

Tesis Doctoral

# Electroterapia y electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales

Turjanski, Pablo Guillermo

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Turjanski, Pablo Guillermo. (2011). Electroterapia y electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Turjanski, Pablo Guillermo. "Electroterapia y electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Computación

# **ELECTROTERAPIA Y ELECTROPORACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES: MODELOS TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área computación

**Pablo Guillermo Turjanski**

Directores de tesis:  
Dr. Ing. Guillermo Marshall  
Dr. Fernando Víctor Molina

Consejero de estudios:  
Dr. Ing. Guillermo Marshall

Buenos Aires, 08 de Febrero de 2011



# Electroterapia y electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales

## Resumen

El cáncer es una de las primeras causas de muerte por enfermedad en el mundo y su incidencia sigue creciendo con el aumento de la contaminación y la expectativa de vida. A pesar de los grandes avances científicos logrados en la lucha contra esta enfermedad, aun es necesario buscar soluciones más integrales, económicas y con menos efectos secundarios adversos que las terapias tradicionales. Aquí estudiamos el uso de campos eléctricos para la eliminación de tumores sólidos, lo que podría representar una alternativa o enfoque complementario a la cirugía, la radio o la quimioterapia. En particular, estudiamos el tratamiento electroquímico de tumores (EChT) y la electroporación reversible (ECT).

El EChT consiste en la aplicación de una corriente eléctrica continua a través de dos o más electrodos insertos localmente en el tejido tumoral, con el objeto de eliminarlo por necrosis. Se cree que el principal mecanismo de destrucción del tumor son los cambios extremos de pH inducidos por el tratamiento. La ECT, o electroquimioterapia, es una técnica basada en la electropermeabilización de la célula combinada con el uso de quimioterapia, permitiendo así una mayor eficiencia, dado que de esta manera una mayor cantidad de droga puede penetrar la célula. Algunas de las ventajas del EChT y de la ECT son su simplicidad, efectividad, bajo costo y efectos secundarios mínimos. Quedan aun muchos interrogantes por develar sobre los mecanismos fundamentales de la interacción de los campos eléctricos con los tejidos vivos. Para lograr dicho objetivo, se presenta aquí un estudio interdisciplinario mediante la formulación de modelos *in silico* o matemático-computacionales, y su validación con modelos experimentales (*in vivo* e *in vitro*).

La validación *in vivo* fue lograda a través de los resultados obtenidos de aplicar la terapia a ratones. La validación *in vitro*, fue obtenida a partir de aplicar la terapia a geles de colágeno tipo I y agar-agar, siendo ambos buenos modelos de la matriz extracelular. Esta metodología interdisciplinaria del estudio de los efectos del EChT y la ECT, nos ha permitido obtener las siguientes contribuciones en esta tesis:

1. La formulación de dos nuevos modelos *in silico* de EChT unidimensionales, basado el primero en la descripción del transporte iónico y el campo eléctrico mediante las ecuaciones de Nernst-Planck y Poisson, respectivamente, y el segundo, basado en las ecuaciones de Nernst-Planck y la condición de electroneutralidad. Ambos modelos validados con modelos *in vivo* e *in vitro*, revelan que:

- Un estado inicial con valores de pH fisiológicos evoluciona entre los electrodos hacia un frente catódico alcalino extremo y un frente anódico ácido extremo moviéndose uno en dirección al otro hasta colisionar. Estos frentes dejan abierta la posibilidad de la existencia –en caso de un tratamiento aplicado en un lapso menor al necesario– de una región entre ellos con pH fisiológico.
  - El avance del frente de pH durante la EChT se correlaciona muy bien con el área necrótica final. Esto revela que el seguimiento del frente de pH puede ser utilizado para predecir el grado de destrucción del tumor y, por tanto, evaluar la eficacia del EChT.
  - El modelo permite calcular la velocidad de los frentes de pH, información extremadamente útil para la predicción de la extensión del tejido tratado, lo cual tiene implicancias significativas en la planificación de la dosis y las condiciones óptimas de operación del EChT. En particular, puede predecir la manera en que la evolución de los frentes de pH cubren, en un tumor, el casquete esférico constituido por células activas.
2. La formulación de un nuevo modelo *in silico* de ECT unidimensional, conformado por dos submodelos: el primero, denominado *ON Time*, es utilizado durante la aplicación del pulso eléctrico y está basado en la solución numérica de las ecuaciones de Nernst-Planck para el transporte iónico, asumiendo la condición de electroneutralidad. El segundo modelo, denominado *OFF Time*, es utilizado cuando el pulso no está siendo aplicado, y está basado en las ecuaciones de difusión-reacción. El modelo final fue validado con un modelo *in vitro* y revela que:
- El método de dos pasos (o de split) del sistema de ecuaciones diferenciales original permitió la integración de dos submodelos de escalas temporales disímiles: una micro (*ON Time*) y otra macro (*OFF Time*), dando como resultado un algoritmo extremadamente robusto.
  - Las mediciones muestran que los frentes de pH son inmediatos y significativos. Dado que éstos pueden producir necrosis del tejido –efecto no deseado tanto en aplicaciones clínicas de la ECT, como en la electroporación irreversible (IRE) y la electroterapia génica (EGT)–, es muy importante cuantificar la extensión y evolución del pH.
  - La técnica utilizada para el seguimiento espacio-temporal de los frentes de pH, muestra que escalan en el tiempo como  $t^{\frac{1}{2}}$ , característico de procesos predominantemente difusivos. Esta información es relevante para predecir la extensión del tratamiento.
  - La comparación de frentes de pH de la ECT con los del EChT muestra un resultado sorprendente: al aplicar una misma dosis de corriente eléctrica, la acidificación anódica en la ECT es mayor que en el EChT, lo que sugiere que la necrosis del tejido puede ser también mayor. Se sugieren maneras de minimizar estos efectos adversos en la ECT.
3. La formulación de un nuevo modelo *in silico* radial esférico de ECT del transporte iónico en un tejido tumoral utilizando una geometría esférica y un electrodo (ánodo) situado en el centro del tejido a tratar, y el cátodo ubicado a una distancia suficientemente lejana

del ánodo como para asegurar que el producto de las reacciones catódicas no afecten al tejido a analizar. El modelo teórico debe ser validado con un modelo experimental cuyo desarrollo se encuentra pendiente. No obstante ello los resultados preliminares muestran que:

- Los frentes de pH se mueven más lentos que en el caso del modelo ECT unidimensional. Esta diferencia posiblemente se origine en la cantidad de corriente eléctrica que necesita cada modelo (*in silico*) para mantener, durante la aplicación del pulso, el voltaje constante. En el caso del modelo radial esférico, dicha cantidad es mucho menor dado que el área es mayor, lo que se traduce en una menor generación de protones alrededor del ánodo con la consiguiente menor acidificación.
- Si bien este modelo de ECT no toma en cuenta la interacción ánodo-cátodo, toma en cuenta la naturaleza tridimensional del tejido tumoral, lo que constituye un modelo más realista que una aproximación unidimensional.

En síntesis, se espera que los resultados de esta tesis ayuden significativamente a mejorar la habilidad para diseñar planes de tratamiento efectivos del EChT y la ECT. Se confía que la inclusión del EChT y la ECT, solas o en combinación con otras terapias en la clínica médica, tenga beneficios significativos a nivel socioeconómico y mejore la calidad y duración de la vida de muchos pacientes.

**Palabras clave:** *Simulación Numérica, Físicoquímica Hidrodinámica Computacional, Diferencias Finitas, Tratamiento Electroquímico de Tumores, Electroporación Reversible.*



# Electrotherapy and electroporation in the treatment of tumors : Theoretical and experimental modelling

## Abstract

Cancer is one of the main causes of death by sickness in the world and its incidence grows in time due to the increase in pollution and life expectancy. In spite of great scientific advances obtained in the fight against this disease, is still necessary to search for new more integral solutions, less costly and with minor side effects than traditional ones. Here we study the use of electric fields in the elimination of solid tumors, that may represent an alternative or complementary approach to surgery, radio or chemotherapy. In particular, we study the electrochemical treatment of tumors (EChT) and the reversible electroporation (ECT).

The EChT consists in the passage of a direct electric current through two or more electrodes inserted locally in the tumor tissue, with the aim of erasing it by necrosis. The extreme pH changes induced are believed to be the main tumor destruction mechanism. The ECT, or electrochemotherapy, is a technique based on cell electropermeabilization combined with the use of chemotherapy, thus allowing greater therapy efficiency, as much more drug can penetrate the cell. Some of the advantages of EChT and ECT are their simplicity, effectivity, low cost and minimal side effects. There are yet many open questions about the fundamental interaction mechanisms between electric fields and living tissues that there is need to unveil. To address this objective we present an interdisciplinary study through the formulation of *in silico* or mathematical-computational models, and their validation with experimental modelling (*in vivo* and *in vitro*).

*In vivo* validation was achieved by results obtained applying the treatment to mice. *In vitro* validation, was achieved by results obtained applying the treatment to collagen type I and agar-agar gels, being both good models of extracellular matrix. This interdisciplinary methodology of the study of the effects of EChT and ECT, has permitted us to obtain the following contributions in this thesis:

1. The formulation of two new *in silico* one-dimensional EChT models, first based in the description of ion transport and the electric field through the Nernst-Planck and Poisson equations, respectively, and the second, based on the Nernst-Planck equations and electroneutrality condition. Both models are validated with *in vivo* and *in vitro* models, reveal that:
  - An initial state with neutral pH values evolves between electrodes into extreme cathodic alkaline and anodic acidic fronts moving towards each other until they collide. This leaves the possible existence, if sufficient time has not elapsed, of a physiological pH region between them.
  - The pH front advance during the EChT correlates very well with the final necrotic area. This indicates that pH front tracking can be used to predict the extent of tumor destruction and thus, the assessment of EChT effectiveness.



- The model allows the calculation of the pH front velocity, useful information for predicting the extension of the treated tissue and with significant implications in EChT optimal operative conditions and dose planning. In particular, it can predict the way in which the evolving pH fronts will cover, in a typical spherical tumor, the active cell spherical casket.
2. The formulation of a new *in silico* one-dimensional ECT model, consists of two submodels: the first model, called *ON Time*, is used during application of electrical pulse, and is based on the numerical solution of the Nernst-Planck equations for ion transport, assuming the condition of electroneutrality. The second model, called *OFF Time*, is used when the pulse is not being applied, and is based on the diffusion-reaction equations. The final model was validated with an *in vitro* model and reveals that:
- The two-step method (or split) of the original differential equations system allowed the integration of two submodels of different time scales: a micro (*ON Time*) and a macro (*OFF Time*), resulting in an extremely robust algorithm.
  - Results suggest that pH fronts during the ECT are immediate and substantial. Since they might give rise to tissue necrosis, an unwanted condition in clinical applications of ECT as well as in irreversible electroporation (IRE) and in electrogenotherapy (EGT), it is important to quantify their extent and evolution.
  - The tracking technique used to follow the space-time evolution of these pH fronts shows that they scale in time as  $t^{\frac{1}{2}}$ , characteristic of a predominantly diffusive process. This is relevant information for predicting the extension of the treatment.
  - Comparing ECT pH fronts with those arising in EChT, a striking result is observed: at the same electric dose applied, anodic acidification is larger in ECT than in EChT, suggesting that tissue necrosis could also be greater. Ways to minimize these adverse effects in ECT are suggested.
3. The formulation of a new *in silico* spherical radial ECT ion transport model in tumor tissue, using spherical geometry and one of the electrodes (anode, for instance) located in the center of the tumor, and the cathode located at a distance far enough from the anode to ensure that the cathodic reactions do not affect the region of the tissue being analyzed. The theoretical model should be validated with an experimental model whose development is still pending. Nevertheless preliminary results show that:
- pH fronts move slower than in the case of the one-dimensional ECT model. This difference may be originated in the amount of electric charge required by each model to maintain the voltage constant during the duration of the pulse. In the case of the spherical radial model, this quantity is much smaller since the area is larger. This results in a lower generation of protons around the anode, and thus, lower acidification.
  - Although the ECT spherical radial model does not take into account anode-cathode interaction, it takes into account the three-dimensional nature of the tumor tissue, which is more a realistic model than a one-dimensional approximation.

In brief, it is expected that results from this study will help to improve the ability of designing effective EChT and ECT treatments. It is also expected that the inclusion of EChT

and ECT alone or in combination with other therapies in medical clinic have significant benefits at a socioeconomical level and improve the quality and length of time of many patients.

**Keywords:** *Numerical Simulation, Computational Physicochemical Hydrodynamic, Finite Differences, Electrochemical Treatment of Tumors, Reversible Electroporation*



*A Sole*



## Agradecimientos

A Guillermo Marshall y Fernando Molina por aceptar dirigirme esta tesis.

A Ceci Suárez, Nahuelito Olaiz y Lucas Colombo por su trabajo en los modelos experimentales y por tanta paciencia que me tuvieron.

A Alejandro Soba por ser mi guía matemático-espiritual.

A Santi Figueira, Diego Garbervetsky y Esteban Mocskos por convencerme de hacer el doctorado (durante una escuela de verano en Río Cuarto).

A Dieguito Slezak por ser un gran compañero de ruta de doctorado.

A los miembros del LSC con los que conviví la mayor parte del tiempo.

A los miembros de la subcomisión de doctorado, que sin su ayuda esto tampoco hubiese sido posible.

A toda la FCEyN y en especial al Departamento de Computación, por hacer que mi lugar de trabajo sea un ambiente más de mi casa.

A Sole por el apoyo incondicional en todo momento.

Y por último y no menos importante a mi familia y amigos que me soportan todo el tiempo.



# Capítulo 1

## Introducción

En la actualidad, el cáncer es una de las enfermedades más comunes y una de las principales causas de deceso en seres humanos. A pesar que las enfermedades cardiovasculares son la primer causa de muerte a nivel mundial (31 % en mujeres y 26 % en hombres), no menos importante deja de ser el cáncer, que le sigue en tercer lugar entre un 12 y 13 % del total (mujeres y hombres) [1]. Lamentablemente Argentina no es la excepción, tal como lo demuestran las estadísticas del Ministerio de Salud (Estadísticas Vitales 2008), donde las muertes por enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar (24 % del total) y las muertes por cáncer el segundo (21 %), estas últimas muy por encima de los valores a nivel global [2]. El cáncer además de ser un problema médico, es un problema económico: el impacto de esta enfermedad en la economía es enorme y la tendencia actual en los países centrales es invertir dinero en investigación, prevención y tratamiento precoz de la enfermedad, ya que el tratamiento en estadíos avanzados resulta ser, a nivel poblacional, una carga económica excesiva y potencialmente inabordable aún por los países con mayores recursos [3–5].

### 1.1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades de los organismos superiores multicelulares. Se caracteriza por alteraciones en la expresión de múltiples genes, que conducen a la desregulación del normal funcionamiento de la división y diferenciación celular. Esto resulta en un desequilibrio de la replicación y muerte celular que favorece el crecimiento de una población de células tumorales. La característica que determina si un cáncer es maligno o benigno (tumor) es la habilidad de invadir localmente, alcanzar los ganglios linfáticos regionales y generar metástasis en órganos distantes del cuerpo. Clínicamente, el cáncer parece ser muchas enfermedades diferentes, con distintas características fenotípicas <sup>1</sup>. Por lo general, el cáncer presenta una gran heterogeneidad en sus características tales como antigenicidad celular, invasión, potencial metastásico, tasa de proliferación celular, estado de diferenciación, respuesta a agentes quimioterapéuticos, etc. [6].

Una característica importante del cáncer es que no sólo se produce en los seres humanos o mamíferos. El Cáncer se ha observado en todos los vertebrados, y hasta en grupos tan antiguos como los cnidarios, equinodermos y cefalópodos [6].

---

<sup>1</sup>**fenotipo:** m. biol. En un organismo, manifestación externa de un conjunto de caracteres hereditarios que dependen tanto de los genes como del ambiente.



## 1.2. Tratamientos contra el cáncer

En el tratamiento de los tumores, es de suma importancia lograr la ablación de manera controlada y precisa del tejido no deseado, sin afectar el tejido sano circundante. Como una alternativa a la resección quirúrgica, han sido desarrollados un gran número de métodos mínimamente invasivos, con el fin de destruir áreas específicas del tejido no deseado. Algunas de estas técnicas se basan en las consecuencias de los efectos térmicos que estas mismas producen. En el caso de bajas temperaturas, por ejemplo, existe la criocirugía [7–9]; en el caso de altas temperaturas, la radiofrecuencia [10, 11]. Por otro lado, existe un grupo de técnicas que no involucran efectos térmicos. Dentro de este grupo, se encuentra un conjunto de técnicas que tienen una característica en común: la aplicación de campos eléctricos.

Los tratamientos de tumores a través de la aplicación de campos eléctricos empiezan a tomar relevancia debido a que se caracterizan por ser seguros, efectivos y a su vez menos onerosos que la cirugía tradicional, quimioterapia, etc.. Dentro de este grupo de tratamientos se pueden mencionar el Tratamiento Electroquímico de Tumores (EChT), la Electroporación Reversible (ECT), la Electroporación Irreversible (IRE) y la Supraporación. Los dos primeros en fase clínica.

A continuación, una breve reseña de cada uno de ellos.

### 1.2.1. EChT

El EChT, también denominado electroterapia o electroacupuntura, consiste en destruir el tejido tumoral utilizando el pasaje de corriente eléctrica continua a través de dos o más electrodos insertos localmente [12] (ver figura 1.1). La técnica se presenta como eficaz, segura, menos traumática que muchas cirugías y quimioterapias, de fácil administración y muy económica. También se ha sugerido que el EChT potenciaría los efectos antineoplásicos de la radio y quimioterapia, minimizando adicionalmente sus efectos secundarios [13–15].

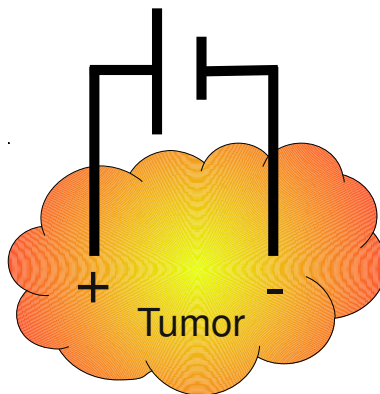


Figura 1.1: Esquema de aplicación del EChT.

A modo de ejemplo, se puede mencionar el trabajo de Xin *et al.* [16], en el cual se aplicó el tratamiento en humanos, realizando varias aplicaciones de 30 min., cada una de ellas a 40-80 miliamperes, 6-8 volts, y una dosis total de entre 80-100 coulombs por cada centímetro de diámetro de tejido tumoral tratado. Durante el tratamiento se produce una marcada acidificación y deshidratación del tejido en la zona del ánodo, así como una gran basificación y edema en la zona del cátodo. Se postula que, el significativo cambio de pH inducido, es uno de los principales factores responsables de la necrosis tisular y que además, el pH es capaz de monitorear confiablemente el nivel de destrucción tisular logrado por el tratamiento [12, 17].

Si bien esta terapia es conocida desde finales del siglo XIX, Bjorn Nordenström (Suecia) es considerado pionero en el tratamiento de tumores con corriente eléctrica en pacientes [18, 19]. A finales de los '70 Nordenström trató tumores primarios de pulmón aplicando una corriente eléctrica entre dos electrodos de platino, reportando en su libro resultados de tratamientos realizados a 26 tumores de pulmón en 20 pacientes. En 12 de los 26 tumores se obtuvo un retroceso sin detectar signos de crecimiento en un período de 2 a 5 años posteriores al tratamiento [18].

Continuando con el trabajo realizado por Nordenström, Xin Yu-Ling y su grupo extendieron el uso del EChT a China, tratando a más de 15 000 pacientes en los últimos 15 años obteniendo resultados clínicos muy alentadores, siendo la tasa de respuesta positiva al tratamiento de un 78 % [16, 20]. En Eslovenia, Miklavcic y colaboradores estudiaron los efectos del EChT en ratones [21–24]. Más recientemente Von Euler *et al.* [25] presentaron resultados sobre proliferación celular y apoptosis en tumores de mama en ratas luego de aplicar el EChT. Si bien hay varios países trabajando en el tema (Brasil [26], Corea [27] y USA [28]), Alemania [29–32], Australia junto a Gran Bretaña [33–35], Cuba [36–40] y China [41–45] parecen ser los de mayor actividad en la actualidad. Una recopilación general del tema se puede ver en [12].

### 1.2.2. ECT

La electroporación es la permeabilización de la membrana celular como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico intenso durante un lapso de tiempo muy corto aplicado a través de la membrana celular. La permeabilización puede ser de carácter temporario (electroporación reversible) o permanente (electroporación irreversible) en función de la magnitud y duración del campo eléctrico, y la cantidad de pulsos aplicados [46]. La electroporación reversible es utilizada para facilitar la penetración, a través de la membrana celular, de moléculas para las cuales la membrana es normalmente impermeable [47–49]. En aquellos tratamientos que involucran el uso de drogas, es de suma importancia que suficiente cantidad de ésta llegue a su sitio blanco (sitio activo). Para que el tratamiento sea efectivo, una droga citotóxica aplicada por vía intravenosa debe atravesar los capilares sanguíneos del tumor, llegar a la matriz intersticial, migrar a través de ésta y penetrar la célula [50].

Así, la ECT [51, 52] implica el uso combinado de agentes terapéuticos y corrientes eléctricas micropulsantes con el fin de incrementar la penetración del agente al interior de la célula y maximizar su efectividad. Esta estrategia busca reducir notablemente la dosis total de droga a administrar y, por lo tanto, los costos y efectos adversos. La ECT utiliza campos pulsantes de alta intensidad (1 000 V/cm), duración del orden de los 100  $\mu$ seg y frecuencias generalmente de 1 Hz, los cuales son capaces de permeabilizar la membrana celular de manera transitoria (electropermeabilización reversible), supuestamente a través de la formación temporaria de poros (electroporación). De esta forma pueden utilizarse drogas con alta eficacia pero poco

permeables en la membrana plasmática (como por ejemplo bleomicina o cisplatino).

La ECT se propone como un método altamente efectivo para el tratamiento de tumores cutáneos y subcutáneos. El tratamiento ya se encuentra en fase de investigación clínica en Europa, habiéndose concluido recientemente con el Estudio ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy), desarrollado en metástasis cutáneas y subcutáneas con muy buenos resultados y elaboración de protocolos de operación estándar [53, 54].

### 1.2.3. IRE

La capacidad de ciertos pulsos eléctricos para permeabilizar de manera irreversible la membrana celular, se la denomina electroporación irreversible y se la conoce desde hace más de tres décadas [55].

En los comienzos de la electroporación, la IRE fue utilizada principalmente para la ablación de microorganismos y células *in vitro* y, estudiada sólo como límite superior de los parámetros eléctricos para la aplicación de la electroporación reversible en tejidos. En [56, 57] se muestra un estudio acerca de los campos eléctricos y los procesos que produce la IRE en una sola célula, utilizando tecnología de microelectroporación.

En el trabajo de Davalos *et al.* [58], se muestra que la IRE permite remover volúmenes sustanciales de tejido sin inducir ningún efecto térmico significativo. Posteriormente, Edd *et al.* [59], aplicaron este tratamiento para la ablación *in vivo* en tejido normal de hígado de rata, logrando la ablación completa del tejido tratado sin inducir daño térmico alguno. También se pudo observar una congestión masiva en vasos sanguíneos en la zona del volumen tratado, efecto complementario que mejora significativamente el tratamiento. El estudio concluye que la IRE produce zonas de ablación muy bien delimitadas. Un estudio más reciente evaluó los efectos a largo plazo de la IRE en un modelo animal de gran tamaño [60], demostrando la capacidad de la electroporación de remover largos volúmenes de tejido utilizando parámetros eléctricos que, si bien son sustancialmente superiores a los utilizados convencionalmente por la electroporación reversible, no provocan significativos efectos térmicos. En [55], Al-Sakere *et al.* reportaron el uso de la IRE para el tratamiento de un tumor cutáneo en ratón, logrando su regresión. En dicho trabajo se utiliza un modelo matemático de campos eléctricos y térmicos para la optimización del protocolo del tratamiento. Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando electrodos de platino, 80 pulsos de 100  $\mu$ s a 0.3 Hz con un campo eléctrico de 2500 V/cm. Bajo las condiciones mencionadas, se indujo la remisión completa en 12 de los 13 tumores tratados (92%), en ausencia total de efectos térmicos significativos en tejido.

### 1.2.4. Supraporación

La Supraporación es otra técnica que no involucra efectos térmicos para eliminar tejidos. Consiste en aplicar pulsos eléctricos del orden de nanosegundos de duración a 40-80 kV/cm de intensidad de campo [61, 62]. R. Nuccitelli *et al.* [63] señalan en su trabajo efectos antitumorales en ratones, luego de aplicada esta técnica. En la Supraporación, los pulsos producidos son mucho más cortos y la magnitud del campo eléctrico aplicado es superior en alrededor de un orden de magnitud a la IRE. La muerte celular producida por la Supraporación no es consecuencia de la permeabilización irreversible de la membrana celular como en la IRE, sino de la probable consecuencia de la liberación de iones  $Ca^{2+}$  dentro de las célula provenientes de las vesículas de almacenamiento interno de  $Ca^{2+}$  (retículos endoplasmáticos), permeabilizadas por los nanopulsos [62].

### 1.3. Motivación

En los trabajos de Nilsson *et al.* [64–67] se estudia el EChT a través de un modelo *in silico* consistente en un sistema de ecuaciones diferenciales de reacción-transporte en coordenadas esféricas. En dicho modelo, sólo se representa un electrodo a la vez, suponiendo el otro electrodo ubicado en el infinito. Esta aproximación no permite analizar la interacción entre ambos electrodos, y por lo tanto no admite el estudio del tratamiento en el caso de electrodos dispuestos a muy corta distancia, como sucede en la práctica clínica. Los perfiles de pH obtenidos a partir de este modelo han demostrado una buena correlación con las zonas de destrucción medidas experimentalmente, suponiendo que un pH por encima y por debajo de ciertos valores provocan una destrucción del tejido. Esto implica que el modelo puede ser de utilidad en la predicción de la destrucción del tumor debido a la aplicación del EChT, y proporcionar así una base para una planificación sistemática de dosis de tratamientos clínicos. Por otra parte, los modelos *in silico* pueden servir como herramientas valiosas en la optimización de las condiciones de funcionamiento del EChT.

En base a estos resultados se decidió ampliar el estudio del EChT a su relación con la destrucción de tejido y a los frentes de pH producidos para el caso de electrodos dispuestos a muy corta distancia. La ocurrencia de cambios de pH también podría estar ocurriendo en las otras terapias anteriormente mencionadas (ECT, IRE, Supraporación). Es por ello que se decidió incursionar en el análisis de este aspecto no sólo para EChT sino para estas últimas también.

### 1.4. Metodología

A pesar de los avances experimentales, teóricos y clínicos realizados, hay mecanismos relacionados con los tratamientos que utilizan campos eléctricos que continúan siendo desconocidos. De esta manera, acceder a un mejor entendimiento de los mecanismos fundamentales implicados en estas terapias permitiría elaborar una estrategia confiable que posibilitaría una optimización de la misma. En este contexto, nuestro objetivo es utilizar una triple metodología combinando modelos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. La combinación de estos tres modelos nos permite abordar el problema desde distintas facetas complementarias.

El modelo *in vivo* se basa en aplicar el tratamiento a un tumor sólido inoculado de manera subcutánea en un ratón. 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 [68].

En el modelo *in vitro* se aplica el tratamiento a un gel de colágeno tipo I, asumiendo que el gel posee propiedades fisicoquímicas e hidrodinámicas parecidas a las que se encuentran en el intersticio de un tumor sólido. El uso del colágeno se basa en que éste constituye más del 70% del intersticio del tumor. Más aún, evidencia previa indica que el gel de colágeno tipo I puede ser un buen modelo inicial simplificado del transporte de especies en la matriz extracelular dentro del tumor [69, 70]. También se ha utilizado como modelo *in vitro* el gel de agar debido a que es más conveniente para estudios ópticos y más resistente a los efectos electroquímicos.

El modelado *in silico* o numérico del cáncer es una herramienta poderosa que puede proporcionar más información sobre los mecanismos de evolución y crecimiento de un tumor. Involucra tanto a los modelos matemáticos como a la simulación numérica. En el presente trabajo, el modelo matemático consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales de reacción-transporte en un dominio espacial fijo que describe las leyes de conservación físico-químicas, cuya solución se obtiene a través de métodos numéricos. En la actualidad es un área activa de investigación y una revisión recomendable se puede encontrar en el libro de Preziosi [71]. Un trabajo pionero en el tema fue hecho por Jain y su grupo del Laboratorio Steele, del Departamento de Oncología Radioterapia, Hospital General de Massachusetts y Harvard Medical School, Boston, EE.UU. [72–75]).

El plan de esta tesis es el siguiente. En el capítulo 2, se propone un primer modelo del EChT de electrodos próximos; en el Capítulo 3, éste es mejorado, proponiendo un segundo modelo más realista. Para analizar los resultados obtenidos extrapolándolos a otras terapias, en el capítulo 4 se propone un modelo para la ECT y se lo compara con los del EChT. En el capítulo 5, se extiende el modelo anterior para modelar la ECT en una geometría radial esférica. Finalmente, el capítulo 6 cierra el presente trabajo con las conclusiones generales obtenidas y futuras líneas de trabajo que surgieron a partir del presente estudio.

## Capítulo 2

# Modelo de Electroterapia con Electroodos Próximos

El grupo de Nilsson *et al.* fue precursor en la introducción de modelos *in silico* para el EChT, dando origen a numerosos trabajos [64–67]. En ellos se describe el transporte de iones en una zona cercana a uno de los electrodos –ánodo o cátodo, de manera independiente– por medio de un modelo cuasi-tridimensional utilizando las ecuaciones de Nernst-Planck bajo la hipótesis de electroneutralidad.

En su primer modelo la matriz tisular se aproxima a una solución salina (NaCl). En las mejoras sucesivas del modelo, se lo extiende para incluir los efectos reguladores de pH, y el transporte y reacción de cloro y especies cloradas. Los resultados fueron comparados con datos experimentales del tratamiento en tejido normal de ratas, obteniendo una buena descripción del perfil de pH cerca del electrodo luego de la aplicación del EChT.

En su último modelo [67], se estudia el transporte de iones cerca del cátodo, mostrando que los perfiles de simulación de pH se encuentran fuertemente correlacionados con el tamaño de las lesiones medidas experimentalmente, lo que confirma que la concentración de iones hidroxilo determina el tamaño de la lesión alrededor del cátodo. También se sugiere que el modelo podría ser utilizado para predecir el tamaño de la lesión producida por el EChT.

Los modelos propuestos por Nilsson *et al.* poseen una importante limitación: utilizan simetría esférica. De esta manera, sólo es posible representar un solo electrodo a la vez, suponiendo el electrodo opuesto ubicado en el infinito. De esta manera, no permite analizar la interacción entre ambos electrodos, y por lo tanto no es posible el estudio del tratamiento en el caso de electrodos dispuestos a muy corta distancia, como generalmente suele aplicárselos.

Dado que el estudio del transporte iónico en Electrodeposición en Celda Delgada (ECD) tiene muchas analogías con el EChT, los conocimientos obtenidos pueden ser aprovechados para avanzar en el conocimiento de este último. La ECD consiste en dos portaobjetos de vidrio que encierran dos electrodos paralelos y un electrolito (por ej. sulfato de cobre en agua destilada); la aplicación de una diferencia de potencial entre electrodos produce un depósito ramificado por reducción del ion metálico. Variando los parámetros de control, tales como la orientación de la celda respecto a la gravedad, la concentración de la solución, la diferencia de potencial aplicada o el espesor de la celda, se obtiene una amplia variedad de patrones de crecimiento que van desde morfologías fractales hasta morfologías densamente ramificadas. El crecimiento dendrítico es acompañado por un complejo proceso fisicoquímico hidrodinámico de transporte iónico. Éste es principalmente gobernado por la difusión, migración y convec-

ción. A su vez, la convección se produce por las fuerzas de Coulomb debidas a cargas eléctricas locales y por la gravedad debida a gradientes de concentración que llevan a gradientes de densidad. [76–82]. Un aporte importante de estos trabajos es el análisis teórico y experimental de los frentes de concentración que se generan, que permiten justificar algunos fenómenos que ocurren en dichos procesos.

Tomando como base los trabajos previos en EChT de Marshall *et al.* [76–82], en el presente capítulo se introduce un primer modelo *in silico* de EChT para dos electrodos próximos, utilizando las ecuaciones de Nernst-Planck de transporte de iones en un electrolito, aplicado a cuatro especies (las más representativas del sistema), y la ecuación de Poisson para el potencial electrostático en condiciones galvanostáticas. Los resultados obtenidos son comparados con los obtenidos en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Dichos resultados han sido publicados en [83].

El capítulo continúa de la siguiente manera. En las secciones 2.1, 2.2 y 2.3 se introducen los modelos *in silico*, *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Luego, en la sección 2.4 se muestran los resultados obtenidos a partir del modelo *in silico*. En la sección 2.5 se analizan los resultados de los modelos *in vivo* e *in vitro* y se los compara entre sí. En la sección 2.6, se realiza una comparación entre los resultados *in silico*, *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, el capítulo finaliza con una breve conclusión en la sección 2.7.

## 2.1. Modelo *in silico* con electrodos próximos

En el modelo de electrodos próximos, cuando el tejido o el gel es sometido al EChT, la energía eléctrica es empleada en producir reacciones electroquímicas en los electrodos. Algunas sustancias disueltas del medio son consumidas por las reacciones de los electrodos y se producen nuevas especies, que pueden tener efectos tóxicos sobre las células. Las especies iónicas que se producen en el ánodo y cátodo son transportadas a los alrededores principalmente por difusión –derivada del gradiente de concentración–, y migración –originada por la presencia de gradientes de potencial–. Se puede considerar que el tejido es un medio heterogéneo que contiene una fase celular discontinua y una fase extracelular continua. Cuando una corriente es aplicada a un tejido, ésta es transportada principalmente por la vía líquida extracelular. Esto puede ser confirmado por el efecto electroosmótico observado durante el EChT [18]. Si bien el transporte por convección puede estar presente en el modelo *in vivo* (principalmente causado por la circulación sanguínea), en el modelo *in vitro* la situación es diferente ya que la convección se puede considerar despreciable debido a la misma estructura del gel.

Por otra parte, es importante mencionar que debido al transporte de solutos a través de la membrana celular, los cambios introducidos en la concentración extracelular afectan también a la composición de electrolitos en el compartimiento intracelular. Sin embargo, la naturaleza y la duración de este proceso, durante el EChT, no son muy conocidas [67].

La elección del material que compone los electrodos es un punto fundamental del tratamiento [65]. A modo de ejemplo, si el material del ánodo fuese electroquímicamente soluble, como ser el caso del cobre, la mayor parte de la corriente anódica estaría destinada a la disolución de dicho metal. Los iones metálicos serían transportados hacia el tejido circundante, donde ejercerían efectos tóxicos específicos, según el metal. Por otra parte, si el metal disuelto anódicamente formase un compuesto no conductor en la superficie del ánodo (por ejemplo,  $AgCl$  o  $Ag_2O$ ), se terminarían obteniendo fluctuaciones de corriente, pudiendo esto afectar

negativamente en el tratamiento [18].

En nuestro caso, el material elegido para el ánodo ha sido platino, el cual es suficientemente inerte ya que su potencial de reducción es alto. Esto permite despreciar la disolución del metal, siendo así las principales reacciones que se observan: la descomposición del agua y la oxidación de las sustancias ya disueltas en ésta. En el caso de tejidos biológicos, estas reacciones involucran la evolución del oxígeno y cloro, junto a una acidificación, a través de las siguientes reacciones:



En el caso del cátodo la elección del material es menos crítica que para el ánodo. En el cátodo, el material está protegido contra la disolución electroquímica por el potencial catódico (negativo). Sin embargo, en ausencia de corriente y por razones de higiene, se suelen elegir materiales resistentes a las condiciones químicas reinantes en el tejido. El platino y el oro pueden ser materiales adecuados para utilizar en el cátodo, siendo la principal reacción catódica, la descomposición del agua en hidrógeno molecular e iones hidroxilo:



La densidad de corriente (corriente por unidad de área) es uno de los principales parámetros del EChT. Ésta determina el sobrepotencial eléctrico en el ánodo y por lo tanto la distribución cuantitativa entre las dos reacciones principales del ánodo: las evoluciones de oxígeno y cloro.

Como una primera aproximación, el tejido será considerado como una solución acuosa de cloruro de sodio 0,16 M (principal sal presente en el compartimento extracelular) y pH 7. Sólo 4 especies iónicas son tenidas en cuenta en el análisis: iones de hidrógeno ( $H^+$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ), cloro ( $Cl^-$ ) y sodio ( $Na^+$ ). En este modelo no se considera la capacidad de regulación del tejido.

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

- Los únicos mecanismos que participan en el transporte de las especies iónicas son la difusión y la migración. La convección, en este modelo, se considera nula.
- 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 ánodo de platino.
- 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 presentadas allí, donde se utiliza electrodos de platino en diversas soluciones acuosas.
- No se tienen en cuenta efectos osmóticos. En realidad, la electroósmosis puede ser importante, ya que causa la pérdida de agua alrededor del ánodo. Sin embargo, el efecto puede ser contrarrestado mediante el suministro periódico, en esa zona, de solución fisiológica de cloruro de sodio.



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 las especies iónicas  $i$  puede ser expresado como [84–86]:

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

Donde  $\phi$  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, y siendo  $i = H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ .  $z_i$  es una cantidad con signo, siendo positiva para cationes y negativa para aniones.

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

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

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



En términos de  $R_i$ , esto se traduce en:

$$R_{H^+} = R_{OH^-} = k_{w,b} C_{H_2O} - k_{w,f} C_{H^+} C_{OH^-} \quad (2.7)$$

$$R_{Cl^-} = R_{Na^+} = 0 \quad (2.8)$$

donde  $k_{w,b}$  y  $k_{w,f}$  representan las constantes de velocidad de la reacción del agua (ecuación 2.6) en dirección hacia atrás (backward) y hacia adelante (forward), respectivamente.

Con corriente y campos eléctricos presentes, deben utilizarse las leyes de la electrodinámica (ecuaciones de Maxwell) junto con las de la mecánica de fluidos. Si no hay campo magnético aplicado y se desprecian los campos magnéticos inducidos por la corriente tanto como los inducidos por los campos eléctricos variables en el tiempo, entonces el problema electrodinámico se reduce a un problema electroestático.

Este problema puede ser especificado mediante la *ecuación de Poisson*, que relaciona la variación espacial del campo eléctrico con la distribución de cargas, la cual, para un medio con constante dieléctrica absoluta  $\epsilon$  se puede expresar como:

$$\nabla^2 \phi = -\frac{F}{\epsilon} \sum_i z_i C_i \quad (2.9)$$

donde  $F$  representa la constante de Faraday y  $z_i$  es una cantidad con signo, que representa la cantidad de cargas de la especie  $i$ ; positiva para los cationes y negativa para los aniones.

## Adimensionalización

Con el objetivo de simplificar el análisis de la parametrización física del problema a tratar, se realiza una transformación algebraica [87–89]. Así, el sistema de ecuaciones queda transformado en:

$$\frac{\partial C_i^*}{\partial t^*} = -\nabla \cdot J_i^* \quad (2.10)$$

$$J_i^* = -\frac{1}{Pe_i} \nabla C_i^* - \frac{z_i}{|z_i|} \frac{1}{M_i} C_i^* \nabla \phi^* + R_i^* \quad (2.11)$$

$$\nabla^2 \phi^* = \frac{1}{Po} \sum_i z_i C_i^* \quad (2.12)$$

siendo

$$t^* = \frac{t}{t_0}; \quad \phi^* = \frac{\phi}{\phi_0}; \quad C_i^* = \frac{C_i}{C_0}; \quad J_i^* = \frac{J_i}{J_0};$$

Las variables  $t_0$ ,  $\phi_0$ ,  $C_0$  y  $J_0$  son valores de referencia para el tiempo, potencial electrostático, concentración y flujo de las especies iónicas que se explicitan más adelante,  $x$  es la variable espacial y  $t$  la temporal. Estas ecuaciones son válidas en el dominio:  $0 < x < XX$  y  $0 < t < +\infty$ , donde  $XX$  es una constante positiva a definir.

Los números adimensionales  $M_i$ ,  $Pe_i$  y  $Po_i$  se detallan en la tabla 2.1.

Número	Símbolo	Definición
Migración	$M_i$	$\frac{x_0^2}{t_0 \phi_0 u_i}$
Pelet	$Pe_i$	$\frac{x_0^2}{t_0 D_i}$
Poisson	$Po_i$	$\frac{\epsilon \phi_0}{x_0^2 C_0 e}$

Tabla 2.1: Definición de los números adimensionales, donde  $e$  es la magnitud de la carga de un electrón,  $x_0$ ,  $t_0$ ,  $\phi_0$ ,  $C_0$  son valores de referencia para la longitud, el tiempo, el potencial electrostático y la concentración respectivamente.

Para tener una idea de la magnitud de los números adimensionales, asumiendo que la distancia entre electrodos es de 3 cm, resultan en:  $M_{H^+} = 2777$ ,  $M_{OH^-} = 5000$ ,  $M_{Cl^-} = 13235$ ,  $M_{Na^+} = 20000$ ,  $Pe_{H^+} = 9,6 \cdot 10^4$ ,  $Pe_{OH^-} = 1,7 \cdot 10^5$ ,  $Pe_{Cl^-} = 4,4 \cdot 10^5$ ,  $Pe_{Na^+} = 6,7 \cdot 10^5$ , y  $Po = 0,04$  (los valores de referencia utilizados aquí fueron:  $x_0 = 3$  cm,  $t_0 = 1$  s,  $\phi_0 = 1$  V,  $C_0 = 1,0 \cdot 10^8$  M). El rango de valores de los números adimensionales refleja la amplia gama de escalas involucradas en este tipo de procesos [82].

## Condiciones de borde

Para todas aquellas especies que participan en las reacciones que ocurren en los electrodos, la transferencia de carga y el transporte de masa en la superficie de los electrodos, se asume que suceden a la misma velocidad. En cambio, para las especies restantes, el transporte de masa es nulo. Así, basado en el modelo de ECD e incorporando las ecuaciones que modelan la transferencia de carga ocurridas en los electrodos –cuyo desarrollo se puede consultar en [65]–, las condiciones de borde en el ánodo quedan definidas de la siguiente manera:

$$-\frac{1}{Pe_i}(\nabla C_i^* \cdot \mathbf{n}) - \frac{z}{|z|} \frac{1}{M_i} C_i^* (\nabla \phi^* \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j^*}{n_j F^*} \quad (2.13)$$

para  $i=H^+, Cl^-$ ;  $j=1,2$

$$-\frac{1}{Pe_i}(\nabla C_i^* \cdot \mathbf{n}) - \frac{z}{|z|} \frac{1}{M_i} C_i^* (\nabla \phi^* \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.14)$$

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

$$I^* = I_1^* + I_2^* \quad (2.15)$$

y en el caso del cátodo:

$$-\frac{1}{Pe_i}(\nabla C_i^* \cdot \mathbf{n}) - \frac{z}{|z|} \frac{1}{M_i} C_i^* (\nabla \phi^* \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j^*}{n_j F^*} \quad (2.16)$$

para  $i=OH^+$

$$-\frac{1}{Pe_i}(\nabla C_i^* \cdot \mathbf{n}) - \frac{z}{|z|} \frac{1}{M_i} C_i^* (\nabla \phi^* \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (2.17)$$

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

donde  $j=1$  y  $j=2$  representan a las reacciones correspondientes a la evolución del oxígeno (2.1) y cloro (2.2) respectivamente,  $n_j$  representa a la cantidad de electrones transferidos en la reacción electroquímica  $j$  y  $\nu_{i,j}$  el coeficiente estequiométrico de la especie  $i$  en la reacción  $j$ .  $I$  e  $I_j$  representan la densidad de corriente total aplicada y la densidad de corriente parcial que aporta la reacción electroquímica  $j$ , respectivamente. Siendo,

$$I^* = \frac{I}{I_0}; \quad I_j^* = \frac{I_j}{I_0}; \quad F^* = \frac{FC_0 x_0}{t_0 I_0};$$

La densidad de corriente parcial correspondiente a la evolución del oxígeno está dada por la ecuación de Butler-Volmer [86], la cual se presenta a continuación sin adimensionalizar:

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

y la densidad de corriente parcial  $I_2$  correspondiente a la evolución del cloro está dada por:

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

donde  $R$  representa la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta.  $I_j^{eq}$  representa la densidad de corriente de intercambio de la reacción  $j$  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  $C_i^0$  son la presión parcial y la concentración inicial de la especie  $i$ , respectivamente.  $\frac{P_i}{P_i^{eq}}$  se asume igual a 1 para todas las especies  $i$ .

En lo que sigue, por comodidad, se deja de utilizar el asterisco en las cantidades adimensionales de las ecuaciones anteriores.

## Condiciones iniciales

Como condiciones iniciales,  $t = 0$ , se impone un gradiente de concentración nulo en todo el dominio. Los valores de concentración inicial utilizados, se encuentran detallados en la tabla 2.2. El potencial en el ánodo fue calculado a partir de la ecuación 2.15. Una función rampa fue utilizada para el cálculo del potencial entre el cátodo y el ánodo.

### 2.1.1. Modelo computacional

Debido a la naturaleza no lineal del sistema de ecuaciones (2.10) - (2.12), su resolución excluye una solución exacta, dejándonos sólo la opción de encontrar una solución aproximada.

El modelo computacional resuelve el sistema de ecuaciones del modelo matemático para cada paso de tiempo, en un dominio fijo en una malla uniforme, utilizando diferencias finitas y un método iterativo fuertemente implícito (aproximación de promedio ponderado con parámetro de ponderación temporal igual a uno).

La utilización de un método fuertemente implícito implica el uso de iteraciones internas en cada paso de tiempo, utilizando el método Successive Over Relaxation (SOR) [90].

El parámetro de relajación es variable y dependiente del problema. En general se utilizó subrelajación con el parámetro de relajación cercano a 0,8.

En concordancia con lo anterior, para cada paso interno de iteración  $m$  se chequea la siguiente condición de convergencia:

$$res_{int} = \max_i \left| u_i^{n+1,m} - u_i^{n+1,m-1} \right| < 10^{-6} \quad u = H^+, OH^-, Cl^-, Na^+, \phi$$

donde  $i$  corresponde al iésimo nodo de la malla.

Cumplida esta condición se avanza al siguiente paso de tiempo.

Si el programa no converge después de las 50 000 iteraciones, la ejecución del mismo es interrumpida. Las ejecuciones realizadas para el presente trabajo nunca sobrepasaron dicha cantidad de iteraciones.

El modelo computacional fue escrito en el lenguaje C y su ejecución se realizó en un equipo Pentium con Windows XP. Los parámetros utilizados para las corridas se encuentran detallados en la tabla 2.2. Para todas las ejecuciones se utilizó una malla de 1000 nodos y un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-3}$ . Los tiempos totales de simulación fueron desde  $T = 1000$  hasta  $T = 2600$ , dependiendo de la dosis del tratamiento simulado.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$D_{H^+}$	$9,31 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/s$	$D_{OH^-}$	$5,26 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/s$
$D_{Na^+}$	$1,33 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/s$	$D_{Cl^-}$	$2,03 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/s$
$u_{H^+}$	$3,24 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$	$u_{OH^-}$	$1,8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$
$u_{Na^+}$	$4,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/Vs$	$u_{Cl^-}$	$6,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/Vs$
$C_{H^+}^0$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$C_{OH^-}^0$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
$C_{Na^+}^0$	1,0	$C_{Cl^-}^0$	1,0
$C_{H_2O}^0$	347	$T$	298 K
$k_{w,f}$	$2,4917 \cdot 10^8$	$k_{w,b}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$
$I_1^{eq}$	$1 \cdot 10^{-10}$	$I_2^{eq}$	$1 \cdot 10^{-3}$
$E_1^{eq}$	1.23	$E_2^{eq}$	1.36
$x_0$	1 cm	$t_0$	1.0 s
$\phi_0$	1.0 V	$C_0$	$1,0 \cdot 10^8 \text{ M}$

Tabla 2.2: Parámetros utilizados por el modelo numérico. Los valores que no presentan unidades corresponden a valores adimensionales.

La viscosidad del fluido se tiene en cuenta a través de los valores de los coeficientes de difusión y movilidad. Debido a la disparidad de escalas no ha sido posible simular números adimensionales realistas. Números adimensionales realistas dieron lugar a problemas de estabilidad numérica. En este contexto, para las condiciones iniciales en  $t = 0$  se eligieron  $C_{H^+} = C_{OH^-} = 10^{-7}$  y  $C_{Cl^-} = C_{Na^+} = 1,0$ .

Todos los resultados *in silico* son presentados en forma adimensional mas adelante, luego de introducir los modelos *in vivo* e *in vitro*

## 2.2. Modelo *in vivo*

El modelo *in vivo* propuesto para el EChT consiste en el tratamiento de tumores subcutáneos en ratones a los que se les aplican tres dosis distintas de EChT (medidas en Coulomb). Finalmente se mide, alrededor de uno de los electrodos, la destrucción tisular por necrosis y los perfiles de pH en el tejido.

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 3-4 meses de edad portadores de un tumor subcutáneo inducido artificialmente por inyección de tejido tumoral de la línea M2. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas, estándares y ética actuales del National Institutes of Health de EEUU (NIH). El adenocarcinoma mamario M2 surgió espontáneamente en un ratón hembra Balb/c del Instituto de Oncología Angel H. Roffo y actualmente es mantenido por sucesivos implantes *in vivo* subcutáneos en el flanco de ratones singeneicos. Este tipo de tumor ha sido bien caracterizado, y posee relativamente bajo desarrollo de necrosis y gran capacidad metastásica. Dichos tumores subcutáneos (pasaje *in vivo* 137 a 141) fueron sometidos al EChT al alcanzar un tamaño de  $1,5 \text{ cm}^2$  de área.

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos y tratados a diferentes dosis de carga eléctrica, con una corriente eléctrica continua constante: 10 C (10 mA, 17 min), 30 C (17 mA, 29 min) y 50 C (20 mA, 42 min). Estas dosis fueron seleccionadas en base a datos publicados en trabajos anteriores [15]. Todos los animales fueron tratados bajo anestesia

general (solución ip Ketamina-Xilacina, 0,01 ml/g) . Un electrodo de platino puntual (ánodo) de 1 mm de diámetro fue insertado en el centro del tumor en dirección cráneo-caudal, mientras que el cátodo fue insertado por vía subcutánea apartado del ánodo. La corriente eléctrica fue aplicada utilizando una fuente de alimentación de corriente continua (Consort E835, Bélgica). Tanto la corriente como la tensión fueron monitoreadas continuamente. Para evitar contracciones musculares, rampas lineales de corriente de 2 minutos fueron aplicadas al inicio del tratamiento.

Finalizado el EChT, los ratones fueron sacrificados y el tumor fue abierto longitudinalmente por la mitad, a lo largo del plano de inserción de los electrodos. El área de necrosis macroscópica, definida por una zona casi esférica de color oscuro alrededor del electrodo, fue medida a lo largo del eje longitudinal del tumor.

Para estudiar los perfiles espaciales de pH luego del EChT, los resultados se tomaron sobre 5 experimentos con 3 ratones por grupo en cada experimento (total:  $3 \times 5 = 15$  ratones por grupo). Siguiendo los procedimientos idénticos a los descritos anteriormente, se hicieron mediciones de pH entre 5 y 10 minutos después del corte de corriente, con electrodos microcombinados de 1,5 mm de diámetro (PHR-146, Lazar Research Lab, Inc., CA). Los valores fueron tomados cada 2 mm en dirección radial desde el centro del tumor (donde había sido ubicado el ánodo), hacia la periferia llegando incluso hasta el tejido sano.

Las zonas de color marrón oscuro que fueron observadas se atribuyen a la formación de hematina ácida y básica [91]. Los patrones de color de las lesiones concuerdan con los resultados encontrados en otros estudios [92]. En la figura 2.1 se presentan resultados del diámetro de necrosis anódica en función de la dosis de carga eléctrica aplicada. El diámetro está definido por la zona casi esférica de color marrón oscuro rodeando el ánodo, atribuida a la formación de hematina. Los patrones de color de las lesiones revelan que el área de necrosis macroscópica escala de forma lineal con la dosis de carga suministrada. Un análisis estadístico ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre las dosis. Específicamente, la prueba de Tukey para comparaciones post-hoc mostraron que para la dosis de 50 C se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las de 10 C y 30 C ( $11.46 \pm 3.2$  y  $17.5 \pm 3.2$  mm para 10 y 30 C respectivamente,  $p = 0,0002$ ). El transporte de agua, desde el ánodo al cátodo, también causó una deshidratación severa en el tejido alrededor del ánodo y un edema significativo en el cátodo. En la dosis más alta, también se observó la formación de una burbuja de gas, probablemente formada por una acumulación de hidrógeno en estado gaseoso originado en el cátodo.

La figura 2.2 presenta la distribución de pH entre el ánodo y la periferia. Se revela que la acidez es extrema en el ánodo y que rápidamente varía hacia la periferia, retornando a valores fisiológicos. Esto indica que el tejido, a pesar de la gran capacidad buffer que posee tanto de origen inorgánico como orgánico, no es capaz de neutralizar la importante alteración del pH producida por el tratamiento. Esto es lo que constituye uno de los principales mecanismos deletéreos del tratamiento. Valores extremos de pH cerca del ánodo deben ser tomados con cautela y considerarse sólo cualitativamente, ya que están fuera del rango dinámico del medidor. Un análisis estadístico ANOVA de medidas repetidas muestran que las diferencias espaciales de pH son significativas ( $p < 0,00001$ ), pero las diferencias entre las dosis no lo son ( $p = 0,08$ ).

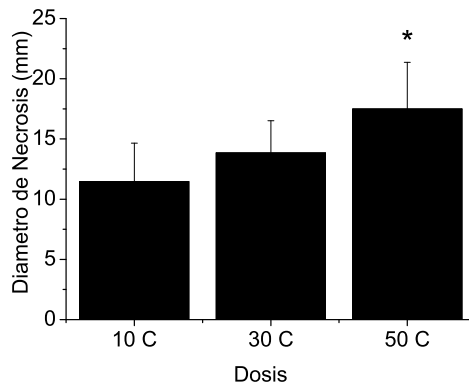


Figura 2.1: Diámetro de necrosis anódica inducido en tumores subcutáneos de ratón sometidos a un EChT bajo diferentes dosis de carga eléctrica (10, 30 y 50 C);  $p < 0,05$ .

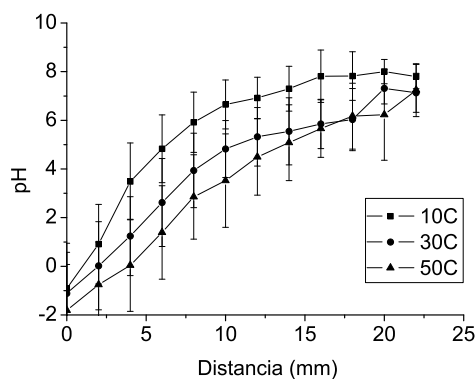


Figura 2.2: Valores de pH vs. distancia al ánodo resultantes de una EChT aplicada bajo diferentes dosis de carga eléctrica (10 C, 30 C y 50 C) en tumores subcutáneos de ratón.

### 2.3. Modelo *in vitro*

El modelo *in vitro* se basa en la aplicación del EChT a geles de colágeno tipo I y agar bajo diferentes dosis de corriente, para finalmente, analizar su perfil de pH.

Para las mediciones del EChT aplicado a gel de colágeno, se diluyó colágeno tipo I en agua destilada a diferentes concentraciones (30 mg/ml y 50 mg/ml), se agregó *NaCl* alcanzando una concentración final de 160 mM y se agudó hasta su gelificación. Ambas concentraciones fueron elegidas con el fin de simular diferentes consistencias de la estructura básica de la matriz extracelular de los tumores, ya que se ha observado que pueden variar desde más densos (por ejemplo, tumores subcutáneos) a menos densos (por ejemplo, tumores cerebrales) [93]. También se ha descrito que el contenido de colágeno podría ser el principal componente responsable de determinar el nivel de consistencia [69]. En la aplicación del EChT, se utilizaron tres dosis de Coulomb diferentes: 3 C (10 mA, 5 min), 10 C (10 mA, 17 min) y 30 C (17 mA,

29 min). En el gel se insertaron dos electrodos de platino (diámetro de la punta de 1 mm), con una separación de 3 cm entre ellos. Se aplicó una corriente eléctrica constante continua con una fuente de alimentación (Consort E835, Bélgica). Tanto la corriente como la tensión fueron monitoreadas continuamente. Al final del tratamiento fueron tomadas mediciones de pH en el gel cada 2 mm, por medio de la combinación de micro-electrodos descriptas anteriormente, a lo largo de una línea entre los dos electrodos y alejándose desde ellos hacia la periferia.

Para las mediciones del EChT aplicado en agar-agar, fue utilizado un agar deshidratado para uso microbiológico en una concentración de 1g/100ml. Fueron agregados *NaCl* alcanzando una concentración final de 160 mM, y fenolftaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) como indicador ácido-base. De la solución resultante se elaboró una película de 0,26 cm de espesor. Fueron empleados electrodos de platino puntuales de 1 mm de diámetro, sumergidos 2 mm en el gel y separados entre ellos a 4 cm. El seguimiento de frentes de pH se realizó con una técnica de absorción óptica descrita en [79]. En este caso particular, isolíneas de pH 8-9 corresponden al cambio de color de la fenolftaleína. La iluminación se realizó a través de un led de alta intensidad con longitud de onda cercana a la absorción máxima del indicador en su forma básica (374 nm). Imágenes de la cámara de video fueron capturadas a 0,2 cuadros/s a una resolución de 455 pixels/cm.

### Modelo Gel de Colágeno Tipo I

Mediciones del EChT en gel de colágeno obtenidas a partir de cuatro experimentos independientes se presentan en la figura 2.3. Un análisis estadístico ANOVA de medidas repetidas muestran que las diferencias espaciales de pH entre las distintas regiones y las dosis son significativas ( $p < 0,00001$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente), aunque no hay diferencias significativas entre las concentraciones de gel.

Como era de esperar, hay un crecimiento del área básica alrededor del cátodo (figura 2.3, primera columna) y de la zona ácida alrededor del ánodo (figura 2.3, última columna) a medida que se aumenta la dosis (mayor corriente implica mayor concentración iónica y por lo tanto mayor gradiente y mayor velocidad de difusión). Como consecuencia de ello, el perfil de pH en las zonas cercanas a los dos electrodos muestra pendientes más suaves a medida que aumenta la dosis de carga. Una vez más, valores extremos de pH, cerca de los electrodos deben tomarse con cautela y considerarse sólo cualitativamente, ya que se encuentran fuera del rango dinámico del medidor. También se observó un perfil de pH cátodo-ánodo que cambia de manera significativa según la dosis (figura 2.3, columna central), donde a dosis más bajas se puede observar una región intermedia de pH casi neutro, que desaparece a dosis más altas. Esto corresponde a la expansión gradual de los frentes de pH que salen de cada electrodo, hasta el momento de su encuentro. También se observó desnaturalización del colágeno cerca de los dos electrodos, que es coherente con los valores extremos de pH encontrados en esos puntos.

### Modelo Gel de Agar

La figura 2.4 muestra imágenes de la región alcalina catódica, casi esférica (representada por píxeles oscuros, con el cátodo en el centro), tomadas a 75, 150, 225 y 300 segundos, durante la aplicación del EChT en gel de agar. El contraste de las imágenes fue realizado utilizando un indicador ácido-base, una técnica de absorción óptica y el post-procesamiento



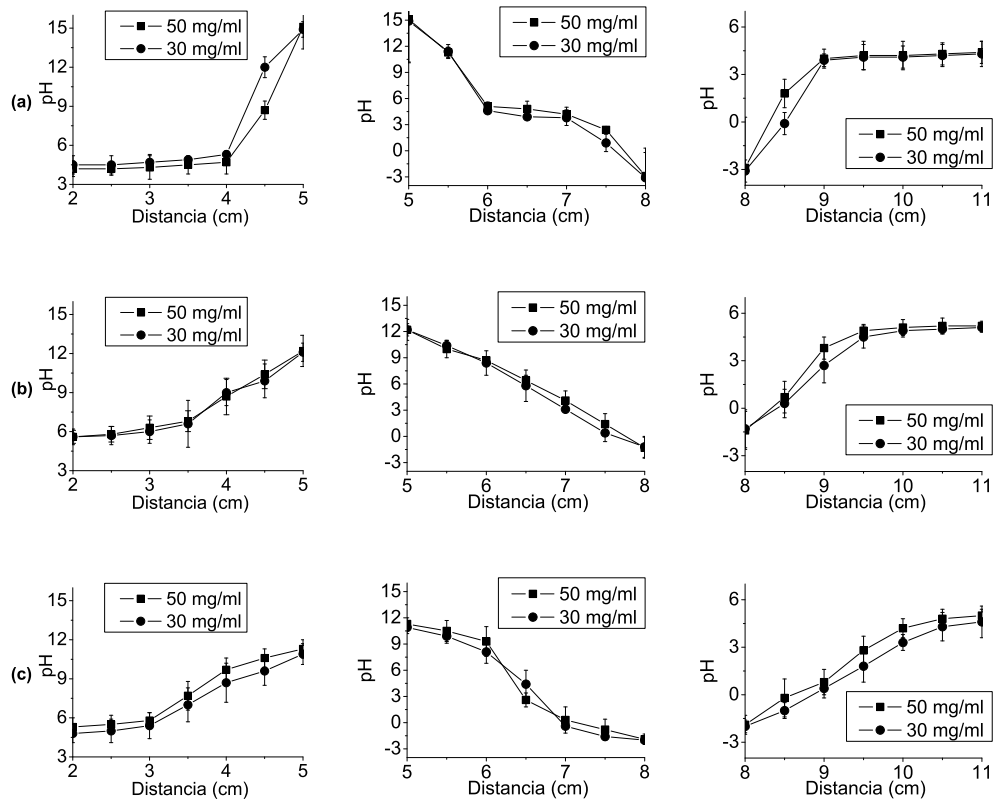


Figura 2.3: Perfil de pH vs. distancia, para distintas dosis de carga eléctrica (3, 10 y 30 C) en un gel de colágeno tipo I preparado a diferentes concentraciones (50 y 30 mg/ml). (a): 3 C, (b): 10 C, y (c): 30 C. Primera columna: distancia periferia-cátodo; columna central: distancia cátodo-ánodo; última columna: distancia ánodo-periferia

de la imagen. La frontera de estas regiones (una capa de transición más bien delgada) puede ser tomada como una línea constante de pH correspondiente a la transición de la fenoltaleína ( $\text{pH} = 8,5$  aproximadamente). Esta línea es la que se utiliza para realizar, en el tiempo, el seguimiento de los frentes de pH a los cuales se alude en los gráficos de resultados.

La figura 2.5(a) muestra el seguimiento en el tiempo de las isóneas del frente de pH 8-9 catódico en una escala logarítmica para diferentes densidades de corriente eléctrica (tomado de experiencias similares a la mostrada en la figura 2.4). La figura revela que a medida que transcurre el tiempo, el frente de pH escala en el tiempo como  $t^{0,58}$ ,  $t^{0,51}$ , y  $t^{0,57}$  para las distintas densidades de corriente eléctrica. Éste se encuentra cercano a  $t^{1/2}$ , lo cual es característico del transporte por difusión, lo que indica que la convección es despreciable por la alta viscosidad del gel empleado. Así, el transporte de los iones  $\text{OH}^-$  es prácticamente difusivo y el transporte de corriente se estaría realizando principalmente a través del electrolito soporte ( $\text{NaCl}$ ).

La figura 2.5(b) muestra las mediciones de pH entre el cátodo y el ánodo realizadas 600 segundos después de aplicar el EChT (10 mA). El pH fue medido utilizando el electrodo micro-combinado descrito anteriormente. Esta figura revela la presencia de una meseta de pH a media distancia entre el ánodo y el cátodo, mostrando la situación anterior al encuentro

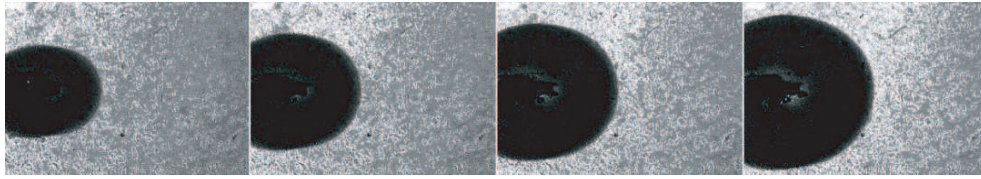


Figura 2.4: Modelo del EChT aplicado a gel de agar, donde se pueden observar imágenes de la región alcalina catódica casi esférica (vista como píxeles oscuros) con el cátodo ubicado en el centro. Imágenes tomadas a los 75, 150, 225 y 300 segundos. Experimento realizado a 5 mA. Tamaño de imagen 1.1 cm x 1.5 cm.

del frente de pH alcalino catódico, con el frente ácido anódico.

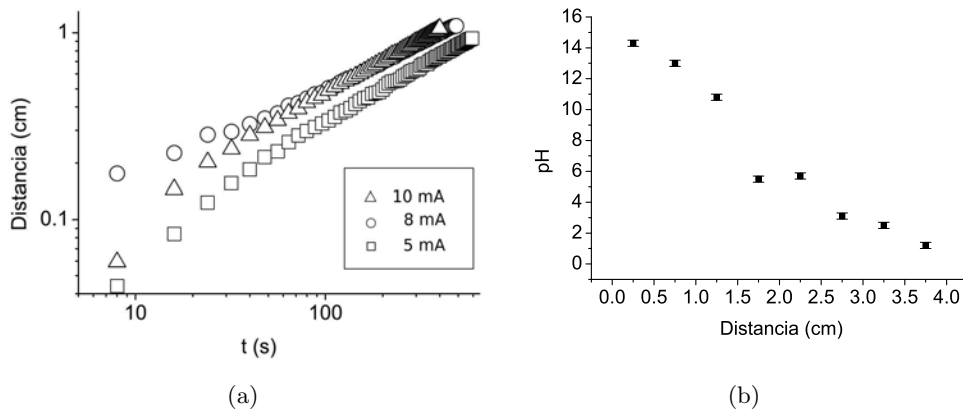


Figura 2.5: (a) Isolíneas correspondientes a la evolución en el tiempo del frente de pH 8-9 catódico en una escala logarítmica bajo diferentes intensidades de corriente eléctrica continua aplicada a un gel de agar; (b) variación del pH cátodo-ánodo a  $t=600$  s y 10 mA.

La figura 2.6(a) muestra la evolución temporal del voltaje aplicado a la celda a diferentes densidades de corriente eléctrica, obtenida con experimentos similares a los presentados en la figura 2.5. Estos resultados revelan que la resistencia de la celda disminuye con el tiempo, siendo la causa principal la generación de iones  $H^+$  y  $OH^-$  en los electrodos. De manera similar a los experimentos anteriores, la figura 2.6(b) muestra el frente de  $Cl_2$  en un experimento en el que el  $Cl_2$  generado a partir de la reacción anódica del  $Cl^-$  y solubilizado en el medio es seguido utilizando o-toluidina como indicador colorimétrico. Dicha figura pone de manifiesto, como es de esperar, que el frente avanza como  $t^{0,5}$  mostrando el carácter puramente difusivo del transporte del  $Cl_2$ .

## 2.4. Predicciones del modelo *in silico* del EChT con electrodos próximos

La figura 2.7, obtenida a partir de resultados del modelo *in silico*, muestra perfiles de pH vs. distancia, al final de la simulación, partiendo desde el ánodo hacia la periferia, a diferentes dosis de carga eléctrica (10 C (10 mA, 17 min), 30 C (17 mA, 29 min) y 50 C (20 mA, 42

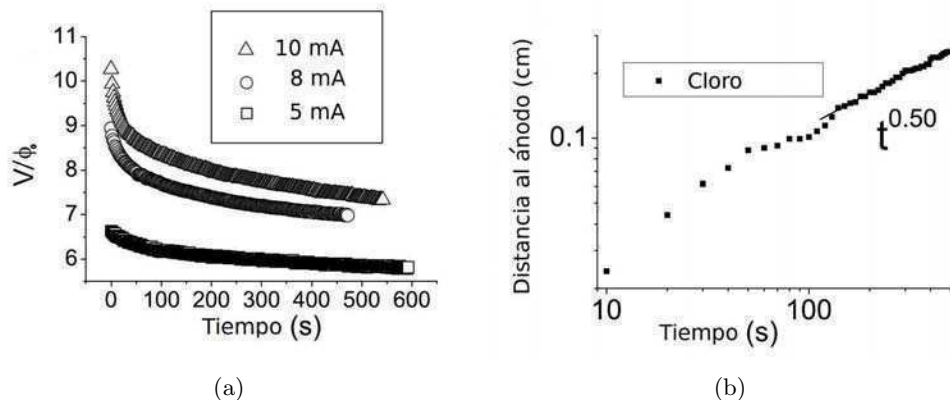


Figura 2.6: (a) Voltaje entre electrodos vs. tiempo, a distintas intensidades de corriente eléctrica aplicada a un gel de agar; (b) seguimiento del frente anódico de  $Cl_2$  en el mismo modelo

min)). En el ánodo se pueden observar valores ácidos extremos, mientras que en la periferia los valores son prácticamente neutrales. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos *in vivo* en la figura 2.2

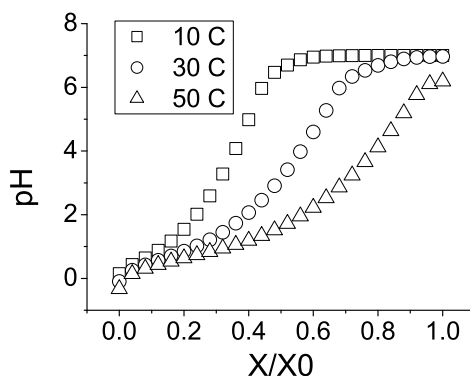


Figura 2.7: Resultados *in silico* del perfil de pH vs. distancia ánodo-periferia (indicado por  $x$ ) a diferentes dosis de tratamiento ( $x_0 = 3$  cm)

La figura 2.8 del modelo *in silico* muestra perfiles de pH vs. distancia (periferia-cátodo, cátodo-ánodo y ánodo-periferia, respectivamente), a distintas dosis de carga eléctrica (3 C (10 mA, 5 min), 10 C (10 mA, 17 min), y 30 C (17 mA, 29 min)). La comparación de estos resultados con las mediciones del modelo *in vitro* de la figura 2.3 revela que las variaciones de pH se correlacionan: valores casi neutrales en la periferia, valores extremos alcalinos cercanos al cátodo y valores en extremo ácidos cercanos al ánodo. La variación de pH entre el ánodo y el cátodo también se ajustan bastante para algunas de las dosis. Incluso la meseta que se observa en la figura 2.3(a) a 3 C (distancia cátodo-ánodo) se advierte también en la figura 2.8(b).

La figura 2.9(a) del modelo *in silico* muestra el seguimiento en el tiempo de los frentes de pH catódicos durante el tratamiento a 5 y 10 mA, revelando que escalan como  $t^{0,601}$ . Este

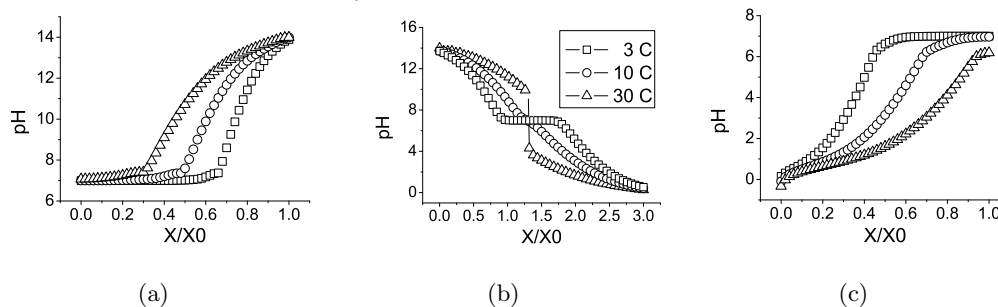


Figura 2.8: Resultados *in silico* del perfil de pH vs. distancia: (a) periferia-cátodo, (b) cátodo-ánodo, y (c) ánodo-periferia, a diferentes dosis de tratamiento ( $x_0 = 3$  cm).

resultado se correlaciona con las mediciones *in vitro* de la figura 2.5(a). La figura 2.9(b) del modelo *in silico* muestra los perfiles de pH para esas mismas corrientes, y revela una meseta de pH en medio de la distancia cátodo-ánodo, imitando la situación previa al choque del frente de pH alcalino catódico con el frente anódico ácido, al igual que en los experimentos presentados en la figura 2.5(b).

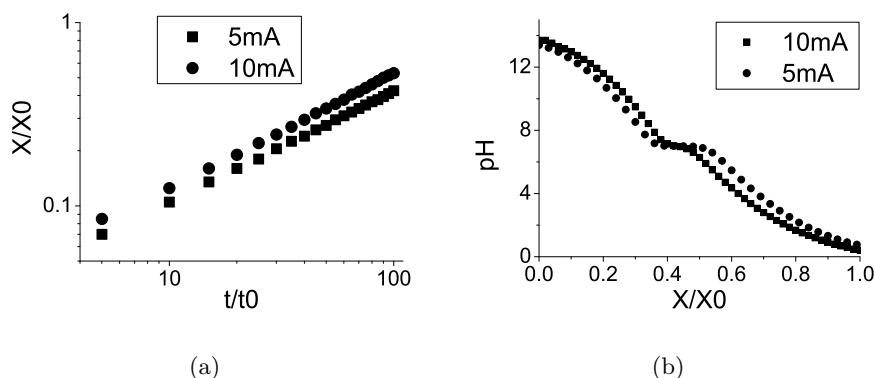


Figura 2.9: Resultados *in silico* (a) del seguimiento de los frentes de pH catódicos y (b) de los perfiles de pH vs. distancia cátodo-ánodo. Ambas gráficas realizadas para 5 y 10 mA en  $t=600$  ( $x_0 = 3$  cm y  $t_0 = 1$  s)

La figura 2.10(a) del modelo *in silico* muestra las variaciones de voltaje en función del tiempo a 5 y 10 mA, revelando que la tensión en la celda disminuye en el tiempo y es más pronunciada para corrientes eléctricas más altas. Esto es debido a que la resistencia disminuye en el tiempo por el aumento en la concentración de iones  $H^+$  y  $OH^-$ , como se observa en los experimentos de la figura 2.6(a). La figura 2.10(b) del modelo *in silico* muestra el potencial electrostático vs. la distancia ánodo-cátodo, a diferentes tiempos de tratamiento. Se observa nuevamente una caída del potencial entre los electrodos a medida que avanza el tiempo de tratamiento

La figura 2.11 del modelo *in silico* muestra las trayectorias de los frentes de pH catódico y anódico en condiciones galvanostáticas. Como se observa en la figura, los frentes catódico y anódico no chocan a mitad de distancia entre electrodos, sino que el frente ácido avanza más

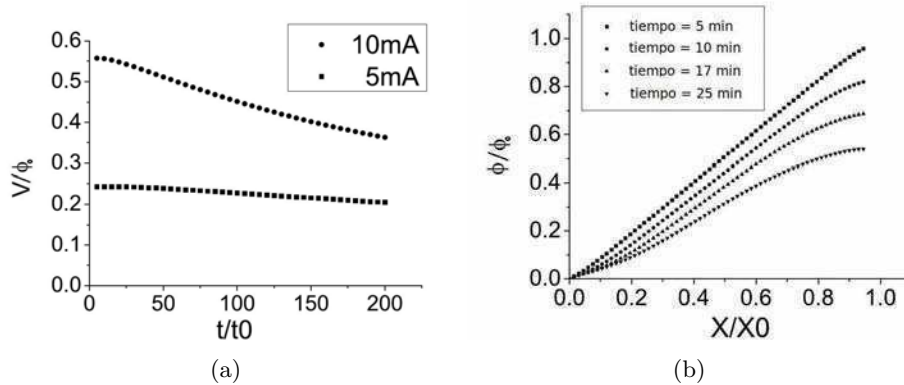


Figura 2.10: Resultados *in silico*. (a) voltaje entre electrodos vs. tiempo para 5 y 10 mA; (b) potencial electrostático vs. distancia a diferentes tiempos de tratamiento; ( $x_0 = 3$  cm,  $t_0 = 1$  s y  $V_0 = 1$  V)

rápido que el básico, por lo que el choque se produce más cerca del cátodo (a una distancia de  $\approx 1,4$  , lo que se aproxima a la relación teórica entre la movilidad  $H^+/OH^-$ ).

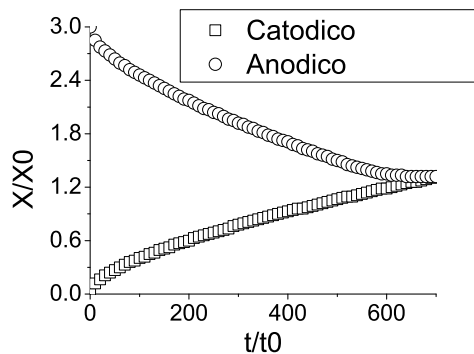


Figura 2.11: Resultados *in silico* de las trayectorias de los frentes de pH catódico y anódico en condiciones galvanostáticas, aplicando una corriente eléctrica de 10 mA.

Por último, las figuras del modelo *in silico* 2.12(a) y 2.12(b) muestran el perfil de las concentraciones de las especies  $Cl^-$  y  $Na^+$  vs. la distancia cátodo-ánodo a diferentes tiempos de tratamiento aplicando una corriente eléctrica de 10 mA. El modelo describe correctamente la concentración espacial esperada de estas especies para este tipo de experimentos (ver [82] para más detalles).

## 2.5. Comparación de los modelos *in vivo* e *in vitro*

Las mediciones *in vivo* del EChT (figura 2.1) revelan que el área necrótica macroscópica alrededor del ánodo, definida por una zona casi esférica de color marrón, escala de forma lineal con la dosis de tratamiento suministrada. La figura 2.2 revela que los valores de pH neutro en la periferia decaen a cero en el ánodo. Al mismo tiempo, el transporte de agua, del

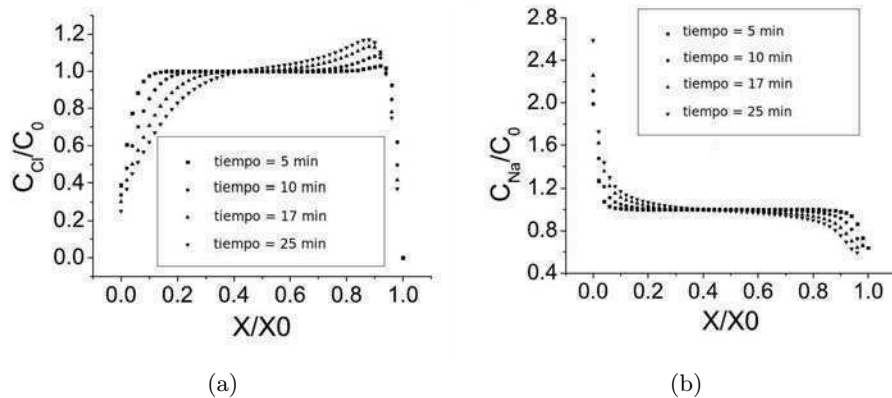


Figura 2.12: Resultados *in silico* de la concentración de (a)  $Cl^-$  y (b)  $Na^+$  vs. distancia cátodo-ánodo, a diferentes tiempos de tratamiento ( $x_0 = 3$  cm y  $C_0 = 10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>), aplicando una corriente eléctrica de 10 mA.

ánodo hacia el cátodo, produce una severa deshidratación en el tejido alrededor del ánodo y un edema importante en el cátodo (resultados no mostrados).

En las mediciones *in vitro*, el perfil de pH cátodo-ánodo –tanto para el colágeno (figura 2.3) como para el agar (figura 2.5(b))– coincide notoriamente: valores extremos de pH en los electrodos, separados por una región amesetada (a una dosis de tratamiento baja, por ejemplo, 3 C). Ambos tipos de geles presentan una estructura de malla, pero difieren principalmente en su composición bioquímica, siendo el gel de agar un compuesto carbohidratado y el gel de colágeno un compuesto proteico. Este hecho podría generar algunas diferencias importantes para el EChT, incluido el hecho de que las proteínas se desnaturalizan en condiciones de pH extremo.

La deshidratación y la hidratación en el ánodo y el cátodo, respectivamente, observada en el modelo *in vivo*, se observó también en el modelo de gel de colágeno tipo I. En ambos casos, este fenómeno podría deberse a la presencia del efecto de electroósmosis.

El modelo *in vitro* de agar permite el seguimiento en el tiempo del frente alcalino de pH alrededor del cátodo (definido por una zona de color casi esférica). El análisis demuestra que el frente de pH escala en el tiempo como  $t^{1/2}$ , característica del transporte difusivo. Este hecho indica que la convección es esencialmente suprimida por la alta viscosidad del medio empleado (lo que también sucedería en los tejidos), mientras que la migración (transporte debido a la corriente eléctrica) está a cargo del  $NaCl$ .

Aunque no se dispone de mediciones *in vivo* de la evolución temporal del frente necrótico, los resultados en el modelo de agar sugieren que éste podría escalar en el tiempo como lo sugiere la figura 2.5(a), es decir, con un régimen gobernado por difusión. Sin embargo, se necesitan más estudios experimentales para demostrar fehacientemente estos hechos.

## 2.6. Comparación del modelo *in silico* del EChT de electrodos próximos con los modelos *in vivo* e *in vitro*

La comparación entre la figura 2.7 del modelo *in silico*, y la figura 2.2 del modelo *in vivo*, muestra la existencia de una buena correlación entre los comportamientos pronosticados y los

reales, es decir, cerca del ánodo el pH tiende a cero, mientras que en la periferia se acerca a valores casi neutros. Además se observa en ambos casos una significativa disminución del pH anódico a medida que se aumenta la dosis de corriente eléctrica aplicada. Las diferencias observadas son más de tipo cuantitativo que cualitativo, lo que muestra la necesidad, en esta etapa, de continuar con el desarrollo del modelo *in silico* utilizado, lo que se concretará en los capítulos siguientes de esta tesis.

Comparando el modelo *in silico* con el modelo *in vitro*, ya sea utilizando colágeno o agar, se observa que los perfiles de pH predichos están fuertemente correlacionados con los experimentales. Los patrones de pH espacial observados en la figura 2.8 se aproximan a los presentados en la figura 2.3. La comparación de las pendientes obtenidas de la figura 2.9(a) (0,58, 0,51 y 0,57) con las de la figura 2.5(a) (0,601) revela que la manera con que avanza el frente de pH con el tiempo es ligeramente superior en el modelo *in silico*. Esto quizás se deba a un incremento del efecto de la migración en el modelo *in silico* originado en el uso de valores constantes de movilidad iónica en lugar de hacerlos dependientes de la fuerza iónica, como se observa en los experimentos. La comparación de la figura 2.10(a) con la figura 2.6(a) revela que la caída de potencial eléctrico de la celda en el modelo *in silico* es siempre mayor que en el modelo *in vitro*, aunque la tendencia en el tiempo es parecida. Una vez más, las diferencias en las movilidades iónicas puede que desempeñen un papel importante en esta discrepancia.

La comparación de los perfiles de pH anódico de las figuras 2.2, 2.3 (columna derecha) y 2.7, revela una buena correlación, a nivel cualitativo, indicando la coherencia entre los resultados obtenidos por los diferentes modelos utilizados: *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.

## 2.7. Conclusiones

En el presente capítulo se presentaron tres tipos de modelos: modelos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* con el objetivo de poder realizar una primera aproximación al estudio de la incidencia del pH y del transporte iónico en el EChT. Siendo en extremo cautelosos, los resultados presentados sugieren que los efectos del EChT en un tumor humano pueden corresponderse con los que encontramos en esta tesis a través de la metodología del triple modelado: valores de pH muy alcalinos y ácidos en el cátodo y ánodo, respectivamente, recuperando valores neutrales no muy lejos de los electrodos. Estos valores tan extremos no pueden ser neutralizados por la capacidad buffer de un tejido vivo, por lo que muy probablemente son responsables de gran parte de la necrosis final observada. El seguimiento de estos frentes de pH muestra un avance en el tiempo como  $t^{\frac{1}{2}}$ , lo que indica un transporte de protones y oxhidrilos controlado por la difusión. Esto indicaría que un adecuado modelado matemático previo a la aplicación de la EChT podría llegar a predecir el nivel de necrosis alcanzado en un tejido, en base a un avance de tipo difusivo de frentes de pH opuestos.

## Capítulo 3

# Modelo de Electroterapia con Electrodo Próximos Bajo Condiciones de Electroneutralidad

En el capítulo anterior se introdujo un primer modelo computacional para la simulación del EChT [83]. El modelo resuelve las ecuaciones de Nernst-Planck para el transporte de iones, y la ecuación de Poisson para el campo eléctrico, en un dominio unidimensional utilizando el método de diferencias finitas en una malla uniforme. Las predicciones del modelo fueron comparadas con modelos experimentales: a) *in vivo*, en ratones Balb/c con tumor subcutáneo; y b) *in vitro*, con geles de agar o de colágeno tipo I; obteniendo una buena descripción cualitativa de la concentración de iones y los perfiles de pH. Aunque los resultados fueron buenos, la utilización de una malla uniforme sumado al hecho de prescindir de la hipótesis de electroneutralidad en todo punto de la malla –y en consecuencia, la necesidad de resolver la ecuación de Poisson para el potencial electrostático– limitó severamente la simulación de números adimensionales más realistas.

Debido a que, en el EChT, el seguimiento de los frentes de pH puede ser utilizado para predecir la magnitud de la destrucción del tumor tratado, surge la necesidad de utilizar parámetros físicos más realistas, y de este modo obtener predicciones adecuadas no solo desde el punto de vista cualitativo sino también cuantitativo. Con este objetivo, y dadas las limitaciones mencionadas, se introduce un nuevo modelo matemático, el cual también será validado experimentalmente.

Este segundo modelo *in silico* consiste en la aplicación de las ecuaciones de Nernst-Planck asumiendo la condición de electroneutralidad bajo una geometría unidimensional. Al igual que en el modelo anterior, en este modelo se utiliza un electrolito compuesto por cuatro especies iónicas ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ ). Para la validación del modelo matemático, se propone un modelo *in vitro* donde el tejido tumoral es aproximado utilizando un gel de agar dentro de un tubo capilar. El objetivo de este modelo es abordar el estudio, de manera cuantitativa, del transporte de iones en el EChT. En particular, la interacción de los frentes de pH, con el propósito de evaluar su posible uso en la terapia clínica.

Los resultados del presente capítulo han sido publicados en el trabajo Turjanski *et al.* [94].



### 3.1. Modelo *in silico* del EChT con electrodos próximos bajo condiciones de electroneutralidad

Con el objetivo de evaluar situaciones más realistas del EChT, se propone adaptar el modelo matemático del capítulo anterior (Capítulo 2), reemplazando la ecuación de Poisson (ecuación 2.9, utilizada para el cálculo del potencial electrostático), por la condición de electroneutralidad. Si bien pareciera que esta condición es más restrictiva, resulta en una muy buena aproximación de la realidad y evita la solución de la ecuación de Poisson, y los problemas numéricos relacionados. El sistema resultante se describe de la siguiente manera:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -\nabla J_i + R_i \quad (3.1)$$

siendo el flujo  $J_i$ :

$$J_i = -D_i \nabla C_i - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i \nabla \phi \quad (3.2)$$

$C_i$ ,  $D_i$ ,  $z_i$  y  $u_i$  representan la concentración, coeficiente de difusión, cantidad de cargas y movilidad iónica de la especie  $i$ , respectivamente ( $i = H^+$ ,  $OH^-$  y  $Cl^-$ ).  $z_i$  es una cantidad con signo, siendo positiva para cationes y negativa para aniones.  $t$  es el tiempo,  $R_i$  representa la producción correspondiente a la especie  $i$  a través de reacciones químicas homogéneas ocurridas en el electrolito y  $\phi$  es el potencial eléctrico.

$$R_{H^+} = R_{OH^-} = k_{w,b} C_{H_2O} - k_{w,f} C_{H^+} C_{OH^-}$$

$$R_{Cl^-} = 0$$

donde  $k_{w,b}$  y  $k_{w,f}$  representan las constantes de velocidad de la reacción del agua (ecuación 2.6) en dirección hacia atrás (backward) y hacia adelante (forward), respectivamente.

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:

$$\sum_{i=1}^4 z_i C_i = 0 \quad (3.3)$$

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:

$$\left( \sum_{i=1}^4 z_i D_i \nabla^2 C_i \right) + \nabla \cdot \left( \sum_{i=1}^4 |z_i| u_i C_i \nabla \phi \right) = 0 \quad (3.4)$$

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

Las ecuaciones diferenciales 3.1 y 3.4 en coordenadas cartesianas en una dimensión quedan expresadas de la siguiente manera:

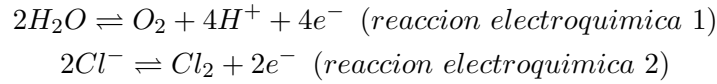
$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{z_i}{|z_i|} u_i \frac{\partial}{\partial x} \left( C_i \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) + R_i \quad (3.5)$$

$$\left( \sum_{i=1}^4 z_i D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \right) + \left( \sum_{i=1}^4 |z_i| u_i \frac{\partial}{\partial x} \left( C_i \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) \right) = 0 \quad (3.6)$$

donde  $x$  y  $t$  son las coordenadas espacial y temporal, respectivamente.  $0 < x < XX$  y  $t > 0$ .  $XX$  es una constante positiva a definir.

### 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  $j=1,2$ :

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j}{n_j F} \quad (3.7)$$

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

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (3.8)$$

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:

$$I_1 = I_1^{eq} \left\{ \exp \left[ -\frac{F(\phi + E_1^{eq})}{2RT} \right] - \left( \frac{P_{O_2}}{P_{O_2}^{eq}} \right)^{\frac{1}{4}} \left( \frac{C_{H^+}}{C_{H^+}^0} \right) \exp \left[ \frac{F(\phi + E_1^{eq})}{2RT} \right] \right\} \quad (3.9)$$

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

$$I_2 = I_2^{eq} \left\{ \left( \frac{C_{Cl^-}}{C_{Cl^-}^0} \right) \exp \left[ -\frac{F(\phi + E_2^{eq})}{2RT} \right] - \left( \frac{P_{Cl_2}}{P_{Cl_2}^{eq}} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[ \frac{F(\phi + E_2^{eq})}{2RT} \right] \right\} \quad (3.10)$$

$I_j^{eq}$  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  $C_i^0$  son la

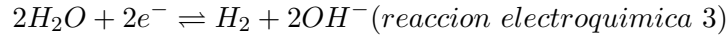
presión parcial y la concentración inicial de la especie  $i$ , respectivamente. Se asume  $\frac{P_i}{P_i^{eq}}$  como 1 para todas las especies  $i$ .

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

$$I = I_1 + I_2 \quad (3.11)$$

Las ecuaciones 3.3, 3.7, 3.8 y 3.11 son utilizadas para calcular las concentraciones de los cuatro electrolitos ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ ), el campo eléctrico y el potencial en el ánodo.

En el borde correspondiente al cátodo se genera 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  $j = 3$ :

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = \frac{\nu_{i,j} I_j}{n_j F} \quad (3.12)$$

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

$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i (\nabla \phi_i \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (3.13)$$

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

Las ecuaciones 3.3, 3.12 y 3.13 son utilizadas para obtener las concentraciones de las cuatro especies y el campo eléctrico en el cátodo.

Las ecuaciones diferenciales de ambos bordes (sólo se presenta una, para el resto el tratamiento es similar), en coordenadas cartesianas en una dimensión, quedan expresadas de la siguiente manera:

$$-D_i \left( \frac{\partial C}{\partial x} \cdot \mathbf{n} \right) - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i \left( \frac{\partial \phi}{\partial x} \cdot \mathbf{n} \right) = 0 \quad (3.14)$$

### Condiciones iniciales

En las condiciones iniciales,  $t=0$ , el electrolito no presenta gradientes de concentración. Los valores iniciales de concentración de las sales fueron establecidos en  $0.16 \text{ mol/dm}^3$ , valores cercanos a la concentración existente en el plasma y fluidos intersticiales [95]. El pH inicial fue establecido en 7 (neutro). El potencial eléctrico en la superficie del ánodo,  $\phi_a^0$ , fue obtenido a partir de la ecuación 3.11. El campo eléctrico en el dominio y los electrodos ha sido obtenido resolviendo la ecuación derivada de reemplazar el vector de flujo migratorio en  $I = F \sum_{i=1}^4 z_i J_i$ , y la ausencia de gradiente de concentración:

$$\frac{1}{F} (I \cdot \mathbf{n}) + \sum_i |z_i| u_i C_i (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (3.15)$$

### 3.1.1. Modelo computacional

Debido a la naturaleza no lineal del problema del EChT representado por las ecuaciones anteriores, su resolución excluye una solución exacta, dejando sólo la alternativa de encontrar una solución numérica.

El modelo computacional resuelve el sistema de ecuaciones del modelo matemático para cada paso de tiempo, en un dominio fijo en una malla no uniforme (mayor resolución cerca de los electrodos), utilizando diferencias finitas y un método iterativo con parámetro de ponderación temporal igual a 1.

Los valores discretos de la variable espacial  $x$  se representan por  $x_i$ , donde  $i$  es un número entero que varía entre 0 e  $ii$  ( $ii$  entero fijo). Debido a que se utiliza una malla no uniforme, se define  $h_i$  como la distancia entre los nodos  $i$  e  $i + 1$  de la malla. Es decir,  $h_i = x_{i+1} - x_i$ .

#### Discretización de la ecuación de transporte

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

$$\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_i \approx \frac{C_i - C_{i-1}}{h_{i-1}} \quad (3.16)$$

En el caso de la derivada de segundo orden (término difusivo de la ecuación 3.5), se aplica el siguiente esquema de discretización:

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_i \approx \frac{\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i+\frac{1}{2}} - \left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i-\frac{1}{2}}}{h_{i-1}} \approx \frac{\frac{C_{i+1} - C_i}{h_i} - \frac{C_i - C_{i-1}}{h_{i-1}}}{h_{i-1}} \quad (3.17)$$

Notar que en el caso de una malla equiespaciada,  $h = h_i = h_{i-1}$ , la ecuación 3.17 es equivalente a:

$$\frac{C_{i+1} - 2C_i + C_{i-1}}{h^2}$$

La expresión  $\left. \frac{\partial}{\partial x} \left( C \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) \right|_i$ , correspondiente al término migratorio de las ecuaciones 3.5 y 3.6, se aproxima de la siguiente manera:

$$\left. \frac{\partial}{\partial x} \left( C \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) \right|_i \approx \frac{(C_i \frac{\partial \phi_i}{\partial x}) - (C_{i-1} \frac{\partial \phi_{i-1}}{\partial x})}{h_{i-1}} \quad (3.18)$$

Las expresiones  $\frac{\partial \phi_i}{\partial x}$  y  $\frac{\partial \phi_{i-1}}{\partial x}$  son tomadas como incógnitas, lo que permite prescindir de su discretización.

El operador diferencial temporal de la ecuación 3.5 es discretizado utilizando un esquema de Euler:

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

donde  $n$  es el nivel temporal y  $\Delta t$  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.

Dado la no linealidad del problema a tratar, se utilizó un esquema fuertemente implícito. En consecuencia, para poder obtener el valor de  $C_i^{n+1}$  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 debe realizar varias iteraciones internas.

La aproximación de la ecuación 3.5 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  $C_i^{m+1, m+1}$  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:

$$\frac{C_i^{m+1} - C_i^n}{\Delta t} = D \frac{\frac{C_{i+1}^m - C_i^{m+1}}{h_i} - \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h_{i-1}}}{h_{i-1}} + \frac{z}{|z|} u \frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^m}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h_{i-1}} + R_i^{m+1}$$

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  $\phi^{m+1}$  de la ecuación 3.6, para luego ser utilizado en el método de Gauss-Seidel:

$$\sum_{especies} zD \left( \frac{\frac{C_{i+1}^m - C_i^{m+1}}{h_i} - \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h_{i-1}}}{h_{i-1}} \right) + \sum_{especies} |z|u \left( \frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h_{i-1}} \right) = 0 \quad (3.19)$$

### 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:

$$-D \left( \frac{C_{anodo+1} - C_{anodo}}{h_{anodo}} \right) - \frac{z}{|z|} u C_{anodo} \frac{\partial \phi_{anodo}}{\partial x} = 0 \quad (3.20)$$

$$-D \left( \frac{C_{catodo} - C_{catodo-1}}{h_{catodo-1}} \right) - \frac{z}{|z|} u C_{catodo} \frac{\partial \phi_{catodo}}{\partial x} = 0 \quad (3.21)$$

donde  $\frac{\partial \phi_{anodo}}{\partial x}$  y  $\frac{\partial \phi_{catodo}}{\partial x}$  son incógnitas del sistema.

En ambos casos, los sistemas no lineales que modelan las condiciones de borde (ecuaciones ánodo: 3.3, 3.7, 3.8 y 3.11; ecuaciones cátodo: 3.3, 3.12 y 3.13 ) 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:

$$res_{int} = \max_i \left| u_i^{t,m} - u_i^{t,m-1} \right| < 10^{-7} \quad u = H^+, OH^-, Cl^-, Na^+, \nabla \phi$$

donde  $i$  corresponde al  $i$ ésimo nodo de la malla.

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

Si el programa no converge después de las 5 000 iteraciones, la ejecución del mismo es interrumpida. Las ejecuciones realizadas para el presente trabajo nunca sobrepasaron dicha cantidad de iteraciones.

### Corrida

El modelo computacional fue escrito en el lenguaje C++ y su ejecución se realizó en un equipo con un procesador Opteron Dual, bajo el entorno Linux Debian como sistema operativo. Los parámetros utilizados para las corridas se encuentran detallados en la tabla 3.1. Para todas las ejecuciones se utilizó una malla no uniforme de 1500 nodos, con una mayor definición en la zona cercana a los electrodos. La máxima y mínima distancia utilizada entre electrodos fue de  $h = 3,7 \cdot 10^{-5}m$  y  $h = 4,9 \cdot 10^{-6}m$ , respectivamente. Se utilizó un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-3}s$ . Los tiempos totales de simulación fueron desde  $T = 1min$  hasta  $T = 8min$ , dependiendo de la dosis del tratamiento simulado.

Los coeficientes de difusión de los iones en un medio líquido publicados en [84] fueron reducidos adecuadamente para describir la difusión en un medio compuesto por un gel. Los nuevos valores obtenidos se encuentran dentro del rango de los datos experimentales publicados para la difusión de cloruro de sodio en geles [96].

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	[95]	$C_{Cl^-}^0$	0.16 M	[95]
$C_{H_2O}^0$	55.5 M		$T$	25 C	
$D_{H^+}$	$6,25 \cdot 10^{-5} cm^2/s$		$D_{OH^-}$	$3,52 \cdot 10^{-5} cm^2/s$	
$D_{Na^+}$	$0,89 \cdot 10^{-5} cm^2/s$		$D_{Cl^-}$	$1,36 \cdot 10^{-5} cm^2/s$	
$I_1^{eq}$	$1 \cdot 10^{-10} A/cm^2$	[97]	$I_2^{eq}$	$1 \cdot 10^{-3} A/cm^2$	[98]
$E_1^{eq}$	1.23 V	[84]	$E_2^{eq}$	1.36 V	[84]
$k_{w,f}$	$1,5 \cdot 10^{11} 1/M.s$	[99]	$k_{w,b}$	$2,7 \cdot 10^{-5} 1/s$	[99]

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

### 3.2. Modelo *in vitro*

El modelo *in vitro* se basa en la aplicación del EChT, a diferentes corrientes eléctricas constantes, en capilares rellenos de gel de agar-agar y el seguimiento de sus frentes de pH por medio de un indicador de pH. En la figura 3.1 se puede observar parte del material experimental utilizado, el cual consiste en tres tubos capilares sujetos a un marco metálico, lo cual permite hacer el seguimiento de tres experimentos de manera casi simultánea: uno en cada tubo capilar.



Figura 3.1: Arreglo de tubos capilares: el cátodo fue ubicado en el extremo izquierdo, mientras que el ánodo en el extremo derecho de cada tubo capilar, respectivamente. El color oscuro en los tubos capilares indica el cambio de pH. Cada capilar representa un experimento independiente.

La cuasi-geometría unidimensional del capilar constituye un buen modelo *in vitro* para la aproximación 1D del modelo *in silico* (no se toman en cuenta los efectos de las paredes del tubo).

Tubos capilares de vidrio de 3,8 cm de largo y 1,4 mm de diámetro interior fueron rellenos de una solución de agar-agar al 1% (pH 7),  $0,16 \text{ mol/dm}^3$  de NaCl y fenolftaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) como indicador ácido-base (punto de transición: pH 8,3 aproximadamente). Electrodo puntual de alambre de platino, 0,14 mm de diámetro, fueron colocados en ambos extremos de los tubos capilares (separados a 3,8 cm entre sí). Diferentes valores de corriente eléctrica continua constante (0,5 mA, 1 mA, 3 mA y 5 mA) fueron aplicados a través de ellos por medio de una fuente de alimentación (Consort E835, Bélgica). Se realizó un seguimiento visual de las isolíneas de pH 8,3 alrededor del cátodo mediante una técnica de absorción óptica (ver figura 3.2).

Para la iluminación se utilizó un LED azul de alta intensidad, con una longitud de onda de emisión cercana a la absorción máxima del indicador a valores básicos (374 nm). Las imágenes de la cámara de video fueron capturadas a 0,5 cuadros por segundo (en el caso de los experimentos realizados a 0,5 mA) y a 1 cuadro por segundo (para el resto de los experimentos), con una resolución de 455 píxeles por centímetro. Las imágenes de video fueron procesadas y analizadas a través del paquete gráfico ImageJ [100].

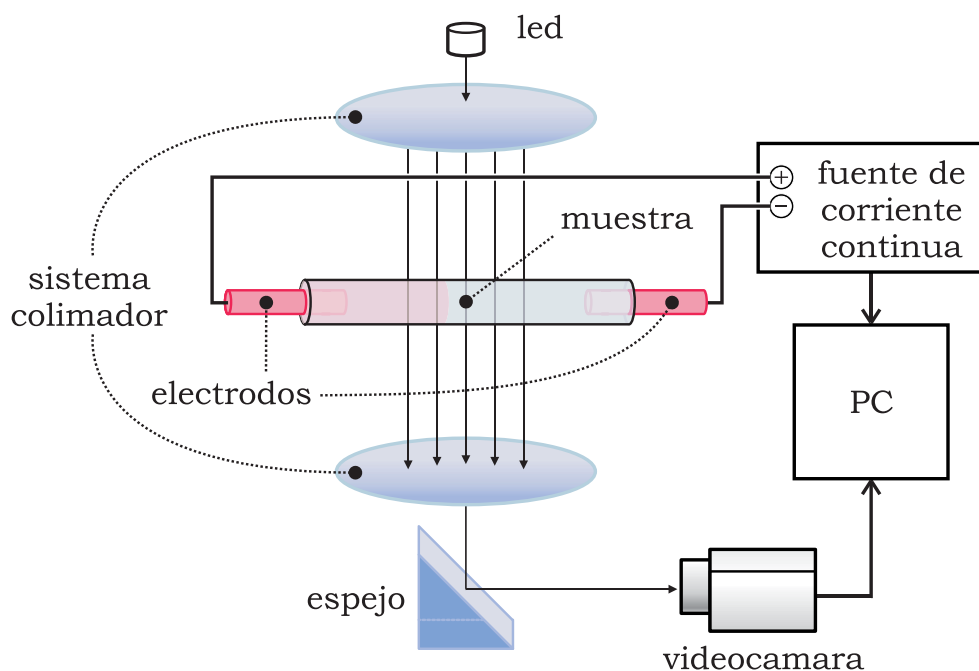


Figura 3.2: Seteo experimental.

### 3.3. Resultados y Discusión

La figura 3.3(a) muestra los datos experimentales correspondientes al seguimiento del frente de pH 8,3 a diferentes corrientes (0,5 mA, 1 mA, 3 mA y 5 mA) a través del tubo capilar cuasi-unidimensional descrito anteriormente. Se puede observar que, a medida que aumenta la intensidad de corriente, la pendiente del gráfico aumenta (aumenta la velocidad de transporte). Para analizar este transporte, se llevó a cabo una linealización de las curvas (figura 3.3(b)). Las pendientes estimadas se pueden observar en la tabla 3.2. En todos los casos las pendientes estimadas toman valores cercanos a 1, siendo esto un indicio de un régimen de transporte gobernado por migración.

I (mA)	Pendiente estimada (cm/s)	IC 95% inferior	IC 95% superior
0.5	0.825	0.823	0.827
1	0.835	0.832	0.838
3	1.069	1.064	1.074
5	1.009	1.001	1.017

Tabla 3.2: Pendientes estimadas a partir del análisis de regresión lineal de los datos experimentales.

La figura 3.4(a) presenta las predicciones del modelo *in silico* del seguimiento de frente de pH 8,3 a distintas corrientes eléctricas (0,5 mA, 1 mA y 3 mA) y la figura 3.4(b), muestra la linealización de las curvas aplicando escala log-log. Las pendientes estimadas se presentan en el cuadro 3.3. Dichos valores, cercanos a 1, indican que la migración sería el proceso que gobierna el transporte iónico. Esto es consistente con las mediciones experimentales mostradas en la figura 3.3. Aunque no ha sido posible obtener resultados a 5 mA (debido a problemas de



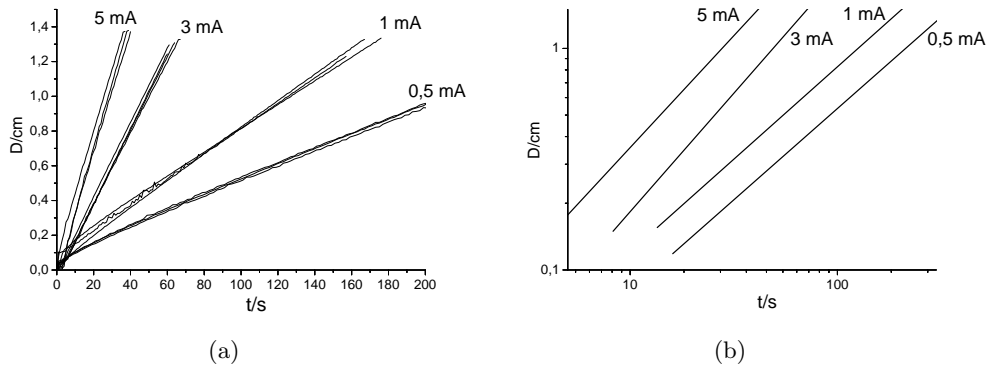


Figura 3.3: Datos experimentales. a) Seguimiento de frente pH catódico ( $\text{pH} = 8,3$ ) a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1 , 3 y 5 mA) del EChT. b) Linealización de las curvas promedio de a) aplicando escala log-log.

inestabilidad numérica), en general se observa, no sólo una buena concordancia cualitativa, sino también cuantitativa entre las predicciones del modelo *in silico* y los datos experimentales.

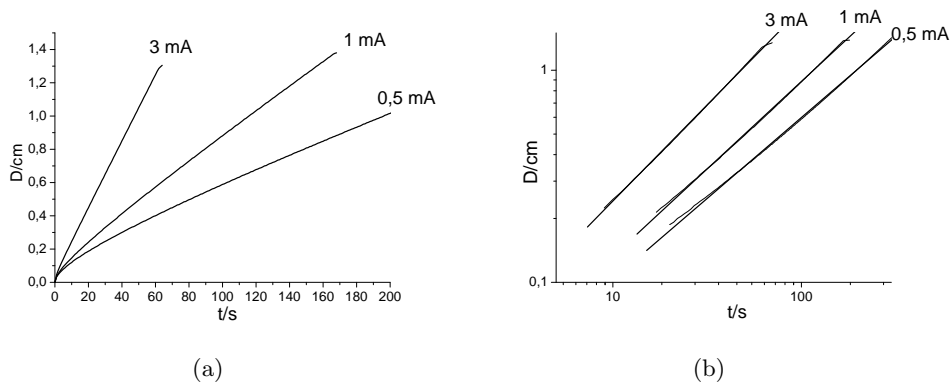


Figura 3.4: Predicciones del modelo *in silico*. a) Seguimiento de frente de pH catódico ( $\text{pH}=8,3$ ) a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1 y 3 mA) del EChT. b) Linealización de las curvas de a) aplicando escala log-log.

Las figuras 3.5(a) y 3.5(b) muestran la distancia (medida desde el cátodo) y el tiempo en que ocurre la colisión de los frentes de pH, respectivamente, tanto para los datos experimentales (barras negras) como para los simulados (barras grises), a diferentes intensidades de corriente (0,5 mA, 1 mA, 3 mA y 5 mA). Se puede observar una muy buena correlación entre los datos experimentales y los simulados. Ambos gráficos indican que, a medida que aumenta la intensidad de corriente, disminuye significativamente el tiempo de choque de frentes, mientras que cambios no significativos se producen a nivel espacial. Esto implica que si el producto resultante de la velocidad por el tiempo se mantiene constante, a medida que aumenta la intensidad de corriente, entonces, las velocidades de los frentes anódicos y catódicos aumentan proporcionalmente. En general, el tiempo que tardan en colisionar los frentes de pH podría ser un dato muy relevante en el uso del EChT a nivel clínico, ya que permitiría elegir

I (mA)	Pendiente estimada (cm/s)	IC 95 % inferior	IC 95 % superior
0.5	0.764	0.763	0.765
1	0.825	0.823	0.827
3	0.907	0.904	0.910

Tabla 3.3: Pendientes estimadas a partir del análisis de regresión lineal del modelo *in silico*.

la separación entre electrodos a una intensidad de corriente y tiempo de exposición dados. Este punto es un gran aporte del modelo propuesto.

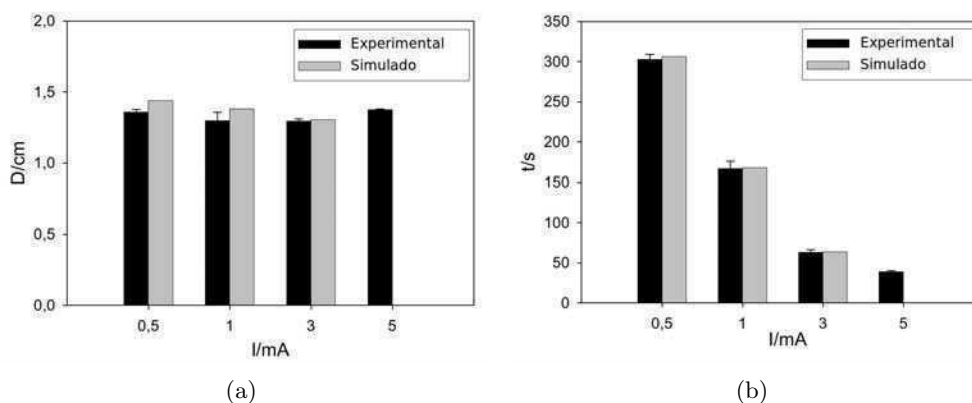


Figura 3.5: a) Distancia (cm desde el cátodo) y b) tiempo (s) de la colisión de frentes, para datos experimentales (barras negras) y simulados (barras grises), a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1, 3 y 5 mA) del EChT. No ha sido posible obtener resultados correspondientes al modelo simulado a 5 mA (debido a problemas de inestabilidad numérica)

El transporte iónico es determinante para conocer los valores de pH en un determinado momento, que a su vez es esencial para la predicción del área necrótica. En este contexto, las figuras 3.6 y 3.7 muestran la concentración iónica a nivel espacial predicha por el modelo *in silico* a diferentes momentos a una intensidad de corriente de 3 mA. Como se puede observar, alrededor del ánodo, la concentración de protones y cloruros se incrementa y el sodio disminuye. Concomitantemente, en el cátodo la concentración de oxidrilos y sodios aumenta y la de cloruros disminuye.

La figura 3.8 muestra los perfiles de pH predichos a nivel espacial a diferentes tiempos e intensidades de corriente: 0,5 mA y 3 mA (figura izquierda y derecha, respectivamente). Como se puede observar, el tiempo de colisión del frente de pH disminuye significativamente a medida que la intensidad de corriente se incrementa (320 s a 0,5 mA vs. 65 s a 3 mA) mientras que el lugar del choque permanece casi constante (2,3 cm a 0.5 mA vs. 2,4 cm a 3 mA).

La figura 3.9 muestra la predicción del seguimiento de los frentes de pH y los puntos de colisión para diferentes valores de pH a una intensidad de corriente de 1 mA. A esta intensidad de corriente, la colisión del frente de pH ocurre a 2.41 cm del ánodo (1.39 cm del cátodo), casi independientemente del valor de pH que tome. Estas predicciones se encuentran respaldadas por resultados experimentales (no mostrados).

A partir de las figuras 3.5(a), 3.8 y 3.9, se puede inferir que, en el rango de densidades

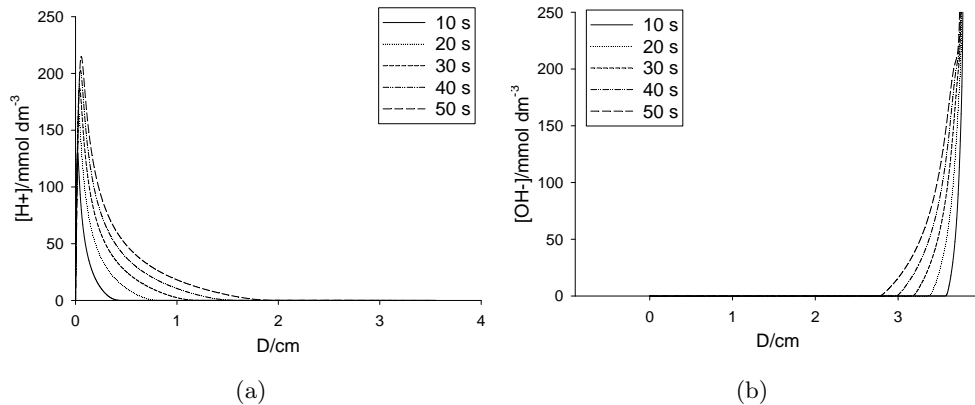


Figura 3.6: Predicciones del modelo *in silico* a)  $H^+$  y b)  $OH^-$ . Concentración (mM) vs. distancia (cm) a diferentes tiempos (10-50 s) del EChT a 3 mA. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente.

de corriente analizadas, los choques de frentes de pH ocurren más cerca del cátodo que del ánodo. Esto implica que el frente ácido se mueve más rápido que el básico, siendo su causa el valor de los coeficientes de difusión y migración, que es mayor en los protones que en los oxidrilos.

Utilizando las hipótesis de este modelo *in silico* se pudo obtener una descripción cuantitativa más realista del EChT, lo cual no se pudo lograr con el modelo del capítulo previo. Esto se debe, básicamente a la estabilidad numérica del nuevo modelo, que surge cuando se impone la condición de electroneutralidad.

De hecho, la electroneutralidad es una condición que puede ser asumida de forma confiable a escala macroscópica en toda el área del dominio, ya que sólo es interrumpida en una zona muy cercana a los electrodos.

La constitución estructural del tejido se representa mejor con un gel que con una solución; al mismo tiempo, para los estudios ópticos, el agar-agar es más adecuado que el colágeno tipo I, a pesar de que éste es más cercano a la realidad desde el punto de vista fisicoquímico. En el presente trabajo se asume que este tipo de geles es una buena aproximación al intersticio del tumor. Por otra parte, la cuasi-geometría unidimensional del capilar constituye un modelo experimental adecuado para la descripción unidimensional del modelo matemático.

### 3.4. Conclusiones

La comparación entre las predicciones teóricas y las mediciones experimentales muestra una muy buena concordancia cualitativa y cuantitativa.

En este sentido, el modelo *in silico* predice que transcurrido un cierto tiempo, a partir de una condición inicial de pH neutro se generan entre los electrodos dos frentes de pH (uno alcalino anódico y otro ácido catódico) extremos que se desplazan hasta colisionar entre sí, desapareciendo de esta manera la región de pH fisiológico que existía entre ellos. Las medidas experimentales obtenidas del modelo *in vitro* de capilares avalan estas predicciones. Esto tiene importantes implicaciones biológicas y terapéuticas, ya que daría lugar a la predicción de la zona necrótica, inducida por el EChT, permitiendo de este modo una optimización clínica del

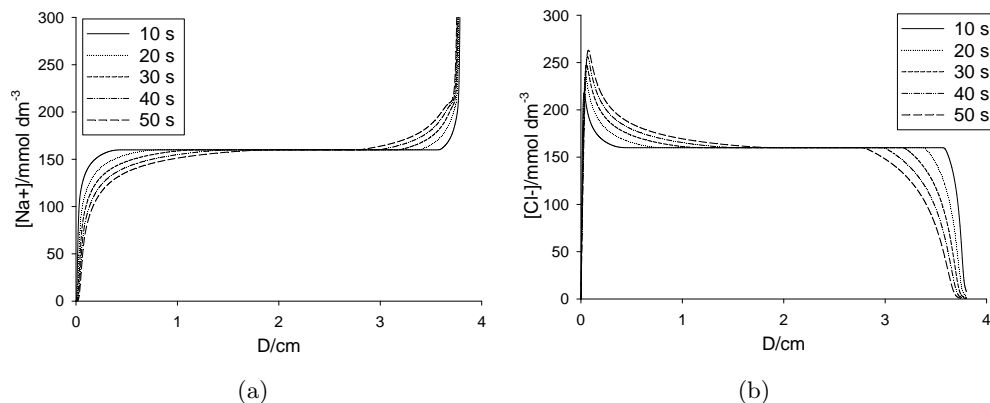


Figura 3.7: Predicciones del modelo *in silico* a)  $Na^+$  y b)  $Cl^-$ . Concentración (mM) vs. distancia (cm) a diferentes tiempos (10-50 s) del EChT a 3 mA. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente.

tratamiento.

A medida que aumenta la corriente eléctrica, el frente de pH tiende a crecer de forma lineal en el tiempo, lo que sugiere que el transporte de iones se desplaza gradualmente a un régimen regulado por la migración. Este dato es esencial para una predicción óptima de la variación de pH espaciotemporal y su implicancia clínica. Respecto al punto de colisión de los frentes de pH se puede inferir que, a medida que aumenta la corriente eléctrica, el tiempo disminuye significativamente, mientras que la ubicación espacial del hecho de la colisión se mantiene casi constante. Por otra parte, a una intensidad de corriente dada, la ubicación espacial del punto de colisión no depende de los valores de pH considerados. En el rango de intensidades de corriente analizados, la localización de este punto se encuentra más cerca del cátodo debido a una mayor velocidad del frente anódico.

En síntesis, el modelo teórico presentado aquí, validado con experimentos *in vitro*, es relativamente sencillo y robusto (numéricamente estable), y es capaz de predecir no solo cualitativa sino también cuantitativamente las concentraciones iónicas y frentes de interacción, en particular, los frentes de pH. Esto tiene implicancias clínicas importantes dado que el cambio de pH es un factor esencial para la destrucción de los tejidos en el EChT. Dado que las zonas necróticas se correlacionan muy bien con las cubiertas por los frentes de pH, el seguimiento de estos frentes se puede utilizar para predecir la magnitud de la destrucción del tumor y, por tanto, la evaluación de la eficacia del EChT.

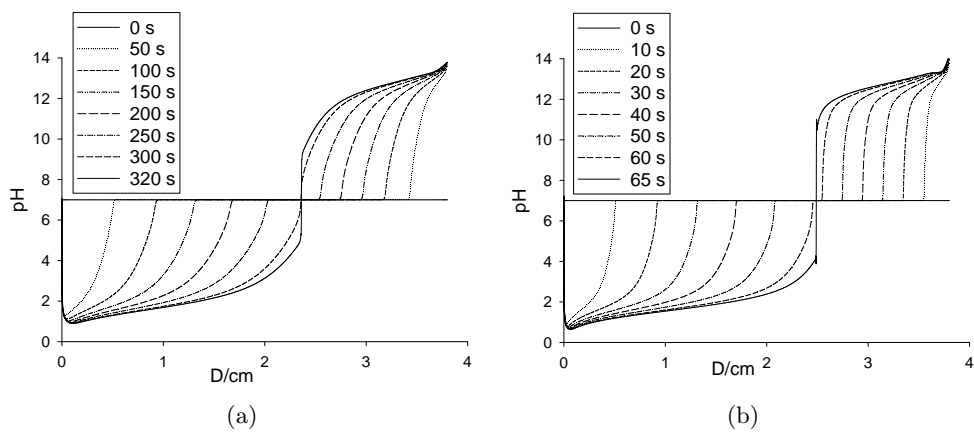


Figura 3.8: Predicción del modelo *in silico* del perfil de pH a nivel espacial a diferentes tiempos a a) 0,5 mA y b) 3 mA del EChT. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente.

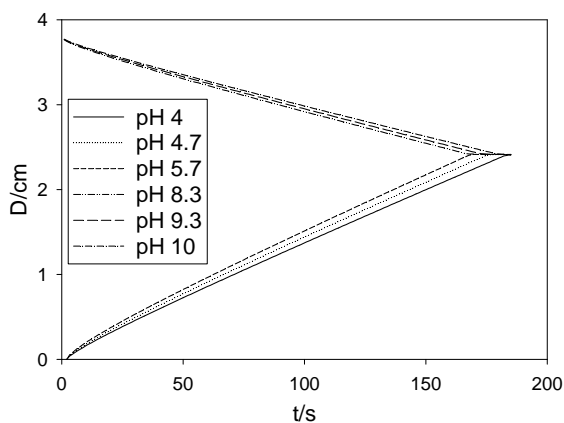


Figura 3.9: Predicción del modelo *in silico* del seguimiento de frentes de pH y puntos de colisión para diferentes valores de pH a una intensidad de corriente de 1 mA del EChT. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente.

## Capítulo 4

# Modelo de Electroporación Reversible con Electrodo Próximos

En el capítulo anterior, se introdujo un modelo matemático para el EChT de electrodos próximos. El modelo resuelve las ecuaciones de Nernst-Planck para el transporte de iones, bajo condiciones de electroneutralidad, en un dominio unidimensional utilizando el método de diferencias finitas en una malla fija. Las predicciones del modelo fueron comparadas con un modelo *in vitro*, obteniendo una buena descripción cuantitativa de la concentración de iones y los perfiles de pH producidos. Como ya se ha mencionado, los perfiles de pH obtenidos a partir del modelo *in silico* han demostrado la existencia de una muy buena correlación con las zonas de destrucción del tejido, medidas experimentalmente. Como consecuencia, el modelo puede ser de utilidad en la predicción de la destrucción del tumor que se produce con la aplicación del EChT.

Este tipo de alteración del pH también podría estar ocurriendo en otras terapias que se basan en la aplicación de corriente: ECT, IRE, Supraporación, etc. Para verificar esta suposición y realizar un estudio detallado del impacto del pH en estas terapias, se decidió incursionar en el análisis de este aspecto en una de ellas: la ECT.

La ECT es una técnica mínimamente invasiva, que emplea pulsos de electroporación reversible con el propósito de permeabilizar temporalmente la membrana celular y así dejar entrar a la célula pequeñas cantidades de drogas anticancerígenas, que en condiciones normales serían impermeables (bleomicina) o poco permeables (cisplatino). Una de las mayores ventajas de la ECT es el uso de bleomicina. Esta droga produce roturas en las hebras del ADN, eliminando de forma selectiva a las células que se encuentran en proceso de división celular, excluyendo a las que no se encuentran dentro de dicho proceso. [55]

Desde los primeros experimentos de laboratorio en cultivo celular [101, 102] hasta los experimentos preclínicos [103, 104] y estudios clínicos [105, 106], los parámetros utilizados han sido generalmente los siguientes: un tren de 8 pulsos de onda cuadrada de 100  $\mu$ seg y aproximadamente 1000 V/cm aplicados a 1 Hz (un pulso por segundo). El voltaje aplicado depende esencialmente del tipo de electrodos y la distancia entre ellos [51].

El uso de ondas cuadradas de pulso eléctrico de una duración y amplitud apropiadas preserva la viabilidad de la célula, permitiendo el restablecimiento de la membrana celular unos pocos minutos después de aplicado el pulso eléctrico [51, 107–109].

A nivel tejido, el conocimiento en electropermeabilización *in vivo* ha mostrados progresos recientes, particularmente en el marco del proyecto CLINIPORATOR (EU 5th FP, proyecto

QLK3-1999-00484). Modelos matemáticos bidimensionales y tridimensionales de la distribución del campo eléctrico en varios tejidos (músculo, hígado, etc.) han sido desarrollados y validados [108, 110–115]. Sin embargo, la descripción del fenómeno que ocurre a nivel de la membrana celular se encuentra todavía incompleto. Una de las teorías más aceptadas hasta el momento, la electroporación celular [46, 116, 117], se basa en la aparición de poros hidrofílicos responsables del transporte de moléculas a través de la membrana. Pero estos poros nunca han podido ser observados en las membranas celulares a las que se les ha aplicado un pulso eléctrico efectivo. Otra de las teorías propone la inexistencia de estos “agujeros”: la estructura bilipídica podría perder su orden debido a las fuerzas de electrocompresión creadas por el voltaje de transmembrana. El agua entraría a la membrana a través de los defectos creados en su estructura, y podría incrementar el coeficiente de permeabilidad de las moléculas hidrofílicas como la bleomicina y el cisplatino [118].

En el contexto de los modelos matemáticos vinculados con la ECT, en el trabajo de Hu *et al.* [119] el potencial transmembrana calculado (TMP, por sus siglas en inglés) y la densidad de electroporación a través de células esferoidales sometidas a pulsos ultra cortos y de alta intensidad, muestran que el TMP inducido por voltajes externos puede ser sustancialmente mayor en células esferoidales achatadas en los polos, comparado con células esféricas o esferoides alargadas. En el trabajo de Krassowska *et al.* [120] se introduce un modelo que describe la aparición y cierre de poros en una célula. Ying *et al.* [121] simulan los efectos de un campo eléctrico externo aplicado a un grupo de células, mostrando que la estimulación de una célula determinada depende en parte del orden las células y no simplemente de su posición dentro del campo. Miklavcic *et al.* [122] calculan la distribución del campo eléctrico en tumores profundos, teniendo en cuenta que la conductividad del tejido se modifica durante la aplicación de los pulsos eléctricos. En el trabajo de Granot *et al.* [123] se calcula la transferencia de masa a la célula durante la ECT, introduciendo un modelo multiescala que acopla un modelo de campo eléctrico externo a nivel tejido, un modelo gobernado por electroporación-transferencia de masa a nivel de una sola célula, y un modelo macroscópico difusivo de transferencia de masa a nivel tejido.

Mientras que en el EChT el objetivo principal es la necrosis de las células tumorales, en la ECT y en la Electroterapia génica (EGT) esto generalmente es evitado debido a sus efectos colaterales. Un problema tanto de la ECT como de la EGT es su baja viabilidad celular y, especialmente en esta última, la baja eficiencia de la transfección comparada con otros métodos [124]. Ha sido sugerido que estos efectos podrían depender fuertemente del cambio de pH inducido por la electrólisis durante la aplicación del tratamiento. Alteraciones significativas del medio durante la EGT podrían tener efectos adversos sobre los plásmidos suministrados, como ser la desnaturalización del ADN, afectado por el pH extremo [125, 126].

En este capítulo se analiza el proceso de electroporación desde un nuevo punto de vista aparentemente desestimado por la literatura: el rol del pH en la ECT. Este análisis se desarrolla a través de un modelo *in silico* y su validación posterior con un modelo *in vitro* (gel de colágeno).

Los resultados del presente capítulo han sido enviados y aceptados para ser publicados en la revista PLoS ONE, bajo el título “The Role of pH Fronts in Reversible Electroporation“, Turjanski *et al.*

## 4.1. Modelo *in silico* de ECT con Electrodo Próximos

En la presente sección se introduce un modelo *in silico* con el objetivo de reproducir un tratamiento estándar de la ECT: un tren de 8 pulsos de onda cuadrada de 1 Hz aplicada a un tejido tumoral. El modelo se encuentra conformado por dos submodelos: a) *ON time*, que representa el caso en que el pulso eléctrico está siendo aplicado; y b) *OFF time*, el caso contrario (figura 4.1).

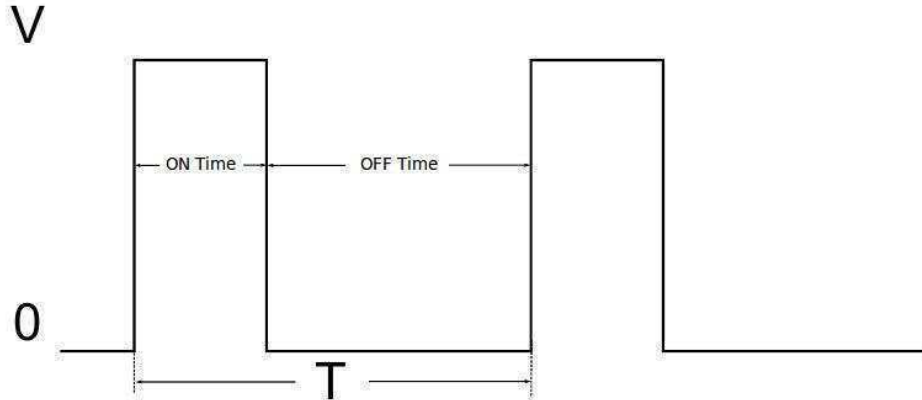


Figura 4.1: Esquema de aplicación pulsos. *ON time*: pulso aplicado, *OFF time*: pulso no aplicado, T tiempo de duración de ambos submodelos, V: amplitud del pulso. Lo tiempos de *ON time* y *OFF time* no se encuentran graficados a escala.

### 4.1.1. Submodelo *ON time*

Suponiendo que se asumen las mismas simplificaciones en ambos modelos (EChT y ECT *ON Time*), todavía quedaría por resolver una diferencia fundamental: el EChT se aplica a corriente constante y la ECT a tensión constante. Esta diferencia es resuelta, en el modelo *in silico*, corrigiendo continuamente los valores de densidad de corriente, con el fin de mantener la tensión constante durante todo el período que es aplicada la onda cuadrada de pulso eléctrico.

En definitiva, esta solución permite tomar íntegramente el modelo del capítulo anterior para representar el submodelo *ON time*.

### 4.1.2. Submodelo *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 de 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:

$$J_i = -D_i \nabla C_i \quad (4.1)$$

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  $i = \text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ :



$$-D_i(\nabla C_i \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (4.2)$$

El campo eléctrico sobre los electrodos se considera nulo.

### 4.1.3. Modelo computacional

De igual modo que en el EChT, el problema de la ECT sigue siendo de naturaleza no lineal y, por lo tanto, la resolución del sistema de ecuaciones planteado excluye una solución exacta, dejando sólo la opción de encontrar una solución aproximada. Para ello, en ambos submodelos se resuelve el sistema de ecuaciones para cada paso de tiempo, en un dominio fijo, utilizando diferencias finitas, en una malla equiespaciada y un método iterativo con parámetro de ponderación temporal igual a 1.

#### Discretización de la ecuación de transporte

Para la derivada de primer orden, se utiliza el esquema planteado en el capítulo anterior. Para la derivada de segundo orden, se aplica el siguiente esquema de discretización:

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_i \approx \frac{\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i+\frac{1}{2}} - \left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{i-\frac{1}{2}}}{h} \approx \frac{\frac{C_{i+1}-C_i}{h} - \frac{C_i-C_{i-1}}{h}}{h} = \frac{C_{i+1} - 2C_i + C_{i-1}}{h^2} \quad (4.3)$$

Esta discretización es de orden  $O(h^2)$  [90].

La aproximación, a través de un esquema fuertemente implícito de la ecuación de transporte 3.5 correspondiente al modelo *ON time* resulta en:

$$\frac{C_i^{m+1} - C_i^n}{\Delta t} = D \left( \frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) + \frac{z}{|z|} u \frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^m}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h} + R_i^{m+1} \quad (4.4)$$

donde  $n$  y  $m$  son los índices temporal y de iteración interna respectivamente. 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  $Na^+$

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

De la ecuación 4.4 se obtiene  $C_i^{m+1}$  utilizando el método de Gauss-Seidel.

En el caso del submodelo *OFF time*, la discretización es similar, pero el término migratorio es eliminado.

#### Discretización de la ecuación de campo eléctrico

La aproximación de la ecuación 3.4 resulta en:

$$\sum_{\text{especies}} zD \left( \frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) + \sum_{\text{especies}} |z|u \left( \frac{(C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial x}) - (C_{i-1}^{m+1} \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial x})}{h} \right) = 0 \quad (4.5)$$

De la misma se obtiene  $\frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial x}$  utilizando el método de Gauss-Seidel.

### Discretización de las ecuaciones en los bordes del dominio

En ambos modelos se realiza la misma discretización que la utilizada en el modelo previo de EChT. En el caso del submodelo *OFF time*, la discretización se realiza eliminando el término migratorio. En ambos casos se utilizan las rutinas *Multidimensional Root-Finding Routines* de la biblioteca *GNU Scientific Library* (GSL) para resolución del sistema no lineal.

### Criterios de convergencia

Los criterios de convergencia utilizados fueron los mismos que para el modelo de EChT del capítulo previo. Las ejecuciones realizadas para las simulaciones del presente trabajo nunca sobrepasaron la cantidad de iteraciones prefijadas.

El modelo computacional fue escrito en el lenguaje C++ y su ejecución se realizó en un equipo con procesador Intel(R) Core(TM) i5 bajo el entorno Linux Ubuntu 10.04 como sistema operativo. Con esta configuración, el tiempo promedio de ejecución de la aplicación fue de 6 minutos. Los parámetros utilizados para las corridas fueron los mismos que para el capítulo anterior y se encuentran detallados en la tabla 3.1. Para todas las ejecuciones se utilizó una malla de 800 nodos y un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-12}$  para el submodelo *ON Time* y un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-5}$  para el submodelo *OFF Time*. En todos los casos, el tiempo total de simulación fue de  $T = 8s$ , correspondiente a la aplicación de un tren de 8 pulsos a  $1Hz$ .

## 4.2. Modelo *in vitro*

El modelo experimental *in vitro* se basa en la aplicación de la ECT a diferentes amplitudes y duraciones de pulso eléctrico sobre un gel cuasi-unidimensional. El esquema experimental se puede observar en la figura 4.2(a). Consiste en una lámina fina de  $4 \times 2 \text{ mm}^2$ ,  $1 \text{ mm}$  de alto, 1% de gel de agar-agar con NaCl a concentración fisiológica ( $0,16 \text{ mol/dm}^3$ ), 1% rojo de metilo ( $C_{15}H_{15}N_3O_2$ , punto de transición pH 6,2), 1% fenofaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ , punto de transición pH 8,3) y pH neutro). Dos alambres de platino de 1 mm de diámetro fueron ubicados en los extremos del gel, a 4 mm uno de otro. Ocho pulsos de 100, 400 y 600 V (correspondientes a 250, 1 000 y 1 500 V/cm) y 100, 300 y 1 000  $\mu s$  fueron aplicados a 1 Hz utilizando un electroporador de onda cuadrada (ECM 830, BTX-Harvard Apparatus, USA). El seguimiento visual del cambio de color de los indicadores de pH que aparecieron en ambos electrodos fue realizado utilizando lentes de aumento. Imágenes de video cámara (Powershot SX20 IS) fueron capturadas durante el proceso a 30 cuadros por segundo con una resolución de 312 píxeles/cm, procesadas y analizadas a 10 cuadros por segundo con la aplicación gráfica ImageJ [100]. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente sin observar cambios significativos en la temperatura durante el proceso. La figura

4.2(b) muestra la configuración del gel y los electrodos con el frente de pH anódico y catódico de colores rosa y rojo respectivamente.

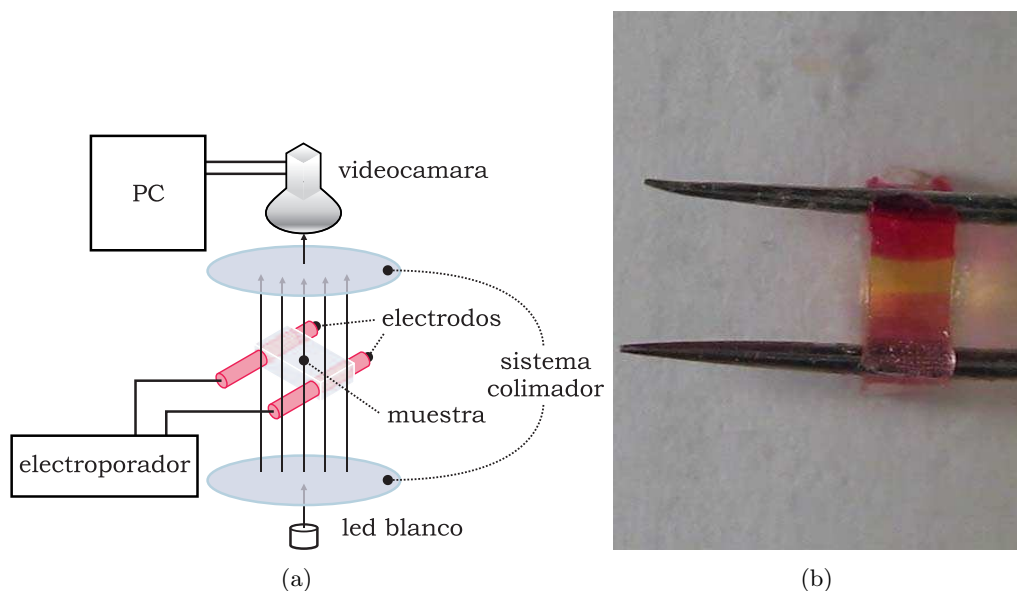


Figura 4.2: a) Esquema Experimental. b) Configuración del gel y los electrodos.

### 4.3. Resultados y Discusión

En la figura 4.3 se puede ver una representación espacio temporal de la aplicación de la ECT sobre un gel, en la cual se observa la evolución de los frentes de pH ácido (rosa) y básico (rojo). La figura es un “reslice“, construida a partir de una secuencia de imágenes tomadas a diferentes tiempos de un video de 8 s de duración. El video fue filmado desde arriba con la celda en posición horizontal. Una línea, paralela al eje  $y$  de la celda y representativa del proceso, fue extraída de cada imagen. Estas líneas fueron apiladas, generando una imagen espacio temporal sobre los 8 segundos de duración del experimento. La figura revela la existencia de gradientes de pH significativos durante un tratamiento estándar de la ECT. Se puede observar la gran extensión del frente de pH anódico vs. catódico, basándose en que ambos indicadores de pH viran de color aproximadamente a una misma distancia del pH neutro (6,2 para el indicador de ácido y 8,3 para el de base). En el trabajo de Kim *et al.* [124], utilizando un modelo distinto, se muestra también una alteración significativa de pH del medio tratado.

La figura 4.4 muestra los resultados experimentales (símbolos) y las predicciones teóricas (líneas) del seguimiento de los frentes de pH, en una escala log-log, durante la aplicación de la ECT para diferentes valores de longitud y amplitud de pulso. Las figuras 4.4 a) y b), presentan los frentes anódicos y catódicos, respectivamente, para una longitud de pulso de  $100 \mu\text{s}$  (8 pulsos, 1 Hz) y amplitudes de pulso de 100, 400 y 600 V; las figuras 4.4 c) y d) presentan los frentes de pH anódicos y catódicos, respectivamente, para una amplitud de pulso de 400 V (8 pulsos, 1 Hz), y longitudes de pulso de 100, 300 y  $1000 \mu\text{s}$ .

Una comparación de las predicciones de los frentes de pH realizadas con el modelo *in silico* vs. las mediciones realizadas en el modelo *in vitro* muestran una buena correlación. Incremen-



Figura 4.3: Frentes opuestos de pH durante la aplicación de la ECT en el modelo *in vitro*. Composición temporal de imágenes de frentes de pH durante un tren de 8 pulsos de 400 V y 300  $\mu\text{s}$  a 1 Hz. Se puede observar en el tiempo una acidificación anódica y una basificación catódica a través del cambio de color de los indicadores de pH: rosa (izquierda) y rojo (derecha).

tos en la longitud y amplitud del pulso resultan en un incremento de la velocidad del avance del frente de pH (las diferencias entre las curvas son significativas), generando potencialmente una mayor superficie necrótica. También, como ha sido mencionado previamente, se ha observado que el frente de pH ácido avanza más rápido que el básico, lo que se relaciona con que los valores de los coeficientes de difusión y migración de los protones son mayores a los de los oxidrilos. Sin embargo, en todos los casos, la pendiente de la curva que representa al avance de pH, se mantiene cercana a 0.5 (ver tabla 4.1), lo que significa que la evolución del frente de pH escala en el tiempo como  $t^{1/2}$ , característico de un proceso controlado predominantemente por la difusión. Esto se debe a que la duración del período *ON* durante todo el proceso es casi insignificante con respecto al período *OFF* (100  $\mu\text{s}$  vs. aproximadamente 1 s).

Ánodo						
	100 $\mu\text{s}$		300 $\mu\text{s}$		1000 $\mu\text{s}$	
	pendiente	error s.	pendiente	s. error	pendiente	error s.
100 V	0.557	0.006				
400 V	0.508	0.005	0.498	0.004	0.496	0.007
600 V	0.477	0.005				
Cátodo						
	100 $\mu\text{s}$		300 $\mu\text{s}$		1000 $\mu\text{s}$	
	pendiente	error s.	pendiente	s. error	pendiente	error s.
100 V	0.460	0.010				
400 V	0.484	0.007	0.434	0.004	0.547	0.009
600 V	0.439	0.008				

Tabla 4.1: Valores de pendiente y error estándar correspondientes a las curvas presentadas en la figura 4.4.

La figura 4.5 presenta una predicción espacio temporal de la aplicación de la ECT mostrando la evolución de los perfiles de pH ácido (rosa) y básico (rojo). Dicha figura ha sido construida utilizando una secuencia temporal de datos de la distribución espacial de pH obtenida del modelo *in silico*. La figura revela la existencia de un gradiente de pH significativo durante la aplicación de una ECT bajo los parámetros utilizados para la figura 4.3. La figura

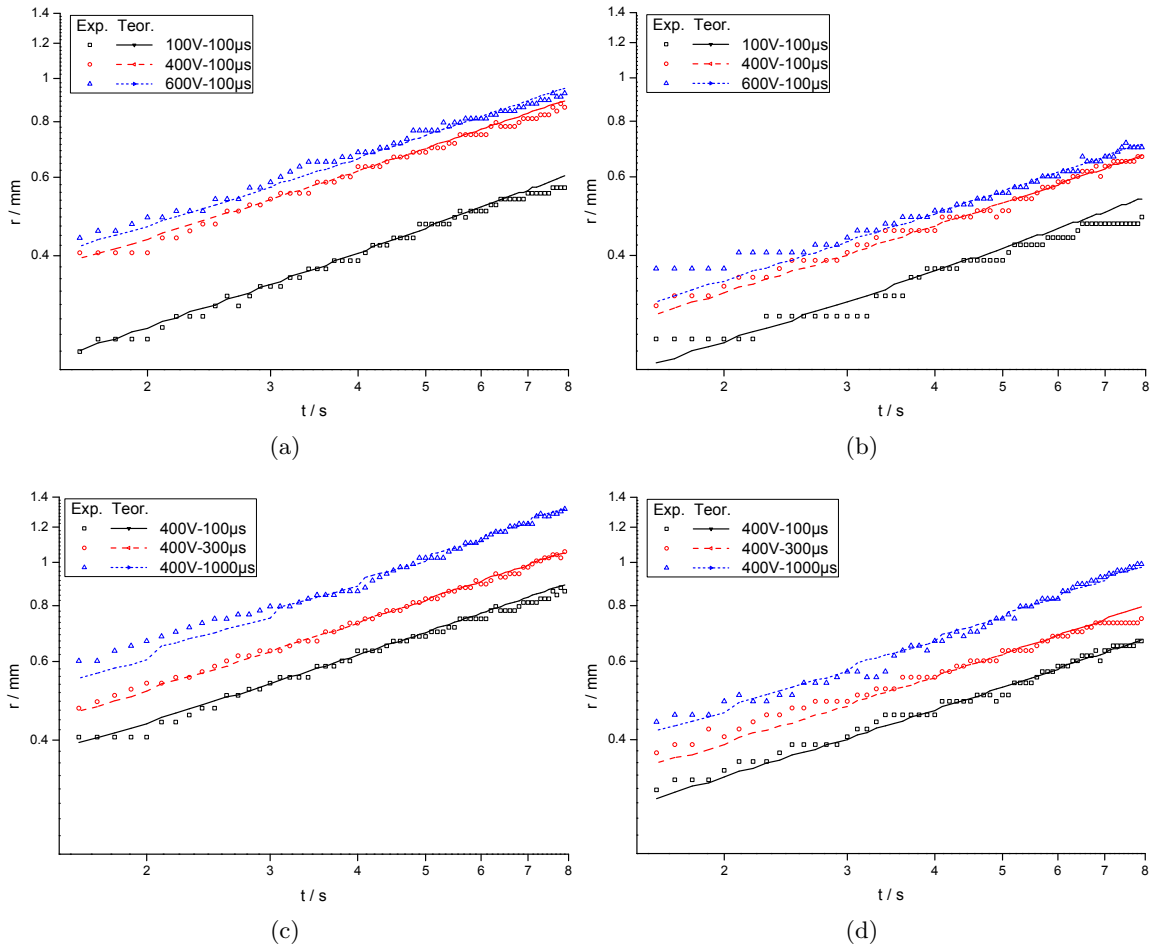


Figura 4.4: Perfiles de frente de pH *in vitro* (símbolos) e *in silico* (líneas) en una escala log-log durante la aplicación de la ECT utilizando distintos valores. a) Frente anódico, amplitud de pulsos de 100, 400 y 600 V, longitud de pulsos de 100  $\mu\text{s}$ , 8 pulsos, 1 Hz. b) Frente catódico, mismos valores que en a). c) Frente anódico, amplitud de pulsos de 400 V, longitud de pulsos de 100, 300 y 1 000  $\mu\text{s}$ , 8 pulsos, 1 Hz. d) Frente catódico, mismos valores que en c).

experimental 4.3, muestra una sorprendente correlación con esta figura. En ambas imágenes, se puede observar que el frente anódico avanza más rápido que el catódico.

La figura 4.6 muestra la concentración espacial de las cuatro especies y la distribución de pH, predichas por el modelo *in silico*, en un tratamiento típico de la ECT (parámetros: tren de 8 pulsos de 100  $\mu\text{s}$  y 400 V/cm a 1 Hz). Se puede observar un incremento en la concentración de cloruros y una disminución de sodio en el ánodo (lado izquierdo del gráfico), mientras que en el cátodo ocurre lo contrario (lado derecho del gráfico). La acidificación anódica extrema y la basificación catódica inducidas durante la ECT son debidas al incremento de protones y oxidrilos en el ánodo y cátodo, respectivamente. De la misma manera, también se pueden observar los frentes de pH ácido (izquierda) y básico (derecha) avanzando en el tiempo, en dirección contraria entre sí.

La figura 4.7 muestra una comparación de la distribución espacial de pH durante la aplicación de la ECT (línea de color negro) y el EChT (línea de color rojo), a misma dosis de

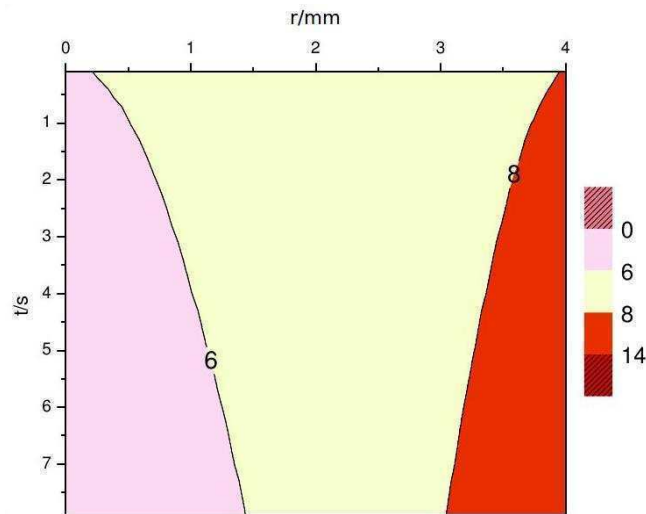


Figura 4.5: Perfil de pH obtenido a través del modelo *in silico*: frente anódico (pH=6) y catódico (pH=8, rojo) durante la aplicación de la ECT a mismas condiciones que las utilizadas para la figura 4.3.

carga eléctrica. La comparación de sus frentes de pH, deja traslucir un resultado *a priori* no esperado: la acidificación anódica es mayor en la ECT que en el EChT, sugiriendo que la necrosis tisular podría ser mayor en la primera que en el segundo.

Las predicciones del modelo *in silico* fueron corroboradas experimentalmente. Utilizando el mismo esquema experimental de la figura 4.2, una tira indicadora de pH (Merk 0,5-5 pH) fue ubicada sobre los electrodos de platino y humedecida con una solución de *NaCl* en concentración fisiológica. Luego de aplicar la ECT (8 pulsos, 400 V, 100  $\mu$ s, 1 Hz), la zona de la tira ubicada sobre el ánodo sufrió un cambio de color (del azul, estado basal, hacia el amarillo) correspondiente a un valor de pH 2 (de acuerdo a la tabla de colores de referencia). El mismo procedimiento, pero ahora aplicando el EChT (135,55 C/m<sup>2</sup>, 16,94 A/m<sup>2</sup>, 8 s) generó un cambio en la tira reactiva de pH hacia el color naranja, correspondiente a un valor de pH 4. Para una mejor comprobación de dichos valores, fueron tomadas imágenes con una cámara de alta velocidad (Casio FH-25) y analizadas con el paquete gráfico *ImageJ*. Luego, se realizaron histogramas con los valores de color de la tira y la tabla de referencias. El análisis reveló que las tiras utilizadas durante la ECT viraron al color correspondiente a pH 2,5, mientras que las tiras correspondiente al EChT viraron al color correspondiente a pH 4. Ambos resultados confirman la predicción *in silico*.

Notar que la densidad de corriente aplicada es, para la longitud de pulso testeado, cuatro órdenes de magnitud mayor para la ECT que para el EChT. Esto implica una cantidad mayor de reacciones electroquímicas y, localmente y de forma instantánea, una mayor generación de protones en el ánodo para la ECT que para el EChT. Esta podría llegar a ser la principal razón de una mayor acidificación lograda en la ECT comparada con la EChT.

Esto puede ser altamente relevante al momento de optimizar del tratamiento de la ECT, en la cual se desea aplicar una dosis eficaz y reducir al mínimo las alteraciones de pH que puede conducir a la necrosis tisular. Una forma de lograrlo podría ser reducir al mínimo la tensión y el número de pulsos, aumentando al máximo la longitud del pulso tanto como sea posible. Se ha demostrado recientemente que este nuevo procedimiento que introduce pulsos de baja

corriente, bajo voltaje y larga duración, suele ser más seguro y eficiente en la EGT [127,128].

#### 4.4. Conclusiones

En el presente capítulo se analizó el proceso de electroporación desde un nuevo ángulo, al parecer poco estudiado por la literatura: el papel del transporte de iones y los cambios asociados de pH en el modelado de la ECT. Este análisis se desarrolló a través de mediciones de gel *in vitro* y modelos teóricos. Se ha presentado evidencia experimental *in vitro* que muestra que el transporte de iones en geles durante la electroporación reversible bajo parámetros utilizados típicamente en estudios clínicos, induce frentes de pH que emergen de ambos electrodos.

Estos frentes de pH son notorios e inmediatos. Usando una técnica de seguimiento espacio-temporal, para el seguimiento de estos frentes, se encontró que escalan en el tiempo como  $t^{1/2}$ , típico de un proceso predominantemente difusivo. Esta información es muy útil para predecir la extensión del tejido tratado. Por otra parte, se introdujo un nuevo modelo teórico que describe el transporte iónico de la ECT en un procedimiento de dos submodelos, el primero u *ON time* que describe el transporte iónico regido por la migración y la difusión, y el segundo u *OFF time* que describe el transporte iónico regido exclusivamente por difusión. Esta división permite trabajar con un paso de tiempo distinto para cada submodelo, siendo el de submodelo *ON time* varios órdenes de magnitud menor, y produciendo así un algoritmo numérico notablemente robusto.

El seguimiento teórico del frente de pH muestra una excelente correlación con las mediciones experimentales realizadas. Por otra parte, las predicciones de la comparación de los frentes de pH de la ECT con los que se plantean en el EChT reveló un sorprendente resultado que fue corroborado experimentalmente: la acidificación anódica es mayor en la ECT que en el EChT, lo que sugiere que la necrosis del tejido tratado también podría ser mayor. La cuantificación de la extensión del pH y su evolución es altamente relevante para optimizar el tratamiento de la ECT, donde se desea aplicar una dosis eficaz y reducir al mínimo las alteraciones de pH que conducen a la necrosis y daños de plásmidos (en el caso de la EGT). Una forma de lograrlo podría ser es el diseño de protocolos que minimicen la tensión y la cantidad de pulsos y aumente al máximo la longitud del pulso tanto como sea posible. Se espera que los resultados de este capítulo contribuya a la optimización de las terapias tumorales basadas en electroporación minimizando los efectos adversos del pH.

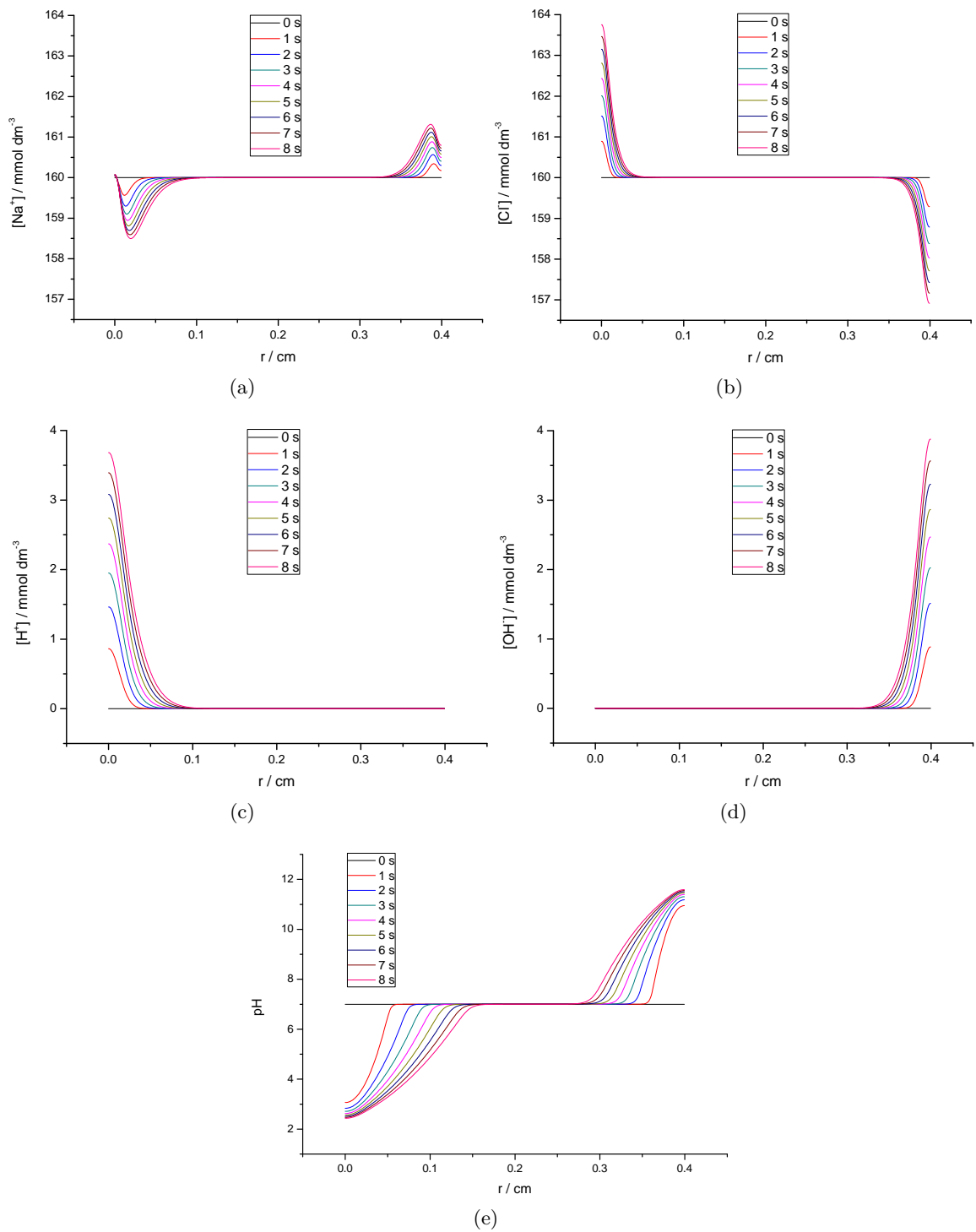


Figura 4.6: Predicciones del modelo *in silico* de la concentración de iones ( $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ) y la distribución de pH a lo largo del trayecto ánodo-cátodo (cm) durante la aplicación de un tratamiento típico de ECT (8 pulsos de 400 V y  $100 \mu\text{s}$  a 1 Hz) a diferentes tiempos (0-8 s). El ánodo se encuentra ubicado a izquierda y el cátodo a derecha. a) Sodios. b) Cloruros. c) Protones. d) Oxidrilos. e) Distribución de pH.



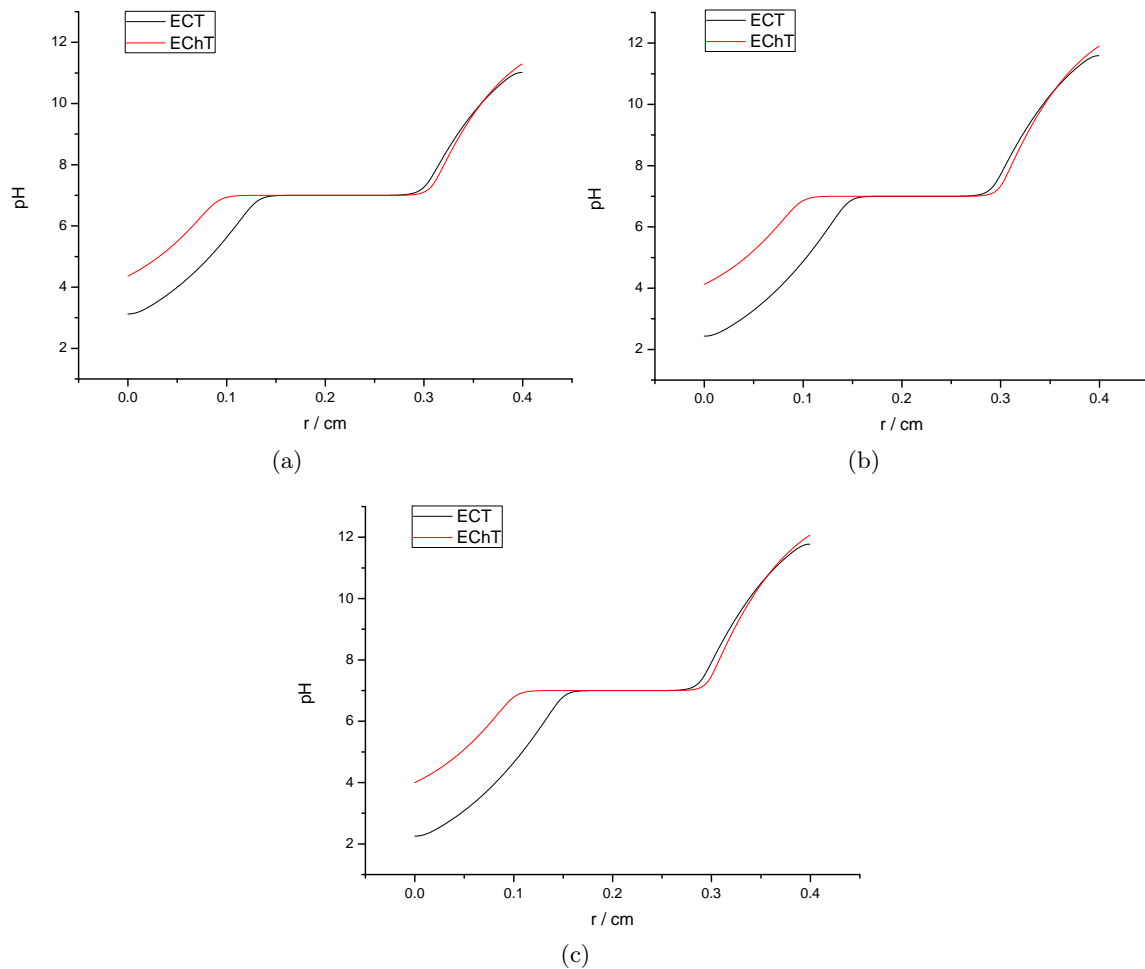


Figura 4.7: Distribución espacial del pH durante la ECT (líneas de color negro) y el EChT (líneas de color rojo) a misma dosis de tratamiento. El ánodo se encuentra ubicado a izquierda y el cátodo a derecha: a) Dosis de  $33,81 \text{ C/m}^2$ , ECT: 8 pulsos de 100 V,  $0,42 \cdot 10^5 \text{ A/m}^2$  y  $100 \mu\text{s}$  a 1 Hz (8 s total), EChT:  $4,23 \text{ A/m}^2$ , 8 s; b) Dosis de  $135,55 \text{ C/m}^2$ . ECT: 8 pulsos de 400 V,  $1,69 \cdot 10^5 \text{ A/m}^2$  y  $100 \mu\text{s}$  a 1 Hz (8 s total); EChT:  $16,94 \text{ A/m}^2$ , 8 s; c) Dosis de  $203,63 \text{ C/m}^2$ . ECT: 8 pulsos de 600 V,  $2,54 \cdot 10^5 \text{ A/m}^2$  y  $100 \mu\text{s}$  a 1 Hz (8 s total), EChT:  $25,45 \text{ A/m}^2$ , 8 s.

## Capítulo 5

# Modelo Radial Esférico de Electroporación Reversible con Electrodo Distantes

En el capítulo anterior, se introdujo un modelo matemático para la ECT de electrodos próximos que describe el transporte iónico a través de un esquema compuesto por dos submodelos: *ON time* para el transporte iónico regido por la migración y la difusión, y *OFF time* para el transporte iónico regido exclusivamente por difusión. Aquí extendemos dicho modelo para la descripción de la ECT a un tejido en una geometría cuasi-tridimensional. En el mismo, un electrodo (por ejemplo el ánodo) está ubicado en el centro del tumor, y el otro (cátodo) suficientemente alejado como para considerar que el producto de las reacciones catódicas no afectan al tejido a analizar. El dominio esférico se presenta en la figura 5.1 y está delimitado por una superficie esférica interior y exterior. La superficie límite esférica interior coincide con el ánodo. La superficie límite exterior se encuentra suficientemente alejada del ánodo por lo que se puede considerar que, aquí, las concentraciones de las especies iónicas son constantes (cátodo en el infinito).

Si bien este modelo no describe la interacción entre electrodos, permite el estudio cuasi-tridimensional del tratamiento aplicado a un tejido.

El modelo ECT 3D propuesto consiste, nuevamente, en la aplicación de las ecuaciones de Nernst-Planck a un tejido compuesto por cuatro especies ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ ) asumiendo la condición de electroneutralidad. Este modelo no presenta aún validación experimental.

En síntesis, el objetivo del presente capítulo es abordar el estudio, de manera cuantitativa, del transporte de iones en la ECT de electrodos distantes, en particular, el seguimiento de los frentes de pH en una geometría radial esférica.

### 5.1. Modelo *in silico* de ECT con Electrodo Distantes

El modelo *in silico* propuesto fue diseñado para estudiar un tratamiento estándar de la ECT: un tren de 8 pulsos de onda cuadrada de 1 Hz aplicada a un tejido tumoral. Dado que en este modelo sólo se puede describir un electrodo a la vez, en una primera instancia se decidió modelar el ánodo. El modelo se encuentra conformado por dos submodelos: a) *ON time*, que representa el caso en que el pulso eléctrico está siendo aplicado; y b) *OFF time*, el caso contrario.

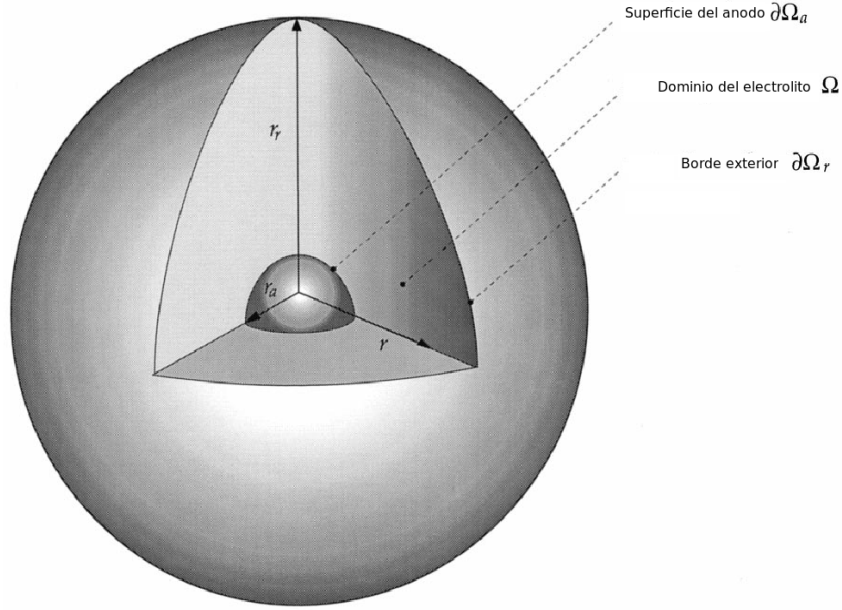


Figura 5.1: Geometría esférica del modelo donde  $r$  denota el radio,  $r_a$  es el radio del ánodo y superficie límite interior del dominio, y  $r_r$  es el radio de la superficie límite exterior del dominio.

### 5.1.1. Submodelo ON time

Al utilizar un sistema de coordenadas esféricas, asumiendo simetría esférica, los operadores divergencia ( $\nabla u$ ) y laplaciano ( $\nabla^2 u$ ) se expresan de la siguiente manera:

$$\nabla u = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 u)}{\partial r} = \frac{2ru}{r^2} + \frac{r^2 \frac{\partial u}{\partial r}}{r^2} = \frac{2u}{r} + \frac{\partial u}{\partial r} \quad (5.1)$$

$$\nabla^2 u = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 \frac{\partial u}{\partial r})}{\partial r} = \frac{2r \frac{\partial u}{\partial r}}{r^2} + \frac{r^2 \frac{\partial^2 u}{\partial r^2}}{r^2} = \frac{2}{r} \frac{\partial u}{\partial r} + \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \quad (5.2)$$

Aquí se utilizan las mismas ecuaciones que en el capítulo anterior. De esta manera, bajo la geometría mencionada, las ecuaciones diferenciales resultan en:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \right) + \frac{z}{|z|} u \frac{\partial C}{\partial r} \frac{\partial \phi}{\partial r} + \frac{z}{|z|} u C \left( \frac{2}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} \right) + R_i \quad (5.3)$$

$$\sum_{\text{especies}} z D \left( \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \right) + \sum_{\text{especies}} |z| u \frac{\partial C}{\partial r} \frac{\partial \phi}{\partial r} + \sum_{\text{especies}} |z| u C \left( \frac{2}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} \right) = 0 \quad (5.4)$$

En el caso de los bordes, la diferencia con el modelo introducido en el capítulo anterior, reside en que no se modela el cátodo. En su lugar se describe el borde exterior, una superficie esférica de radio  $r_r$ , a una distancia tal del ánodo en la que se puede asegurar que las concentraciones de las especies iónicas permanecen constantes. Por lo tanto, en el borde exterior se asume que el gradiente de concentración de las especies iónicas es nulo:

$$\nabla C_i \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (5.5)$$

De la sustitución de la expresión del flujo molar ( $J_i = -D_i \nabla C_i - \frac{z_i}{|z_i|} u_i C_i \nabla \phi$ ) en la ecuación  $I = F \sum_{i=especies} z_i J_i$ , se obtiene la expresión para el campo eléctrico en el borde exterior:

$$\frac{(I \cdot \mathbf{n})}{F} + \sum_{i=especies} |z_i| u_i C_i (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) = 0 \quad (5.6)$$

donde  $\mathbf{n}$  es el vector normal saliente e  $I$  la densidad de corriente en el borde exterior, mucho menor a la del ánodo debido al incremento de su superficie.

### 5.1.2. Submodelo OFF time

El modelo *OFF time* se basa en las mismas ecuaciones del capítulo anterior, salvo en el borde exterior. Al respecto, se asume que las concentraciones de las especies iónicas permanecen constantes:

$$\nabla C_i \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (5.7)$$

También en el borde exterior el campo eléctrico se asume nulo.

### 5.1.3. Modelo computacional

El problema de la ECT es de naturaleza no lineal y, por lo tanto, la resolución del sistema de ecuaciones planteado excluye una solución exacta, dejando sólo la opción de encontrar una solución numérica. Para ello, en ambos submodelos se resuelve el sistema de ecuaciones para cada paso de tiempo, en un dominio fijo, utilizando diferencias finitas y un método iterativo con parámetro de ponderación temporal igual a 1.

En la discretización se utiliza una malla espacial uniforme. Para la derivada de primer y segundo orden, se aplica el mismo esquema de discretización que en el capítulo anterior. Así, si se define  $n$  como el índice temporal y  $m$  como el de iteración interna, el método de Gauss-Seidel para la ecuación de transporte 5.3 discretizada, correspondiente al modelo *ON time*, resulta de la solución de  $C_i^{m+1}$  de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \frac{(C_i^{m+1} - C_i^m)}{\Delta t} = & \frac{2D}{r_i} \left( \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h} \right) + D \left( \frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) \\ & + \frac{z}{|z|} u \left( \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h} \right) \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} \\ & + \frac{z}{|z|} \frac{2u C_i^{m+1}}{r_i} \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} + \frac{z}{|z|} u C_i^{m+1} \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} - \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial r} \\ & + R_i^{m+1} \end{aligned}$$

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  $Na^+$

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

En el caso del submodelo *OFF time*, la discretización es similar, pero sin los términos migratorios.

La discretización de la ecuación de campo eléctrico 5.4 resulta:

$$\begin{aligned} & \sum_{\text{especies}} \frac{2zD}{r_i} \left( \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h} \right) + \sum_{\text{especies}} zD \left( \frac{C_{i+1}^m - 2C_i^{m+1} + C_{i-1}^{m+1}}{h^2} \right) \\ & + \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} \sum_{\text{especies}} |z|u \left( \frac{C_i^{m+1} - C_{i-1}^{m+1}}{h} \right) \\ & + \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} \sum_{\text{especies}} \frac{2|z|uC_i^{m+1}}{r_i} + \left( \frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r} - \frac{\partial \phi_{i-1}^{m+1}}{\partial r} \right) \sum_{\text{especies}} |z|uC_i^{m+1} = 0 \end{aligned}$$

Esta ecuación se resuelve para  $\frac{\partial \phi_i^{m+1}}{\partial r}$  utilizando el método de Gauss-Seidel.

Para el caso de las ecuaciones de borde, en ambos modelos se realiza una discretización similar a la del capítulo anterior y se utilizan las rutinas *Multidimensional Root-Finding Routines* de la biblioteca *GNU Scientific Library* (GSL) para la resolución del sistema no lineal.

Los criterios de convergencia utilizados fueron los mismos que en capítulos anteriores. Las ejecuciones realizadas para las simulaciones del presente trabajo nunca sobrepasaron la cantidad de iteraciones prefijadas.

El modelo computacional fue escrito en el lenguaje C++ y su ejecución se realizó en un equipo con procesador Intel(R) Core(TM) i5, bajo un entorno Linux Ubuntu 10.04 como sistema operativo. Con esta configuración, el tiempo promedio de ejecución de la aplicación fue de 30 minutos. Los parámetros utilizados para la corrida fueron los mismos que para el capítulo anterior y se encuentran detallados en la tabla 3.1. En su borde interior, el dominio está limitado por una esfera de 1 mm de radio, que constituye el ánodo. El borde exterior del dominio está ubicado a una distancia de 3,8 cm del borde interior. Para todas las ejecuciones se utilizó una malla de 7600 nodos y un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-12}$  para el submodelo *ON Time* y un  $\Delta t = 1 \cdot 10^{-5}$  para el submodelo *OFF Time*. En todos los casos, el tiempo total de simulación fue de  $T = 8s$ , correspondiente a la aplicación de un tren de 8 pulsos a 1Hz.

## 5.2. Resultados y Discusión

La figura 5.2 muestra la concentración espacial de tres de las cuatro especies ( $H^+$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ ) y la distribución de pH, predichas por el modelo *in silico*, en un tratamiento típico de la ECT (parámetros: tren de 8 pulsos de 100  $\mu s$  y 400 V/cm a 1 Hz). En la región cercana al ánodo, la concentración de oxidrilos ( $OH^-$ ) no sufre una variación significativa con respecto a su estado inicial, es por ello que no se muestra su gráfica. Se puede observar un leve incremento en la concentración de cloruros y una leve disminución de sodio en el ánodo (lado izquierdo

del gráfico), mientras que en el borde exterior, como es de esperar, las concentraciones se mantienen constantes. La acidificación anódica extrema inducida durante la ECT puede ser atribuida al incremento de protones en el ánodo. También se puede observar el frente de pH ácido (izquierda) avanzando en el tiempo. Todos estos resultados son consistentes con lo observado en el capítulo anterior. La diferencia fundamental radica en las diferencias de sus valores, siendo éstos mayores en el caso de los electrodos próximos..

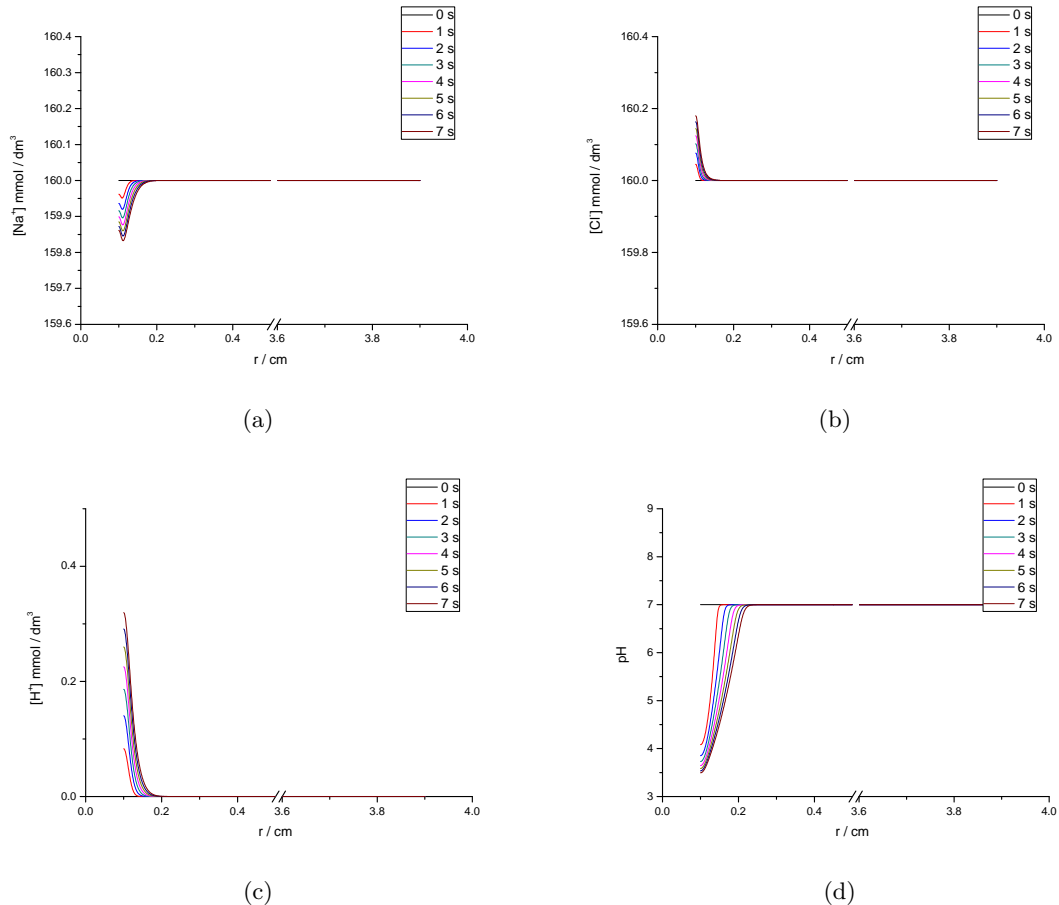


Figura 5.2: Predicciones del modelo *in silico* de la concentración de iones ( $mmol/dm^3$ ) y la distribución de pH alrededor del ánodo (cm) durante la aplicación de un tratamiento típico de ECT (8 pulsos de 400 V y 100  $\mu s$  a 1 Hz) a diferentes tiempos (0-7 s). El ánodo se encuentra ubicado a izquierda. a) Sodios. b) Cloruros. c) Protones. d) Distribución de pH.

En la figura 5.3 se puede observar la disminución del potencial eléctrico en función de la distancia al ánodo. Los datos graficados corresponden a los valores de potencial eléctrico durante los distintos pulsos aplicados en un tratamiento de ECT estándar. Se puede observar que no hay variaciones significativas entre los distintos pulsos. La forma de la curva se encuentra altamente relacionada a la geometría del problema, ya que a medida que aumenta la distancia al ánodo, el volumen de la esfera crece en forma no lineal.

En la figura 5.4 se pueden observar los frentes de pH del modelo *in silico*, en una escala logarítmica, durante la aplicación de la ECT a diferentes valores de longitud y amplitud de

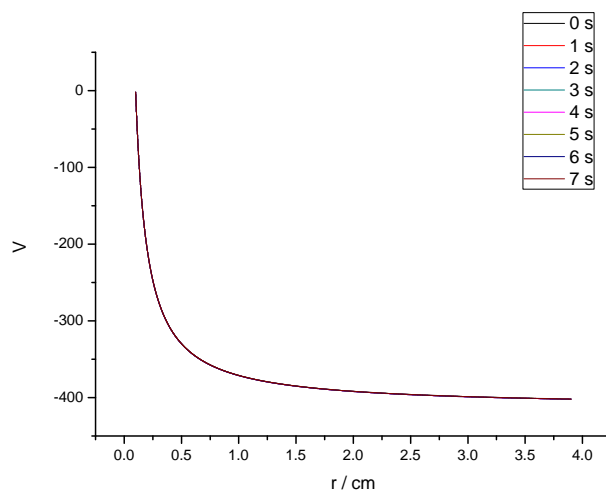


Figura 5.3: Potencial electrostático del modelo *in silico*, en función de la distancia al ánodo, en el momento que los pulsos son aplicados en la ECT (tren de 8 pulsos, 400 V, 100  $\mu$ s, 1 Hz). Se observa una superposición de las curvas correspondientes a los diferentes tiempos.

pulso. La figura 5.4 a) muestra los frentes anódicos de pulsos de 100  $\mu$ s (8 pulsos, 1Hz,) y 100, 400 y 600 V de amplitud; la figura 5.4 b) muestra los frentes de pH anódicos, de pulsos de 400 V de amplitud, y de 100, 300 y 1000  $\mu$ s de longitud ( 8 pulsos, 1Hz). Incrementos en la longitud y amplitud del pulso resultan en un incremento de la velocidad del avance del frente de pH, generando potencialmente así una mayor superficie necrótica. En todos los casos, las pendientes de las curvas se mantienen cercanas a 0,5 (tabla 5.1), lo que significa que la evolución del frente de pH escala en el tiempo como  $t^{1/2}$ , característico de un proceso controlado predominantemente por la difusión. Nuevamente, esto se puede atribuir a que la duración del período *ON time* durante todo el proceso es casi insignificante (difiere en varios órdenes de magnitud) con respecto al período *OFF time*.

	100 $\mu$ s	error s.	300 $\mu$ s	s. error	1000 $\mu$ s	error s.
100 V	0.44774	0.00307				
400 V	0.46016	0.00178	0.47056	0.00233	0.47131	0.00527
600 V	0.46371	0.00184				

Tabla 5.1: Valores de pendiente y error estándar correspondientes a las curvas presentadas en la figura 5.4.

Una comparación de la distribución del pH entre el modelo unidimensional (figura 4.6(e)) y el radial esférico (figura 5.2(d)), luego de aplicar el tratamiento de la ECT de 8 pulsos a 400 V, 100  $\mu$ s, 1 Hz, revela que en una región cercana al ánodo, el primero alcanza valores de pH de 2,5 mientras que el segundo toma valores de pH de 3,5. Esta diferencia puede ser atribuida a la densidad de corriente necesaria para mantener el voltaje constante durante la aplicación del pulso (modelo unidimensional  $16,9 \cdot 10^4 A/m^2$ , modelo radial esférico  $2,65 \cdot 10^4 A/m^2$ ), lo que conlleva a que en el modelo radial esférico se generen menos protones alrededor del electrodo, y por lo tanto una menor acidificación. En la tabla 5.2 se pueden observar los

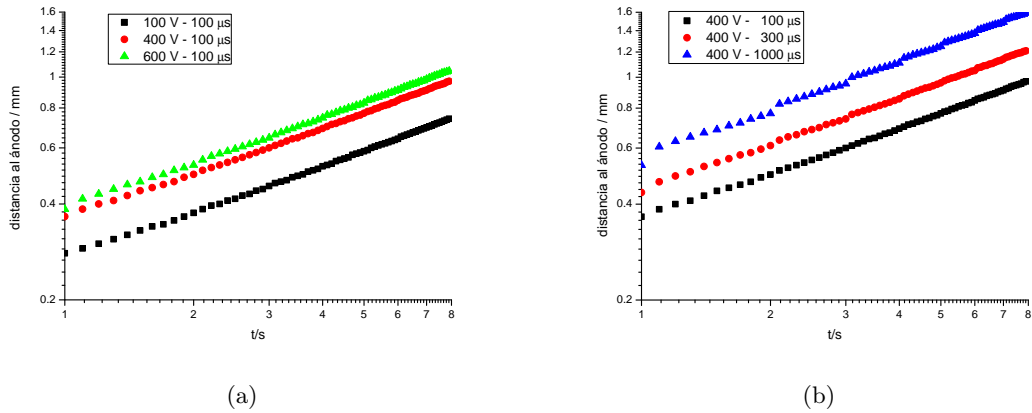


Figura 5.4: Perfiles de frentes anódicos de pH obtenidos a través del modelo *in silico* en una escala log-log durante la aplicación de la ECT. a) amplitud de pulsos de 100, 400 y 600 V, longitud de pulsos de 100  $\mu\text{s}$ , 8 pulsos, 1 Hz. b) amplitud de pulsos de 400 V, longitud de pulsos de 100, 300 y 1 000  $\mu\text{s}$ , 8 pulsos, 1 Hz.

valores de densidad de corriente necesarios para mantener el voltaje constante (en el modelo *in silico*) bajo distintas condiciones de tratamiento, los cuales pueden ser comparados con los utilizados en la figura 4.7. Se observa un aumento de la densidad de corriente a medida que aumenta la intensidad del pulso aplicado. Sin embargo, el aumento de la duración del pulso no produce modificaciones significativas.

	100 $\mu\text{s}$	300 $\mu\text{s}$	1000 $\mu\text{s}$
100 V	$1,46 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$1,46 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$1,44 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$
400 V	$2,65 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$2,61 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$2,51 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$
600 V	$3,33 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$3,25 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$	$3,06 \cdot 10^4 \text{ A/m}^2$

Tabla 5.2: Valores *in silico* representativos de la densidad de corriente para diferentes valores de amplitud y longitud de pulso, durante una ECT típica de 8 pulsos a 1 Hz.

En la tabla 5.3 se muestran los valores de dosis de corriente eléctrica correspondientes a la aplicación del tratamiento de la ECT de 8 pulsos, 1 Hz, bajo diferentes valores de amplitud y longitud de pulso. Se observa que, en este caso, tanto el aumento de la amplitud como el aumento de la duración del pulso inducen un incremento significativo de la dosis de corriente eléctrica aplicada. Estos valores pueden ser utilizados como base para una futura comparación con el EChT.

	100 $\mu\text{s}$	300 $\mu\text{s}$	1000 $\mu\text{s}$
100 V	$1,46 \text{ C/m}^2$	$4,38 \text{ C/m}^2$	$14,44 \text{ C/m}^2$
400 V	$2,65 \text{ C/m}^2$	$7,84 \text{ C/m}^2$	$25,11 \text{ C/m}^2$
600 V	$3,33 \text{ C/m}^2$	$9,75 \text{ C/m}^2$	$30,63 \text{ C/m}^2$

Tabla 5.3: Dosis *in silico* de corriente eléctrica utilizada, a diferentes valores de amplitud y longitud de pulso, durante una ECT típica de 8 pulsos a 1 Hz.



En síntesis, si bien el modelo ECT radial esférico no toma en cuenta la interacción ánodo-cátodo, este modelo de simetría esférica permitió considerar la naturaleza eminentemente tridimensional del tejido tumoral. Una consecuencia inmediata es que las corrientes eléctricas predichas son mucho menores que las del modelo unidimensional, lo que se supone que es más realista.

## Capítulo 6

# Conclusiones y Trabajos Futuros

### 6.1. Conclusiones

Los tratamientos de tumores a través de la aplicación de campos eléctricos empiezan a tomar relevancia debido a que se caracterizan por ser seguros, efectivos y menos onerosos que la cirugía tradicional, quimioterapia, etc. Dentro de este grupo de tratamientos se pueden mencionar el EChT, la ECT, la IRE y la Supraporación. En el presente trabajo se exploraron dos de ellos: el EChT y la ECT. Para ello se utilizó la metodología *in vivo-in vitro-in silico*, que permite una visión integral del problema, posibilitando al mismo tiempo la descripción y predicción de resultados experimentales así como la detección de artefactos numéricos.

En la literatura se postula que el perfil de pH inducido por el EChT presenta una buena correlación con el nivel de necrosis tisular alcanzado por este tratamiento, debido a que un pH por encima o por debajo de cierto rango fisiológico produce la destrucción de tejido. Un modelo teórico-computacional puede ser de utilidad en la predicción del nivel y extensión de esta destrucción, proporcionando así una base para la planificación sistemática del tratamiento clínico

En el capítulo 2 se introdujo un primer modelo del EChT para electrodos próximos, con el objetivo de poder realizar una primera aproximación al estudio del EChT validado experimentalmente. El modelo *in vivo* reveló la alta correlación existente entre los valores de pH extremo y las zonas de destrucción de tejido. Tanto el modelo *in silico* como el modelo *in vitro* mostraron igual comportamiento: la aparición de valores de pH muy alcalinos y ácidos en el cátodo y ánodo, respectivamente, recuperando valores neutrales hacia la periferia, no muy lejos de los electrodos. El seguimiento de los frentes de pH indica que éstos avanzan en el tiempo como  $t^{\frac{1}{2}}$ , indicando un transporte iónico controlado por difusión. Esto indicaría que el frente de necrosis también tendría este comportamiento. Si bien los resultados obtenidos *in silico* fueron buenos a nivel cualitativo, la utilización de una malla uniforme sumado al hecho de prescindir de la hipótesis de electroneutralidad —y en consecuencia, la necesidad de resolver la ecuación de Poisson para el potencial electrostático—, resultaron en un problema de estabilidad numérica que limitó severamente la utilización de valores paramétricos más realistas.

A los efectos de utilizar el seguimiento de los frentes de pH para la predicción de la magnitud de la destrucción del tejido tratado, fue necesario utilizar valores más realistas en los modelos teóricos de predicción. Con este objetivo, y dada la limitación del modelo del capítulo 2, se introdujo un nuevo modelo *in silico* en el capítulo 3.

Este nuevo modelo, validado con experimentos *in vitro*, resultó muy robusto (numéricamente estable), y capaz de predecir mejor las concentraciones iónicas y los frentes de interacción, en particular los frentes de pH, no solo a nivel cualitativo sino también cuantitativo. En este sentido, se predice que, transcurrido un cierto tiempo, a partir de una condición inicial de pH neutro, se generan entre los electrodos dos frentes de pH extremos (uno alcalino catódico y otro ácido anódico) que se desplazan en direcciones opuestas hasta colisionar entre sí, haciendo, con el tiempo suficiente, desaparecer toda posible región de pH fisiológico entre ellos. El análisis de los resultados indica que, en este modelo de tipo unidimensional, el frente de pH se desplaza gobernado por la migración Este dato es esencial para la predicción de la zona de destrucción tisular en aplicaciones clínicas. Respecto al punto de colisión de los frentes de pH se pudo inferir que, a medida que aumenta la corriente eléctrica, el tiempo de colisión disminuye significativamente, mientras que la ubicación espacial de la colisión se mantiene casi constante. Por otra parte, a una intensidad de corriente dada, la ubicación espacial del punto de colisión no depende de los valores de pH considerados. En el rango de intensidades de corriente analizados, la localización de este punto se encuentra siempre más cerca del cátodo, lo que indica que el frente ácido avanza más rápido que el básico.

La existencia de cambios de pH, durante la aplicación de campos eléctricos, podría estar ocurriendo no sólo en el EChT sino también en otras terapias basadas en la aplicación de corriente: ECT, IRE, Supraporación, etc. Con el objetivo de verificar esta hipótesis, en el capítulo 4 se realizó un estudio detallado del rol del pH en la ECT. El análisis del rol del pH en la ECT ha sido poco estudiado en la literatura, sin embargo, éste puede ser relevante considerando su efecto inductor de necrosis, algo que busca ser minimizado en este tipo de tratamiento. Se presentó evidencia experimental *in vitro* que muestra que, durante una electroporación reversible bajo condiciones de aplicación utilizadas típicamente en estudios clínicos, se inducen frentes de pH que emergen de ambos electrodos. Estos frentes son notorios e inmediatos. Usando una técnica de seguimiento espacio-temporal, para el seguimiento de estos frentes, se encontró que escalan en el tiempo como  $t^{1/2}$ , típico de un proceso predominantemente difusivo. Esto se debe a que, en la ECT, la duración del período en que se aplica el pulso durante todo el proceso es casi insignificante (difiere en varios órdenes de magnitud) con respecto al período en que el pulso es nulo. Esta información es muy útil para predecir la extensión del tejido dañado por necrosis. El seguimiento teórico del frente de pH mostró una excelente correlación con las mediciones experimentales realizadas. Por otra parte, la comparación entre los frentes de pH teóricos de la ECT con los de la EChT, para una misma dosis de corriente, reveló un sorprendente resultado que fue corroborado experimentalmente: la acidificación anódica es mayor en la ECT que en el EChT, lo que sugiere que la necrosis del tejido tratado también podría ser mayor. La cuantificación de la alteración del pH y su evolución es altamente relevante para optimizar el tratamiento de la ECT, donde se desea aplicar una dosis eficaz y reducir al mínimo las alteraciones de pH que conducen a la necrosis y daños de plásmidos (en el caso de la EGT). Una forma de lograrlo es el diseño de protocolos que minimicen la tensión y la cantidad de pulsos y aumente al máximo la longitud del pulso tanto como sea posible. Se espera que los resultados de este capítulo contribuyan a la optimización de las terapias tumorales basadas en electroporación minimizando los efectos adversos del pH.

En el capítulo 5 se presentó una extensión del modelo a una geometría radial esférica del capítulo 4 —utilizando un electrodo (ánodo) de platino—, para la aplicación de la ECT. Aquí se asumió que el cátodo está ubicado a una distancia suficientemente lejana del ánodo como para asegurar que el producto de las reacciones catódicas no afecten al tejido a analizar.

Si bien al utilizar coordenadas esféricas con simetría esférica, sólo se puede representar un solo electrodo a la vez (se supone al electrodo opuesto ubicado en el infinito) y por lo tanto no permite analizar la interacción entre ambos electrodos (muy importante en el caso de tratamientos con electrodos dispuestos a muy corta distancia), en contraposición permite incursionar en el estudio cuasi-tridimensional de la ECT aplicada a un tejido. Los resultados teóricos permitieron realizar una caracterización del perfil del frente de pH que escala en el tiempo como  $t^{1/2}$ , típico de un proceso predominantemente difusivo (los ensayos experimentales correspondientes se realizarán en un futuro próximo). Esto no es de extrañar ya que, en este tipo de tratamiento, el tiempo total en estado “ON” es insignificante con respecto al tiempo en estado “OFF”. Los resultados obtenidos por este modelo radial esférico revelaron que los frentes se mueven más lentos que en el caso del modelo unidimensional (capítulo 4). Estas diferencias podrían estar originadas en la cantidad de corriente que necesita cada modelo (*in silico*) para mantener, durante la aplicación del pulso, el voltaje constante. En el caso del modelo radial esférico, dicha cantidad es mucho menor, y por lo tanto esto conlleva a que se generen menos protones alrededor del ánodo, y por lo tanto una menor acidificación. Desde el punto de vista fisicoquímico, la razón es que el cátodo se encuentra mucho más lejos que en el otro modelo y la resistencia es mucho mayor, por lo tanto la corriente que circula es mucho menor.

En síntesis, el abordaje interdisciplinario del estudio de los efectos del EChT y la ECT nos ha permitido obtener las siguientes contribuciones en esta tesis:

1. La formulación de un nuevo modelo *in silico* unidimensional validado con modelos *in vivo* e *in vitro*, todos bajo el EChT, revela que un estado inicial con valores de pH fisiológicos evoluciona entre electrodos hacia un frente catódico alcalino extremo y un frente anódico ácido extremo moviéndose uno en dirección al otro, hasta eliminar la posible existencia de una zona de pH fisiológico entre ellos. Esta información es extremadamente útil para la predicción de la extensión del tratamiento del tejido, lo cual tiene implicancias significativas en la operación óptima del EChT.
2. La formulación de un modelo *in silico* unidimensional validado con un modelo *in vitro*, sometido al EChT, revela que las áreas necróticas se correlacionan muy bien con las áreas cubiertas por los frentes ácidos y alcalinos de modo que el seguimiento de frentes de pH puede ser utilizado con ventaja para la predicción de la extensión de la destrucción tumoral y por ende, para una evaluación de la efectividad del EChT.
3. La formulación de un modelo *in silico* unidimensional del transporte iónico en un tejido tumoral validado con un modelo *in vitro*, bajo la ECT, en condiciones típicas semejantes a las usadas en muchos estudios clínicos de la literatura, nos permite estudiar el rol del pH en la ECT. Las mediciones revelan que los frentes de pH son inmediatos y significativos. Dado que pueden producir necrosis del tejido, un efecto no deseado en aplicaciones clínicas de la ECT, así como también en situaciones más críticas como daño en los plásmidos utilizados en una EGT, es muy importante cuantificar la intensidad y la evolución de la alteración del pH. El seguimiento de los frentes de pH muestra que los mismos escalan como  $t^{1/2}$  característica de procesos difusivos, información relevante para la predicción de la extensión del tratamiento. La comparación de frentes de pH de la ECT con el EChT, muestra un resultado sorprendente: la acidificación anódica, para una misma dosis de corriente eléctrica, en la ECT es mayor que en el EChT, lo que sugiere que la necrosis resultante en un tejido puede ser también mayor. Estos

resultados adversos del pH en la ECT pueden ser minimizados con un correcto diseño del tratamiento eléctrico basado en los resultados de este trabajo. Una manera sencilla de lograrlo es utilizando pulsos con menor amplitud y mayor duración. El método de dos pasos (o de split) del sistema de ecuaciones diferenciales original permitió la integración de dos submodelos de escalas temporales disímiles: una micro (*ON Time*) y otra macro (*OFF Time*), dando como resultado un algoritmo extremadamente robusto.

4. La formulación de un modelo *in silico* radial esférico del transporte iónico en un tejido tumoral, bajo la ECT, en condiciones típicas semejantes a las usadas en muchos estudios clínicos de la literatura, revela que los frentes de pH se mueven más lentos que en el caso del modelo unidimensional. Estas diferencias podrían estar originadas en la cantidad de corriente que necesita cada modelo (*in silico*) para mantener, durante la aplicación del pulso, el voltaje constante. En el caso del modelo radial esférico, dicha cantidad es mucho menor, y por lo tanto esto conlleva a que se generen menos protones alrededor del ánodo, y por lo tanto una menor acidificación.

Se espera que los resultados de esta tesis ayuden significativamente a mejorar la habilidad para diseñar planes de tratamientos efectivos del EChT y la ECT. Se confía que la inclusión del EChT y la ECT, solas o en combinación con otras terapias, en la clínica médica, tenga beneficios significativos a nivel socioeconómico y mejore la calidad y duración de la vida de muchos pacientes.

## 6.2. Trabajos Futuros

En primera instancia cabe destacar que, si bien en el capítulo 5 se introdujo un modelo radial esférico de ECT, ha quedado pendiente la realización de experimentos que validen los resultados obtenidos. Adicionalmente, se podría construir su homólogo para el EChT y realizar una comparación entre ambos modelos, tanto de los resultados computacionales como experimentales. Ambas experiencias pueden ser replicadas para el cátodo.

En los primeros capítulos, se han introducido modelos unidimensionales de EChT y ECT. Si bien estos modelos *in silico* se correlacionan muy bien con el modelo experimental propuesto, para obtener una mejor aproximación a los tratamientos reales, habría que extenderlos a modelos *in silico* bi y tridimensionales. Adicionalmente, se podrían agregar otras especies que describan en forma más realista el tejido a tratar, como es el caso de aquellas que actúan como buffer.

Otra línea de investigación sería explorar modelos de EChT y ECT a nivel celular y analizar cuáles son los efectos de la terapia a ese nivel.

En cuanto a la validación experimental, habría que explorar la posibilidad de obtener mediciones de las restantes especies iónicas. Hasta el momento, las únicas mediciones que se han podido realizar son las correspondientes a pH y voltaje/corriente eléctrica.

En el presente trabajo, sólo se han explorado las terapias de EChT y ECT. Si bien los modelos han sido diseñados para estas terapias, se podrían extender a otras terapias, como la IRE y la Supraporación, entre otras.

# Acrónimos

**ECD** Electrodeposición en Celda Delgada

**EChT** Tratamiento Electroquímico de Tumores

**ECT** Electroporación Reversible

**EGT** Electroterapia génica

**IRE** Electroporación Irreversible

**NIH** National Institutes of Health de EEUU

**SOR** Successive Over Relaxation

**TTFs** Tumor Treating Fields

# 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 - 2008, 2009.
- [3] K. Robin Yabroff, Elizabeth B. Lamont, Angela Mariotto, Joan L. Warren, Marie Topor, Angela Meekins, and Martin L. Brown. Cost of Care for Elderly Cancer Patients in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9):630–641, 2008.
- [4] Joseph Lipscomb. Estimating the Cost of Cancer Care in the United States: A Work Very Much in Progress. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9):607–610, 2008.
- [5] 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.
- [6] Raymond W. Ruddon. *Cancer Biology, Fourth Edition*. Oxford University Press, 2007.
- [7] Onik G, Rubinsky B, Zemel R, Weaver L, Diamond D, Cobb C, and Porterfield B. Ultrasound-guided hepatic cryosurgery in the treatment of metastatic colon carcinoma. preliminary results. *Cancer*, 67(4):901–907, 1991.
- [8] Onik G. M., Cohen J. K., Reyes G. D., Rubinsky B., Chang Z., and J. Baust. Transrectal ultrasound-guided percutaneous radical cryosurgical ablation of the prostate. *Cancer*, 72(4):1291–1299, 1993.
- [9] Mouraviev V and Polascik TJ. Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Curr Opin Urol.*, 16(3):152–156, 2006.
- [10] de Baere T, Rehim M, Teriitheau C, Deschamps F, Lapeyre M, Dromain C, Boige V, Ducreux M, and Elias D. Usefulness of guiding needles for radiofrequency ablative treatment of liver tumors. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 29(4):650–654, 2006.
- [11] Martin RC. Hepatic tumor ablation: cryo versus radiofrequency, which is better? *Am Surg*, 72(5):391–392, 2006.
- [12] 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.

- [13] Luis Bergues Cabrales and Liliana Gómez Luna. La electroterapia: una alternativa terapéutica para el tratamiento de tumores. *Revista Cubana de Medicina*, 42(6), 2003.
- [14] Héctor Camués Ciria and Demetrio Segura López. La electroquimioterapia: una nueva alternativa terapéutica en la oncología. *Revista Cubana de Oncología*, 17(3):188–194, 2001.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] J Finch, B Fosh, A Anthony, E Slimani, M Texler, D Berry, A Dennison, and G Maddern. Liver electrolysis: pH can reliably monitor the extent of hepatic ablation in pigs. *Clin Sci (Lond)*, 102(4):389–395, 2002.
- [18] Björn Nordenström. *Biologically Closed Electrical Circuits: Clinical, Experimental and Theoretical Evidence for an Additional Circulatory System*. Nordic Medical Publications, Stockholm, Sweden, 1983.
- [19] BNordenstrom1989 Nordenström. Electrochemical treatment of cancer I: variable response to anodic and cathodic fields. *Am J Clin Oncol: Cancer Clinical Trials*, 12(6):530–536, 1989.
- [20] Y Xin. Organization and spread of electrochemical therapy (ECT) in China. *Eur J Surg*, Suppl 574:25–30, 1994.
- [21] D. Miklavčič, G. Serša, S. Novakovič, and S. Rebersek. Tumor bioelectric potential and its possible exploitation for tumor growth retardation. *J Bioelectricity*, 9(2):133–149, 1990.
- [22] D. Miklavčič, G. Serša, M. Kryžanowski, S. Novakovič, F. Bobanovič, R. Golouh, and L. Vodovnik. Tumor treatment by direct electric current: tumor temperature and pH, electrode material and configuration. *Bioelectrochem Bioenerg*, 30:209–220, 1993.
- [23] G. Serša and D. Miklavčič. The feasibility of low level direct current electrotherapy for regional cancer treatment. *Regional Cancer Treatment*, 6(1):31–35, 1993.
- [24] D Miklavčič, A Fajgelj, and G Serša. Tumour treatment by direct electric current: electrode material deposition. *Bioelectrochem Bioenerg*, 35(1-2):93–97, November 1994.
- [25] H von Euler, K Strähle, A Thörne, and G Yongqing. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). *Bioelectrochemistry*, 62(1):57–65, 2004.
- [26] 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.



- [27] 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 anticancer therapy. *Micron*, 38(7):747 – 753, 2007.
- [28] 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.
- [29] Maria Wartenberg, Nina Wirtz, Alexander Grob, Wilhelm Niedermeier, Jürg 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.
- [30] 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.
- [31] Arsov C, Winter C, and Albers P. Value of galvanotherapy for localised prostate cancer. *Urologe A*, 48(7):748–754, 2009.
- [32] Ralf Czymek, Jan Nassrallah, Maximilian Gebhard, Andreas Schmidt, Stefan Limmer, Markus Kleemann, Hans-Peter Bruch, and Philipp Hildebrand. Intrahepatic radiofrequency ablation versus electrochemical treatment in vivo. *Surgical Oncology*, In Press, Corrected Proof:–, 2010.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.

- [38] Ramírez Aguilera A, Bergues Cabrales LE, Camué Ciria HM, Soler Pérez Y, Roca Oria E, Acosta Brooks S, and Rubio González T. Distributions of the potential and electric field of an electrode elliptic array used in tumor electrotherapy: Analytical and numerical solutions. *Mathematics and Computers in Simulation*, 79(7):2091 – 2105, 2009.
- [39] Ramírez Aguilera A, Bergues Cabrales LE, Camué Ciria HM, Soler Pérez Y, Gilart González F, Morales González M, Ortíz Zamora L, Suárez Palencia F, Fariñas Salas M, Real Bestard N, Sierra González G, and Bergues Cabrales I. Electric current density distribution in planar solid tumor and its surrounding healthy tissue generated by an electrode elliptic array used in electrotherapy. *Mathematics and Computers in Simulation*, 80(9):1886 – 1902, 2010.
- [40] Luis Bergues Cabrales, Juan Godina Nava, Andres Ramirez Aguilera, Javier Gonzalez Joa, Hector Camue Ciria, Maraelys Morales Gonzalez, Miriam Farinas Salas, Manuel Verdecia Jarque, Tamara Rubio Gonzalez, Miguel O’Farril Mateus, Soraida Acosta Brooks, Fabiola Suarez Palencia, Lisset Zamora Ortiz, Maria Cespedes Quevedo, Sarah Edward Seringe, Vladimir Crombet Cuitie, Idelisa Bergues Cabrales, and Gustavo Sierra Gonzalez. Modified gompertz equation for electrotherapy murine tumor growth kinetics: Predictions and new hypotheses. *BMC Cancer*, 10(1):589, 2010.
- [41] Lai M, Wang SM, Wang Y, Tang CL, Kong LW, and Xu XY. Effects of electroacupuncture of ”zusnali”(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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Liu F, Fang JQ, and Shao XM. Influence of electroacupuncture on human recombination tumor necrosis factor-alpha induced cyclooxygenase expression in air sac model rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 30(8):867–870, 2010.
- [46] Orłowski S and Mir L. Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1154(1):51–63, 1993.
- [47] Luis Mir. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry*, 53(1):1–10, 2001.
- [48] Andre F and Mir L. Dna electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy*, 11:S33–S42, 2004.

- [49] L Mir, P Moller, F Andre, and J Gehl. Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet*, 54:83–114, 2005.
- [50] RK Jain. Understanding barriers to drug Delivery: high resolution in vivo imaging is key. *Clinical Cancer Research*, 5(7):1605–1606, July 1999.
- [51] Luis Mir. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer*, Supp 4(11):38–44, 2006.
- [52] G Serša, D Miklavčič, M Čemažar, Z Rudolf, G Pucihar, and M. Snoj. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol*, 34(2):232–240, 2008.
- [53] 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.
- [54] G Serša. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *Eur. J. Cancer*, supp 4(11):52–59, November 2006.
- [55] B Al-Sakere, F André, C Bernat, E Connault, P Opolon, R Davalos, B Rubinsky, and L Mir. Tumor ablation with irreversible electroporation. *PLoS One*, 2(11):e1135, 2007.
- [56] Yong Huang and Boris Rubinsky. Micro-electroporation: Improving the efficiency and understanding of electrical permeabilization of cells. *Biomedical Microdevices*, 2:145–150, 1999.
- [57] Davalos R, Huang Y, and Rubinsky B. Electroporation: Bio-electrochemical mass transfer at the nano scale. *Microscale Thermophysical Engineering*, 4:147–159, 2000.
- [58] R Davalos, L Mir, and B Rubinsky. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng*, 33(2):223–231, 2005.
- [59] Edd JF, Horowitz L, Davalos R, Mir L, and Rubinsky B. In vivo results of a new focal tissue ablation technique: irreversible electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng.*, 53(7):1409–1415, 2006.
- [60] Rubinsky B, Onik G, and Mikus P. Irreversible electroporation: a new ablation modality—clinical implications. *Technol Cancer Res Treat.*, 6(1):37–48, 2007.
- [61] Deng J, Schoenbach KH, Stephen Buescher E, Hair PS, Fox PM, and Beebe SJ. The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophysical journal*, 84(4):2709–2714, 2003.
- [62] Beebe SJ, White J, Blackmore PF, Deng Y, Somers K, and Schoenbach KH. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA Cell Biol.*, 22(12):785–796, 2003.
- [63] Nuccitelli R, Pliquett U, Chen X, Ford W, James Swanson R, Beebe S, Kolb JF, and Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem Biophys Res Commun.*, 343(2):351–360, 2006.

- [64] 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.
- [65] E Nilsson, J Berendson, and E Fontes. Electrochemical treatment of tumours: a simplified mathematical model. *J Electroanal Chem*, 460:88–99, 1999.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] M Knowles and P Selby. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, Oxford, GB, 4th ed, 2005.
- [69] PA Netti, DA Berk, MA Swartz, AJ Grodzinsky, and RK Jain. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*, 60:2497–2503, 2000.
- [70] Saroja Ramanujan, Alain Pluen, Trevor D. Mckee, Edward B. Brown, Yves Boucher, and Rakesh K. Jain. Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophysics Journal*, 83(3):1650–1660, 2002.
- [71] L Preziosi. *Cancer Modelling and Simulation*. CHAPMAN & HALL/CRC, London, UK, 2003.
- [72] Laurence T. Baxter and Rakesh K. Jain. Transport of fluid and macromolecules in tumors. i. role of interstitial pressure and convection. *Microvascular Research*, 37(1):77–104, January 1989.
- [73] Laurence T. Baxter and Rakesh K. Jain. Transport of fluid and macromolecules in tumors. ii. role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvascular Research*, 40(2):246–263, September 1990.
- [74] Laurence T. Baxter and Rakesh K. Jain. Transport of fluid and macromolecules in tumors : iii. role of binding and metabolism. *Microvascular Research*, 41(1):5–23, January 1991.
- [75] Laurence T. Baxter and Rakesh K. Jain. Transport of fluid and macromolecules in tumors. iv. a microscopic model of the perivascular distribution. *Microvascular Research*, 41(2):252–272, March 1991.
- [76] G. Marshall and P. Mocsos. A growth model for ramified electrochemical deposition in the presence of diffusion, migration and electroconvection. *Physical Review E*, 55(1):549–563, Jan 1997.
- [77] G. Marshall, P. Mocsos, H. L. Swinney, and J. M. Huth. Buoyancy and electrically driven convection models in thin-layer electrodeposition. *Physical Review E*, 59(2):2157–2167, Feb 1999.

- [78] S. Dengra, G. Marshall, and F. Molina. Front tracking in thin-layer electrodeposition. *Journal of the Physical Society of Japan*, 69(3):963–971, Mar 2000.
- [79] G. González, G. Marshall, F. V. Molina, S. Dengra, and M. Rosso. Viscosity effects in thin-layer electrodeposition. *Journal of the Electrochemistry Society*, 148(7):C479–C487, Jul 2001.
- [80] G. González, G. Marshall, F. Molina, and S. Dengra. Transition from gravito- to electroconvective regimes in thin-layer electrodeposition. *Physical Review E*, 65(5):051607, May 2002.
- [81] G. Marshall, E. Mocskos, F. V. Molina, and S. Dengra. Three-dimensional nature of ion transport in thin-layer electrodeposition. *Physical Review E*, 68(2):021607, Aug 2003.
- [82] G. Marshall, F.V. Molina, and A. Soba. Ion transport in thin cell electrodeposition: modelling three-ion electrolytes in dense branched morphology under constant voltage and current conditions. *Electrochimica Acta*, 50(16–17):3436–3445, 2005.
- [83] L. Colombo, G. González, G. Marshall, F. Molina, A. Soba, C. Suárez, and P. Turjanski. Ion transport in tumors under electrochemical treatment: in vivo, in vitro and in silico modeling. *Bioelectrochemistry*, 71(2):223–232, July 2007.
- [84] J Newman and K Thomas-Alyea. *Electrochemical Systems*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 3rd edition, 2004.
- [85] Ronald F. Probstein. *Physicochemical Hydrodynamics, an Introduction*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, July 1994.
- [86] Allen J. Bard and Larry R. Faulkner. *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, 2001.
- [87] R. Bruinsma and S. Alexander. Theory of electrohydrodynamic instabilities in electrolytic cells. *The Journal of Chemical Physics*, 92(5):3074–3085, 1990.
- [88] I. Rubinstein. *Electro-Diffusion of Ions*. Studies in Applied Mathematics. SIAM, Philadelphia, PA, 1990.
- [89] Makoto Suzuki and Yasuji Sawada. Relative stabilities of metastable states of convecting charged-fluid systems by computer simulation. *Physical Review A*, 27(1):478–489, January 1983.
- [90] Guillermo Marshall. *Solución Numérica de Ecuaciones Diferenciales. Tomo II: Ecuaciones en Derivadas Parciales*. Editorial Reverté S.A., Buenos Aires, 1986.
- [91] R Lemberg and JW Legge. *Haematin Compounds and bile pigments*. Interscience Publishers, Inc, NY, 1949.
- [92] L Samuelsson, T Olin, and NO Berg. Electrolytic destruction of lung tissue in the rabbit. *Acta Radiol Diagn*, 21(4):447–454, 1980.

- [93] A Pluen, Y Boucher, S Ramanujan, TD McKee, T Gohongi, E di Tomaso, EB Brown, Y Izumi, RB Campbell, DA Berk, and RK Jain. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs subcutaneous tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8):4628–4633, 2001.
- [94] 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.
- [95] John West. *Physiological Basis of Medical Practice*. Lippincott, William & Wilkins, Baltimore, 11th edition, 1985.
- [96] S Otake, K Hatae, A Shimada, and S Iibuchi. Apparent diffusion coefficient of sodium chloride in cubical agar gel. *Agric Biol Chem*, 54(11):2811–2817, 1990.
- [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] W Rasband. NIH ImageJ: an image processing and analysis package, 1997–2005.
- [101] Mir LM, Banoun H, and Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: Direct access to the cytosol. *Experimental Cell Research*, 75(1):15 – 25, 1988.
- [102] Orłowski S, Belehradec Jr. J, Paoletti C, and Mir LM. Transient electropermeabilization of cells in culture: Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 37(24):4727 – 4733, 1988.
- [103] Mir LM, Orłowski S, Belehradec Jr J, and Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(1):68 – 72, 1991.
- [104] Belehradec Jr J, Orłowski S, Poddevin B, Paoletti C, and Mir LM. Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(1):73 – 76, 1991.
- [105] Mir LM, Belehradec M, Orłowski S, Poddevin B, Belehradec Jr J, Schwaab G, Luboinski B, and Paoletti C and. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci III.*, 313(13):613 – 618, 1991.
- [106] Belehradec M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradec Jr J, and Mir LM. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. first clinical phase i-ii trial. *Cancer*, 72(12):3694 – 3700, 1993.
- [107] Miklavcic D, Corovic S, Pucihar G, and Pavselj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11):45 – 51, 2006. Electrochemotherapy.

- [108] Damijan Miklavčič, Dejan Šemrov, Halima Mekid, and Lluís M. Mir. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for dna electrotransfer for gene therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523(1):73–83, September 2000.
- [109] G Pucihar, T Kotnik, B Valic, and D Miklavčič. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 34(4):642–652, April 2006.
- [110] Damijan Miklavcic, Katarina Beravs, Dejan Semrov, Maja Cemazar, Franci Demsar, and Gregor Sersa. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophysical Journal*, 74(5):2152 – 2158, 1998.
- [111] Gehl J, Sorensen TH, Nielsen K, Raskmark P, Nielsen SL, Skovsgaard T, and Mir LM. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1428(2-3):233 – 240, 1999.
- [112] G Serša, M Čemažar, D Šemrov, and D Miklavčič. Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectrochem Bioenerg*, 39(1):61–66, February 1996.
- [113] Belehradek Jr J, Orłowski S, Ramirez LH, Pron G, Poddevin B, and Mir LM. Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1190(1):155 – 163, 1994.
- [114] S Corović, M Pavlin, and D Miklavčič. Analytical and numerical quantification and comparison of the local electric field in the tissue for different electrode configurations. *Biomed Eng Online*, 15:6–37, 2007.
- [115] D Sel, A Lebar, and D Miklavčič. Feasibility of employing model-based optimization of pulse amplitude and electrode distance for effective tumor electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 54(5):773–781, 2007.
- [116] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, and Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1(7):841–845, 1982.
- [117] Weaver JC and Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2):135–160, 1996.
- [118] Teissie J, Golzio M, and Rols MP. Mechanisms of cell membrane electroporation: 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.
- [119] Q Hu and R Joshi. Transmembrane voltage analyses in spheroidal cells in response to an intense ultrashort electrical pulse. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 79(1 Pt 1):011901, 2009.

- [120] W Krassowska and P Filev. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, 92:404–417, 2007.
- [121] W Ying, N Pourtaheri, and C Henriquez. Field stimulation of cells in suspension: use of a hybrid finite element method. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1:2276–2279, 2006.
- [122] D Miklavčič, M Snoj, A Zupanic, B Kos, M Čemažar, M Kropivnik, M Bracko, T Pecnik, E Gadzijevec, and G Serša. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. *Biomed Eng Online*, 23:9–10, 2010.
- [123] Y Granot and B Rubinsky. Mass transfer model for drug delivery in tissue cells with reversible electroporation. *Int J Heat Mass Transf*, 51(23–24):5610–5616, 2008.
- [124] J Kim, K Cho, M Shin, W Lee, N Jung, C Chung, and J Chang. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:1353–1360, 2008.
- [125] 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.
- [126] 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.
- [127] L Mir. Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future. *Mol Biotechnol*, 43(2):167–176, 2009.
- [128] J De Vry, P Martinez-Martinez, M Losen, G Bode, Y Temel, T Steckler, H Steinbusch, M De Baets, and J Prickaerts. Low current-driven micro-electroporation allows efficient in vivo delivery of nonviral dna into the adult mouse brain. *Molecular Therapy*, 18(6):1183–1191, 2010.



# Índice de figuras

1.1. Esquema de aplicación del EChT. . . . .	15
2.1. Diámetro de necrosis anódica inducido en tumores subcutáneos de ratón sometidos a un EChT bajo diferentes dosis de carga eléctrica (10, 30 y 50 C); $p < 0,05$ . . . . .	29
2.2. Valores de pH vs. distancia al ánodo resultantes de una EChT aplicada bajo diferentes dosis de carga eléctrica (10 C, 30 C y 50 C) en tumores subcutáneos de ratón. . . . .	29
2.3. Perfil de pH vs. distancia, para distintas dosis de carga eléctrica (3, 10 y 30 C) en un gel de colágeno tipo I preparado a diferentes concentraciones (50 y 30 mg/ml). (a): 3 C, (b): 10 C, y (c): 30 C. Primera columna: distancia periferia-cátodo; columna central: distancia cátodo-ánodo; última columna: distancia ánodo-periferia . . . . .	31
2.4. Modelo del EChT aplicado a gel de agar, donde se pueden observar imágenes de la región alcalina catódica casi esférica (vista como píxeles oscuros) con el cátodo ubicado en el centro. Imágenes tomadas a los 75, 150, 225 y 300 segundos. Experimento realizado a 5 mA. Tamaño de imagen 1.1 cm x 1.5 cm. . . . .	32
2.5. (a) Isolíneas correspondientes a la evolución en el tiempo del frente de pH 8-9 catódico en una escala logarítmica bajo diferentes intensidades de corriente eléctrica continua aplicada a un gel de agar; (b) variación del pH cátodo-ánodo a $t=600$ s y 10 mA. . . . .	32
2.6. (a) Voltaje entre electrodos vs. tiempo, a distintas intensidades de corriente eléctrica aplicada a un gel de agar; (b) seguimiento del frente anódico de $Cl_2$ en el mismo modelo . . . . .	33
2.7. Resultados <i>in silico</i> del perfil de pH vs. distancia ánodo-periferia (indicado por $x$ ) a diferentes dosis de tratamiento ( $x_0 = 3$ cm) . . . . .	33
2.8. Resultados <i>in silico</i> del perfil de pH vs. distancia: (a) periferia-cátodo, (b) cátodo-ánodo, y (c) ánodo-periferia, a diferentes dosis de tratamiento ( $x_0 = 3$ cm). . . . .	34
2.9. Resultados <i>in silico</i> (a) del seguimiento de los frentes de pH catódicos y (b) de los perfiles de pH vs. distancia cátodo-ánodo. Ambas gráficas realizadas para 5 y 10 mA en $t=600$ ( $x_0 = 3$ cm y $t_0 = 1$ s) . . . . .	34
2.10. Resultados <i>in silico</i> . (a) voltaje entre electrodos vs. tiempo para 5 y 10 mA; (b) potencial electrostático vs. distancia a diferentes tiempos de tratamiento; ( $x_0 = 3$ cm, $t_0 = 1$ s y $V_0 = 1$ V) . . . . .	35
2.11. Resultados <i>in silico</i> de las trayectorias de los frentes de pH catódico y anódico en condiciones galvanostáticas, aplicando una corriente eléctrica de 10 mA. . . . .	35

2.12. Resultados <i>in silico</i> de la concentración de (a) $Cl^-$ y (b) $Na^+$ vs. distancia cátodo-ánodo, a diferentes tiempos de tratamiento ( $x_0 = 3$ cm y $C_0 = 10^{-7}$ mol/dm <sup>3</sup> ), aplicando una corriente eléctrica de 10 mA. . . . .	36
3.1. Arreglo de tubos capilares: el cátodo fue ubicado en el extremo izquierdo, mientras que el ánodo en el extremo derecho de cada tubo capilar, respectivamente. El color oscuro en los tubos capilares indica el cambio de pH. Cada capilar representa un experimento independiente. . . . .	45
3.2. Seteo experimental. . . . .	46
3.3. Datos experimentales. a) Seguimiento de frente pH catódico (pH = 8,3) a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1 , 3 y 5 mA) del EChT. b) Linealización de las curvas promedio de a) aplicando escala log-log. . . . .	47
3.4. Predicciones del modelo <i>in silico</i> . a) Seguimiento de frente de pH catódico (pH=8,3) a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1 y 3 mA) del EChT. b) Linealización de las curvas de a) aplicando escala log-log. . . . .	47
3.5. a) Distancia (cm desde el cátodo) y b) tiempo (s) de la colisión de frentes, para datos experimentales (barras negras) y simulados (barras grises), a diferentes intensidades de corriente (0,5 , 1, 3 y 5 mA) del EChT. No ha sido posible obtener resultados correspondientes al modelo simulado a 5 mA (debido a problemas de inestabilidad numérica) . . . . .	48
3.6. Predicciones del modelo <i>in silico</i> a) $H^+$ y b) $OH^-$ . Concentración (mM) vs. distancia (cm) a diferentes tiempos (10-50 s) del EChT a 3 mA. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente. . . . .	49
3.7. Predicciones del modelo <i>in silico</i> a) $Na^+$ y b) $Cl^-$ . Concentración (mM) vs. distancia (cm) a diferentes tiempos (10-50 s) del EChT a 3 mA. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente. . . . .	50
3.8. Predicción del modelo <i>in silico</i> del perfil de pH a nivel espacial a diferentes tiempos a a) 0,5 mA y b) 3 mA del EChT. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente. . . . .	51
3.9. Predicción del modelo <i>in silico</i> del seguimiento de frentes de pH y puntos de colisión para diferentes valores de pH a una intensidad de corriente de 1 mA del EChT. El ánodo se encuentra situado a 0 cm y el cátodo a 3,8 cm, respectivamente. . . . .	51
4.1. Esquema de aplicación pulsos. <i>ON time</i> : pulso aplicado, <i>OFF time</i> : pulso no aplicado, T tiempo de duración de ambos submodelos, V: amplitud del pulso. Lo tiempos de <i>ON time</i> y <i>OFF time</i> no se encuentran graficados a escala. . .	54
4.2. a) Esquema Experimental. b) Configuración del gel y los electrodos. . . . .	57
4.3. Frentes opuestos de pH durante la aplicación de la ECT en el modelo <i>in vitro</i> . Composición temporal de imágenes de frentes de pH durante un tren de 8 pulsos de 400 V y 300 $\mu$ s a 1 Hz. Se puede observar en el tiempo una acidificación anódica y una basificación catódica a través del cambio de color de los indicadores de pH: rosa (izquierda) y rojo (derecha). . . . .	58

4.4.	Perfiles de frente de pH <i>in vitro</i> (símbolos) e <i>in silico</i> (líneas) en una escala log-log durante la aplicación de la ECT utilizando distintos valores. a) Frente anódico, amplitud de pulsos de 100, 400 y 600 V, longitud de pulsos de 100 $\mu$ s, 8 pulsos, 1 Hz. b) Frente catódico, mismos valores que en a). c) Frente anódico, amplitud de pulsos de 400 V, longitud de pulsos de 100, 300 y 1 000 $\mu$ s, 8 pulsos, 1 Hz. d) Frente catódico, mismos valores que en c). . . . .	59
4.5.	Perfil de pH obtenido a través del modelo <i>in silico</i> : frente anódico (pH=6) y catódico (pH=8, rojo) durante la aplicación de la ECT a mismas condiciones que las utilizadas para la figura 4.3. . . . .	60
4.6.	Predicciones del modelo <i>in silico</i> de la concentración de iones (mmol/dm <sup>3</sup> ) y la distribución de pH a lo largo del trayecto ánodo-cátodo (cm) durante la aplicación de un tratamiento típico de ECT (8 pulsos de 400 V y 100 $\mu$ s a 1 Hz) a diferentes tiempos (0-8 s). El ánodo se encuentra ubicado a izquierda y el cátodo a derecha. a) Sodios. b) Cloruros. c) Protones. d) Oxidrilos. e) Distribución de pH. . . . .	62
4.7.	Distribución espacial del pH durante la ECT (líneas de color negro) y el EChT (líneas de color rojo) a misma dosis de tratamiento. El ánodo se encuentra ubicado a izquierda y el cátodo a derecha: a) Dosis de 33,81 C/m <sup>2</sup> , ECT: 8 pulsos de 100 V, 0,42 · 10 <sup>5</sup> A/m <sup>2</sup> y 100 $\mu$ s a 1 Hz (8 s total), EChT: 4,23 A/m <sup>2</sup> , 8 s; b) Dosis de 135,55 C/m <sup>2</sup> . ECT: 8 pulsos de 400 V, 1,69 · 10 <sup>5</sup> A/m <sup>2</sup> y 100 $\mu$ s a 1 Hz (8 s total); EChT: 16,94 A/m <sup>2</sup> , 8 s; c) Dosis de 203,63 C/m <sup>2</sup> . ECT: 8 pulsos de 600 V, 2,54 · 10 <sup>5</sup> A/m <sup>2</sup> y 100 $\mu$ s a 1 Hz (8 s total), EChT: 25,45 A/m <sup>2</sup> , 8 s. . . . .	63
5.1.	Geometría esférica del modelo donde $r$ denota el radio, $r_a$ es el radio del ánodo y superficie límite interior del dominio, y $r_r$ es el radio de la superficie límite exterior del dominio. . . . .	65
5.2.	Predicciones del modelo <i>in silico</i> de la concentración de iones (mmol/dm <sup>3</sup> ) y la distribución de pH alrededor del ánodo (cm) durante la aplicación de un tratamiento típico de ECT (8 pulsos de 400 V y 100 $\mu$ s a 1 Hz) a diferentes tiempos (0-7 s). El ánodo se encuentra ubicado a izquierda. a) Sodios. b) Cloruros. c) Protones. d) Distribución de pH. . . . .	68
5.3.	Potencial electrostático del modelo <i>in silico</i> , en función de la distancia al ánodo, en el momento que los pulsos son aplicados en la ECT (tren de 8 pulsos, 400 V, 100 $\mu$ s, 1 Hz). Se observa una superposición de las curvas correspondientes a los diferentes tiempos. . . . .	69
5.4.	Perfiles de frentes anódicos de pH obtenidos a través del modelo <i>in silico</i> en una escala log-log durante la aplicación de la ECT. a) amplitud de pulsos de 100, 400 y 600 V, longitud de pulsos de 100 $\mu$ s, 8 pulsos, 1 Hz. b) amplitud de pulsos de 400 V, longitud de pulsos de 100, 300 y 1 000 $\mu$ s, 8 pulsos, 1 Hz. . .	70

# índice de tablas

2.1. Números adimensionales . . . . .	24
2.2. Parámetros utilizados por el modelo numérico. Los valores que no presentan unidades corresponden a valores adimensionales. . . . .	27
3.1. Parámetros utilizados por el modelo <i>in silico</i> . . . . .	44
3.2. Pendientes estimadas a partir del análisis de regresión lineal de los datos experimentales. . . . .	46
3.3. Pendientes estimadas a partir del análisis de regresión lineal del modelo <i>in silico</i> . 48	
4.1. Valores de pendiente y error estándar correspondientes a las curvas presentadas en la figura 4.4. . . . .	58
5.1. Valores de pendiente y error estándar correspondientes a las curvas presentadas en la figura 5.4. . . . .	69
5.2. Valores <i>in silico</i> representativos de la densidad de corriente para diferentes valores de amplitud y longitud de pulso, durante una ECT típica de 8 pulsos a 1 Hz. . . . .	70
5.3. Dosis <i>in silico</i> de corriente eléctrica utilizada, a diferentes valores de amplitud y longitud de pulso, durante una ECT típica de 8 pulsos a 1 Hz. . . . .	70

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>14</b>
1.1. Cáncer . . . . .	14
1.2. Tratamientos contra el cáncer . . . . .	15
1.2.1. EChT . . . . .	15
1.2.2. ECT . . . . .	16
1.2.3. IRE . . . . .	17
1.2.4. Supraporación . . . . .	17
1.3. Motivación . . . . .	18
1.4. Metodología . . . . .	18
<b>2. Modelo de Electroterapia con Electrodo s Próximos</b>	<b>20</b>
2.1. Modelo <i>in silico</i> con electrodos próximos . . . . .	21
2.1.1. Modelo computacional . . . . .	26
2.2. Modelo <i>in vivo</i> . . . . .	27
2.3. Modelo <i>in vitro</i> . . . . .	29
2.4. Predicciones del modelo <i>in silico</i> del EChT con electrodos próximos . . . . .	32
2.5. Comparación de los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . . . . .	35
2.6. Comparación del modelo <i>in silico</i> del EChT de electrodos próximos con los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . . . . .	36
2.7. Conclusiones . . . . .	37
<b>3. Modelo de Electroterapia con Electrodo s Próximos Bajo Condiciones de Electroneutralidad</b>	<b>38</b>
3.1. Modelo <i>in silico</i> del EChT con electrodos próximos bajo condiciones de electroneutralidad . . . . .	39
3.1.1. Modelo computacional . . . . .	42
3.2. Modelo <i>in vitro</i> . . . . .	45
3.3. Resultados y Discusión . . . . .	46
3.4. Conclusiones . . . . .	49
<b>4. Modelo de Electroporación Reversible con Electrodo s Próximos</b>	<b>52</b>
4.1. Modelo <i>in silico</i> de ECT con Electrodo s Próximos . . . . .	54
4.1.1. Submodelo <i>ON time</i> . . . . .	54
4.1.2. Submodelo <i>OFF time</i> . . . . .	54
4.1.3. Modelo computacional . . . . .	55
4.2. Modelo <i>in vitro</i> . . . . .	56

4.3. Resultados y Discusión . . . . .	57
4.4. Conclusiones . . . . .	61
<b>5. Modelo Radial Esférico de Electroporación Reversible con Electrodo</b> <b>Distantes</b>	<b>64</b>
5.1. Modelo <i>in silico</i> de ECT con Electrodo Distantes . . . . .	64
5.1.1. Submodelo ON time . . . . .	65
5.1.2. Submodelo OFF time . . . . .	66
5.1.3. Modelo computacional . . . . .	66
5.2. Resultados y Discusión . . . . .	67
<b>6. Conclusiones y Trabajos Futuros</b>	<b>72</b>
6.1. Conclusiones . . . . .	72
6.2. Trabajos Futuros . . . . .	75