



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE COMPUTACIÓN

Electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales

Tesis presentada para optar al título de
Licenciado en Ciencias de la Computación

Matías Daniel Marino

Directores: Dr. Pablo Turjanski, Dr. Nahuel Olaiz
Buenos Aires, 2013

RESUMEN

Dentro de los tratamientos contra el cáncer, existen un grupo de técnicas que tienen como característica común la aplicación de campos eléctricos a través de la utilización de electrodos. Entre las ventajas que presentan con respecto a las terapias tradicionales (cirugía, quimioterapia, radioterapia) se pueden mencionar la eficacia, la seguridad, el bajo costo económico y la aplicación ambulatoria. La técnica de electroporación celular consiste en permeabilizar localmente la membrana celular mediante la aplicación, a través de electrodos, de pulsos eléctricos cortos y de gran intensidad (Pulsos de Campo Eléctrico (PEF)). Esto permite el ingreso de agentes terapéuticos al interior de la célula para los cuales la membrana plasmática representa una barrera físico-química. Los agentes terapéuticos pueden variar según el tipo de tratamiento que se realice. A modo de ejemplo, en la Electroquimioterapia (ECT) se utilizan drogas quimioterápicas clásicas. En el caso de la Electroterapia Génica (GET), se utilizan moléculas de ADN y ARN. En ambos casos, la mayor absorción de las células producto del proceso de electroporación antes mencionado, se traduce en la posibilidad de utilizar menores concentraciones de dichos agentes, lo que implica daños colaterales reducidos y costos económicos.

Analizar el rol del pH en las terapias mencionadas resulta de gran importancia dado que las reacciones electroquímicas que ocurren en el tejido debido a su aplicación generan valores extremos de pH, los cuales resultan tóxicos para las células. En este trabajo de tesis, se presentan dos extensiones a un modelo matemático-computacional ya existente, el cual consta de un sistema determinístico de ecuaciones diferenciales de reacción-transporte que describe las leyes de conservación físico-químicas y cuya resolución se obtiene computacionalmente a través de métodos numéricos. En la primera extensión, se modela la presencia de distintos tipos de tejido. En la segunda, se agregan más especies iónicas que funcionan como reguladores y amortiguadores del pH (especies *buffer*). Además, ambos modelos se comparan entre sí y se cotejan con experimentos *in vivo* realizados en ratones a los que se les aplicó un procedimiento estándar de Electroterapia Génica (GET). Las nuevas extensiones presentadas ratifican la presencia de pH extremo en la zona cercana a los electrodos y mejoran las predicciones del modelo original tomado como base. Se espera que la simulación numérica de estos modelos contribuya a ajustar y calibrar los parámetros de la terapia.

Palabras claves: Simulación Numérica, Fisicoquímica Computacional, Pulsos de Campo Eléctrico, Electroporación, Electroterapia, Electroterapia Génica, Electrotransferencia Génica.

Índice general

1..	Introducción	1
1.1.	Problemática del Cáncer	1
1.2.	Electroterapia	1
1.2.1.	Electroquimioterapia	2
1.2.2.	Electroterapia Génica	2
1.2.3.	Electroporación Irreversible (IRE)	3
1.2.4.	Tratamiento Electroquímico de Tumores	3
1.3.	Motivación	4
1.4.	Metodología	4
1.5.	Plan	5
2..	Modelado de Electroterapia Génica en Múltiples Tejidos	7
2.1.	Introducción	7
2.2.	Modelo <i>in silico</i>	8
2.2.1.	Modelo matemático	8
2.2.2.	Modelo Computacional	13
2.3.	Modelo <i>in vivo</i>	16
2.3.1.	Pliegue Cutáneo Dorsal (DSC)	16
2.3.2.	Músculo Tibial Anterior (TAM)	17
2.4.	Resultados y Discusión	17
2.4.1.	DSC	17
2.4.2.	TAM	19
2.5.	Conclusiones	21
3..	Modelo de Electroterapia Génica con Sistemas Buffer	25
3.1.	Modelo <i>in silico</i>	25
3.1.1.	Modelo Matemático	25
3.1.2.	Modelo Computacional	27
3.2.	Resultados y Discusión	29
3.3.	Conclusiones	31
4..	Conclusiones y Trabajos Futuros	33
4.1.	Conclusiones	33
4.2.	Trabajos Futuros	33
	Apéndice	35
A..	Sobre el Material Entregado	37
A.1.	Instructivo de uso	37
A.2.	Pseudocódigo <i>script</i> del Capítulo 2	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática del Cáncer

El cáncer es, a nivel mundial, la tercera causa de muerte tanto para hombres (13,4 %) como para mujeres (11,8 %) [1]. En Argentina, las cifras no son más alentadoras. Las defunciones por tumores malignos se ubican en el segundo lugar (19,9 %), por debajo de las enfermedades cardiovasculares, y en el primero en la franja etaria que va desde los 45 hasta los 64 años de edad. En particular, afecta con mayor intensidad a las mujeres entre los 35 y los 64 años, en donde el cáncer respresenta la principal causa de muerte. [2]. A escala global, según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), Argentina se encuentra en un nivel medio-alto tanto de incidencia como de mortalidad de la enfermedad [3].

Además del problema médico y humanitario, el cáncer representa un problema económico, sobretodo para familias y países de medios y bajos recursos. Entre los principales motivos se pueden enumerar los largos tratamientos, las reiteradas cirugías o las drogas altamente costosas [4]. Pese a los enormes avances hechos en el tratamiento de la enfermedad, la tendencia indica que los costos seguirán aumentando en los próximos años [5].

Otros problemas de similar envergadura se suscitan al afrontar un tratamiento, el cual puede variar según el tipo cáncer y la etapa de su detección. Si el tumor es inabordable quirúrgicamente, alternativas clásicas como la radioterapia o la quimioterapia pueden resultar, por diversas causas, excesivamente dañinas para el paciente. En particular, para aquellos tratamientos que dependen de la aplicación vía sistémica de agentes terapéuticos, existen un conjunto de barreras biológicas y físico-químicas que éstos deben atravesar hasta llegar a su sitio activo (el interior de la célula tumoral en el caso de tratamientos antitumorales). Por ejemplo, en la quimioterapia, si una droga es aplicada vía intravenosa ésta debe superar el endotelio vascular (la membrana que recubre los vasos sanguíneos), luego migrar por el líquido intersticial (entre células del tejido) para finalmente atravesar la membrana plasmática (que es quien recubre la célula) [6–8]. Estas limitaciones pueden superarse en parte suministrando altas dosis, lo cual conlleva no sólo elevados costos económicos sino también efectos secundarios tóxicos.

En este contexto, las electroterapias surgen como un tratamiento complementario o alternativo tanto a la intervención quirúrgica como al uso de drogas antitumorales u otros agentes terapéuticos como anticuerpos, plásmidos¹, etc [9].

1.2. Electroterapia

La Electroterapia (ET) consiste en el uso de la energía eléctrica con fines médicos [10]. En esta introducción centraremos la atención en algunas de sus variantes: la Electroquimioterapia (ECT), la Electroterapia Génica (GET), la Electroporación Irreversible (IRE) y el Tratamiento Electroquímico de Tumores (EChT). Las primeras tres involucran la utilización de una técnica denominada **electroporación**, que consiste en la permeabilización de la membrana celular mediante la aplicación de Pulsos de Campo Eléctrico (PEF).

¹ **Plásmidos:** Moléculas de ADN circular o lineal que se replican independientes del ADN cromosómico.

Dependiendo de la cantidad, duración e intensidad de estos pulsos, esta *electropermeabilización* puede ser reversible (temporal) o irreversible (permanente). La ECT y la GET son tratamientos que combinan la electroporación reversible con el uso de un agente terapéutico poco permeable al interior de la célula, mientras que la IRE busca dañar el tejido tumoral de forma controlada a través de campos eléctricos de alta intensidad.

Haremos a continuación una breve reseña de cada una de las terapias mencionadas.

1.2.1. Electroquimioterapia

La Electroquimioterapia (ECT) es un tratamiento que utiliza Pulsos de Campo Eléctrico (PEF) con el objetivo de permeabilizar local y temporalmente la zona del tumor, y así permitir la entrada a drogas citotóxicas² que en condiciones normales no podrían atravesar la membrana plasmática de las células tumorales o lo harían en insuficientes proporciones. Un tratamiento estándar de la ECT consta de dos etapas: primero, el suministro vía intravenosa, peri o intratumoral de la droga citotóxica, típicamente bleomicina o cisplatino; segundo, la aplicación de 8 pulsos eléctricos de onda cuadrada de alta intensidad (1000 V/cm) de una duración de 100 μ s y una frecuencia de 1 Hz a través de dos o más electrodos dispuestos en la superficie del tumor [11]. Esta estrategia busca destruir el tejido tumoral utilizando bajas dosis de droga, reduciendo costos y favoreciendo así la viabilidad celular del tejido sano. La bleomicina, por ejemplo, resulta ser una droga muy efectiva dado su alto efecto tóxico sobre la célula. Adicionalmente, debido a que ataca selectivamente los procesos de división y diferenciación celular se ven afectadas principalmente las células tumorales [12]. De esta manera, la terapia se presenta como eficaz, simple, ambulatoria, segura y económica.

Actualmente, la ECT se encuentra en fase clínica. En el año 2006 se publicó el estudio ESOPE (European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy) en donde se relevaron muy buenos resultados en pacientes con metástasis cutáneas y subcutáneas pequeñas (menores a 3 cm^3) y se desarrollaron protocolos de operación estándar [13]. La propuesta actual es la de un tratamiento paliativo en tumores sólidos al alcance de los electrodos, tendientes a mejorar la calidad de vida del paciente. Puede ser una alternativa en situaciones donde tratamientos como la radioterapia, la quimioterapia o la cirugía sean ineficaces, o como complemento citoreductivo previo a una intervención quirúrgica. Además, con el desarrollo de nuevos tipos de electrodos se propone también que la terapia pueda ser utilizada para tumores internos [14–16].

1.2.2. Electroterapia Génica

Una derivación reciente de la ECT es la Electroterapia Génica (GET), en donde el agente farmacológico no es una droga citotóxica sino un gen. En efecto, las terapias génicas involucran la administración, suministro y transporte de genes terapéuticos hacia las células afectadas, con el objetivo de prevenir, tratar o curar enfermedades genéticas o adquiridas. Los plásmidos han sido sugeridos como uno de los vectores más simples y seguros a la hora del *delivery* de genes hacia las células objetivo [17]. Además, resultan ser fáciles de manipular y producir a gran escala [18]. Sin embargo, dado su tamaño y características físico-químicas, los ácidos nucleicos no difunden a través de la membrana celular, lo que resulta en una baja eficiencia en la transfección³ en comparación a los vectores virales [19].

² **Cito-:** célula

³ **Transfección:** Es el proceso de introducir moléculas de ADN en el interior de una célula.

A su vez, pese a su efectividad, estos últimos conllevan conocidos efectos secundarios como ser una respuesta inmunológica que no permitiría la readministración del virus [20], como también riesgos potenciales asociados a la mutagénesis celular [21].

En este contexto, el uso de campos eléctricos ha permitido desarrollar una estrategia no-viral eficiente para el suministro de genes que contiene bondades similares a aquellas mencionadas para la ECT: bajo costo, seguridad y fácil implementación. Se han realizado exitosos experimentos *in vivo* en tejidos como piel [22, 23], músculo [24, 25], hígado [26], pulmón [27, 28], riñón [29], ojos [30, 31], cerebro [32] y tumores [33, 34]. Además, existe un experimento en humanos que ha dejado resultados alentadores [35]. El protocolo consiste generalmente en la combinación de pulsos cortos de alta intensidad (que permiten la electroporación de la membrana celular) junto con pulsos largos de baja intensidad (que favorecen y aceleran el proceso de transporte de la molécula de ADN hacia la membrana). Se ha sugerido que este mecanismo puede ser la forma más eficiente de administración terapéutica [36–38].

La GET se presenta además como una técnica que puede ser utilizada para una variada gama de aplicaciones incluyendo también la modulación de respuestas inmunes hacia patógenos y el tratamiento contra enfermedades infecciosas [39].

1.2.3. Electroporación Irreversible (IRE)

Otro tratamiento derivado del fenómeno de electroporación celular es la Electroporación Irreversible (IRE). Esta técnica utiliza pulsos de corta duración y alta intensidad (superior a GET y ECT) de manera de superar el umbral de electroporación reversible y crear un daño permanente en la célula, provocando su muerte. La terapia no necesita de drogas ni agentes terapéuticos complementarios y se presenta como una técnica de ablación sin aumento considerable de la temperatura (a diferencia de la radiofrecuencia o criocirugía) lo cual conlleva considerables ventajas, entre ellas, una significativa preservación del tejido sano circundante. Un procedimiento típico de IRE para un tumor sólido de aproximadamente 3 cm^3 consiste en 90 pulsos de $100\text{ }\mu\text{s}$ con un campo eléctrico de entre 1500 y 3000 V/cm y una frecuencia de 0.3 Hz. Por esta razón, una sesión de ablación tiene una duración menor a un minuto, lo que significa tiempos reducidos de anestesia, menor dolor post-tratamiento y bajo costo económico. Un resumen de características, ventajas y desventajas de la técnica puede encontrarse en Lee *et. al* [40].

Desde su aparición en 2005 [41], se han realizado varios estudios pre-clínicos con tumores en hígado [42, 43], cerebro [44] y mama [45], entre otros. A modo de ejemplo, en [43] se experimentó con 10 ratas con tumores hepáticos inoculados y se obtuvo una regresión total en el 90 % de los casos. También se pueden encontrar reportes de los primeros ensayos clínicos en humanos en [15, 46, 47].

1.2.4. Tratamiento Electroquímico de Tumores

El EChT es una terapia en la cual el tejido tumoral es necrosado mediante el pasaje de corriente eléctrica continua de baja intensidad a través de dos o más electrodos insertados localmente. Este tratamiento se distingue de los mencionados anteriormente fundamentalmente en dos aspectos:

- No hay pulsos eléctricos sino que la fuente de corriente es continua. Se aplican dosis de carga (10C-50C) a intensidad fija (1-200mA) y baja tensión (60V-80V). Esto provoca

que las células tumorales no se electroporen y por lo tanto el mecanismo terapéutico se explica por otras causas.

- El tratamiento produce deshidratación y acidificación anódica e hidratación y basificación catódica. Se postula que los perfiles de pH extremos en los alrededores de los electrodos son los principales responsables de la necrosis tumoral y que además pueden brindar una medida confiable de la cantidad de tejido necrosado [48–52].

El EChT se presenta entonces como una terapia mínimamente invasiva, segura, eficaz, económica y sin efectos secundarios de consideración. Puede ser utilizada junto con quimio o radioterapia o bien previo a una intervención quirúrgica para reducir el tamaño del tumor. Otra ventaja significativa es que no se produce resistencia ante aplicaciones reiteradas del tratamiento, como sí puede ocurrir con las drogas quimioterápicas [49].

En los últimos años, la terapia ha sido objeto de activa investigación en países como China [53–56], Alemania [57, 58], Gran Bretaña [59–61], EEUU [62], Corea [63], Brasil [64] y Cuba [50, 65–67]. En particular, China es el país que más casos clínicos ha efectuado (alrededor de 15 mil) obteniendo una tasa de respuesta positiva al tratamiento del 78 % [68–70].

1.3. Motivación

El rol del pH en ECT fue abordado en [71] por Turjanski *et. al.* Este trabajo introduce un nuevo modelo *in silico*, basado en los desarrollados previamente para el EChT [72–76], que resulta de la unión de dos submodelos: uno que representa el caso en el que el pulso eléctrico es aplicado y otro que representa el caso contrario. Este modelo fue contrastado con experimentos *in vitro* obteniéndose una buena correlación para los perfiles de pH. Sin embargo, existen una serie de factores no modelados que pueden acelerar o limitar el avance de estos frentes, como ser: *i*) las diferentes conductividades específicas de cada tejido; *ii*) el aumento de la conductividad del tejido producto de la permeabilización de la membrana plasmática luego de la electroporación; *iii*) los efectos reguladores de pH (sistemas buffer) presentes en los diferentes compartimentos intracelular y extracelular. Es necesario entonces tomar en consideración estos factores para así poder predecir con mayor exactitud cuál va a ser el daño en el tejido a causa del pH extremo ante la aplicación de **Pulsos de Campo Eléctrico** (PEF), ya sea en el marco de la ECT, la GET o la IRE.

Teniendo en cuenta la correlación entre los datos aportados por la simulación numérica y los experimentos *in vitro* se decidió ampliar este modelo inicial agregándole los elementos mencionados y analizar los efectos que éstos tienen en el tratamiento.

1.4. Metodología

Para abordar el problema presentado, se adoptará un enfoque interdisciplinario combinando dos tipos de modelos: *in silico* e *in vivo*.

El modelo *in silico* consta del modelo matemático-computacional. Dicho modelo se basa en un sistema determinístico de ecuaciones diferenciales de reacción-transporte que describe las leyes de conservación físico-químicas y cuya resolución se obtiene computacionalmente a través de métodos numéricos.

El modelo *in vivo* consiste, básicamente, en aplicarle el tratamiento a un ratón. Generalmente, se le inocular un tumor de manera subcutánea, aunque dependiendo de los

objetivos ésto podría no ser necesario. Los modelos murinos han sido en extremo valiosos en el estudio del cáncer en seres humanos. Una de las principales razones es que el ratón y los humanos comparten genes y vías de señalización (tumores en ratones y seres humanos mutan generalmente en la misma clase de genes, lo cual es un índice de similitud de los mecanismos que rigen el crecimiento del tumor). De hecho, la literatura muestra que los ratones son potencialmente útiles en el establecimiento de mejores modelos preclínicos [77].

Ambos modelos nos permiten analizar el problema desde facetas complementarias. En el modelado *in silico* podemos observar la evolución del sistema con absoluta granularidad y manipularla con relativa sencillez, pero siempre a instancias de que los fenómenos sean cotejados con modelos físicos más cercanos al problema real. A su vez, con el modelo *in vivo* podemos corroborar y validar el modelo matemático-computacional. Sin embargo, no siempre será posible una medición exacta ni aproximada de todos los fenómenos que puedan ser de interés dentro del modelo físico presentado. De esta manera, una “vuelta” a los resultados del modelo *in silico* nos puede brindar una posible explicación de los procesos subyacentes.

1.5. Plan

En el capítulo 2 se propone una extensión al modelo de Turjanski *et. al* [71] en el que se incluye la posibilidad de introducir distintos tipos de tejido. En el capítulo 3, se propone otra extensión al modelo de Turjanski *et. al* en el que se introducen nuevas especies iónicas denominadas *buffer*. En ambos capítulos, se verifican los resultados con experimentos *in vivo*.

2. MODELADO DE ELECTROTERAPIA GÉNICA EN MÚLTIPLES TEJIDOS

En el presente capítulo, se abordará el modelado matemático-computacional de un conjunto de terapias que utilizan Pulsos de Campo Eléctrico (PEF) con el objetivo de permeabilizar la membrana celular y así permitir la entrada de agentes terapéuticos a la célula. Finalmente, se contrastará dicho modelo con experimentos *in vivo* en el marco de la Electroterapia Génica (GET).

2.1. Introducción

Al someter un tejido a una diferencia de potencial eléctrico, circula corriente y se producen reacciones electroquímicas en la zona cercana a los electrodos. En dichas reacciones, hay sustancias que son consumidas y otras nuevas que son producidas. El tejido se puede considerar como un medio heterogéneo que contiene una fase celular discontinua y una fase extracelular continua, llamada líquido intersticial o extracelular¹. El hecho de que la corriente sea transportada principalmente por el líquido intersticial se puede confirmar dados los efectos electroósmóticos² observados durante el tratamiento. [48,79] Las reacciones químicas mencionadas desencadenan, por medio de la producción de nuevas especies, una acidificación en la zona del ánodo y una alcalinización o basificación en la zona del cátodo. Estos valores extremos de pH resultan tóxicos para el tejido y determinan la necrosis celular, haciendo interesante estudiar su aplicación en tratamientos antitumorales.

Este fenómeno fue modelado matemáticamente en varios trabajos sucesivos por el grupo de Nilsson *et. al* en el marco del Tratamiento Electroquímico de Tumores (EChT) [72–75]. Turjanski *et. al* ampliaron y validaron el modelo, mostrando una buena correlación entre la simulación numérica y experimentos *in vitro* e *in vivo* [76]. En un trabajo posterior, Turjanski *et. al* desarrollaron un modelo para PEF utilizando los parámetros clásicos de un tratamiento de ECT [71]. De esta manera, en dicho trabajo se analiza este tratamiento desde un enfoque novedoso al modelar las interacciones físico-químicas que ocurren en la matriz intersticial. Como resultado de este análisis, se ha mostrado que la acidificación anódica en la terapia ECT resulta todavía mayor que en la terapia EChT y por ende la necrosis del tejido a tratar es mayor, situación no buscada ni deseada para la ECT. Se sugiere también que el mismo fenómeno podría estar ocurriendo en la GET, produciendo de esta manera daños a los agentes terapéuticos (plásmidos) [80,81]. Para contrarrestar estos efectos no deseados se propone, tanto como sea posible, minimizar la tensión y la cantidad de pulsos y aumentar la duración de cada uno de ellos.

A nivel celular, la aplicación de un campo eléctrico induce a una acumulación de cargas de signo contrario a los dos lados de la membrana plasmática [82,83]. Esto produce una diferencia de potencial denominada Potencial Transmembrana (TMP, en inglés). Todos los experimentos han mostrado que cuando este potencial supera un valor (llamado umbral de electroporación) y se lo mantiene por alrededor de 30 a 40 μs se comienzan a observar cambios estructurales en la membrana que permiten el traspaso de molécu-

¹ Líquido contenido en el intersticio o espacio entre las células.

² La electroósmosis es el fenómeno por medio del cual se produce el movimiento, inducido por un campo eléctrico, de un líquido polar a través de una membrana o de una estructura porosa [78].

las antes impermeables hacia el interior de la célula [36]. La descripción completa de esos cambios estructurales es todavía materia de investigación. La teoría más aceptada (*electroporación celular* [84–86]) formula la aparición de nanoporos hidrofílicos en la membrana, aunque, hasta el momento, éstos nunca hayan sido observados en ningún experimento. Otras teorías alternativas que no incluyen la formación de poros pueden encontrarse en Teissie *et. al* [87]. En nuestro trabajo de tesis, los términos electroporación y electropermeabilización se usarán indistintamente refiriéndose al fenómeno y no a la teoría que intenta describirlo.

La electropermeabilización de la célula depende de varios factores, entre ellos: parámetros dependientes de sí mismos y del tejido (conductividad específica de cada tejido, tamaño, forma y distribución espacial de las células) [88–90], parámetros del pulso (duración, amplitud y cantidad) [91] y, principalmente, de la intensidad del campo eléctrico. Además, parece haber una correlación entre la conductividad medida post-tratamiento y el nivel de electropermeabilización del tejido (en términos de reversibilidad) [92]

El modelo presentado por Turjanski *et al.* [71] describe el transporte iónico a través del líquido intersticial de un único tejido, típicamente la piel. La conductividad propia de cada tejido afecta a la velocidad en el que los iones difunden. Por este motivo, el modelo encuentra dificultades cuando tiene que contrastar sus resultados con algún experimento *in vivo* en el cual participen dos o más tipos de tejido con diferentes conductividades (por ejemplo, piel y músculo). Así, las predicciones de densidad de corriente circulada y el avance de los frentes de pH sólo coinciden parcialmente y no resultan muy aceptables.

En este capítulo, se presentará entonces una extensión al modelo propuesto en Turjanski *et. al* [71] en donde se consideran distintos tipos de tejido y el efecto que éstos tienen sobre la evolución del pH. Para mayor claridad, se expondrá el modelo *in silico* de forma completa junto a su extensión.

2.2. Modelo *in silico*

A continuación describiremos las dos facetas del modelo *in silico*: el modelo matemático y el modelo computacional.

2.2.1. Modelo matemático

Como se mencionó en el Capítulo 1, las especies iónicas producidas por las reacciones electroquímicas en los electrodos son transportadas principalmente por el espacio intersticial. Por este motivo, E. Nilsson *et al* [72], en su primera aproximación, consideraron modelar el tejido como una solución de cloruro de sodio (*NaCl*) a concentración fisiológica en agua (pH = 7). Esta aproximación toma en consideración el hecho de que el *NaCl* es la sal de mayor concentración en el líquido extracelular, compuesto fundamentalmente por *H₂O*. De esta manera, el modelo analiza el transporte de cuatro especies iónicas: H^+ , OH^- , Cl^- y Na^+ .

Las principales reacciones químicas ocurren en la superficie de los electrodos y dependen fundamentalmente del material del cual estén compuestos. En este caso, se ha seleccionado el platino tanto para el modelado del ánodo como del cátodo, dado que este material no reacciona con la solución elegida. Con esta configuración consideraremos las siguientes reacciones en el ánodo:





y las siguientes reacciones en el cátodo:



Para el transporte de las especies, se van a tener en cuenta los movimientos generados a partir de la difusión (originados por los gradientes de concentración) y la migración (originados por los gradientes de potencial). La convección no será considerada ya que en un tejido existiría una microconvección muy reducida.

Debido a la complejidad del sistema, las siguientes simplificaciones adicionales a las previamente mencionadas, son tenidas en cuenta con motivo de facilitar su implementación [72]:

- La solución cercana al ánodo se encuentra saturada con respecto al oxígeno y al cloro, a una presión efectiva de 1 atm, en equilibrio con respecto a la superficie del electrodo de platino anódico.
- La cinética de los electrodos se basa en mecanismos de reacción propuestos en la literatura. Los parámetros cinéticos se obtienen a partir de mediciones experimentales allí presentadas.
- No se tienen en cuenta efectos osmóticos. El efecto electroosmótico es muy reducido en los Pulsos de Campo Eléctrico (PEF) ya que los pulsos son muy cortos en duración y la electroósmosis es muy significativa cuando los tiempos de campo eléctrico aplicados son muy prolongados.

El modelo se encuentra conformado por dos modos de comportamiento: a) Modo “*ON time*”, que representa el caso en que el pulso eléctrico está siendo aplicado; y b) Modo “*OFF time*”, el caso contrario (Figura 2.1).

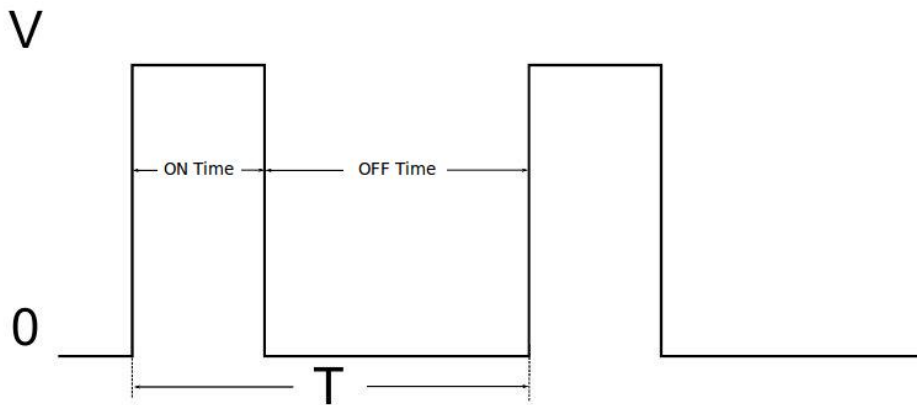


Fig. 2.1: Esquema de aplicación de pulsos. *ON time*: tiempo en el cual se aplica campo eléctrico, *OFF time*: tiempo sin aplicar campo eléctrico, T tiempo de duración de ambos submodelos, V: amplitud del pulso. Los tiempos de *ON time* y *OFF time* no se encuentran graficados a escala.

Modo “ON time”

Asumiendo que las ecuaciones de transporte en soluciones diluidas son aplicables, es posible superponer linealmente las contribuciones al flujo por difusión y migración. Por lo tanto, el flujo molar J_i de la especie iónica i puede ser expresado como [93–95]:

$$J_i = \underbrace{-D_i \nabla C_i}_{\text{flujo difusivo}} - \underbrace{\frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i \nabla \phi}_{\text{flujo migratorio}} \quad (2.4)$$

donde ϕ representa el potencial electrostático, C_i , D_i , z_i y u_i , la concentración, el coeficiente de difusión, la cantidad de cargas y la movilidad iónica de la especie i , respectivamente, siendo $i = H^+$, OH^- , Cl^- y Na^+ . z_i es la carga eléctrica, siendo positiva para cationes y negativa para aniones. El coeficiente de difusión D_i de cada especie va a depender del medio por el que transite. Esta extensión permitirá ajustar este valor en cada punto del espacio, conforme los distintos tipos de tejido que se quiera representar (piel, músculo, etc). De esta manera, la única característica distintiva que se toma en cuenta para cada tejido es su conductividad, cuyo valor se ve reflejado directamente en el valor D_i .

El balance de masa para cada una de las especies se encuentra dado por

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \underbrace{-\nabla \cdot \mathbf{J}_i}_{\text{flujo molar}} + \underbrace{R_i}_{\text{reacción}} \quad (2.5)$$

Desarrollando el operador de divergencia ∇ , esta ecuación puede reescribirse como

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 C_i + \frac{z_i}{|z_i|} u_i \nabla \cdot (C_i \nabla \phi) + R_i \quad (2.6)$$

El término *flujo molar* se corresponde con la cantidad neta de material transportado por los diferentes tipos de transporte, en tanto que el término *reacción* involucra las reacciones químicas homogéneas que ocurren en la solución, sin incluir a aquellas que ocurren en los electrodos. La única reacción homogénea a ser tomada en cuenta en este modelo es el equilibrio de disociación del agua, el cual se detalla a continuación:



En términos de R_i , esto se traduce en:

$$R_{H^+} = R_{OH^-} = k_{w,b} C_{H_2O} - k_{w,f} C_{H^+} C_{OH^-} \quad (2.8)$$

$$R_{Cl^-} = R_{Na^+} = 0 \quad (2.9)$$

donde $k_{w,b}$ y $k_{w,f}$ representan las constantes de velocidad de la reacción del agua (ecuación 2.7) en dirección hacia atrás (*backward*) y hacia adelante (*forward*), respectivamente. Esta ecuación es utilizada para obtener las concentraciones de las especies H^+ , OH^- y Cl^- .

La movilidad iónica y el coeficiente de difusión se encuentran relacionados a través de la ecuación Nernst-Einstein:

$$D_i = \frac{RT}{|z_i|F} u_i$$

donde T es la temperatura absoluta, R la constante universal de los gases y F la constante de Faraday.

La concentración de la especie Na^+ es obtenida a partir de la hipótesis de electroneutralidad:

$$\sum_{i=1}^4 z_i C_i = 0 \quad (2.10)$$

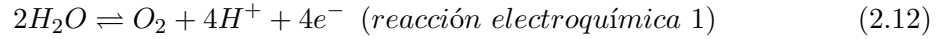
Finalmente, considerando que $I = F \sum_{i=1}^4 z_i J_i$, donde I es la densidad de corriente, la ecuación para la conservación de la carga eléctrica $\nabla \cdot I = 0$ puede ser reescrita como:

$$\left(\sum_{i=1}^4 z_i D_i \nabla^2 C_i \right) + \nabla \cdot \left(\sum_{i=1}^4 |z_i| u_i C_i \nabla \phi \right) = 0 \quad (2.11)$$

Esta última ecuación es la utilizada para obtener el campo eléctrico.

Condiciones de borde

Sean las siguientes reacciones que tienen lugar en el ánodo:



Para las especies H^+ y Cl^- , que participan en las reacciones que ocurren en el ánodo, se asume que la transferencia de carga y el transporte de masa en la superficie del electrodo ocurren a la misma velocidad. En cambio, para las restantes especies (OH^- y Na^+), el transporte de masa es igual a cero.

Así, para $i=H^+$, Cl^- y $j=1,2$:

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j}{n_j F} \quad (2.14)$$

y para $i=OH^-$, Na^+ :

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.15)$$

donde \mathbf{n} es el vector normal unitario saliente, n_j es la cantidad de electrones transferidos en la reacción electroquímica j y $\nu_{i,j}$ es el coeficiente estequiométrico de la especie i en la reacción j . I_j representa la densidad de corriente parcial contribuida por la reacción electroquímica j .

La densidad de corriente parcial I_1 correspondiente a la *reacción electroquímica 1* (evolución del oxígeno), se encuentra dada por:

$$I_1 = I_1^{eq} \left\{ \exp \left[-\frac{F(\phi + E_1^{eq})}{2RT} \right] - \left(\frac{P_{O_2}}{P_{O_2}^{eq}} \right)^{\frac{1}{4}} \left(\frac{C_{H^+}}{C_{H^+}^0} \right) \exp \left[\frac{F(\phi + E_1^{eq})}{2RT} \right] \right\} \quad (2.16)$$

y la densidad de corriente parcial I_2 correspondiente a la *reacción electroquímica 2* (evolución del cloro), está dada por:

$$I_2 = I_2^{eq} \left\{ \left(\frac{C_{Cl^-}}{C_{Cl^-}^0} \right) \exp \left[-\frac{F(\phi + E_2^{eq})}{2RT} \right] - \left(\frac{P_{Cl_2}}{P_{Cl_2}^{eq}} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[\frac{F(\phi + E_2^{eq})}{2RT} \right] \right\} \quad (2.17)$$

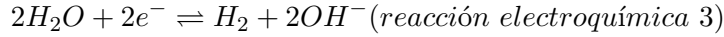
I_j^{eq} representa el intercambio de densidad de corriente en la reacción electroquímica j en el equilibrio. E_j^{eq} es la diferencia de potencial entre las fases líquida y sólida en condiciones de equilibrio y relativa al potencial estándar del electrodo en la reacción j . P_i^{eq} y C_i^0 representan la presión parcial y la concentración inicial de la especie i , respectivamente. Se asume que $\frac{P_i}{P_i^{eq}}$ es igual a 1 para todas las especies i .

La densidad de corriente total en el ánodo, I , es la suma de las densidades de corriente parciales correspondientes a ambas reacciones electroquímicas:

$$I = I_1 + I_2 \quad (2.18)$$

Las ecuaciones 2.10, 2.14, 2.15 y 2.18 son utilizadas para calcular las concentraciones de las cuatro especies (H^+ , OH^- , Na^+ y Cl^-), el campo eléctrico y el potencial en el ánodo.

En el borde correspondiente al cátodo se asume la siguiente reacción:



Al igual que en las condiciones de borde del ánodo, el transporte de masa de la especie i a través de la superficie del cátodo se asume, o bien inexistente, o bien igual a la carga transferida. Así, para $i = OH^-$ y $j = 3$:

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j}{n_j F} \quad (2.19)$$

y para $i = H^+$, Cl^- , Na^+ :

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.20)$$

Dado que la única reacción existente, en el caso del cátodo, es la evolución del hidrógeno, entonces se asume que la densidad de corriente parcial $I_3 = I$.

Las ecuaciones 2.10, 2.19 y 2.20 son utilizadas para obtener las concentraciones de las cuatro especies y el campo eléctrico en el cátodo.

$$\frac{1}{F}(I \cdot \mathbf{n}) + \sum_i |z_i| u_i C_i (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.21)$$

Modo "OFF time"

Durante el período *OFF time* el pulso eléctrico es suprimido. En este caso, es posible tomar las ecuaciones diferenciales del período *ON time*, pero eliminando los términos asociados a la aplicación del campo eléctrico. De esta manera, para el transporte iónico, se

resuelven solamente las ecuaciones de difusión-reacción, y el campo eléctrico se considera nulo. El flujo molar queda representado de la siguiente manera:

$$J_i = -D_i \nabla C_i \quad (2.22)$$

Con respecto a las condiciones de borde, el transporte de masa de la especie i a través de ambas superficies de los electrodos se asume inexistente. Por lo tanto, para $i = \text{H}^+$, OH^- , Cl^- y Na^+ :

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.23)$$

El campo eléctrico sobre los electrodos se considera nulo.

Condiciones iniciales

En las condiciones iniciales, $t = 0$, se asume que ninguna especie presenta gradientes de concentración. Los valores iniciales de concentración de las sales fueron establecidos en 0.16 mol/dm^3 , valores cercanos a la concentración existente en el plasma y fluidos intersticiales [96]. El pH inicial fue establecido en 7 (neutral). El potencial eléctrico en la superficie del ánodo, ϕ_a^0 , fue obtenido a partir de la ecuación 2.18. El campo eléctrico en el dominio y los electrodos ha sido obtenido resolviendo la ecuación derivada de reemplazar el flujo migratorio en $I = F \sum_{i=1}^4 z_i J_i$, dada la ausencia de gradientes de concentración.

2.2.2. Modelo Computacional

Debido a la naturaleza del problema representado por las ecuaciones previamente descritas, su resolución excluye una solución **exacta**, dejando solamente la alternativa de encontrar una solución numérica.

La implementación computacional resuelve el sistema de ecuaciones del modelo matemático para cada paso del tiempo, en un dominio fijo, en una malla uniforme y unidimensional, utilizando diferencias finitas y un método iterativo con parámetro de ponderación temporal igual a 1. La recta unidimensional considerada es la que une ambos electrodos.

En lo que sigue, i hará referencia al i -ésimo nodo de la malla y h será la distancia entre cada uno de ellos.

Discretización de la ecuación de transporte

Para la aproximación de las derivadas de primer orden, se aplica el siguiente esquema de discretización:

$$\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_i \approx \frac{C_i - C_{i-1}}{h} \quad (2.24)$$

En el caso de la aproximación de las derivadas de segundo orden, se discretizó de la siguiente manera:

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_i \approx \frac{\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i+\frac{1}{2}} - \left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i-\frac{1}{2}}}{h} \approx \frac{\frac{C_{i+1} - C_i}{h} - \frac{C_i - C_{i-1}}{h}}{h} = \frac{C_{i+1} - 2C_i + C_{i-1}}{h^2} \quad (2.25)$$

El operador diferencial temporal de la ecuación 2.5 es discretizado utilizando un esquema de Euler:

$$\left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_i \approx \frac{C_i^{m+1} - C_i^m}{\Delta t}$$

donde n es el nivel temporal y Δt es el incremento del tiempo. Dependiendo del operador espacial, si se evalúa en n , $n + \frac{1}{2}$ o en $n + 1$, se define si el esquema es explícito, Crank-Nicolson o fuertemente implícito, respectivamente. Los dos últimos esquemas dan lugar a la resolución de un sistema algebraico.

En este caso, se utilizó un esquema fuertemente implícito. En consecuencia, para poder obtener el valor de C_i^{m+1} es necesario resolver un sistema algebraico. Para ello se utiliza un método iterativo, es decir, que para obtener la solución en el paso temporal $n + 1$ a partir de la solución en el paso temporal n , se deben realizar varias iteraciones internas.

La aproximación de la ecuación 2.5 por un método de diferencias finitas implícito resulta en un sistema algebraico que se resuelve con el método iterativo de Gauss-Seidel. En dicho método la solución se indica por $C_i^{n+1,m+1}$ donde $n + 1$ y $m + 1$ son los índices temporal y de iteración interna, respectivamente. A los efectos de simplificar la escritura en lo que sigue, donde corresponde $C_i^{n+1,m+1}$, se escribe directamente C_i^{m+1} , obviando el súper índice temporal $n + 1$. La ecuación queda:

$$\frac{C_i^{m+1} - C_i^m}{\Delta t} = D \left(\frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) + \frac{z}{|z|} u \frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^m}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h} + R_i^{m+1} \quad (2.26)$$

donde, para el caso de H^+ y OH^-

$$R_i^{m+1} = k_{w,b} C_{H_2O,i}^{m+1} - k_{w,f} C_{H^+,i}^{m+1} C_{OH^-,i}^m$$

y para el caso de Cl^- y Na^+

$$R_i^{m+1} = 0$$

Discretización de la ecuación de campo eléctrico

De manera similar a los pasos realizados para la ecuación anterior, se obtiene la expresión utilizada para obtener ϕ^{m+1} de la ecuación 2.11, para luego ser utilizado con el método de Gauss-Seidel:

$$\sum_{especies} zD \left(\frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) + \sum_{especies} |z|u \left(\frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h} \right) = 0 \quad (2.27)$$

Discretización de las ecuaciones en los bordes del dominio

Asumiendo que el ánodo se encuentra del lado izquierdo de la malla, y el cátodo en el extremo opuesto, la discretización de las ecuaciones de borde finalmente quedan determinadas por:

$$-D\left(\frac{C_{anodo+1} - C_{anodo}}{h}\right) - \frac{z}{|z|} u C_{anodo} \frac{\partial \phi_{anodo}}{\partial x} = k \quad (2.28)$$

$$-D\left(\frac{C_{catodo} - C_{catodo-1}}{h}\right) - \frac{z}{|z|} u C_{catodo} \frac{\partial \phi_{catodo}}{\partial x} = k \quad (2.29)$$

donde $k = 0$ para las especies sin transferencia de masa o $k = I_j$, donde I_j es la densidad de corriente parcial contribuida por la reacción electroquímica j . Las incógnitas del sistema son C_{anodo} y $\frac{\partial \phi_{anodo}}{\partial x}$ para el ánodo y C_{catodo} y $\frac{\partial \phi_{catodo}}{\partial x}$ para el cátodo.

En ambos casos, los sistemas no lineales que modelan las condiciones de borde (ecuaciones ánodo: 2.10, 2.14, 2.15 y 2.18; ecuaciones cátodo: 2.10, 2.19 y 2.20) son aproximados por el método de Newton, utilizando las rutinas *Multidimensional Root-Finding Routines* de la biblioteca *GNU Scientific Library* (GSL).

Criterios de convergencia

Al utilizar, en la solución numérica, un método de diferencias finitas fuertemente implícito, es necesario realizar iteraciones internas entre dos pasos de tiempo consecutivos. Así, para cada paso interno de iteración m se chequea la siguiente condición de convergencia:

$$res_{int} = \max_i \left| u_i^{t,m} - u_i^{t,m-1} \right| < 5 \cdot 10^{-8} \quad \text{donde } u = H^+, OH^-, Cl^-, Na^+$$

$$res_{int} = \max_i \left| u_i^{t,m} - u_i^{t,m-1} \right| < 1 \cdot 10^{-3} \quad \text{donde } u = \nabla \phi$$

donde i corresponde al iésimo nodo de la malla.

Cumplida esta condición, se avanza al siguiente paso de tiempo.

Corrida y Parámetros

El modelo computacional fue escrito en C++ y el mismo se adjunta en el siguiente trabajo. Las ejecuciones se realizaron en un equipo con un procesador Interl(R) Core(TM) i7, bajo el sistema operativo Linux Ubuntu.

Todas las ejecuciones contaron con una malla de 1000 nodos equiespaciados. En los casos en los que se modelaron 2 tejidos (piel y músculo), se tomó un espesor de la piel de 0.3 mm. Además, se consideraron dos Δt diferentes: uno más lento ($1 \cdot 10^{-12}$ s) en los aumentos y descensos bruscos de voltaje y uno más rápido en los momentos donde el voltaje se mantiene estable ($1 \cdot 10^{-5}$ s). De esta manera, se logró una implementación robusta desde el punto de vista numérico. La temperatura fue establecida en 37 °C en función de los experimentos *in vivo* a realizarse.

Como se dijo anteriormente, los valores de los coeficientes de difusión de cada especie no permanecen inalterados durante el tratamiento, sino que aumentan una vez que la membrana del tejido se ha permeabilizado. La función que describe esta variación no ha sido modelada en este trabajo, por lo que los coeficientes de difusión debieron ser ajustados en función del voltaje aplicado en cada corrida, con el objetivo de que en la simulación se obtenga un valor similar a la corriente medida *in vivo*. Para ello, se desarrolló un *script* que automatizara esta búsqueda en función de una densidad de corriente objetivo. Todos

los coeficientes de difusión fueron variados en la misma escala, manteniendo así la relación entre ellos. El pseudo-código del *script*, junto con un instructivo de su ejecución, se adjunta en el Apéndice A.

Los valores de base de los coeficientes de difusión junto con otros parámetros utilizados para las corridas se encuentran detallados en la tabla 2.1.

Parámetro	Valor	Ref.	Parámetro	Valor	Ref
$C_{H^+}^0$	$1 \cdot 10^{-7}$ M		$C_{OH^-}^0$	$1 \cdot 10^{-7}$ M	
$C_{Na^+}^0$	0.16 M	[96]	$C_{Cl^-}^0$	0.16 M	[96]
$C_{H_2O}^0$	55.5 M		T	37 °C	
D_{H^+}	$12,5 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]	D_{OH^-}	$7,05 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]
D_{Na^+}	$1,78 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]	D_{Cl^-}	$2,72 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]
I_1^{eq}	$1 \cdot 10^{-10}$ A/ cm^2	[97]	I_2^{eq}	$1 \cdot 10^{-3}$ A/ cm^2	[98]
E_1^{eq}	1.23 V	[93]	E_2^{eq}	1.36 V	[93]
$k_{w,f}$	$1,5 \cdot 10^{11}$ 1/M.s	[99]	$k_{w,b}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$ 1/s	[99]

Tab. 2.1: Parámetros utilizados por el modelo *in silico*.

2.3. Modelo *in vivo*

Con el objetivo de poder contrastar el modelo matemático-computacional, se realizaron dos tipos de experimentos sobre ratones: uno **sobre el TAM y otro sobre el DSC**. El objetivo consistió en poder analizar la relación entre las áreas de daño del tejido y la acidificación y alcalinización producida alrededor de los electrodos.

En ambos experimentos, los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas, estándares y ética actuales del National Institutes of Health de EEUU (NIH). A continuación, una breve descripción de cada uno de ellos.

2.3.1. Pliegue Cutáneo Dorsal (DSC)

Con el objetivo de observar y cuantificar los frentes de pH y dada la imposibilidad de hacerlo en el TAM, se introdujo un modelo *in vivo* en el que un dispositivo llamado *ventana transparente de plástico* se implantó en el pliegue dorsal cutáneo de cada ratón (Figura 2.2) de manera tal que el perfil de pH pudiera ser visualizado por microscopía intravital³. De esta manera, se desarrolló una serie de experimentos en 10 ratones hembra BALB-c/J de 6 a 8 semanas de edad, con el siguiente protocolo GET: 10 pulsos de 100, 200 y 300 V/cm de 20 ms de duración a una frecuencia de 1 Hz. Los electrodos, de 0.9 mm de diámetro y una superficie total de aproximadamente 9 mm², fueron insertados en uno de los lados del pliegue, a 2 mm de distancia uno del otro. Los animales fueron tratados bajo anestesia general (*Ketamina/Xilacina*), usando *Flumixin meglumine* como analgésico y *Enrofloxacin* como antibiótico. Se usó un gel conductivo para asegurar un buen contacto eléctrico.

³ Técnica utilizada para observar sistemas biológicos *in vivo* con alta resolución.



Fig. 2.2: Dibujo de un ratón con el implante de una *ventana transparente* en el Pliegue Cutáneo Dorsal (DSC).

2.3.2. Músculo Tibial Anterior (TAM)

Se seleccionó un grupo de 10 ratones hembra BALB-c/J de 6 a 8 semanas de edad y se les inyectó en cada TAM $25 \mu\text{l}$ de una solución de ADN plásmido a 1 mg/ml en suero fisiológico (0.85 %). Minutos después, se les aplicó el mismo protocolo que en DSC: 10 pulsos eléctricos a intensidad fija (100, 125, 150, 175 y 200 V/cm) de 20 ms de duración cada uno a una frecuencia de 1 Hz. Los electrodos⁴ apretaron el TAM a 3 mm uno del otro, de manera que en la dirección que une el ánodo con el cátodo se pueden conceptualizar básicamente dos tejidos: piel (en los extremos, en contacto con los electrodos) y músculo (en el medio). Los pulsos fueron aplicados mediante un electroporador BTX ECM 830 Harvard Apparatus y la corriente eléctrica y el voltaje fueron medidos con un osciloscopio digital (InfiniiVision DSO-X 2012A-SGM, Agilent Technologies, USA). Más detalle se puede consultar en un experimento similar realizado por McMahon *et. al* [100].

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. DSC

La Figura 2.3(a) presenta una imagen por microscopía intravital del experimento en DSC, en donde se pueden observar los frentes de pH al finalizar la aplicación del protocolo GET mencionado a 200 V/cm . El frente ácido (electrodo izquierdo) se indica con color amarillento (marcado con Rojo Fenol), mientras que el frente básico (electrodo derecho) con color rosado (marcado con Fenolftaleína). Esta imagen deja evidencia clara de la presencia de frentes ácidos y básicos alrededor de los electrodos.

En la Figura 2.3(b) se puede ver un gráfico que muestra la Distancia Normalizada (ND) del avance de los frentes de pH ácido y básico para diferentes valores de campo eléctrico. Se consideró pH extremo a valores menores a 5.5 (ácido) o superiores a 8.5 (básico). La distancia (D) se normalizó mediante la función $f(D) = (D - D_0)/(D_T - D_0)$, donde D es la distancia cubierta por el frente (en la dirección de los electrodos), D_0 es la distancia inicial cubierta por el mismo frente y D_T es la distancia entre los electrodos. El avance considerado es la suma del avance del frente ácido (en el ánodo) y el avance del frente básico (en el cátodo). En el gráfico se puede observar que la velocidad de los frentes de pH crece junto al campo eléctrico aplicado, lo cual es esperable dado que el incremento en la corriente conlleva un aumento en la producción de protones (en el ánodo) y oxidrilos (en el cátodo) generando de esta manera un aumento en el transporte de masa.

La Figura 2.3(c) presenta un gráfico de la corriente (I) vs. el campo eléctrico (E) medidos durante el mismo experimento. Se puede observar una relación no lineal entre ambas variables. Se sugiere que esto podría deberse al aumento de la conductividad del

⁴ BTX, TweezertrodesTM

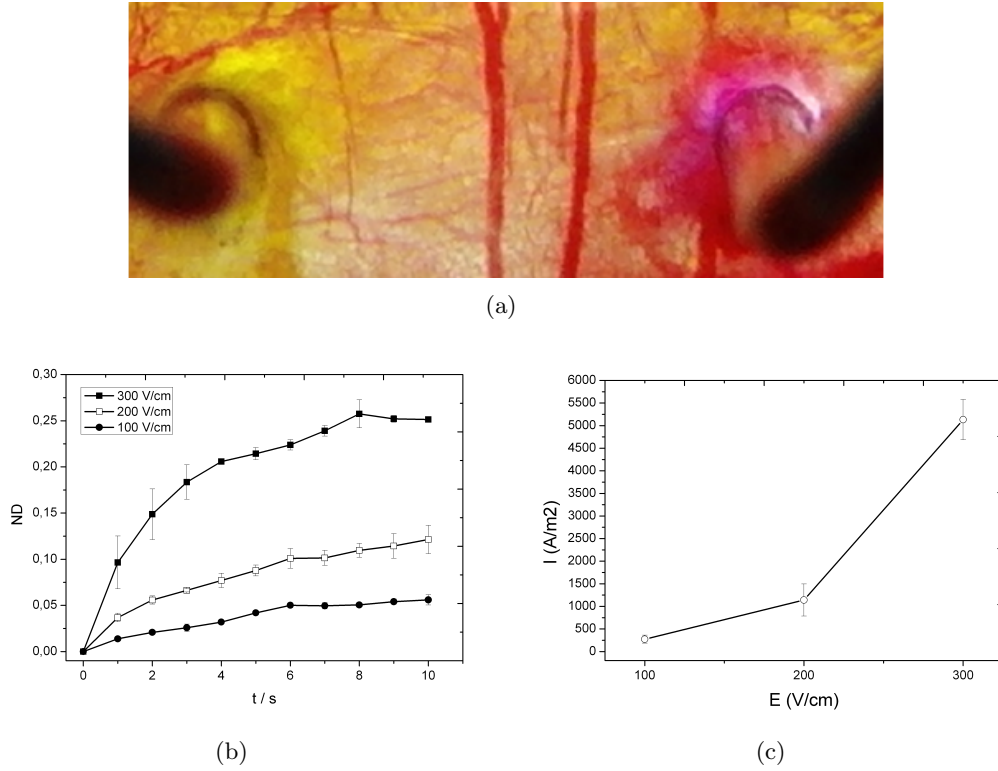


Fig. 2.3: Aplicación de un protocolo GET (a ratones BALB-c/J), 10 pulsos de 100, 200 y 300 V/cm, duración de 20 ms y una frecuencia de 1Hz. La distancia entre los electrodos es de 2 mm y la superficie del electrodo considerada es de 9 mm². a) Frentes anódicos y catódicos observados por microscopía intravital al finalizar el protocolo mencionado a 200 V/cm. El frente ácido (electrodo izquierdo) marcado con Rojo Fenol (área amarillenta) y frente básico (electrodo derecho) marcado con Fenolftaleína (área rosada). b) Frente de pH anódico-catódico (Distancia Normalizada (ND) vs. Tiempo), para diferentes campos eléctricos E. c) Densidad de corriente eléctrica (I) vs. Campo Eléctrico (E)

tejido producto del proceso de electroporación. [92]

Con el objetivo de comparar los experimentos presentados con el modelo *in silico* de la Sección 2.2 utilizando un sólo tipo de tejido (Modelo de Turjanski *et. al*), se llevaron a cabo tres ejecuciones del protocolo GET mencionado a 100, 200 y 300 V/cm. La Figura 2.4(a) muestra la predicción del avance de los frentes ácido y básico sumados en cada simulación. El coeficiente de difusión de cada especie se ajustó a efectos de hacer coincidir la densidad de corriente medida en los experimentos con la de las simulaciones. Se puede observar una evolución similar a la de la Figura 2.3(b), correspondiente al experimento *in vivo*, aunque la predicción del avance está sobreestimada con respecto a la real. Una posible causa es la ausencia de sistemas de buffer en el modelo, desestimando así una serie de reacciones químicas que neutralizan el pH. Esta gráfica nos permite observar con mayor nivel de detalle el aumento de la aceleración que se produce en los períodos de pulso conforme se aumenta el campo eléctrico. La Figura 2.4(b) muestra los mismos datos que 2.4(a) en una escala log-log en superposición con la recta $t^{1/2}$. De esta manera, se puede observar, y tal como ya se mostró en Turjanski *et. al* [71], que la evolución del pH escala en el tiempo como $t^{1/2}$, característico de un proceso controlado predominantemente por la difusión. Se

sugiere que este fenómeno puede deberse a que la duración del pulso es significativamente menor a la duración del período sin pulso (20 ms vs. 980 ms respectivamente).

2.4.2. TAM

En la Figura 2.5(a) se presentan mediciones *in vivo* del Área de Daño Normalizada (NDA) vs. el campo eléctrico (E). El área dañada A_D es normalizada mediante la función $f(A_D) = (A_D - A_0)/(A_T - A_0)$, donde A_0 es el área dañada inicial y A_T es el área total. Al igual que en DSC, el área de daño se incrementa junto al campo eléctrico aplicado. Dado el conocido efecto tóxico que tiene el pH extremo sobre las células [72], puede suponerse que al menos parte de ese aumento sea producto del incremento del pH mostrado en la figura 2.3(b).

En la Figura 2.5(b) se muestra la densidad de corriente (I) vs. el Campo Eléctrico (E). Nuevamente, la corriente tiene un comportamiento no lineal con respecto a E, presumiblemente, como ya se mencionó, debido al aumento de la conductividad del tejido producto del proceso de electroporación.

En la Figura 2.6 se presenta una comparación entre la predicción del avance de los frentes de pH (anódicos y catódicos) en una simulación del mismo protocolo GET (10 pulsos, 20 ms de duración, frecuencia de 1 Hz) a 200 V/cm con 1 y 2 tipos de tejido (sólo piel y piel-músculo, respectivamente). Los coeficientes de difusión se ajustaron de manera tal de hacer coincidir la corriente de cada simulación con la corriente medida en el experimento sobre el TAM. En el sector que representa al músculo, dichos coeficientes se incrementaron 3 veces con respecto a la zona que representa a la piel, de acuerdo a mediciones experimentales realizadas en Corovic *et. al* [101]. De esta manera, se puede observar que el modelo con 1 sólo tipo de tejido subestima el área de daño con respecto a los datos presentados en la Figura 2.5(a). Sin embargo, con la misma densidad de corriente, el modelo con 2 tejidos sobreestima el avance de los frentes y, por ende, el área de daño. La diferencia de comportamiento se debe justamente al agregado de un tejido de mayor conductividad (el músculo). Con respecto a la sobreestimación, como ya se mencionó anteriormente, puede deberse a que no se modeló la interacción con sistemas reguladores del pH (o sistemas buffer). La aceleración del avance de los frentes que se observa a partir del cuarto pulso (en el modelo con 2 tipos de tejido), ocurre al mismo tiempo que el frente ácido supera la superficie que representa el espesor de la piel, exactamente a los 0,3 mm (no se muestra en el gráfico).

La Figura 2.7(a) muestra la predicción de las concentraciones de las 4 especies consideradas (H^+ , OH^- , Cl^- y Na^+) inmediatamente después del último pulso en la simulación sobre piel y músculo presentada en la Figura 2.6. Los movimientos iónicos son consistentes con los obtenidos en Turjanski *et. al* [71] y en Nilsson *et. al* [72]. Los protones (H^+) son producidos en la reacción electroquímica 2.1 en el ánodo. Luego, fluyen hacia el cátodo por vías migratorias y difusivas. Los cloruros (Cl^-) son consumidos en la reacción electroquímica 2.2 en el ánodo y al mismo tiempo fluyen hacia allí atraídos por fuerzas eléctricas de signo contrario. Por este motivo, presentan un pico de concentración no muy lejos del ánodo. Los oxidrilos (OH^-) se producen en la reacción electroquímica 2.3 en el cátodo y fluyen por vías migratorias y difusivas hacia el ánodo. Por último, los sodios (Na^+) fluyen hacia el cátodo básicamente por el hecho de que debe mantenerse la condición de electroneutralidad.

Los perfiles de pH anódicos y catódicos se muestran en la Figura 2.7(b). Puede obser-

Tejidos Modelo	Piel / DSC (2mm)	Piel-Músculo / TAM (3mm)
In Vivo	$I \simeq 1000 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.24\text{mm}$	$I \simeq 1800 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.84\text{mm}$
In Silico	$I \simeq 1000 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.46\text{mm}$ $I \simeq 1800 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.68\text{mm}$	$I \simeq 1000 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.46\text{mm}$ $I \simeq 1800 \text{ A/m}^2 \rightarrow \text{Avance} = 0.93\text{mm}$

Tab. 2.2: Tabla comparativa entre los modelos con 1 (Turjanski *et. al*) y 2 tipos de tejidos, en función de los datos experimentales. Cada celda contiene la densidad de corriente que circuló y el avance de los frentes obtenido. Los datos marcados en azul corresponden a los presentados en la Figura 2.6.

Modelo Campo Eléctrico	Piel	Piel-Músculo
200 V/cm	15.4660 min	15.1005 min
225 V/cm	16.4533 min	16.3678 min
250 V/cm	15.4297 min	15.1508 min
275 V/cm	16.5923 min	16.5117 min
300 V/cm	15.2512 min	15.6017 min

Tab. 2.3: Tiempos de ejecución (en minutos) de los dos modelos *in silico* para distintos valores de Campo Eléctrico.

varse que el frente ácido se mueve a mayor velocidad que el frente básico, lo que resulta esperable dado que la magnitud de los valores de coeficientes de difusión y migración de los protones (H^+) es mayor que la de los oxidrilos (OH^-). Dadas las diferencias de resistencia entre los dos tejidos considerados (piel y músculo), se puede apreciar una marcada aceleración en el avance del pH extremo anódico, una vez que los iones superan el sector que representa a la piel (a los 0.3 mm, es decir, el espesor considerado de la piel).

En la Tabla 2.2 se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos por cada modelo (*in vivo* y *in silico*) con respecto a las dos distribuciones de tejido consideradas (Sólo piel / DSC y Piel-músculo / TAM). Podemos observar como el modelo *in silico* que distingue entre dos tipos de tejido obtiene resultados más aproximados a los de los experimentos realizados.

Por último, en la Tabla 2.3 se muestran los tiempos de ejecución de cada modelo *in silico* para algunos valores de Campo Eléctrico. Se puede observar que el agregado de un nuevo tejido al modelo base no ha tenido efectos sobre el tiempo de ejecución, al menos para los valores de Campo Eléctrico requeridos por la terapia modelada.

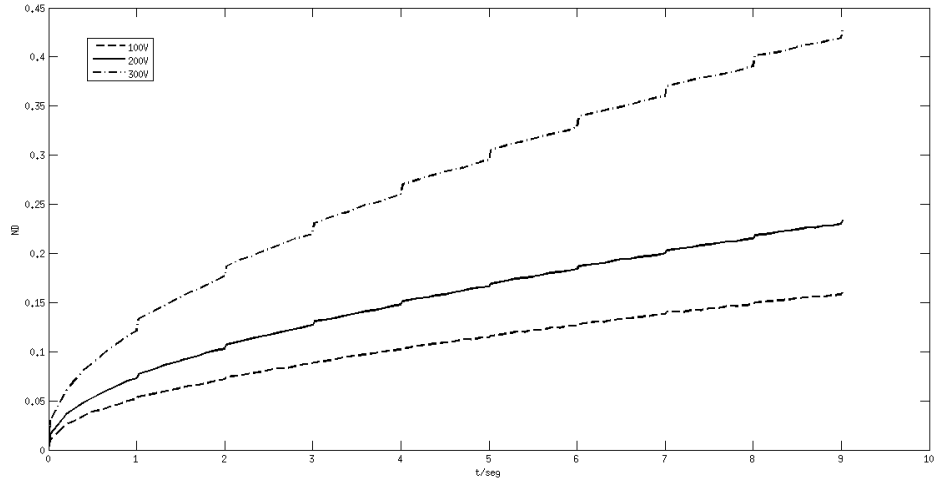
2.5. Conclusiones

En el presente capítulo, se analizó la evolución del pH en el tiempo y en el espacio, en un modelo pulsátil de campo eléctrico en el marco de la Electroterapia Génica (GET). Se realizaron experimentos *in vivo* con ratones y luego se contrastaron sus resultados con los obtenidos por el modelo *in silico*, en el cual se tuvieron en cuenta distintos tipos de tejido, tomando a la resistencia como su única característica distintiva. A partir de los experimentos realizados, se consideró sólo a los tejidos de piel y de músculo de manera homogénea, dejando de lado las diversas subcapas y divisiones existentes dentro de cada uno de ellos. Los valores iniciales de los coeficientes de difusión de cada especie fueron tomados de la literatura y, para cada experimento, se variaron dichos valores de manera de hacer coincidir los resultados de densidad de corriente obtenidos en la simulación con los medidos en los experimentos *in vivo*.

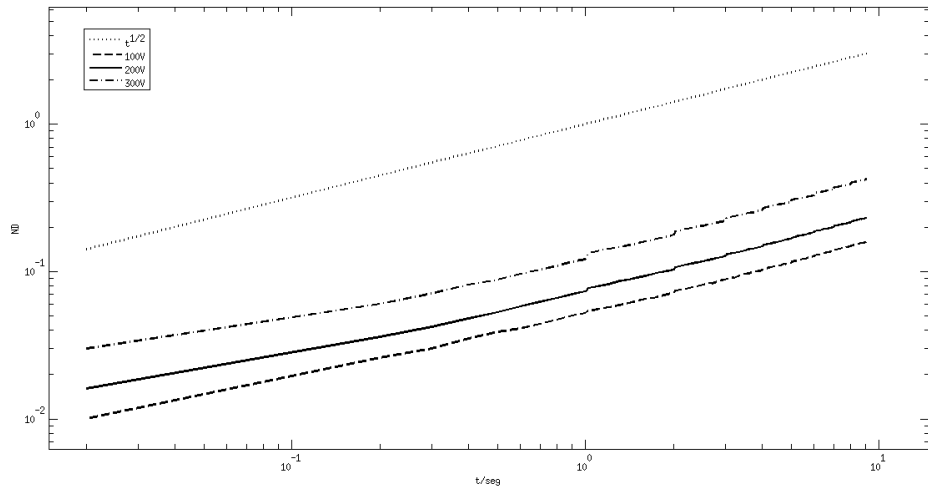
Podemos resumir las siguientes conclusiones a partir de los resultados descriptos:

- El modelo inicial tomado como base (Turjanski *et. al*) no se ajusta adecuadamente a las mediciones de un experimento *in vivo* como el presentado en la Sección 2.4.2 dado que subestima el área de daño. La nueva extensión obtiene una mejor aproximación al problema y a sus resultados, además de que permite eventualmente considerar una variedad mayor de tejidos o subdividir los mencionados de diversas maneras y así obtener un mayor nivel de detalle. El modelo sigue siendo robusto numéricamente y los tiempos de simulación no se han incrementado de manera significativa.
- Dada la buena concordancia cualitativa con respecto a los experimentos realizados, el modelo teórico presentado puede anticipar de manera aproximada la evolución de los frentes de pH ante la modificación de ciertos parámetros de la terapia, como ser el tiempo de duración y cantidad de pulsos, frecuencia, longitud del tejido, etc.
- La simulación puede resultar de gran utilidad a la hora de predecir otros datos que, por diversas razones, no pudieran ser medidos de manera experimental. En este caso particular, las concentraciones de Cl^- y Na^+ no fueron medidas *in vivo*, de modo que el modelo computacional nos ofrece allí una fuente de información adicional a los experimentos.

Se espera que el modelo presentado y los resultados de este capítulo contribuyan a un mejor entendimiento de los procesos bioelectroquímicos subyacentes que determinan el avance de los frentes de pH en las terapias antitumorales a base de Pulsos de Campo Eléctrico (PEF) (especialmente en la Electroterapia Génica (GET)) y producto de ello se puedan optimizar sus parámetros con el objetivo de minimizar los efectos adversos del pH.



(a)



(b)

Fig. 2.4: a) Predicción del avance de los perfiles de pH (ánodo + cátodo) en tres simulaciones distintas de un protocolo GET de 10 pulsos de 100, 200 y 300 V/cm y duración de 20ms a 1Hz de frecuencia, sobre un modelo que utiliza un sólo tipo de tejido (Modelo de Turjanski *et. al*). La distancia entre electrodos es de 2mm. b) Mismos frentes en una escala log-log superpuestos con la recta $t^{1/2}$.

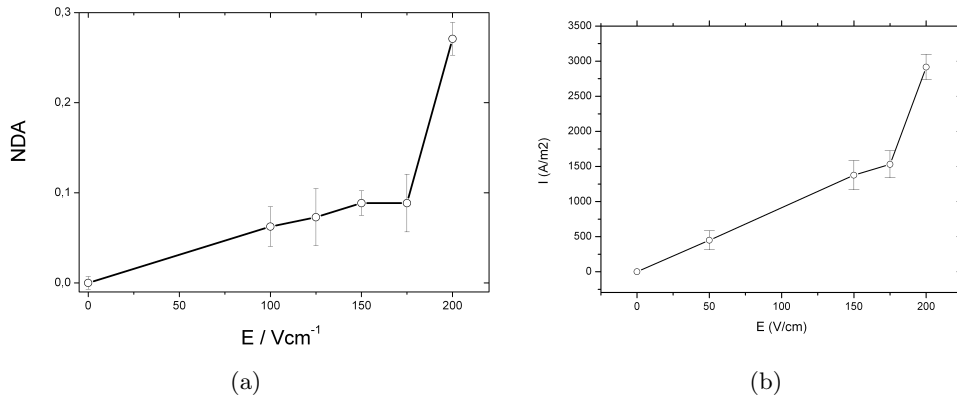


Fig. 2.5: Experimento sobre el **Músculo Tibial Anterior** (TAM), con un protocolo GET de 10 pulsos de 100, 125, 150, 175 y 200 V/cm y duración de 20ms a 1Hz de frecuencia. La distancia de los electrodos es de 3 mm y la superficie del electrodo considerada es de 13 mm² a) Densidad de corriente eléctrica (I) vs. Campo Eléctrico (E). b) Área de Daño Normalizada (NDA) vs. Campo Eléctrico (E)

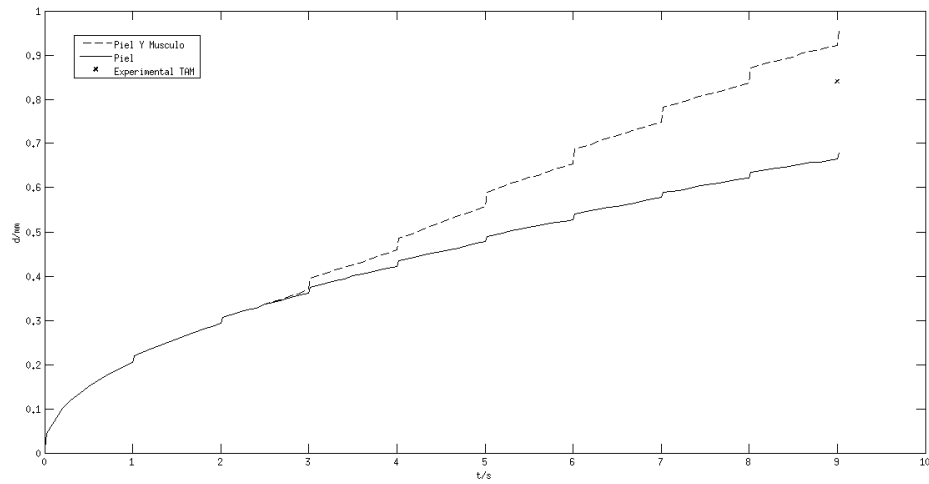
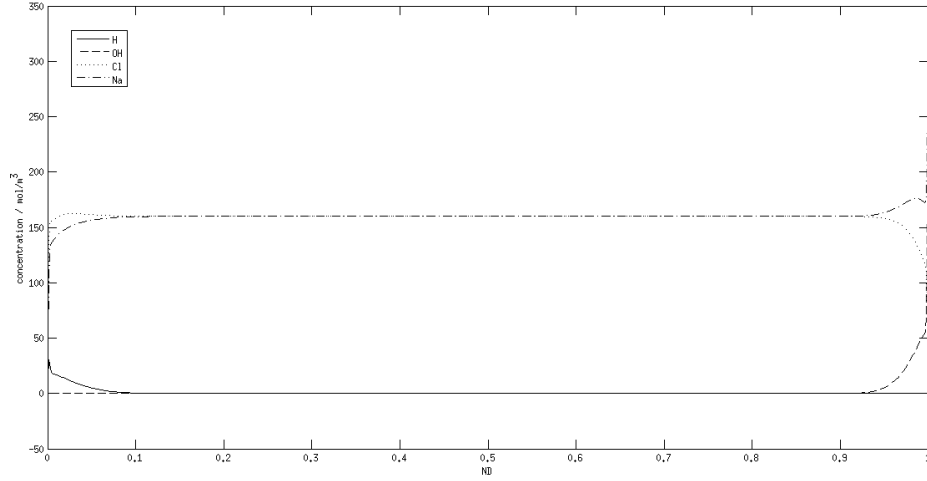
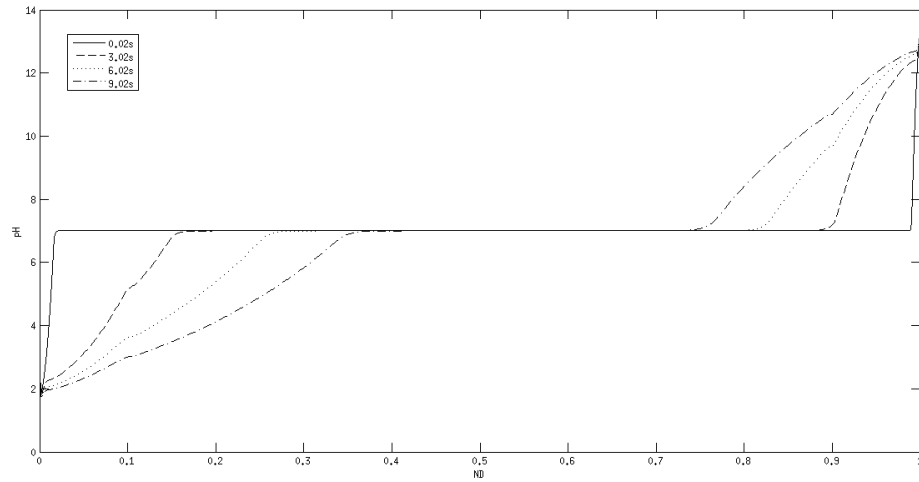


Fig. 2.6: Predicción del avance del frente de pH (anódico + catódico) para dos ejecuciones en 1 tejido (representando la piel) y 2 tejidos (representando piel y músculo), respectivamente. El protocolo simulado y la densidad de corriente corresponden a los datos del experimento sobre el TAM para 200 V/cm, mostrada en la Figura 2.5. La distancia de los electrodos es de 3mm y el espesor de la piel considerada (para el caso de Piel y Músculo) es de 0,3 mm. El Área de Daño Normalizada (NDA) de la Figura 2.5 **se muestra con un asterisco**.



(a)



(b)

Fig. 2.7: Simulación en base a un modelo con dos tipos de tejido (piel y músculo) de un protocolo GET de 10 pulsos de 200 V/cm y duración de 20ms a 1Hz de frecuencia. La distancia de los electrodos es de 3mm y el espesor de la piel considerado es 0,3mm. El ánodo se encuentra representado a la izquierda y el cátodo a la derecha. a) Predicción de las concentraciones de H^+ , OH^- , Cl^- y Na^+ en cada nodo de la malla, inmediatamente después del último pulso. (b) Perfiles de pH en cada nodo de la malla, inmediatamente después del primer (0,02 s), cuarto (3,02 s), séptimo (6,02 s) y décimo (9,02 s) pulso.

3. MODELO DE ELECTROTERAPIA GÉNICA CON SISTEMAS BUFFER

En el capítulo anterior se extendió un modelo matemático del comportamiento de un conjunto de especies iónicas en una solución de cloruro de sodio ante la aplicación de pulsos eléctricos. Esta extensión tomaba en cuenta el efecto que tenía la conductividad específica de cada tejido en el transporte de dichas especies iónicas. La simulación fue contrastada con experimentos *in vivo* mostrándose una buena correlación entre los perfiles de pH. Sin embargo, también se observó que el modelo teórico sobreestimaba tanto el frente ácido como el básico. Esto puede deberse fundamentalmente, como se dijo, a que no fueron considerados los sistemas amortiguadores (sistemas *buffer*) presentes en los compartimentos intra y extracelular. Estos sistemas son la primer línea de defensa frente a los cambios de pH de los líquidos corporales, entre los que se destacan: el sistema fosfato, el sistema de proteínas y el sistema bicarbonato, siendo este último quien predomina en el plasma sanguíneo y en el líquido intersticial [102].

En el marco del Tratamiento Electroquímico de Tumores (EChT), el grupo de Nilsson *et al.* extendió su modelo inicial de [72] (en donde el tejido era modelado como una solución de cloruro de sodio) para tener en cuenta la acción reguladora del buffer bicarbonato en el ánodo. En un trabajo subsiguiente [75], se desarrolló un modelo extendido para el cátodo en donde se agregó un buffer orgánico. Este modelo fue comparado con los dos anteriores y se obtuvieron correlaciones más ajustadas con respecto a resultados experimentales.

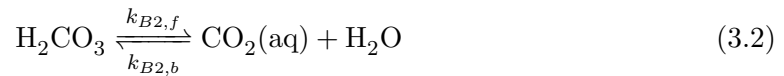
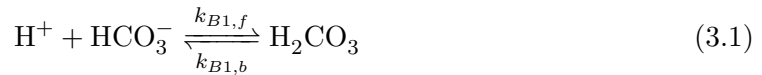
En la presente sección se presentará otra extensión al modelo propuesto en Turjanski *et al.* [71] agregando tres nuevas especies iónicas a la solución (bicarbonato HCO_3^- , carbonato CO_3^{2-} y dióxido de carbono CO_2), y se analizará su efecto sobre el perfil del pH.

3.1. Modelo *in silico*

El modelo matemático presentado en esta sección será similar al del capítulo anterior con el agregado de una serie de reacciones químicas producidas por las especies agregadas.

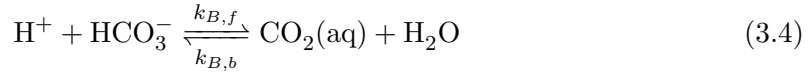
3.1.1. Modelo Matemático

El tejido es tratado como una solución de cloruro de sodio con un sistema *buffer* de bicarbonato. Este sistema caracteriza dos grupos de reacciones: aquellas que se encargan de neutralizar el pH ácido y las que hacen lo propio con el pH básico. El primer grupo se encuentra representado por las siguientes reacciones:



donde $k_{B1,f}$, $k_{B2,f}$, $k_{B3,f}$ y $k_{B1,b}$, $k_{B2,b}$, $k_{B3,b}$ representan las constantes de velocidad hacia adelante (*forward*) y hacia atrás (*backward*).

El sistema regulador de bicarbonato funciona de manera tal que cuando el tejido es sometido a una fuerte acidificación, el exceso de protones (H^+) reacciona con el bicarbonato (HCO_3^-), desplazando las reacciones 3.1, 3.2 y 3.3 hacia la derecha. Se ha reportado que el pH sanguíneo permanece estable durante experimentos de **Tratamiento Electroquímico de Tumores** (EChT) [72, 103, 104]. Esto indica que el aumento de CO_2 que ocurre durante breves períodos no resulta determinante para afectar a su concentración total en sangre. Este hecho permite despreciar la reacción 3.3. Además, el hecho de que las constantes $k_{B1,f}$ y $k_{B1,b}$ sean muy grandes ($k_{B1,f}$ del orden de $5 \cdot 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ y $k_{B1,b}$ del orden de $1 \cdot 10^7 s^{-1}$) motiva la asunción de que la reacción 3.1 está cerca del equilibrio. De esta manera, se puede reducir el esquema de reacciones presentado anteriormente a una sola reacción:



con la siguiente velocidad de reacción v_B :

$$v_B = k_{B,f} c_{H^+} c_{HCO_3^-} - k_{B,b} c_{CO_2(aq)} c_{H_2O}$$

donde

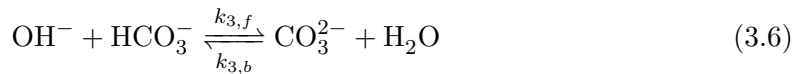
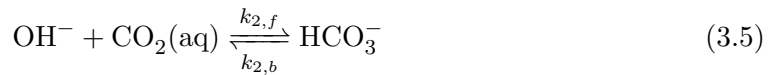
$$k_{B,f} = k_{B2,f} K_{B1}$$

y

$$k_{B,b} = k_{B2,b}$$

donde K_{B1} es la constante de equilibrio de la reacción 3.1.

El segundo grupo, encargado de neutralizar el pH básico, se encuentra caracterizado por las siguientes reacciones:



Cuando el tejido es sometido a una fuerte alcalinización, OH^- reacciona con $CO_2(aq)$ y HCO_3^- , desplazando así las reacciones 3.5 y 3.6 hacia la derecha. Por las mismas razones que para 3.3, la reacción 3.7 es desestimada.

En suma, se tendrán en cuenta las reacciones de evolución del oxígeno (2.1) y del cloro (2.2) para el ánodo y de evolución del hidrógeno (2.3) para el cátodo. Para el resto del dominio, se considerarán la protólisis del agua (2.7) y las reacciones 3.4, 3.5 y 3.6 del sistema regulador de bicarbonato presentadas más arriba.

Tal como se presentó en el capítulo anterior, se dividirá nuevamente el problema en dos modos de comportamiento: Modo *ON time* y Modo *OFF time*.

Modo “ON time”

Al tener nuevas reacciones químicas, se deberá modificar la ecuación de balance de masa, particularmente el término reactivo R_i :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -D_i \nabla^2 C_i + \frac{z_i}{|z_i|} u_i \nabla (C_i \nabla \phi) + R_i \quad (3.8)$$

para $i = \text{H}^+, \text{OH}^-, \text{Cl}^-, \text{HCO}_3^-, \text{CO}_2, \text{CO}_3^{2-}$

donde

$$\begin{aligned} R_{\text{H}^+} &= k_{w,b} C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{w,f} C_{\text{H}^+} C_{\text{OH}^-} \\ &\quad + k_{B,b} C_{\text{CO}_2(\text{aq})} C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{B,f} C_{\text{H}^+} C_{\text{HCO}_3^-} \\ R_{\text{OH}^-} &= k_{w,b} C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{w,f} C_{\text{H}^+} C_{\text{OH}^-} \\ &\quad - k_{2,f} C_{\text{CO}_2(\text{aq})} C_{\text{OH}^-} + k_{2,b} C_{\text{HCO}_3^-} \\ &\quad - k_{3,f} C_{\text{HCO}_3^-} C_{\text{OH}^-} + k_{3,b} C_{\text{CO}_3^{2-}} \\ R_{\text{HCO}_3^-} &= k_{B,b} C_{\text{CO}_2(\text{aq})} C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{B,f} C_{\text{H}^+} C_{\text{HCO}_3^-} \\ &\quad - k_{2,f} C_{\text{CO}_2(\text{aq})} C_{\text{OH}^-} + k_{2,b} C_{\text{HCO}_3^-} \\ &\quad - k_{3,f} C_{\text{HCO}_3^-} C_{\text{OH}^-} + k_{3,b} C_{\text{CO}_3^{2-}} \\ R_{\text{CO}_2} &= -k_{2,f} C_{\text{CO}_2(\text{aq})} C_{\text{OH}^-} + k_{2,b} C_{\text{HCO}_3^-} \\ R_{\text{CO}_3^{2-}} &= k_{3,f} C_{\text{HCO}_3^-} C_{\text{OH}^-} - k_{3,b} C_{\text{CO}_3^{2-}} \\ R_{\text{Cl}^-} &= 0 \end{aligned}$$

A estas ecuaciones se les suman las de conservación de carga (ecuación 2.11) y electro-neutralidad (ecuación 2.10), las cuales permanecen inalteradas. Queda entonces definido un sistema de ecuaciones con 8 incógnitas ($\text{H}^+, \text{OH}^-, \text{Cl}^-, \text{Na}^+, \text{HCO}_3^-, \text{CO}_2(\text{aq}), \text{CO}_3^{2-}, \phi$). A diferencia del modelo presentado en el capítulo anterior, no se tienen en cuenta diversos tipos de tejido.

Con respecto a las condiciones de borde, se considera que el transporte de masa de las especies agregadas ($\text{HCO}_3^-, \text{CO}_2(\text{aq})$ y CO_3^{2-}) es nulo. De esta manera, la ecuación que modela su comportamiento tanto en el ánodo como en el cátodo es similar a 2.20.

Modo “OFF time”

Durante el lapso denominado *OFF time*, el pulso eléctrico es suprimido. Se toman en cuenta las ecuaciones consideradas para el mismo período del Capítulo 2.

3.1.2. Modelo Computacional

Los algoritmos de resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales planteado, junto con los esquemas de discretización, son idénticos a los desarrollados en el Capítulo 2.

En cuanto al criterio de convergencia en cada iteración espacial, el error tolerable ha sido relajado con respecto al capítulo anterior (excepto en el caso de $\nabla\Phi$) de la siguiente manera:

$$res_{int} = \max_i \left| u_i^{t,m} - u_i^{t,m-1} \right| < 5 \cdot 10^{-5} \quad \text{donde } u = H^+, OH^-, Cl^-, Na^+, HCO_3^-, CO_2, CO_3^{2-}$$

Condiciones Iniciales y Parámetros

La concentración inicial de bicarbonato fue fijada en 27 mM. Esta decisión se justifica por el hecho de que su concentración en plasma y en líquido intersticial es 25.8 y 27.1 meq dm^{-3} H_2O , respectivamente [96]. Las concentraciones iniciales de carbonato y dióxido de carbono fueron obtenidas de las expresiones de equilibrio de las reacciones 3.5 y 3.6. La concentración inicial de Cl^- fue calculada a partir de la condición de electroneutralidad. Todos los parámetros fueron considerados a una temperatura de 37 °C y el pH inicial fue fijado en 7.

Las constantes de equilibrio de cada reacción se calculan teniendo en cuenta las siguientes fórmulas de equilibrio:

$$\begin{aligned} K_2 &= \frac{C_{HCO_3^-}^0}{C_{CO_2}^0 C_{OH^-}^0} \\ K_3 &= \frac{C_{CO_3^{2-}}^0}{C_{HCO_3^-}^0 C_{OH^-}^0} \\ K_W &= C_{H^+}^0 C_{OH^-}^0 \end{aligned}$$

Las constantes de velocidad *forward* (hacia adelante) son tomadas de la literatura (ver Tabla 3.1), mientras que las *backward* (hacia atrás) son obtenidas calculando

$$\begin{aligned} k_{2,b} &= \frac{k_{2,f}}{K_2} \\ k_{3,b} &= \frac{k_{3,f}}{K_3} \\ k_{w,b} &= \frac{k_{w,f} K_W}{C_{H_2O}^0} \\ k_{B,b} &= \frac{k_{B,f} C_{H^+}^0 C_{HCO_3^-}^0}{C_{H_2O}^0 C_{CO_2(aq)}^0} \end{aligned}$$

Los coeficientes de difusión fueron calculados usando la siguiente relación:

$$\frac{D_{25} \mu_{25}}{T_{25}} = \frac{D_{37} \mu_{37}}{T_{37}}$$

donde D_{25} son los coeficientes a 25 °C en agua [93]. La viscosidad fue tomada de la literatura tal que $\mu_{25} = 0,890 \text{ mNs } m^{-2}$ y $\mu_{37} = 0,692 \text{ mNs } m^{-2}$ [96].

Una lista de los parámetros utilizados puede consultarse en la Tabla 3.1.

Parámetro	Valor	Ref.	Parámetro	Valor	Ref
$C_{H^+}^0$	$1 \cdot 10^{-7}$ M	[96]	$C_{OH^-}^0$	$1 \cdot 10^{-7}$ M	[96]
$C_{Na^+}^0$	0.16 M	[96]	$C_{Cl^-}^0$	$\simeq 0.1329$ M	[96]
$C_{HCO_3^-}^0$	0.027 M	[96]	$C_{CO_2(aq)}^0$	$1,3 \cdot 10^{-3}$ M	[75]
$C_{H_2O}^0$	55.5 M		$C_{CO_3^{2-}}^0$	$4,4 \cdot 10^{-2}$ M	
D_{H^+}	$12,5 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]	D_{OH^-}	$7,05 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]
D_{Na^+}	$1,78 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]	D_{Cl^-}	$2,72 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]
$D_{HCO_3^-}$	$1,49 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[93]	$D_{CO_3^{2-}}$	$2,46 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[75]
D_{CO_2}	$2,71 \cdot 10^{-5}$ cm^2/s	[75]	T	37 °C	
I_1^{eq}	$1 \cdot 10^{-10}$ A/ cm^2	[97]	I_2^{eq}	$1 \cdot 10^{-3}$ A/ cm^2	[98]
E_1^{eq}	0.816 V	[93]	E_2^{eq}	1.407 V	[93]
$k_{w,f}$	$1,5 \cdot 10^{11}$ 1/M.s	[99]	$k_{B,f}$	$3,1 \cdot 10^5$ 1/M.s	[99]
$k_{2,f}$	20 1/M.s	[75]	$k_{3,f}$	$1,5 \cdot 10^8$ 1/s	[75]

Tab. 3.1: Parámetros utilizados por el modelo *in silico*.

Motivado por efectos de impedancia por polarización en el electrodo, se ajustaron los coeficientes de difusión en el ánodo y en el cátodo para hacer coincidir la densidad de corriente de la simulación con la medida *in vivo* [105]. Con respecto al resto del dominio, el valor del coeficiente de difusión de cada especie se multiplica por un factor F . De esta manera, el coeficiente efectivo (o aparente) D^* resulta

$$D^* = D \times F$$

donde D es el coeficiente medido en agua (tomado de la literatura) y F es un factor que agrupa distintos parámetros del medio como la tortuosidad, porosidad, permeabilidad del tejido, capacidad buffer, etc [106, 107]. El valor de F fue ajustado tomando en cuenta la medición del avance del frente de pH en los experimentos mencionados. Este cambio puede entenderse por el hecho de que, en este capítulo, la capacidad *buffer* es un parámetro explícito del modelo (expresado en las concentraciones de HCO_3^- , CO_2 y CO_3^{2-}) y por lo tanto su impacto no debe estar incorporado en F .

El ambiente de ejecución es idéntico al utilizado en el Capítulo 2.

3.2. Resultados y Discusión

En la presente sección, se realizarán comparaciones entre el modelo de Turjanski *et. al* (en adelante Modelo *Cloruro de sodio*) y la nueva extensión presentada (en adelante Modelo *Cloruro de Sodio + Buffer*). Además, ambos modelos se contrastarán con los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* mostrados en el Capítulo 2.

La Figura 3.1 muestra la predicción de la concentración de las especies H^+ , OH^- , HCO_3^- y CO_3^{2-} en cada nodo de la malla después de la simulación de un protocolo GET de 10 pulsos a 200 V/cm de 20 ms de duración y una frecuencia de 1 Hz.

En la zona del ánodo, las concentraciones de H^+ y OH^- muestran una tendencia similar a la mostrada en la Figura 2.7(a) del Capítulo 2. La diferencia principal se encuentra en el marcado descenso de acidificación producto de la presencia del buffer bicarbonato. En efecto, la reacción del HCO_3^- con los protones (H^+) causa una merma en ambas concentraciones. De esta manera, el bicarbonato se va consumiendo desde el ánodo hacia el cátodo al transcurrir los pulsos.

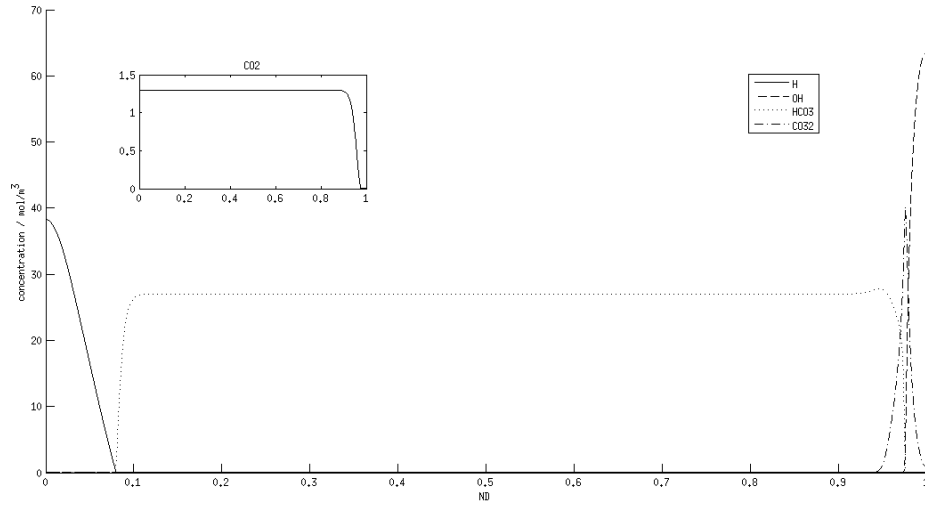


Fig. 3.1: Predicción de la distribución espacial de las concentraciones de las especies H^+ , OH^- , HCO_3^- , CO_2 y CO_3^{2-} para el final del último pulso en una simulación de un protocolo GET de 10 pulsos de 20 ms de duración a 200 V/cm y una frecuencia de 1 Hz. La distancia de los electrodos es 2 mm. El ánodo se encuentra a la izquierda y el cátodo a la derecha.

En la zona del cátodo, el avance de los oxidrilos se encuentra contrarrestado por la presencia del bicarbonato y el dióxido de carbono. A su vez, los iones OH^- y HCO_3^- se cruzan en un punto muy cercano al cátodo (alrededor del 2%). El ión carbonato (CO_3^{2-}), formado en la reacción entre oxidrilos y bicarbonatos, presenta un máximo en este punto. Luego, por vías difusivas y migratorias el CO_3^{2-} se transporta hacia la dirección en donde se encuentra el ánodo. Debido a la reacción con los oxidrilos, el dióxido de carbono se reduce a prácticamente cero en la zona del cátodo. La distribución de su concentración en los alrededores del cátodo al final del último pulso se muestra en un recuadro más pequeño en la esquina superior izquierda en la Figura 3.1, dado que es órdenes de magnitud menor que la del resto de las especies. Se aprecia claramente como esta especie es consumida en el cátodo debido a la reacción 3.5.

En la Figura 3.2 se muestra una comparación entre los perfiles de pH obtenidos por la simulación del modelo *Cloruro de Sodio* y del modelo *Cloruro de Sodio + Buffer*. Tanto alrededor del ánodo como del cátodo, se puede observar que la extensión de las zonas ácidas y básicas se reducen con el sistema buffer de bicarbonato. Además, la curva predicha por el modelo *Cloruro de Sodio + Buffer* posee una pendiente más pronunciada que la del modelo *Cloruro de Sodio*. Esto puede deberse a que la presencia del *buffer* consume un volumen de protones y oxidrilos y por consiguiente estos tienden a acumularse en las cercanías de los electrodos. A consecuencia de ello, es de esperar que se encuentren zonas ácidas y básicas aún más intensas que la del modelo *Cloruro de Sodio* en la zona próxima a los electrodos.

Por último, con el objetivo de comparar ambos modelos junto con los resultados del experimento sobre el **Pliegue Cutáneo Dorsal** (DSC) presentado en el capítulo anterior, se llevó a cabo una nueva simulación con los mismos parámetros que en dicho experimento. En la Figura 3.3, se compara el avance de los frentes de pH extremo para simulaciones de ambos modelos junto con el avance recogido de los datos experimentales mencionados.

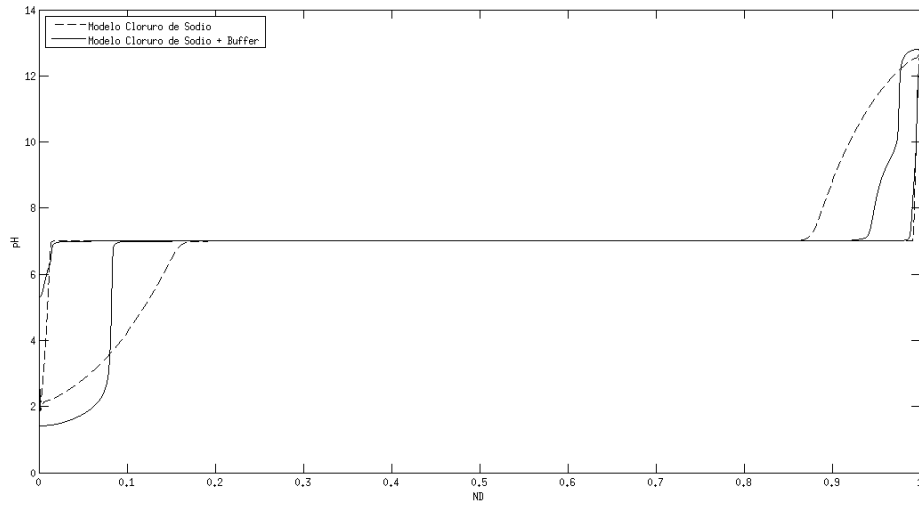


Fig. 3.2: Comparación entre perfiles de pH simulados por mismo protocolo GET que la Figura 3.1 a 200V/cm para el modelo *Cloruro de Sodio* y *Cloruro de Sodio + Buffer*. Las predicciones son para el final del primer y último pulso.

Se puede observar que la predicción del avance de los frentes de pH arrojados por la simulación del modelo *Cloruro de Sodio + Buffer* se ajustan mejor a los datos reales.

3.3. Conclusiones

En el presente capítulo, se extendió el modelo presentado en Turjanski *et. al* [71], dotándolo de nuevas especies iónicas con sus correspondientes reacciones químicas. Estos agregados tienen como objetivo modelar el sistema de *buffer* bicarbonato, uno de los principales reguladores del pH que está presente tanto en el líquido intersticial como en la sangre.

La nueva extensión del modelo, en comparación al presentado en el Capítulo 2, muestra una importante reducción en el avance de los frentes ácido y básico. Además, existe una buena correlación tanto cualitativa como cuantitativa con respecto a los resultados del experimento sobre el *Pliegue Cutáneo Dorsal* (DSC). De esta manera, se desarrolló un modelo más descriptivo con resultados más ajustados a la realidad.

Se espera que el modelo presentado en este capítulo pueda ser utilizado para una mejor calibración en la predicción del área de daño de tejido sano que se produce tanto en la *Electroterapia Génica* (GET) como también en otras terapias basadas en *Pulsos de Campo Eléctrico* (PEF).

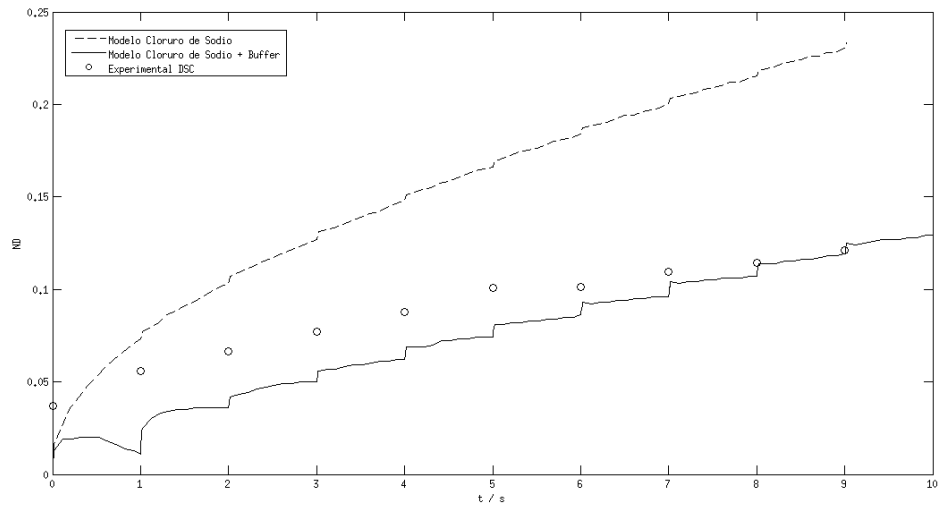


Fig. 3.3: Comparación entre los frentes de pH simulados por el modelo *Cloruro de Sodio* y *Cloruro de Sodio + Buffer* vs datos experimentales. Los modelos fueron simulados con un protocolo GET a 200 V/vm similar al del experimento del Capítulo 2 (10 pulsos, 20 ms de duración, 1 Hz de Frecuencia, distancia de electrodos de 2 mm). La densidad de corriente en ambos modelos se ajustó a la obtenida experimentalmente.

4. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

4.1. Conclusiones

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 1, el abordaje de tratamientos antitumorales mediante electroterapias es un área de activa investigación en las últimas décadas. Tal es así, que algunas de sus variantes, como la **Electroquimioterapia** (ECT), ya se ha estandarizado como un tratamiento para melanomas subcutáneos en la Comunidad Europea. Sin embargo, todavía quedan abiertos muchos interrogantes sobre los mecanismos fundamentales que describen los fenómenos físico-químicos de dichas terapias. Se han mencionado una gama diversa de modelos, a nivel micro y macrocelular, tendientes a zanjar muchos de estos interrogantes. En el presente trabajo se toma como base el modelo de Turjanski *et. al* que centra su análisis en el rol del pH ante la aplicación de **Pulsos de Campo Eléctrico** (PEF). La extensión de distintos aspectos de este modelo responde a la necesidad de poder obtener predicciones más aproximadas a partir de la simulación numérica, verificándolas con experimentos *in vivo*.

En el Capítulo 2 se extendió este modelo dando la posibilidad de describir múltiples tejidos. Los resultados de los experimentos *in vivo* realizados sobre dos tipos de tejidos (piel y músculo) muestran que el modelo tomado como base subestima el daño que la terapia provoca en el tejido, mientras que el nuevo modelo propuesto es capaz de proporcionar predicciones, aunque sobreestimadas, coherentes y esperables.

A los efectos de obtener un modelo más realista, en el Capítulo 3 se decidió avanzar en la modelización de las especies que actúan como *buffer*. La nueva extensión presentada mostró una importante reducción en el avance de los frentes ácido y básico y resultados cuantitativamente más ajustados con respecto a los experimentos realizados.

De esta manera, podemos enumerar las siguientes contribuciones de la tesis:

- 1 La formulación de una extensión del modelo base que permite obtener una descripción de los procesos físico-químicos más confiable en el caso de modelos *in vivo* con más de 1 tejido, todo ello sin comprometer la estabilidad y la velocidad de ejecución de la simulación numérica.
- 2 La formulación de una extensión del modelo base introduciendo nuevas especies iónicas en donde se muestra la importancia que el sistema *buffer* bicarbonato tiene en la neutralización del pH en terapias de **Pulsos de Campo Eléctrico** (PEF) y además se obtienen buenas predicciones con respecto a datos experimentales.

4.2. Trabajos Futuros

Se sugieren posibles líneas de investigación para profundizar en la temática abordada:

1. Un nuevo modelo más realista debe necesariamente realizar un estudio en detalle de las diversas características del tejido, que incluya mediciones de la tortuosidad y porosidad y una descripción más realista del fenómeno de permeabilización del tejido, en donde se pueda determinar, entre otras cosas, una ecuación que prediga el comportamiento del coeficiente de difusión.

2. La polarización que se produce en el electrodo (llamada impedancia de polarización) puede explicar una mayor resistencia en la zona del ánodo y del cátodo lo cual limitaría la corriente total aplicada. Para un modelo más aproximado, se sugiere realizar mediciones del potencial en la zona de los electrodos.
3. Se pueden fusionar los modelos presentados en ambos capítulos teniendo en cuenta nuevas especies iónicas y además múltiples tejidos.
4. La extensión de dichos modelos a 2 y 3 dimensiones, los cuales pueden brindar resultados más aproximados a los datos experimentales.
5. Si bien este trabajo se ha aplicado a la Electroterapia Génica (GET), queda por explorar el nivel de correlación con terapias similares (desde el punto de vista del modelo matemático-computacional presentado) como la Electroporación Irreversible (IRE).
6. Sería interesante poder obtener mediciones del resto de las especies iónicas para lograr mayor precisión en la contrastación del modelo teórico.

Apéndice

A. MATERIAL ENTREGADO

A.1. Instructivo de uso

El material entregado consta de esta tesis en formato digital (pdf) y una carpeta con nombre *Codigo*. Dentro de ella, hay dos subcarpetas (*capitulo2* y *capitulo3*) en donde se encuentran todos los archivos necesarios para la ejecución y el procesamiento de datos de los programas desarrollados para ambos capítulos.

Requisitos

- Sistema Operativo Linux
- Compilador GCC versión > 4.4

En particular, el código fuente presentado se ha probado en Linux Ubuntu 12.04, con GCC versión 4.6.

Compilación y Ejecución

Para la compilación del código fuente, situarse dentro de la carpeta del capítulo correspondiente, y escribir en una terminal:

```
$ make
```

A continuación, para la ejecución del programa escribir en una terminal:

```
$ ./cap2 <archivoParametros>
```

para la ejecución del programa del Capítulo 2, o:

```
$ ./cap3 <archivoParametros>
```

para la ejecución del programa del Capítulo 3.

El parámetro *archivoParametros* es el nombre del archivo en donde se encuentran los parámetros utilizados por el programa. Los datos de salida se guardarán en una subcarpeta cuyo nombre será el mismo que el de este archivo, precedido por la cadena de texto *EjecucionDe*.

Para facilitar la reproducción de las ejecuciones presentadas en cada capítulo, se pre-configuraron archivos de parámetros según las ejecuciones presentadas en los Capítulos 2 y 3. En la Tabla A.1 se muestra el detalle de qué archivo corresponde con qué ejecución.

En caso de querer ejecutar las simulaciones con otros parámetros, se debe modificar el archivo *param.ini* ubicado en la misma carpeta donde se encuentra el binario. En dicho archivo se encuentran los parámetros más relevantes del programa junto a una breve descripción de cada uno de ellos.

Capítulo 2	
Archivo	Descripción
param_100V_Piel_2mm.ini	Figura 2.4(a) (se muestra sólo el avance de la suma de los frentes)
param_200V_Piel_2mm.ini	Figura 2.4(a) y 3.3 (se muestra sólo el avance de la suma de los frentes)
param_300V_Piel_2mm.ini	Figura 2.4(a) (se muestra sólo el avance de la suma de los frentes)
param_200V_Piel_3mm.ini	Figura 2.6 (se muestra sólo el avance de la suma de los frentes)
param_200V_PielYMusc_3mm.ini	Figura 2.6 y 2.7(a)
Capítulo 3	
param_200V_Buffer.ini	Figura 3.1, 3.2 y 3.3

Tab. A.1: Nombre de archivos de parámetros preconfigurados para cada Capítulo.

Archivos de Salida y Gráficos

La concentración de las especies en cada nodo se escribe en disco cada cierta cantidad (configurable) de iteraciones. A cada uno de estos archivos de texto lo llamaremos *foto*. El nombre de esos archivos responde a la siguiente convención: *NroDeFoto_capitulo_especie.dat* en donde cada nodo de la malla está separado por un espacio, el valor de más a la izquierda representa la concentración en el ánodo y el de más a la derecha representa la concentración en el cátodo. Además de las especies, en todas las iteraciones se guarda el valor de distintos parámetros, como ser voltaje, corriente, momento actual en el tiempo, etc. En este caso, el valor de cada iteración se escribe de izquierda a derecha y hay tantos valores como iteraciones hubo en esa ejecución.

Para la elaboración de los gráficos de las simulaciones se utilizó MATLAB versión 7.8. Una vez ejecutado el programa, los archivos para graficar (extension *.m*) se encuentran en la misma carpeta junto a los archivos de salida. Una vez que abrimos MATLAB, nos situamos en ese mismo directorio, y podemos ejecutar alguno de los *scripts* mencionados en la Tabla A.2.

A.2. Pseudocódigo *script* del Capítulo 2

El *script* 1 obtiene un factor F tal que multiplicándolo por cada valor de coeficiente de difusión de cada especie, el promedio de la densidad de corriente obtenida en una ejecución del modelo de un solo tejido coincide con el valor pasado por parámetro. Para obtener ese promedio, se ejecuta solamente un pulso de la simulación, calculándose la sumatoria de la densidad de corriente de cada iteración temporal dividido la cantidad de iteraciones.

Para la ejecución del *script* 1 es necesario tener instalado el intérprete de *Python*, el cual viene por defecto en la mayoría de las distribuciones estándar de Linux. Además, se debe haber compilado previamente el código fuente del programa del Capítulo 2 (ver Sección A.1) y tener el binario (*cap2*) en el mismo directorio en donde se encuentra este *script*. Una vez cumplido estos requisitos, situarse en la carpeta correspondiente y escribir en una terminal:

Archivo	Descripción
graficos.m	Distribución espacial de la concentración de las especies en la última <i>foto</i> (Ejemplo: Figura 3.1), distribución espacial de los frentes de pH en distintas <i>fotos</i> de la simulación (Ejemplo: Figura 2.7(b)) y porcentual de avance en el espacio de los frentes ácido, básico y la suma de ambos (Ejemplo: Figura 2.4(a)).
comparacion2vs3.m	Se encuentra en el directorio raíz al mismo nivel que las carpetas <i>capitulo2</i> y <i>capitulo3</i> . Compara entre los dos modelos <i>in silico</i> y el modelo <i>in vivo</i> del Pliegue Cutáneo Dorsal (DSC) (Figuras 3.3 y 3.2). Necesita el directorio donde se encuentran los archivos de salida de cada ejecución.

Tab. A.2: Archivos para graficar.

Script 1 Búsqueda de coeficientes difusivos para ajustar densidad de corriente en modelo de 1 sólo tejido con respecto a datos experimentales sobre el Pliegue Cutáneo Dorsal (DSC)

Entrada: Densidad de corriente *corriente_objetivo*

Salida: Factor de ajuste F para los valores de los coeficientes difusivos

- 1: $\text{bordes} \leftarrow \{F_{\min}, F_{\max}\}$ {Límite inferior y superior por donde va a oscilar la búsqueda para F }
 - 2: **mientras** $\text{error} > \text{LIM_TOLERABLE}$ **y** $\text{cant_intentos} < \text{MAX_INTENTOS}$ **hacer**
 - 3: $F_{\text{candidato}} \leftarrow \frac{\text{bordes}(1) + \text{bordes}(2)}{2}$ {Búsqueda binaria}
 - 4: $\text{corriente_obtenida} \leftarrow \text{simulacion}(F_{\text{candidato}})$ {Ejecuta un pulso de la simulación con factor $F_{\text{candidato}}$ }
 - 5: $\text{error} \leftarrow |\text{corriente_objetivo} - \text{corriente_obtenida}|$
 - 6: $\text{cant_intentos} \leftarrow \text{cant_intentos} + 1$
 - 7: **fin mientras**
 - 8: $F \leftarrow F_{\text{candidato}}$
 - 9: **devolver** F
-

\$ python corriente.py <corriente_objetivo> <archivoParametros>

donde *corriente_objetivo* es la densidad de corriente a la que se quiere ajustar los coeficientes de difusión y *archivoParametros* es el nombre del archivo de parámetros del programa en cuestión.

Al finalizar la ejecución de este *script*, se modifica el mismo archivo de parámetros pasado como argumento, en donde se ajusta el factor por el cual se multiplica a los coeficientes de difusión para hacerlos coincidir con *corriente_objetivo* (dentro del archivo ese parámetro se llama *factor_difusivo*). Una vez finalizado, puede ejecutarse el archivo binario *cap2* pasándole como argumento el archivo de parámetros modificado.

ACRÓNIMOS

ET Electroterapia

PEF Pulsos de Campo Eléctrico

IRE Electroporación Irreversible

EChT Tratamiento Electroquímico de Tumores

ECT Electroquimioterapia

GET Electroterapia Génica

NIH National Institutes of Health de EEUU

TAM Músculo Tibial Anterior

DSC Pliegue Cutáneo Dorsal

NDA Área de Daño Normalizada

ND Distancia Normalizada

Bibliografía

- [1] C. Mathers, D.M. Fat, World Health Organization, and J.T. Boerma. *The global burden of disease: 2004 update*. Nonserial Publication Series. World Health Organization, 2008.
- [2] Ministerio De Salud, Argentina. Estadísticas vitales - información básica, 2011.
- [3] Instituto Nacional Del Cáncer, Ministerio de Salud. Estadísticas, 2013.
- [4] Neal J. Meropol, Deborah Schrag, Thomas J. Smith, Therese M. Mulvey, Jr Robert M. Langdon, Diane Blum, Peter A. Ubel, and Lowell E. Schnipper. American Society of Clinical Oncology Guidance Statement: The Cost of Cancer Care. *Journal of Clinical Oncology*, 27(23):3868–3874, 2009.
- [5] National Cancer Institute. Cancer prevalence and cost of care projections, 2010.
- [6] RK Jain. Understanding barriers to drug Delivery: high resolution in vivo imaging is key. *Clinical Cancer Research*, 5(7):1605–1606, July 1999.
- [7] RK Jain. Transport of molecules, particles and cells in solid tumors. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1:241–263, 1999.
- [8] Andrew I. Minchinton and Ian F. Tannock. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews*, 6:583–592, 2006.
- [9] Andre F and Mir L. Dna electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy*, 11:S33–S42, 2004.
- [10] George O’Clock. *Electrotherapeutic devices: principles, design, and applications*. Artech House, Boston MA, 2007.
- [11] Luis Mir. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer*, Supp 4(11):38–44, 2006.
- [12] Poddevin, Orlowski, Belehradek Jr. J., and Mir L. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem. Pharmacol.*, 42:67–75, 1991.
- [13] M Marty, D Serša, J Garbay, J Gehl, C Collins, M Snoj, V Billard, P Geertsen, J Larkin, D Miklavčič, I Pavlovic, S Paulin-Kosir, M Čemažar, N Morsli, D Soden, Z Rudolf, C Robert, G O’Sullivan, and L Mir. Electrochemotherapy, an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of esope (european standard operating procedures of electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer*, Supp 4:3–13, 2006.
- [14] N Olaiz, F Maglietti, C Suárez, F Molina, D Miklavcicc, L Mir, and G Marshall. Electrochemical treatment of tumors using a one-probe two-electrode device. *Electrochimica Acta*, 55:6010–6014, 2010.

-
- [15] Ken Thomson and S.T. Kee. *Clinical Aspects of Electroporation*, chapter Clinical Research on Irreversible Electroporation of the Liver, pages 237–246. Springer, 2011.
 - [16] D Soden, J Larkin, C Collins, M Tangney, S Aarons, J Piggott, A Morrissey, C Dunne, and G O’Sullivan. Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours. *Cancer Lett.*, 232:300–10, 2006.
 - [17] JA Wolff and V. Budker. The mechanism of naked dna uptake and expression. *Adv Genet*, 54:3–20, 2005.
 - [18] DM Bower and KL Prather. Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid dna. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:805–13, 2009.
 - [19] J. Wolff and et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247:1465–8, 1990.
 - [20] J. Couzin and J. Kaiser. Gene therapy. as gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science*, 307:1028, 2005.
 - [21] S. Hacein-Bey-Abina. Lmo2-associated clonal t cell proliferation in two patients after gene therapy for scid-x1. *Science*, 302:415–19, 2003.
 - [22] AV. Titomirov, S. Sukharev, and E. Kistanova. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid dna. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1088(1):131–4, 1991.
 - [23] G. Vandermeulen. Optimisation of intradermal dna electrotransfer for immunisation. *J Control Release*, 124(1-2):81–7, 2007.
 - [24] H. Aihara and J. Miyazaki. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 16(9):867–70, 1998.
 - [25] L. Mir. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci*, 96:4262–7, 1999.
 - [26] R. Heller. In vivo gene elctroinjection and expression in rat liver. *FEBS Letters*, 389:225–8, 1996.
 - [27] DA. Dean. Electroporation as a method for high-level non-viral gene transfer to the lung. *Gene Ther.*, 10(18):1608–15, 2003.
 - [28] R. Zhou. Electroporation-mediated transfer of plasmids to the lung results in reduced tlr9 signaling and inflammation. *Gene Ther.*, 14(9):775–80, 2007.
 - [29] Y. Isaka. Electroporation-mediated hgf gene transfection protected the kidney against graft injury. *Gene Ther.*, 12(10):815–20, 2005.
 - [30] K. Blair-Parks, BC. Weston, and D. Dean. Gene delivery to the cornea by plasmid injection and electroporation. *J Gene Med.*, 4:92–100, 2002.
 - [31] C. Bloquel. Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using htnf-alpha soluble receptor in uveitis. *FASEB Journal*, 20(2):389–91, 2006.

-
- [32] B. Judkewitz. Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. *Nat Protoc.*, 4(6):862–9, 2009.
- [33] MP. Rols. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol.*, 16(2):168–71, 1998.
- [34] M. Cemazar. Control by pulse parameters of dna electrotransfer into solid tumors in mice. *Gene Ther.*, 16(5):635–44, 2009.
- [35] AI. Daud. Phase i trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 26(36):5896–903, 2008.
- [36] L Mir. Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future. *Mol Biotechnol*, 43(2):167–176, 2009.
- [37] P. Hojman, H. Gissel, F. Andre, Cournil-Henrionnet, J Eriksen, and J. Gehl. Physiological effects of high and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Human Gene Therapy*, 19:1249–1260, 2008.
- [38] F Andre, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, and J Eriksen. Efficiency of high and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor and skin. *Human Gene Therapy*, 19:1261–1271, 2008.
- [39] J. Gehl. Electroporation for drug and gene delivery in the clinic: doctors go electric. *Methods Mol Biol.*, 423:351–9, 2008.
- [40] E. W. Lee, Susan Thai, and S.T. Kee. Irreversible electroporation: A novel image-guided cancer therapy. *Gut Liver*, 4(Suppl. 1):S99–104, 2010.
- [41] R Davalos, L Mir, and B Rubinsky. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng*, 33(2):223–231, 2005.
- [42] E. W. Lee, C. Chen, V.E Prieto, S.M. Dry, C.T. Loh, and S. Kee. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation. *Radiology*, 255:426–433, 2010.
- [43] Y Guo, Y Zhang, R Klein, et al. Irreversible electroporation therapy in the liver: longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 70:1555–1563, 2010.
- [44] Thomas L Ellis, Paulo A Garcia, John H Rossmesl, Natalia Henao-Guerrero, John Robertson, and Davalos R. Nonthermal irreversible electro poration for intracranial surgical applications. *Journal Neurosurgery*, 114(3):661–8, 2010.
- [45] RE 2nd Neal, R Singh, HC Hatcher, ND Kock, SV Torti, and Davalos R. Treatment of breast cancer through the application of irreversible electroporation using a novel minimally invasive single needle electrode. *Breast Cancer Res. Treat.*, 123:295–301, 2010.
- [46] C Ball, KR Thomson, and H. Kavnoudias. Irreversible electroporation: a new challenge in .out of operating theater. anesthesia. *Anesth. Analg.*, 110:1305–1309, 2010.

-
- [47] M Pech, A Janitzky, J Wendler, C Strang, S Blaschke, O Dudeck, J Rieke, and UB Liehr. Irreversible electroporation of renal cell carcinoma: a first-in-man phase i clinical study. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 34(1):132–8, 2011.
- [48] AK Vijh. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, ph changes, electroosmosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:663–665, 2004.
- [49] E Nilsson, H von Euler, J Berendson, A Thörne, P Wersäll, I Näslund, A Lagerstedt, K Narfström, and J Olsson. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*, 51:1–11, 2000.
- [50] Luis Bergues Cabrales and Liliana Gómez Luna. La electroterapia: una alternativa terapéutica para el tratamiento de tumores. *Revista Cubana de Medicina*, 42(6), 2003.
- [51] HC Ciria, MS Quevedo, LB Cabrales, RP Bruzón, MF Salas, OG Pena, TR González, DS López, and JM Flores. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer*, 4(1):87, November 2004.
- [52] J Finch, B Fosh, A Anthony, E Slimani, M Texler, D Berry, A Dennison, and G Madder. Liver electrolysis: ph can reliably monitor the extent of hepatic ablation in pigs. *Clin Sci (Lond)*, 102(4):389–395, 2002.
- [53] Lai M, Wang SM, Wang Y, Tang CL, Kong LW, and Xu XY. Effects of electroacupuncture of "zusunli" (st 36), "hegu" (li 4) and/or "sanyinjiao" (sp 9) on immunofunction in gastric carcinectomy rats. *Zhen Ci Yan Jiu*, 33(4):245–249, 2008.
- [54] Lai M, Wang SM, Zhang WL, Wang Y, Huang SQ, Dong W, and Li A. Effects of electroacupuncture on tumor growth and immune function in the walker-256 model rat. *Zhongguo Zhen Jiu*, 28(8):607–609, 2008.
- [55] Liu ZD, Pei J, Fu QH, Li HY, Yu QW, Zhang JY, and Zhang DQ. Influence of electroacupuncture and moxibustion and their treated mouse serum on the proliferation of the cultured splenic cd4+ cd25+ regulatory t cells of tumor-bearing mice. *Zhen Ci Yan Jiu*, 34(4):219–224, 2009.
- [56] Xiaolong Yan, Jing Han, Zhipei Zhang, Jian Wang, Qingshu Cheng, Kunxiang Gao, Yunfeng Ni, and Yunjie Wang. Lung cancer a549 cells migrate directionally in dc electric fields with polarized and activated egfrs. *Bioelectromagnetics*, 30(1):29–35, 2009.
- [57] Maria Wartenberg, Nina Wirtz, Alexander Grob, Wilhelm Niedermeier, Jürgen Hescheler, Saskia C. Peters, and Heinrich Sauer. Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by nadph oxidase-derived reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*, 29(1):47–54, 2008.
- [58] Nico Schaefer, Hartmut Schafer, David Maintz, Mathias Wagner, Marcus Overhaus, Arnulf H. Hoelscher, and Andreas Turler. Efficacy of direct electrical current therapy

- and laser-induced interstitial thermotherapy in local treatment of hepatic colorectal metastases: An experimental model in the rat. *Journal of Surgical Research*, 146(2):230 – 240, 2008.
- [59] Gianpiero Gravante, Seok Ling Ong, Matthew S. Metcalfe, Roberto Sorge, John Overton, David M. Lloyd, Guy J. Maddern, and Ashley R. Dennison. Cytokine response of electrolytic ablation in an ex vivo perfused liver model. *ANZ Journal of Surgery*, 80(7-8):537–541, 2010.
- [60] Gianpiero Gravante, Seok Ling Ong, Matthew S. Metcalfe, Roberto Sorge, Andrew J. Fox, David M. Lloyd, Guy J. Maddern, and Ashley R. Dennison. Changes in acid-base balance during electrolytic ablation in an ex vivo perfused liver model. *The American Journal of Surgery*, In Press, Corrected Proof:–, 2010.
- [61] G. Gravante, S.L. Ong, M.S. Metcalfe, N. Bhardwaj, G.J. Maddern, D.M. Lloyd, and A.R. Dennison. Experimental application of electrolysis in the treatment of liver and pancreatic tumours: Principles, preclinical and clinical observations and future perspectives. *Surgical Oncology*, In Press, Corrected Proof:–, 2010.
- [62] E.A. Schroepfel, K. Kroll, M.C. Damon, and A.A.H. Kroll. Direct current ablation destroys multi-stage fibrosarcomas in rats. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE*, pages 3099 –3104, 2009.
- [63] Hong Bae Kim, Saeyoung Ahn, Hee Jin Jang, Sung Bo Sim, and Ki Woo Kim. Evaluation of corrosion behaviors and surface profiles of platinum-coated electrodes by electrochemistry and complementary microscopy: Biomedical implications for anti-cancer therapy. *Micron*, 38(7):747 – 753, 2007.
- [64] M Telló, L Oliveira, O Parise, AC Buzaid, RT Oliveira, R Zanella, and A Cardona. Electrochemical therapy to treat cancer (in vivo treatment). *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, pages 3524–3527, 2007.
- [65] MV Jarque, MO Mateus, LJ Hong, LB Cabrales, FS Palencia, HC Siria, SA Books, and MF Salas. Primeras experiencias clínicas en cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales. *Medisan*, 11(1), 2007.
- [66] L Cabrales, A Aguilera, R Jiménez, M Jarque, H Ciria, J Reyes, MA Mateus, F Palencia, and M Ávila. Mathematical modeling of tumor growth in mice following low-level direct electric current. *Mathematics and Computers in Simulation*, 78:112–120, 2008.
- [67] H Camué, L Bergues, M Suárez, D Segura, and M Fari nas. Efectos de la corriente eléctrica directa en el crecimiento del tumor de ehrlich. *Rev Cubana Oncol*, 17(3):167–170, 2001.
- [68] Y Xin. Organization and spread of electrochemical therapy (ECT) in China. *Eur J Surg*, Suppl 574:25–30, 1994.
- [69] Y Xin, F Xue, and F Zhao. Effectiveness of electrochemical therapy in the treatment of lung cancers of middle and late stage. *Chin Med J*, 110(5):379–383, 1997.

-
- [70] Y.L. Xin, D.R. Liu, and X. Meng. Clinical observation on effect of electroacupuncture therapy in treating superficial tumor. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 21(3):174–176, 2001.
- [71] Pablo Turjanski, Nahuel Olaiz, Felipe Maglietti, Sebastian Michinski, Cecilia Suarez, Fernando Victor Molina, and Guillermo Marshall. The role of ph fronts in reversible electroporation. *PLoS ONE*, 6(4):e17303, 04 2011.
- [72] E Nilsson, J Berendson, and E Fontes. Development of a dosage method for electrochemical treatment of tumours: a simplified mathematical model. *Bioelectrochem Bioenerg*, 47:11–18, 1998.
- [73] E Nilsson, J Berendson, and E Fontes. Electrochemical treatment of tumours: a simplified mathematical model. *J Electroanal Chem*, 460:88–99, 1999.
- [74] E Nilsson, J Berendson, and E Fontes. Impact of chlorine and acidification in the electrochemical treatment of tumours. *Journal of Applied Electrochemistry*, 30(12):1321–1333, 2000.
- [75] E Nilsson and E Fontes. Mathematical modelling of physicochemical reactions and transport processes occurring around a platinum cathode during the electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*, 53:213–224, 2001.
- [76] P Turjanski, N Olaiz, P Abou-Adal, C Suárez, M Risk, and G Marshall. ph front tracking in the electrochemical treatment (EChT) of tumors: experiments and simulations. *Electrochimica Acta*, 54:6199–6206, 2009.
- [77] M Knowles and P Selby. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, Oxford, GB, 4ta ed, 2005.
- [78] Erik R Scott, Ana I Laplaza, Henry S White, and J. Bradley Phipps. Transport of ionic species in skin: Contribution of pores to the overall skin conductance. *Pharmaceutical Research*, 10:1699–1709, 1993.
- [79] Björn Nordenström. *Biologically Closed Electrical Circuits: Clinical, Experimental and Theoretical Evidence for an Additional Circulatory System*. Nordic Medical Publications, Stockholm, Sweeden, 1983.
- [80] D Lando, S Haroutiunian, A Kul’ba, E Dalian, P Orioli, S Mangani, and A Akhrem. Theoretical and experimental study of dna helix-coil transition in acidic and alkaline medium. *J Biomol Struct Dyn*, 12(2):355–366, 1994.
- [81] R Dubey and D Tripathi. A study of thermal denaturation/renaturation in dna using laser light scattering: a new approach. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 42:301–307, 2005.
- [82] Tadej Kotnik and Damijan Miklavcic. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophysical Journal*, 79, 2000.
- [83] Jan Gimsa and Derk Wachner. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophysical Journal*, 81, 2001.

-
- [84] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, and Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1(7):841–845, 1982.
- [85] Orlowski S and Mir L. Cell electroporabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1154(1):51–63, 1993.
- [86] Weaver JC and Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2):135–160, 1996.
- [87] Teissie J, Golzio M, and Rols MP. Mechanisms of cell membrane electroporabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1724(3):270 – 280, 2005. Some Insights into the Biophysics of Complex Systems.
- [88] N.; Miklavcic D. Pavlin, M.; Pavselj. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 49, 2002.
- [89] B Valic, M Golzio, M Pavlin, A Schatz, C Faurie, B Gabriel, J Teissie, MP Rols, and Miklavcic D. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiments. *Eur Biophys J*, 32:519–528, 2003.
- [90] Blaz; Mojca Pavlin; Damijan Miklavcic Valic. The effect of resting transmembrane voltage on cell electroporabilization: a numerical analysis. *Bioelectrochemistry*, 63, 2004.
- [91] H.; M.P. Rols; E. Boldt; E. Neumann; J. Teissie Wolf. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*, 66, 1994.
- [92] A Ivorra, B Al-Sakere, B Rubinsky, and L Mir. In vivo electrical conductivity measurements during and after electroporation of sarcomas: conductivity changes reflect treatment outcome. *Phys Med Biol*, 54:5949–5963, 2009.
- [93] J Newman and K Thomas-Alyea. *Electrochemical Systems*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 3rd edition, 2004.
- [94] Ronald F. Probstein. *Physicochemical Hydrodynamics, an Introduction*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, July 1994.
- [95] Allen J. Bard and Larry R. Faulkner. *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, 2001.
- [96] John West. *Physiological Basis of Medical Practice*. Lippincott, William & Wilkins, Baltimore, 11th edition, 1985.
- [97] A Damjanovic, V Birss, and D Boudreaux. Electron transfer through thin anodic oxide films during the oxygen evolution reactions at Pt electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 138:2549, 1991.

- [98] AJ Bard. *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*. Marcel Dekker, New York, 1973.
- [99] WJ Moore. *Basic Physical Chemistry*. Prentice-Hall Int Ed, London, 1983.
- [100] E; Wells K E; Fazio V M; Wells D J McMahon, J M; Signori. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase-increased expression with reduced muscle damage. *Gene Therapy*, 8, 2001.
- [101] Damijan Miklavcic Selma CoroviC, Lluís M. Mir. In vivo muscle electroporation threshold determination: Realistic numerical models and in vivo experiments. *The Journal of Membrane Biology*, 245, 9 2012.
- [102] Allen Arief. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders*. Churchill Livingstone, New York, 2nd ed. edition, 1995.
- [103] H von Euler, A Lagerstedt, J Olsson, and E Nilsson. Development of a dose-planning method for electrochemical treatment of tumors: a study of mammary tissue in healthy female cd rats. *Electro and Magnetobiology*, 18(1):93–104, 1999.
- [104] L Samuelsson, T Olin, and NO Berg. Electrolytic destruction of lung tissue in the rabbit. *Acta Radiol Diagn*, 21(4):447–454, 1980.
- [105] Allen j. Bard and Michael V. Mirkin. *Scanning electrochemical microscopy*. Marcel Dekker, New York, 2001.
- [106] F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, and L.J. Gibson. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-gag scaffolds. *Biomaterials*, 26(4):433 – 441, 2005.
- [107] Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677 – 689, 2006.