulmón comprendiendo la tasa de falla más grande. En paciente cirróticos con carcinoma hepatocelular,

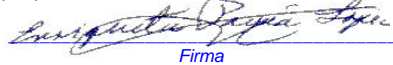
15 de 18 lesiones han terminado la ablación del tumor objetivo meta, a pesar de que un paciente requirió cinco tratamientos. Metástasis del hígado grande (> 5 cm) no fueron controlados con EIR. Ningún paciente con tumores grandes tuvo una respuesta al tratamiento. Complicaciones notablemente de EIR incluido ventricular y en las otras arritmia. Después cuatro pacientes experimentaron arritmias, la entrega sincronizada de electrocardiograma fue utilizada entonces. A pesar de esto, dos pacientes adicionales experimentaron arritmia. Adicionalmente, las complicaciones durante las ablaciones renales incluyendo ablación objetivo meta de la glándula adrenal, llevando a grave hipertensión y del uréter, más tarde causando obstrucción ureteral. Otras complicaciones estuvieron relacionadas a la anestesia general.

La experiencia publicada ha ido en crecimiento lentamente desde el estudio inicial y la literatura sugiere que las lesiones al hígado puedan ser el objetivo meta óptimo para ablación de electroporación irregular. Por ejemplo, un estudio prospectivo reciente de 44 pacientes sometidos a 48 ablaciones de EIR para metástasis colorrectal (20 lesiones), carcinoma hepatocelular (14 lesiones) y otras metástasis (10 lesiones) demostraron un lugar de supervivencia libre de recurrencia de 97.4% en tres meses, 94.6% a seis meses y 59.5% a 12 meses, con la tendencia para tasas de recurrencia más altas por lesiones mayores a 4 cm (31).

Las series más pequeñas investigaron la seguridad de los tumores de hígado tratados cerca de las estructuras vasculares describiendo EIR de 65 tumores encontrados en 28 pacientes, 21 de los cuales tuvieron metástasis colorrectal (32). Ninguno de los 25 tumores tratados ubicados localmente a 1 cm de una vena hepática mayor tiene trombosis venosa; un tratamiento de los 16 tumores dentro de 1 cm de pedículo de portal mayor resultó en trombosis de la vena portal. Los autores sugieren que EIR puede satisfactoriamente llevar a cabo en el hígado lesiones adyacentes a las estructuras vasculares mayores, consistentes con los beneficios teóricos de ablación no térmica. Después de seis meses de seguimiento, hubo una enfermedad persistente en 1.9% de los tumores y la recurrencia local en 5.7%, dando una tasa de falla de tratamiento general de 7.5%.

Más allá de los tumores del hígado, la EIR también ha sido aplicada en el tratamiento de cáncer pancreático irresectable avanzado para descender y controlar (Figura 2). De acuerdo con la serie de casos retrospectiva, se llevó a cabo su EIR en 14


 Traducción de original en INGLES.
 Responsable de la traducción: **PET, CONSULTORIA, COMUNICACION Y DESARROLLO, S. C.**
 R.F.C. PCC-890628-GP8/ Lic. María Enriqueta Pavia 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 febrero de 1995 para ESPAÑOL, FRANCÉS, ITALIANO, INGLES, PORTUGUES Y ALEMAN. Bol. 7 feb. 1997, Bol. 15 feb. 1999, Bol. 15 jul. 2003. ING. Bol. 9 de junio, 2009. PORTUGUES, ITALIANO, INGLES 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 Fjacc. Veranda, Cuernavaca
 Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Ofna. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México.
petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx


 Firma

pacientes, con un paciente recibiendo dos tratamientos; tres pacientes tuvieron enfermedad metastásica y el tamaño de tumor medio fue 3.3 cm (33). Sólo una complicación relacionada con EIR, pancreatitis, fue encontrada. Los escudriñamientos postprocedimiento se llevaron a cabo inmediatamente después de EIR y 24 horas más tarde demostró vasculatura patente. Todos los pacientes con enfermedad metastásica ocasionalmente murieron de progresión de la enfermedad, pero otros dos pacientes quienes fueron tratados exitosamente permanecieron libres de enfermedad durante 11 y 14 meses.

Otro estudio clínico multicéntrico incluyó 27 pacientes con cáncer pancreático avanzado localmente quienes recibieron EIR ya sea con o sin resección parcial concurrente (34). Todos con excepción de un paciente recibieron EIR, opuesto a paciente final, quien fue sometido a EIR percutánea. En cuatro casos, hubo posibles complicaciones relacionadas con el dispositivo de EIR. Hubo una mortalidad de 90 días debido a falla hepática y renal pero no hubo casos de pancreatitis o formación de fistula. Otras varias complicaciones, tales como trombosis venosa profunda, íleo y derrame de bilis, fueron atribuidos a cirugía. En 26 de 27 pacientes quienes estuvieron vivos al día 90 de seguimiento, no hubo evidencia de enfermedad recurrente. Además, no hubo decremento significativo en el dolor del paciente y el uso de narcóticos comparado antes de la EIR. Los autores concluyeron que la EIR es eficaz y relativamente segura. Estos estudios iniciales son prometedores y sugieren que la EIR pueda ser una modalidad de ablación segura para cáncer pancreático avanzado localmente. Ensayos más grandes están pendientes.

Aún en su infancia como modalidad de ablación, la EIR puede ser eficaz para otros tumores. De hecho, existen datos limitados que respaldan el uso potencial en sarcoma (35, 36). Los modelos animales han mostrado eficacia de EIR para cáncer de mama (37) y posiblemente tumores de cabeza (38), a pesar de que los ensayos humanos están pendientes. A pesar de que los ensayos clínicos iniciales han sugerido que el uso de EIR para carcinoma de célula renal pueden ser seguros relativamente (39), los datos carecen de respaldo en su uso en el lugar de la crioterapia o ablación por radiofrecuencia (30). De manera similar, los datos limitados para cáncer de pulmón han fallado en proporcionar respaldo evidente de su uso, con tasas de recurrencia mayor (30, 40). El sistema de EIR NanoKnife (Angiodynamics,

Tabla. Parámetros de tratamiento de electroporación irreversibles típicos

Organo	Nº de impulsos	Duración del impulso (ms)	Voltaje (V)	Referencia
Próstata	90	70-100	1500	29
Hígado	90	20-100	1500-3000	30-32
Páncreas	90	70-100	1500-3000	33, 34

Latham, Nueva York, EUA) ha estado comercialmente disponible desde el 2009 y está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA para ablación de tumores de tejido blando.

Otros usos clínicos de EIR


Más allá de la ablación del tumor, la EIR pudo ser utilizada para abladir otras estructuras para usos no oncológicos. Por ejemplo, denervación del nervio simpático renal con EIR actualmente está bajo investigación para el tratamiento de hipertensión con base en los éxitos iniciales con ablación de radiofrecuencia percutánea (41). En esta técnica la desnervación simpática renal se lleva a cabo vía el lumen de la arteria renal principal con un catéter conectado a un generador de radiofrecuencia. Al abladir estos nervios simpáticos, los niveles de norepinefrina se reducen y la hipertensión se mejora. Un ensayo pequeño de 50 pacientes informó buenos resultados con presión sanguínea decremada o casi 30 puntos a nueve meses; una disección de arteria renal fue notada (41). Ensayos más grandes están garantizados para evaluar la seguridad del procedimiento (42). Hipotéticamente, el uso de EIR más que ablación por radiofrecuencia pudo evitar cualquier efecto disipador de calor y disminuir complicaciones renovasculares no deseadas; aún, otros han informado que la EIR relativamente salva nervios. Por ejemplo, un nervio ciático de rata tratado con EIR demostró una recuperación total de la función neural después de siete semanas (43). Es necesario trabajo posterior para asegurar si la EIR puede aplicarse en este campo de manera segura y eficaz.

Otro uso de electroporación es la curación de heridas. La terapia de gen también emerge del campo de heridas no calentadas que se enfoca en los factores de crecimiento recombinantes que pueden promover la curación de heridas (44). Los múltiples métodos de inserción de genes existen, incluyendo pistolas de genes y vectores virales; la electroporación puede surgir de una modalidad dominante.

La EIR también puede ser aplicada a la medicina vascular para evitar reestenosis arterial después de angioplastia. La capa medial de las arterias contiene las células de músculo lisas (VSMC) que proliferan después de la angioplastia, causando pérdida luminal desconocida significativamente (45, 46). Varios métodos propuestos para evitar VSMC proliferación han sido sugeridas, incluyendo braquiterapia, crioplastia, terapia del gen, endoprótesis elusoras de medicamento, terapia fotodinámica y más recientemente, electroporación (47). Los estudios en modelos de rata y conejo demostraron que las arterias tratadas por EIR endovascular causan la ablación de VSMCs, la cual persiste durante más de un mes; la lámina elástica permaneció intacta, mientras que la capa endotelial se regenera (19, 47, 48). El número de VSMCs, decrementó sin la formación de un aneurisma o trombos y sin necrosis. La primera matriz de tejido conectivo que permaneció intacta. A cinco semanas, fibrosis de la pared con endotelio regenerado fue observado. Estos hallazgos han sido implicaciones claras para ablación endovascular no térmica utilizando la EIR en medicina cardiovascular.

Consideración especial para llevar a cabo EIR comparado con otros tumores de modalidades de ablación

La consideración primaria para llevar a cabo el EIR es aquel que el procedimiento deba llevarse a cabo bajo una anestesia general, en contraste a las técnicas de ablación dérmica que frecuentemente se forman bajo sedación consciente. Las razones principales para simulación de músculo incluyen arritmias cardíacas debido a campos eléctricos impulsados, fuertes. Estimulación muscular, incluyendo el diafragma, necesita el uso de agentes paralíticos. Contracciones musculares son típicamente localizadas para el área de tratamiento pero aún pueden involucrar diafragma aún cuando los pacientes estén lo suficientemente paralizados. La administración de agentes paralíticos necesita supervisión neuromuscular.



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

Las arritmias cardíacas fueron previamente notadas en modelos animales y subsecuentemente en ensayos clínicos tempranos (30); éstas son más probable que ocurran cuando las lesiones de tratamiento cierran al corazón. Esta observación llevó al uso de rutina de sincronización cardíaca durante EIR, la cual necesita supervisión cardíaca. Mientras EIR necesita supervisión neuromuscular y cardíacas, ésta no requiere las almohadillas de puesta a tierra que se necesitó en ablación de radiofrecuencia, el sistema de enfriamiento (por ejemplo, cubeta de hielo), necesitada en radiofrecuencia y ablación de microondas o el tanque de gas y el sistema de entrega necesitan crioterapia.

En un nivel práctico, la ablación con EIR se llevó a cabo con dos a seis sondas monopolares o una sola sonda bipolar con un generador. Las zonas de ablación de varios tamaños y formas confeccionados para órganos específicos pueden crearse dependiendo de las sondas y programaciones utilizadas (Tabla). El modelado matemático cuidadoso puede predecir las características de la zona de ablación. Tomografía computarizada o guía US a menudo utilizan durante la ablación de EIR y es típicamente más corta en duración. Por ejemplo, más fuertemente un minuto se requiere que ablación a 3 cm de la lesión del hígado.


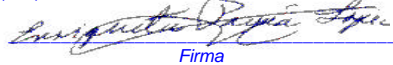
En resumen, mientras muchos detalles del procedimiento son similares entre EIR y otras modalidades de ablación, la necesidad para anestesia general y más supervisión intraprocedimiento involucrada es una consideración adicional que puede ser más apropiada para tumores adyacentes a los vasos y otras estructuras críticas debido a que es este escenario en donde la EIR tiene su beneficio teórico más fuerte.

Conclusión

La electroporación es una técnica con un historial largo de uso en laboratorio. Se ha desarrollado lentamente, inicialmente desde las observaciones en los efectos de electricidad en sistemas biológicos, en paralelo con el estudio de impulsos eléctrico sobre alimentos esterilizados y agua. Una vez que los mecanismos subyacentes de electroporación no térmica fueron entendidos mejor, para el uso de pacientes humanos que surgieron. Mientras EIR para el tratamiento de tumores hepáticos, pancreáticos y posiblemente otros tumores es una herramienta de oncología de intervención nueva prometedora, se necesita más trabajo para mejorar su seguridad y delinear los resultados esperados.

Conflicto de intereses de revelación

Los autores declaran no haber conflictos de intereses.

	<p>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 Fjacc. Veranda, Cuernavaca Super Avenida Lomas Verdes 651, Edif. 4, Of. "D", Jardines de Satélite 53129, Naucalpan, Edo. de México. petconsultoriapoliglotas@prodigy.net.mx</p>
	<p> Firma</p>