

Distribución espacial de la permeabilización y frentes de pH en un modelo 2D inducido por la electroporación electrolítica: Simulaciones

Spatial distribution of permeabilization and pH fronts in a 2D tissue model induced by electrolytic electroporation: a numerical study

Presentación: 4 y 5 de Octubre de 2022

Doctorando:

Enaide Maine Calzado

ICC_Instituto de Ciencias de la Computación, Departamento de Computación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

enaide8702@gmail.com

Director:

Pablo Guillermo Turjanski

Codirector:

Nahuel Manuel Olaiz

Resumen

La electroporación electrolítica es una nueva técnica de ablación de tejidos que está dando excelentes resultados en el tratamiento de tumores. Esta técnica consiste en acoplar la electroporación con la ablación electrolítica. El objetivo de este estudio es simular la distribución espacial de los frentes de pH generados por diferentes conjuntos de electrodos y analizar cómo este parámetro afecta el daño tisular cuando se aplica la electroporación electrolítica. Se utiliza un modelo bidimensional de buffer de bicarbonato para simular el tejido biológico. El modelo numérico resuelve las ecuaciones bidimensionales de Nernst-Planck para el transporte de iones en un electrolito de nueve iones. Las simulaciones numéricas muestran que los frentes extremos de pH alcanzaron valores de $\text{pH} < 4,0$ (alrededor de los ánodos) y $\text{pH} > 8,6$ (cerca de los cátodos). Estos valores de pH afectan a los niveles de permeabilización celular, provocando la entrada de altas concentraciones de moléculas en el tejido tratado y, en consecuencia, su destrucción. El patrón espacial de los frentes de pH dependen del tiempo de exposición, la carga aplicada, la forma de la matriz de electrodos y la polaridad entre los electrodos. Los resultados obtenidos en este estudio se contrastaron con los obtenidos en experimentos *in vitro* e *in vivo* reportados en la literatura internacional. Concluimos que los frentes de pH ácido-base y la acción que ejercen sobre la permeabilización tisular juegan un papel importante en el daño tisular cuando se aplica la electroporación electrolítica.

Palabras clave: Electroporación electrolítica, Permeabilización, Frentes de pH, Tumor.

Abstract

Electrolytic electroporation is a new tissue ablation technique that is giving excellent results in the treatment of tumors. This technique consists of coupling electroporation with electrolytic ablation. The goal of this study is to simulate the spatial distribution of pH fronts generated by different electrode arrays and to analyze how these parameters impact tissue damage when electrolytic electroporation is applied. A two-dimensional bicarbonate buffer model is used to simulate the biological tissue. Numerical simulations show that extreme pH fronts reach values of $\text{pH} < 4.0$ (around the anodes) and $\text{pH} > 8.6$ (near the cathodes). These pH values affect cell permeabilization levels, resulting in the entry of high concentrations of molecules into the treated tissue and, consequently, its destruction. Spatial pattern of pH fronts depend on the exposure time, applied charge, shape electrodes array and polarity. Results obtained in this study were contrasted with those obtained in *in vitro* and *in vivo* experiments reported in the international literature. We conclude that acid-base pH fronts and the action they exert on tissue permeabilization play an important role in tissue damage when electrolytic electroporation is applied.

Keywords: Electrolytic electroporation, Permeabilization, pH fronts, Tumors

Introducción

En la actualidad una nueva técnica de electroporación electrolítica (E2) está brindando excelentes resultados en el tratamiento de tumores (Guenther et al., 2020; Klein et al., 2019; Kim et al., 2020). Dicha técnica consiste en la combinación de la ablación electrolítica (EA), también conocida como terapia electroquímica (EChT), y la electroporación. La E2 consiste en la aplicación de un pulso similar a un decaimiento exponencial, que tiene una etapa inicial de alta tensión destinada a electroporar las membranas celulares, y una etapa posterior de baja tensión y larga duración destinada a suministrar suficiente corriente para inducir la electrólisis en la interfaz entre los electrodos (Guenther et al., 2020; Klein et al., 2019). Esta combinación permite mejorar la eficacia de la ablación electrolítica en función del tiempo de exposición, y a la vez, mitigar las contracciones musculares provocadas por la electroporación, empleando unos pocos pulsos de campo eléctrico. La combinación sinérgica entre ambas técnicas hace posible que las células sean más susceptibles a cantidades menores de productos de la electrólisis. La EA involucra diferentes procesos biofísicos y biológicos, que necesitan ser entendidos y descritos en detalle. Aunque los efectos de la E2 se han investigado en una serie de estudios clínicos, todavía falta una comprensión más profunda de los mecanismos de acción antitumoral detrás del método (Kim et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Una manera de comprender mejor los fenómenos complejos que ocurren durante la E2 es a través de la modelación y simulación. Los modelos pueden proporcionarnos información acerca de los efectos que pueden tener los diferentes parámetros del tratamiento y, conducir así a mejorar el protocolo del tratamiento. Existen modelos previos que modelan, de manera independiente, ciertos aspectos de la electroporación (Miklavcic, 2017) y de la electrólisis (Gu et al., 2019; Marino et al., 2017; Maglietti et al., 2013). Estos muestran que parámetros tales como la geometría de los electrodos, el voltaje aplicado y la propiedad eléctrica del tejido tratado, entre otros, son factores sumamente importantes en ambos casos.

Desarrollo

En el modelo *in silico* propuesto, se varían los principales parámetros de la terapia (corriente/tensión) y se utilizan 8 especies iónicas ($A = H^+, OH^-, Cl^-, HCO_3^-, HClO, Cl_2, CO_2$ y CO_3^{2-}). El modelo representa el fenómeno de migración, difusión y reacción. En el ánodo, las reacciones electroquímicas más importantes son la evolución del oxígeno

($2H_2O \rightarrow O_{2(gas)} + 4H^+ + 4e^-$) y la evolución del cloro ($2Cl^- \rightarrow Cl_{2(gas)} + 2e^-$); en la vecindad del ánodo se produce la

formación del ácido hipocloroso ($Cl_{2(aq)} + H_2O \rightarrow HClO + H^+ + Cl^-$). En el cátodo, se produce la reacción de evolución del

hidrógeno ($2e^- + 2H_2O \rightarrow H_{2(gas)} + 2OH^-$). En la literatura internacional se reporta que los productos de las reacciones

químicas (iones H^+ , alrededor del ánodo y iones OH^- , alrededor del cátodo), son la causa principal del daño tisular, ya que se alcanzan valores de pH extremos durante el tratamiento electroquímico. Por otra parte, otros estudios informan que los iones

cloro y otros compuestos que involucran cloro, producen cierta toxicidad que induce la necrosis del tejido producto de la electrólisis.

Los sistemas de buffer del tejido contrarrestan la propagación de iones en el medio. Dentro de los sistemas de buffer más importantes que constituyen la capacidad de buffer total de los tejidos se encuentran, el buffer de bicarbonato y sistemas de buffer que involucran proteínas y contenidos de fosfatos orgánicos. Nosotros en este modelo tenemos en cuenta los aspectos de buffer de bicarbonato en el tejido (Marino et al., 2017). Las principales reacciones que ocurren en un sistema de buffer de bicarbonato son:



Modelo de ecuaciones

La ecuación de Nernst-Planck se utiliza para calcular la concentración de cada especie química y el potencial eléctrico en el electrolito, dado por $\frac{\partial C_A}{\partial t} = -\nabla \cdot N_A + R_A$ donde t es el tiempo (s), R_A representa la producción de la especie A a partir de reacciones químicas que se inducen en el electrolito. El flujo molar N_A ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) se calcula mediante la siguiente expresión

$N_A = -D_A \nabla C_A - \frac{z_A}{|z_A|} u_A C_A \nabla \Phi$, donde C_A (mol m^{-3}), D_A ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), z_A , u_A ($\text{m}^2 \text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) y Φ (V) son la concentración, el coeficiente de difusión, el número de carga, la movilidad de las especies A y potencial eléctrico, respectivamente.

El signo positivo de z_A se asigna a cationes, mientras que el signo negativo a aniones. El equilibrio en la disolución del agua (término reactivo) viene dado por $R_{H^+} = R_{OH^-} = K_{w,b} \cdot C_{H_2O} - K_{w,f} \cdot C_{H^+} \cdot C_{OH^-}$, $R_{Cl^-} = 0$, donde $K_{w,b}$ (s^{-1}) y $K_{w,f}$ ($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) son las constantes de velocidad de formación y disociación del agua, respectivamente. Las velocidades de las reacciones consideradas para el modelo de buffer de bicarbonato vienen dadas por:

$$R_{OH^-} = R_{CO_2} = -R_{HCO_3^-} = -K_{c,f}(C_{CO_{2(aq)}} C_{OH^-} - \frac{C_{HCO_3^-}}{K_c}), \quad R_{OH^-} = R_{HCO_3^-} = -R_{CO_3^{2-}} = -K_{h,f}(C_{HCO_3^-} C_{OH^-} - \frac{C_{CO_3^{2-}}}{K_c}),$$

$$R_{HCO_3^-} = R_{H^+} = -R_{CO_{2(aq)}} = -K_{b,f}(C_{H^+} C_{HCO_3^-} - \frac{C_{CO_{2(aq)}} C_{H_2O}}{K_b}), \quad \text{donde } K_c \text{ (mol}^{-1}\text{)} \text{ y } K_b \text{ (mol}^{-1}\text{)} \text{ son las constantes de equilibrio de la$$

reacción de absorción de cloro y la reacción de hidrógeno, con soluciones acuosas de bicarbonato, respectivamente. $K_{c,f}$, $K_{h,f}$ y $K_{b,f}$ ($\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) son las constantes de velocidad de disociación del cloro, hidróxido e hidrógeno, respectivamente.

La movilidad iónica y el coeficiente de difusión están relacionados mediante la ecuación de Nernst-Einstein, dada por $D_A = \frac{RT}{|z_A|F} u_A$, donde T es la temperatura absoluta, R la constante universal de los gases y F la constante de Faraday. Este modelo incluye el coeficiente de permeabilización P que indica, para cada localización, el grado de permeabilización del tejido tratado. Para poros muy grandes y moléculas muy pequeñas, podría aproximarse al coeficiente de difusión (D) como $P = D$. La

densidad de corriente viene dada por la ley de Faraday, $J = F \sum_{A=1}^8 z_A N_A$. La separación de carga en electrolitos está dentro de la escala de longitud de Debye, la ecuación de Poisson que relaciona el campo eléctrico y la separación de carga para electrolitos

se simplifica a la condición de electroneutralidad, dado por $\sum_{A=1}^8 z_A C_A = 0$. Por tanto, la ecuación para la conservación de la

carga eléctrica se puede escribir como $\sum_{A=1}^8 z_A \nabla(D_A \nabla C_A) + \frac{F}{RT} \sum_{A=1}^8 |z_A| \nabla(D_A C_A \nabla \Phi) = 0$, donde J (A m^{-2}) es la densidad de

corriente eléctrica total. La ecuación anterior permite el cálculo de Φ , a partir de la cual se calcula la intensidad del campo eléctrico E ($V\ m^{-1}$) mediante la ecuación $\vec{E} = -\nabla\Phi$.

Resultados

El modelo se validó comparando los resultados con datos experimentales (Klein et al., 2019). La precisión de las ecuaciones, las reacciones electroquímicas, la cinética de reacción homogénea y todos los parámetros de entrada se variaron para cada electrodo por separado (Klein et al., 2019). La figura 1 muestra la distribución espacial de los frentes de pH inducidos por la aplicación de la E2 (después de 10 pulsos aplicados) para la Configuración I (Fig. 1a), Configuración II (Fig. 1b) y Configuración III (Fig. 1c). La figura 1d-f muestra la evolución de los frentes de pH en función de la distancia para un solo pulso de E2, en un corte unidimensional para la configuración I, entre dos electrodos de polaridad opuesta.

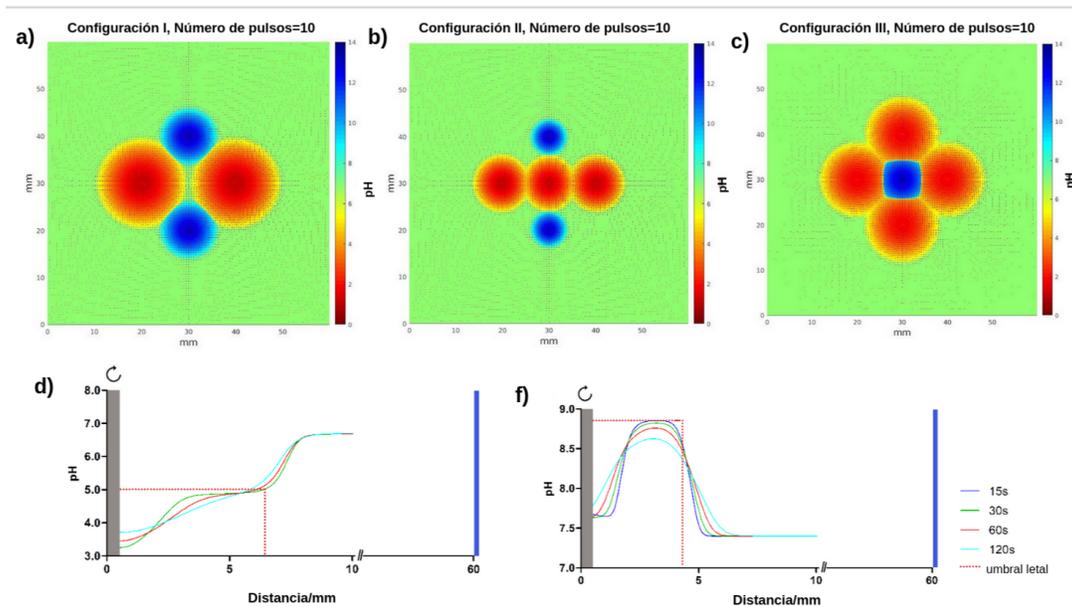


Figura 1: Distribución espacial de los frentes de pH luego de aplicado 10 pulsos de decaimiento exponencial en modelo de E2 in silico. a) Configuración I, b) Configuración II, c) Configuración III y d-f) Evolución de los frentes de pH para la configuración I luego de aplicar un solo pulso de E2, entre un ánodo y cátodo

La figura 2 muestra el porcentaje de células permeabilizadas en función del tiempo después de finalizada la aplicación de la terapia. Dichos valores fueron obtenidos del modelo in vitro presentado en (Klein et al., 2019) y del ajuste de su curva, respectivamente.

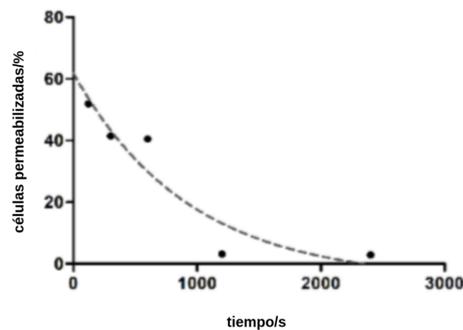


Figura 2: Ajuste de curva (línea de puntos) correspondiente al porcentaje de células permeabilizadas en función del tiempo. Los puntos corresponden a mediciones de modelo in vitro (Klein et al., 2019)

La figura 3 muestra cortes unidimensionales de tres concentraciones de especies químicas para la Configuración I, H^+ (Fig. 3a), Cl^- (Fig. 3b) y OH^- (Fig. 3c), el corte en el modelo in silico se toma entre uno de los dos pares de ánodo-cátodo. Los iones H^+ producidos en el ánodo (debido a la evolución del oxígeno y la hidrólisis del gas cloro) fluyen hacia el cátodo a través de procesos migratorios y de difusión. Los procesos de difusión prevalecen en ausencia de campo eléctrico. Los iones Cl^- consumidos en el ánodo, producto de la reacción electroquímica correspondiente al desprendimiento de cloro, fluyen hacia este electrodo atraídos por fuerzas eléctricas de signo contrario. Además, los iones Cl^- migran del cátodo al ánodo por repulsión electrostática (cátodo con carga negativa e iones Cl^-). Los iones OH^- producidos en el cátodo (debido a la evolución del hidrógeno) fluyen a través de procesos migratorios y difusivos hacia el ánodo.

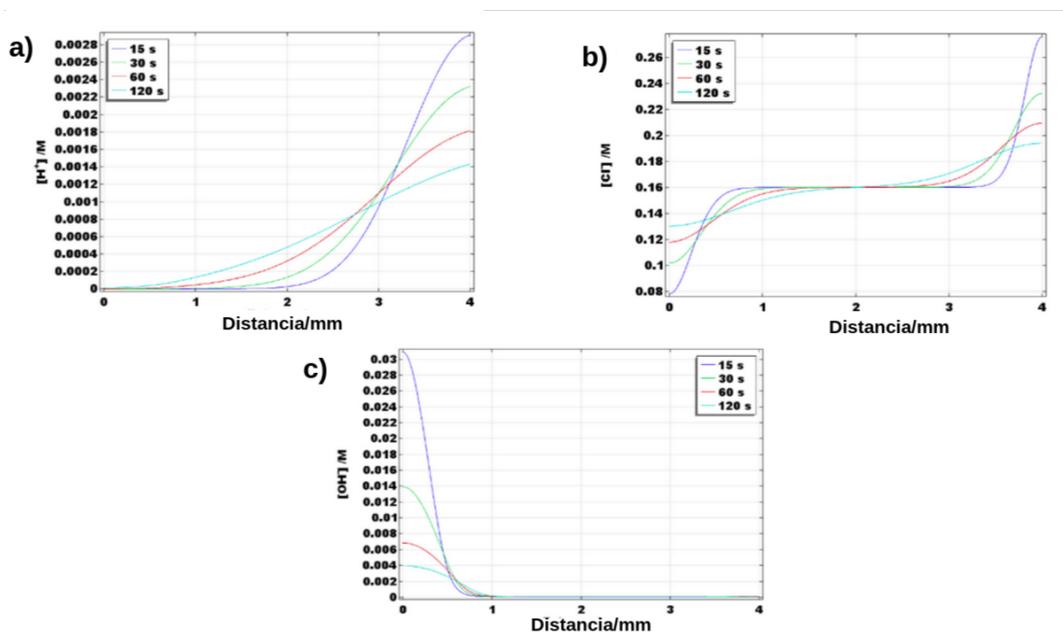


Figura 3: Perfiles de concentración simulados entre los electrodos después del tratamiento E2 con tres pulsos. La vista es un plano de corte entre el cátodo ($x = 0$ mm) y el ánodo ($x = 4$ mm) a la mitad de la longitud del electrodo (lo que significa que la línea va justo en el medio del área de tratamiento). a) Concentraciones de iones hidrógeno, b) Concentraciones de iones cloruro y c) Concentraciones de iones hidróxido

Conclusiones

La permeabilización de la membrana celular -debido a la electroporación-, genera que las células sean más sensibles a los productos de la electrólisis. Estos productos pueden, por lo tanto, ingresar a las células de manera no regulada, causando un deterioro de la homeostasis y, finalmente, la muerte celular. Por lo tanto, hipotetizamos que existe una sinergia entre la electroporación y la electrólisis que hace que la E2 sea una técnica más eficaz que aplicar la electroporación o la electrólisis de manera separada. A través de nuestro modelo in silico de E2 (y posteriormente verificaciones in vitro e in vivo) esperamos mostrar que el tratamiento del tumor puede lograrse con una dosis electrolítica mucho más baja que la requerida para la ablación tisular por simple electrólisis.

Referencias

Guenther, E., Klein, N., Mikus, P., Botea, F., Pautov, M., Lugnani, F., Macchioro, M., Popescu, I., M Stehling, K. y Rubinsky, B. (2020). "Toward a clinical real time tissue ablation technology: combining electroporation and electrolysis (E2)". PeerJ 8, e7985.

Y Gu, H., Yamashita, T., Inoue, T., J Song, H. y K Kang, M. (2019). "Cellular and molecular level mechanisms against electrochemical cancer therapy". Journal of Pathogens, 2019, 3431674.

H Kim, B. y J Chung, H. (2020). "Incorporation of reversible electroporation into electrolysis accelerates apoptosis for rat liver tissue". Technology in Cancer Research & Treatment, 19, 1-8.

Klein, N., Guenther, E., Botea, F., Pautov, M., Dima, S., Tomescu, D., Popescu, M., Ivorra, A., Stehling, M. y Popescu, I. (2019). "The combination of electroporation and electrolysis (E2) employing different electrode arrays for ablation of large tissue volumes". PLoS One, 14, e0221393.

Miklavcic, D. (2017). Handbook of Electroporation. Berlin, Germany: Springer International Publishing.

Maglietti, F., Michinski, S., Olaiz, N., Castro, M., Suárez, C. y Marshall, G. (2013). "The role of pH fronts in tissue electroporation based treatments". PLoS ONE, 8(11), e80167.

Marino, M., Olaiz, N., Signori, E., Manglietti, F., Suárez, C., Michinski, S. y Marshall, G. (2017). "pH fronts and tissue natural buffer interaction in gene electrotransfer protocols". Electrochimica Acta, 255, 463-471.

Zhao L., Rasko A., Drescher C., Maleki S., Cejnar M., McEwan A. (2019). "Preliminary Validation of Electroporation-Electrolysis (E2) for Cardiac Ablation Using a Parameterisable In-Vivo Model". Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2019,289-293.