

Frentes escarpados de onda de alta tensión para tratamientos oncológicos; perspectivas y potenciales desarrollos

Steep-fronted High Voltage pulses for oncologic treatments: overview and future potential development

Miguel Ángel Hombrados-Herrera,¹ Ana Reig,² Juan Manuel Martínez-Tarifa,¹ Juan José Martínez-Ortiz³

▷ RESUMEN

Recientemente se han publicado múltiples trabajos dedicados al análisis de células tumorales tras la aplicación de transitorios de tensión de corta duración. Los nuevos avances en sistemas de potencia permiten aplicar pulsos de tensión de bajos tiempos de conmutación y cortos tiempos de aplicación. Esto, conjugado con tecnologías ya maduras sobre Ingeniería de alta tensión han permitido aplicar transitorios de tensión ultrarrápidos a células y tejidos tumorales, con sorprendentes resultados. En este artículo se resumen los resultados obtenidos hasta la fecha, al igual que se muestran los principales circuitos de generación de impulsos que se han diseñado para reducir el volumen de masas tumorales o destruir células cancerígenas.

Palabras clave: células tumorales, tejidos tumorales, cáncer, electroporación, transitorios de tensión, España.

▷ ABSTRACT

Many works devoted to tumor cells analysis after short duration voltage pulses application have been published recently. New advances in power systems allow applying short rise time voltage pulses for short periods of times. These advances, in addition to developed high voltage technologies have led to the application of steep fronted pulses to tumor cells and tissues with surprising results. This paper tries to review the results obtained to the date regarding to volume reduction in tumor masses or cancer cell destruction; in addition to this, main impulse generation circuits are presented and explained.

Keywords: Tumor cells, tumor tissues, cancer, electroporation, voltage transients, Spain.

¹Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Carlos III de Madrid,

²Hospital de la Esperanza, Parc de Salut Mar, Barcelona, España.

³Hospital San Juan de la Cruz, Úbeda (Jaén), España.

Correspondencia: Miguel Ángel Hombrados Herrera. C/ Butarque 15. 29811, Leganés (Madrid), España. Teléfono: 0034 91624 6228, Fax: 0034 91624 9430. Correo electrónico: jmmtarif@ing.uc3m.es.

▷ INTRODUCCIÓN

Existen tratamientos tradicionalmente útiles en la lucha contra las enfermedades neoplásicas. La cirugía, la quimioterapia (incluyendo hormonoterapia e inmunoterapia con anticuerpos monoclonales) y la radioterapia, han conseguido disminuir de forma drástica la mortalidad por estas enfermedades. En concreto, la radioterapia mediante la emisión de fotones u otras partículas subatómicas, ha permitido disminuir la recidiva local de estas enfermedades, si bien llevan implícitas toxicidades agudas o crónicas debido a lesión tejido sano circundante. La electroterapia consiste en la emisión de pulsos eléctricos ultracortos de bajo voltaje que puede devenir en una nueva arma terapéutica en oncología. Numerosas experiencias han probado que pulsos eléctricos ultracortos de alto voltaje, pueden resultar eficaces en la lucha contra diferentes enfermedades así como una poderosa herramienta para el avance científico médico. Si bien su uso es aún incipiente, esta técnica se ha revelado útil en diversas aplicaciones. La destrucción de células tumorales, provocar respuestas del sistema inmunitario, terapia génica o la activación funciones celulares específicas son solo algunos ejemplos^{1,2}.

▷ MODELO CELULAR

Para comprender el efecto que los campos eléctricos pulsados tienen sobre la célula, varios investigadores han propuesto algunos modelos eléctricos de la misma. Estos modelos se basan en considerar a la célula como un cuerpo esférico en donde se incluyen uno o varios orgánulos, por simplificación también esféricos, de manera que, tanto la membrana celular como la membrana de los orgánulos, se consideran prácticamente capacidades puras y el medio celular externo (citoplasma y núcleo celular) se consideran fundamentalmente resistivos (**Tabla 1**).¹

Aunque los modelos eléctricos de la célula se van sofisticando progresivamente y describen con mayor exactitud las interacciones físicas de los campos eléctricos pulsantes con la célula, existe la gran dificultad de describir mediante estos modelos, los efectos producidos por los transitorios en la célula como unidad biológica (destrucción de membranas, alteraciones en ADN, etc.).

▷ CARACTERÍSTICAS DEL PULSO

Los pulsos utilizados habitualmente en bioelectricidad, son de onda cuadrada. Sus valores característicos son: amplitud máxima, duración del pulso, número de pulsos aplicados y tiempo de conmutación (*rise and fall*

Tabla 1.

Valores de parámetros eléctricos de una célula animal utilizados para una simulación.¹

	Parámetros Geométricos	Conductividad en S/m	Permitividad Relativa
Medio extracelular	Radio 10 μm	0.6	80.0
Membrana celular	Espesor 5 μm	0.0	8.0
Citoplasma	Radio 5 μm	0.6	80.0
Membrana del orgánulo	Espesor 10 μm	0.0	4.0
Contenido del orgánulo	Radio 1 μm	0.6	80.0

times). Si se habla en órdenes de magnitud, la amplitud del campo aplicado puede oscilar desde unos pocos KV/cm hasta algunas centenas, en función del tipo de carga eléctrica al que se aplique (masa de tejido, disolución celular, entre otros). Por otro lado, la duración de pulso va desde decenas de nanosegundos hasta algunos microsegundos. Las combinaciones de estos valores, permiten su uso en distintas aplicaciones como se verá más adelante. Sin embargo, el parámetro crítico por antonomasia para que todas estas aplicaciones tengan éxito, es el tiempo de conmutación.²

Suponiendo un pulso eléctrico aplicado a una célula con un tiempo de subida excesivamente largo, éste establecerá un campo eléctrico creciente a través de la membrana. En respuesta, los iones disueltos en el citoplasma se desplazarán del interior al exterior de la célula acumulándose en las paredes de la membrana atraídos por el campo aplicado. Por tanto, al campo eléctrico aplicado se opone un campo eléctrico inducido consecuencia de la acumulación de carga espacial de los iones. De esta manera, el efecto que pudiera ejercer el campo eléctrico aplicado se ve fuertemente atenuado. Este fenómeno es similar al descrito por las descargas parciales internas que tienen lugar en vacuolas de aislamiento eléctrico de carácter polimérico.³ Sin embargo, cuando el tiempo de conmutación es menor, una inversión de la polaridad puede producirse antes de que los iones acumulados vuelvan a su posición original; esto hace que campo aplicado e inducido se superpongan y se intensifique el campo eléctrico total en las membranas de las células. Por otro lado, un transitorio abrupto de tensión, da lugar a una distribución no uniforme de la misma a lo largo de la red de capacidades parásita considerada (de la misma manera que ocurre en transitorios aplicados sobre máquinas eléctricas), por lo que en una membrana de la célula se puede concentrar casi toda la tensión aplicada.⁴

Recientemente también se han llevado a cabo experiencias con otro tipo de pulsos. Por ejemplo, Katsuki y colaboradores,⁵ se detallaron el uso de pulsos conocidos como *Intense Burst Sinusoidal Electric Field* (IBSEF). Éstos, caracterizados por un espectro de frecuencia de banda estrecha, pueden llegar a provocar efectos similares a los descritos para el pulso de onda cuadrada y adicionalmente, para una duración de pulso suficiente, lo que se conoce como *Golpe térmico transitorio*. Este consiste en una elevación repentina de la temperatura de la célula objetivo y, la superposición de esto al efecto no-térmico convencional producido por el IBSEF, facilita la destrucción de la célula.

▷ EFECTOS DE LOS PULSOS ELÉCTRICOS EN CÉLULAS Y TEJIDOS

La función de las membranas celulares es aislar a la célula y sus orgánulos del medio, permitiendo regular sus funciones biológicas. La membrana está constituida de una bicapa lipídica que se encuentra tachonada por una serie de proteínas que actúan como válvulas o canales de iones que permiten o impiden el paso de moléculas a través de la misma. Algunos de estos canales están controlados por tensión (*voltage gated*), de forma que si aplicamos un pulso eléctrico por encima de un cierto valor umbral (típicamente 1 V), estas vías de comunicación pueden ser activadas. Gran parte de las técnicas que usan pulsos eléctricos, tienen como objetivo conseguir desencadenar este mecanismo (denominado *Electroporación*), en primer lugar, para tener acceso a la célula y posteriormente, para acceder a los orgánulos celulares.¹ Así, por ejemplo, la *Electroporación* de la membrana celular, puede ser utilizada para mejorar la absorción de fármacos por parte de las células tumorales en la quimioterapia.²

Como ya se mencionó, conforme menor sea el tiempo de subida del pulso, se consigue un mayor acceso a estructuras internas de la célula. Schoenbach y colaboradores,² explicaron que el tiempo de carga típico para orgánulos y el núcleo, son inferiores a 1 μ s. En general, se utiliza el término de pulsos *ultracortos* para todos aquellos que tienen una duración inferior al tiempo de carga de la membrana celular, que tiene un valor aproximado de 1 microsegundo para las células humanas.

Otra aplicación límite del fenómeno de la *Electroporación* es en que la membrana, modelada como un condensador, se ve sometida a tal nivel de tensión que puede llegar a romperse. Desde este punto de vista, el campo eléctrico aplicado superaría al de ruptura de la sustancia considerada, dando lugar a un gran paso de corriente eléctrica que, acompañado de alta tensión

aplicada, produciría un consumo de potencia que no puede ser disipada, y por lo tanto, derivar a la combustión de esa lámina. Los grandes poros formados en la célula, permiten verter el contenido de ésta, *cortocircuitándola*.

La hipótesis de que pulsos más cortos, afectan incrementalmente a membranas de estructuras subcelulares, manteniendo la membrana externa intacta, fueron mostrados, entre otros, por Schoenbach.¹ Mediante la aplicación de pulsos de 60 nanosegundos de duración y más de 50 KV/cm en eosinófilos humanos en solución salina, se evidenció la presencia de marcadores que indicaban la afectación de estructuras internas celulares.

Los efectos que se han observado como resultado de la acción de los campos eléctricos pulsados en las estructuras internas celulares, son muy diversos. Un campo eléctrico de valor suficiente, puede provocar cambios estructurales en membranas de orgánulos internos como el núcleo, retículo endoplasmático o la mitocondria. Estos dos últimos orgánulos se encargan de almacenar calcio (Ca^{++}), esencial como transductor para la realización de funciones celulares como síntesis proteica, control respiratorio o expresión génica entre otras.

En esta línea, evidencias experimentales descritas,⁷ muestran que tanto la liberación de calcio intracelular, como otros fenómenos (caída de voltaje en la membrana mitocondrial o fragmentación del ADN), tienen una gran correlación con el desencadenamiento de lo que se conoce como *Apoptosis*. La *Apoptosis*, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos, de ahí que frecuentemente el proceso apoptótico se describa como suicidio celular por el cual la célula se destruye ordenadamente en cuestión de minutos u horas. Cuando alguna de las vías de la *Apoptosis* está alterada, la ausencia de esta, puede favorecer una reproducción celular incontrolada que puede dar lugar a una neoplasia.

Un ejemplo de las diferentes experiencias que se han llevado a cabo para inducir *Apoptosis* de forma provechosa, fue realizado por Schoenbach.² A 120 ratones con células de melanoma se les aplicó 400 pulsos eléctricos de 300 ns de duración (inferior al tiempo necesario para causar la *Electroporación* clásica), en los que se alcanzó el 90% de su valor pico en 30 ns. En el transcurso de dos semanas, el volumen del tumor decreció 90%.

De igual manera, se observó la aparición de indicadores de *Apoptosis* al exponer células *Jurkat* (una línea celular de linfocitos T) *in vitro* a diferentes pulsos de nanosegundos de duración: 150KV/cm durante 10 ns, 60KV/cm durante 60 ns o 26KV/cm durante 300 ns.⁸ Existen otros ejemplos de inducción de *Apoptosis*.^{1,2,9,10}

La variación de los parámetros eléctricos del pulso, permite obtener un gran espectro de efectos producidos en la célula. Dado que la misma es un sistema dinámico y los parámetros eléctricos varían dependiendo de su tipo, resulta difícil establecer unas reglas fijas sobre su comportamiento. Sin embargo, algunos trabajos previos apuntan a iguales productos de tiempo de duración de pulso por magnitud del campo aplicado como agentes de daños similares (siempre y cuando el tiempo de subida sea suficientemente pequeño). Es fácil continuar el razonamiento de estos autores asociando esta relación a la energía involucrada en el transitorio aplicado. Al tratarse de un medio material esencialmente conductor, un transitorio de tensión $u(t)$ da lugar a un transitorio de corriente $i(t)$ prácticamente en fase con el anterior. Conforme la tensión aumente, también lo hará la corriente que atraviese el tejido, y por tanto, la energía consumida por el mismo crecerá con la magnitud de la tensión aplicada $u(t)$ y el tiempo de aplicación $\tau=(t_2-t_1)$ de la misma.

$$W = \int_{t_2}^{t_1} u(t) \cdot i(t) \cdot dt \quad (1)$$

Así, iguales valores de energía consumida W por un determinado volumen de tejido, deberían tener similares consecuencias. Por ejemplo, una aplicación prolongada del transitorio aplicado ($\tau \gg 1 \mu s$), daría lugar a la carbonización del tejido bajo estudio, incluyendo en esto a las células sanas del mismo.

Es conocido que la quimioterapia antineoplásica daña de forma parecida a células cancerosas y células sanas. Según se explica Schoenbach,² experiencias llevadas a cabo con células cancerosas y sanas en viales, mostraron una destrucción bastante selectiva de las células cancerosas mediante el uso de transitorios de campos eléctricos. Sin embargo, pruebas en tejidos de ratones vivos muestran un cierto daño en la zona sana que rodea al tumor, aunque dicho daño fue solamente temporal. Este fenómeno sólo se explica por la posibilidad de que las células sanas tengan un programa genético que les permita actuar en respuesta, defenderse y regenerarse ante dichos transitorios eléctricos, mientras que las células cancerosas no.²

La aplicación de pulsos ultracortos puede funcionar como sustitutivo de las actuales técnicas de terapia génica basadas en un virus vector, que permiten introducir un nuevo gen en el núcleo con el objetivo de corregir una enfermedad de origen genético o inmunizar a las personas de una enfermedad en particular, permeabilizando las membranas y rechazando los mecanismos de la célula que evitarían la entrada del material genético. La utilización de virus como vectores de entrada en la célula, ha sido llevada a cabo con éxito anteriormente; sin embargo, en

ocasiones entraña grandes riesgos para el paciente. El virus puede incluir el nuevo gen en una ubicación distinta de la deseada o incluso puede, por sí mismo, desencadenar una reacción fuera de control del sistema inmune. La aplicación de pulsos eléctricos eliminaría estas y otras trabas que habitualmente encuentra la ingeniería genética.

▷ GENERADORES DE PULSOS DE ALTA TENSIÓN

A continuación, se describen tres dispositivos basados en diferentes tecnologías: Cable coaxial activado por explosor, un Water Blumlein activado por explosor y un modulador. Cada uno de los dispositivos responde a unas necesidades de pulso y carga, ya sea disoluciones celulares en vidrio portaobjetos para microscopio, disolución celular en cubetas o tejidos. Cada una de estas tiene unas propiedades eléctricas diferentes y distintos ámbitos de aplicación.

Sistema Water Blumlein o minipulser: Dispositivo basado en los sistemas de línea de transmisión Blumlein. Este consiste generalmente en un dieléctrico cubierto en ambos lados, a modo de sándwich, por conductores. Uno de estos conductores está conectado a una fuente continua de alto voltaje (de valor tal como el que se quiere aplicar sobre la carga); por el mismo extremo, el otro conductor, está conectado a tierra (**Figura 1**). La carga se ubica en una abertura realizada en el punto medio del conductor conectado a tierra, en cuyos extremos se sitúan unos electrodos planos típicamente de aluminio. Opcionalmente, para mejorar el comportamiento del mecanismo, se pueden introducir los electrodos dentro de la cubeta que contiene la muestra.

El dispositivo Blumlein generalmente se alimenta mediante una fuente a través de un convertidor Flyback. Esta fuente permite cargar el dispositivo hasta el momento en que un explosor ubicado en el extremo de la fuente cortocircuita los conductores. Estos se descargan de manera que, debido a la longitud de los mismos, aparecen una serie de ondas viajeras que, por medio de fenómenos de reflexión y refracción, alcanzan la carga con valor el máximo de tensión.

La duración del pulso viene determinada por la longitud de la línea de transmisión de la siguiente manera

$$l = \frac{c\tau}{\sqrt{\epsilon_r}}$$

Donde

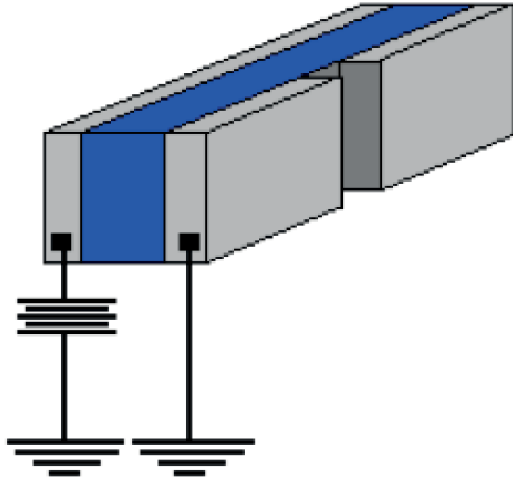
l es la longitud de la línea de transmisión

τ duración del pulso

c velocidad de la luz

ϵ_r , permisividad relativa del dieléctrico que separa los dos conductores

Figura 1.
 Línea de transmisión Blumlein.



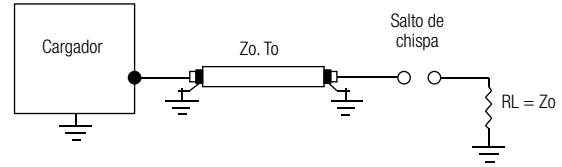
El pulso de voltaje aplicado a la carga será una onda de tensión cuadrada unipolar de amplitud igual a la del generador, siempre y cuando la impedancia de la carga sea igual a la impedancia del conductor.

Este generador de pulsos está orientado a cargas grandes, generalmente tejidos o cubetas. Las cubetas son recipientes de teflón con un volumen inferior al ml que contienen varios millones de células en suspensión en medio acuoso. Las dimensiones de la cubeta vienen condicionadas, entre otras cosas, por la separación entre electrodos de la cámara de exposición del dispositivo.

La carga suspensión-cubeta tiene una resistencia que oscila en torno a los $10\ \Omega$. Por otro lado, el comportamiento eléctrico de ésta es muy aproximado al del agua. Una permisividad relativa tan alta (~ 80) hace que, para frecuencias progresivamente más altas, domine un componente capacitivo que se superpone al pulso, distorsionándolo notablemente. Es por esto habitual que en el generador Blumlein, el dieléctrico ubicado entre los conductores sea agua destilada, ya que adoptando una cierta simetría entre las medidas de cubeta y el dieléctrico de la línea Blumlein, se facilita la adaptación de impedancias entre carga y línea de transmisión.^{1,7}

Dentro de los dispositivos comentados aquí, posiblemente este sea el que menor flexibilidad ofrece a la hora de configurar los pulsos; la duración del pulso viene determinada por el diseño del Blumlein (longitud, espesor, dieléctrico intermedio).

Figura 2.
 Sistema de transmisión de un solo extremo.⁷

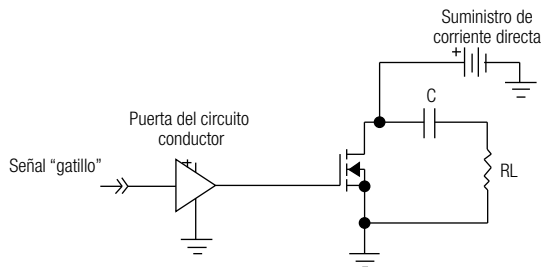


Cabe destacar que una de las ventajas de este dispositivo frente a otros generadores de pulsos, es su capacidad para mantener una independencia entre la duración de pulso y el tiempo de conmutación.

Sistema de línea de transmisión de un solo extremo o medipulser: Similar al anterior, en el sentido en que se basa en una línea de transmisión; sin embargo, en este caso, el Blumlein se sustituye por un cable coaxial de potencia que realiza la misma función (**Figura 2**). El cable se alimenta mediante un transistor de efecto campo, *Metal-Oxide-Silicon Field Effect Transistor* (MOSFET) que conmuta tensiones continuas. Una ventaja respecto al Blumlein, reside en que la posibilidad de cambiar los cables coaxiales con mayor facilidad de manera que se pueda modular la duración de los pulsos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el voltaje aplicado sobre la carga será la mitad del generado por la fuente. Esto es debido a que el dispositivo está pensado para cargas de menor impedancia, como por ejemplo, tipo cubeta.

Generador de pulsos basado en circuitos de estado sólido o minipulser: Este dispositivo está pensado para generar pulsos sobre muestras depositadas en portaobjetos para su observación en el microscopio. El portaobjetos se sitúa en una cámara de exposición integrada en el dispositivo. Esta cámara tiene una anchura entre electrodos que oscila en la centena de micrómetros, permitiendo grandes intensidades de campo en la muestra (en torno a decenas de KV/cm) para voltajes que no superan el KV. Esto se consigue mediante el dispositivo descrito en la **Figura 3**. Un condensador, se carga a través de una fuente de continua; con el MOSFET fuera de conducción, toda la tensión continua cae en el condensador. Para cada señal de control que llega a la puerta del MOSFET, éste permite el paso a la corriente entre drenador y fuente, haciendo que el condensador descargue el pulso sobre la carga; en el proceso transitorio, el condensador presenta impedancia despreciable respecto a R_L , aplicándose sobre ésta toda la

Figura 3.
Generador de pulsos basados en circuitos de conmutación MOSFET.⁷



tensión al final del proceso de descarga del condensador a través de la malla $R_L-C-R_{DC(on)}$. En comparación con los generadores explicados anteriormente, esta tecnología proporciona tensiones considerablemente más bajas. Sin embargo, atendiendo a la necesidad de monitorizar en tiempo real las muestras celulares expuestas, este generador permite una gran miniaturización y flexibilidad de los parámetros de pulso. Es posible variación de amplitud, frecuencia, duración de pulso y adicionalmente se puede controlar el tiempo de subida del pulso ajustando la señal de disparo del MOSFET. Por otro lado, las muestras a analizar son siempre soluciones con cantidades pequeñas de células que rondan la centena.

En la **Tabla 2** se muestra una comparación sobre los tipos de circuitos que pueden emplearse para generar los campos eléctricos necesarios para provocar daños en tejidos o células cancerígenas.

► CONCLUSIONES

En este trabajo se han presentado las líneas de investigación dedicadas al tratamiento de células y tejidos tumorales. Los nuevos desarrollos en electrónica de potencia junto con la madurez de la Ingeniería de la Alta Tensión han permitido desarrollar equipos capaces de aplicar tensiones transitorias de gran magnitud, corta duración y tiempos de conmutación ínfimos. Estos campos eléctricos han

Tabla 2.
Valores característicos de los generadores.⁷

	<i>Coaxial Line</i>	<i>Water Blumlein</i>	<i>Solid State</i>
Voltaje Máximo	Tens of KV	Tens of KV	1KV
Tiempo de Conmutación	< 1ns	< 1ns	3ns
Impedancia de la Carga	Z_0	$2Z_0$	$\gg R_{ds-on}$
Fuente de carga	$2V_{load}$ pulsado	V_{load} pulsado	V_{load} pulsado
Duración del pulso	> 1ns	>1 ns	>12 ns
Tamaño	Medio	Grande	pequeño
Interfaz con la carga	Difícil	Fácil	Fácil

demostrado tener un efecto nocivo sobre células cancerígenas, con una gran selectividad en su ataque tejidos vivos del organismo. Esta técnica merece a juicio de los autores la atención de los investigadores en oncología básica y clínica, pues puede dar lugar a una nueva tecnología alternativa a los tratamientos actuales.

REFERENCIAS

1. Schoenbach KH, Joshi RP, Kolb JF, et al. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proc IEEE* 2004;92:1122-37.
2. Schoenbach KH, Nuccelli R, Beebe SJ. *Spectrum IEEE* 2006;43:20-6.
3. Cavallini A., Montanari G.C. Effect of supply voltage frequency on testing of insulation system. *IEEE Trans Dielec Elec Insul* 2006;13:111-112.
4. Martínez-Tarifa JM, Sanz-Feito J, Amarís-Duarte H. Reduction of electrical stresses on low voltage induction motors insulation systems through remote controlled inverters. *Elec Power Comp Sys* 2008;36:885-96.
5. Katsuki S, Mitsutake K, Yano M, et al. Non-thermal and transient thermal effects of burst 100MHz sinusoidal electric fields on apoptotic activity in HeLa Cells. *IEEE Trans Dielec Elec Insul* 2010;17:678-84.
6. Cheng N, Schoenbach KH, Kolb JK, et al. Leukemic intracellular responses to nanosecond electric fields. *Biochem and Biophys Res Comm* 2004;317:421-7.
7. Behrend M, Kuthi A, Gu X, et al. Pulse generators for pulsed electric fields exposure of biological cells and tissues. *IEEE Trans Dielec Elec Insul* 2003;10:820-5.
8. Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, et al. Nanoseconds pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002;30:286-92.
9. Mi Y, Yao C, Li C, et al. Apoptosis Induction effects of steep pulsed electric fields (SPEF) on human liver cancer cell SMMC-7721 *in vitro*. *IEEE Trans Dielec Elec Insul* 2009;5:302-10.
10. Donthula V, Camps-Raga B, Islam N.A. Effects of nanosecond pulsed electric fields on the human prostate cancer cell line LNCaP. *IEEE Trans Dielec Elec Insul* 2009;16:1311-16.