

Evolución dinámica de la membrana celular durante la electroporación: Medidas de espectroscopia de impedancia eléctrica

Tomás García Sánchez¹, Anna M. Gomez-Foix², Javier Rosell-Ferrer¹, Ramon Bragós¹

¹ Grupo de Instrumentación Electrónica y Biomédica, Departament d'Enginyeria Electrònica, Universitat Politècnica de Catalunya, España, tomas.garcia.sanchez@upc.edu

² Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, IBUB Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

Resumen

Las medidas de las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos son un instrumento interesante para la caracterización de procesos celulares. En el presente estudio se muestra como las medidas de espectroscopia de impedancia eléctrica son una herramienta útil para el estudio de los cambios dinámicos producidos en la membrana celular durante el proceso de electroporación. Aplicando técnicas rápidas de medida de impedancia basadas en señales multiseno, este estudio, realizado durante la electroporación de células adherentes creciendo sobre microelectrodos, muestra dos comportamientos dinámicos diferentes en la membrana celular. También se pone de manifiesto cómo las medidas multifrecuencia son útiles para la extracción de información sobre diferentes procesos que tienen lugar durante la electroporación. Adicionalmente se utiliza las medidas de impedancia también para monitorizar el estado del cultivo antes y después del tratamiento de electroporación.

1. Introducción

La aplicación de pulsos de campo eléctrico de alta intensidad, típicamente con amplitudes en el orden de los kV/cm y duraciones en el orden de los μ s, sobre tejidos biológicos tiene como resultado un estado de permeabilidad de la membrana celular que puede ser transitorio si las condiciones de campo eléctrico son cuidadosamente seleccionadas (electroporación reversible)[1]. La técnica es aplicada en condiciones *in vitro* para la introducción de especies moleculares como drogas, ADN, siRNA, etc. También se utiliza en condiciones *in vivo* donde el objetivo también es la introducción de ciertos fármacos, por ejemplo en el tratamiento del cáncer (electroquimioterapia) o en la terapia génica. Cuando se sobrepasa cierto umbral de campo eléctrico, el estado de permeabilidad celular es permanente desencadenando la muerte celular. Este fenómeno se utiliza entre otras para la ablación de ciertos tejidos o para la esterilización de productos en la industria alimentaria (electroporación irreversible) [2].

El estudio de los mecanismos íntimos por los que se produce la electroporación es, incluso hoy en día, un tema de gran interés pues siguen sin conocerse las causas moleculares que desencadenan el proceso [3]. Entre las técnicas utilizadas para estudiar al permeabilización de la membrana, normalmente químicas, se

encuentra el estudio de las propiedades eléctricas de la membrana citoplásmica durante la aplicación de los pulsos de campo eléctrico. Los estudios de autores anteriores utilizando técnicas eléctricas se basan en su mayoría en medidas voltaje/corriente del sistema durante la aplicación de los pulsos, otros estudios han utilizado señales alternas. Sin embargo, debido a los excesivos tiempos de medida requeridos por las técnicas clásicas de medida de impedancia, pocos estudios han registrado la respuesta frecuencial completa del sistema y ninguno de ellos lo ha hecho durante la aplicación de los pulsos [4-7]. En el presente estudio se presentan medidas de espectroscopia de impedancia realizadas durante el intervalo entre pulsos de un tratamiento estándar de electroporación. La resolución temporal conseguida con el presente sistema (1ms) excede con creces a los anteriores intentos estudiando la impedancia durante la electroporación. Además, también se utilizan los registros de impedancia para monitorizar el crecimiento del cultivo durante las horas previas al tratamiento de electroporación y el estado de los mismos tras la aplicación de los pulsos de campo eléctrico conformando todo ello un sistema completo de monitorización y tratamiento celular.

2. Materiales y métodos

2.1. Sistema de medida

La señal de medida utilizada consiste en una multiseno con fase aleatoria que incluye 21 frecuencias de medida desde los 5 kHz hasta los 1.31 MHz. La señal es generada en una plataforma PXIe-1062Q (National Instruments) utilizando un generador de forma de onda arbitraria NI PXI-5422. La señal es inyectada utilizando un front-end analógico que mide corriente y tensión. Éstas son registradas a través del digitalizador de alta resolución NI PXIe-5122. Adicionalmente el módulo de conmutación NI PXI-2530 se utiliza para controlar las conexiones entre los electrodos y el sistema. Todo este equipo está sincronizado con el estimulador, diseñado por el propio equipo de trabajo, que genera los pulsos de electroporación.

2.2. Microelectrodos

Para realizar las medidas se utilizó un set de microelectrodos diseñado y fabricado expresamente para esta aplicación. La topología del mismo consiste en 6

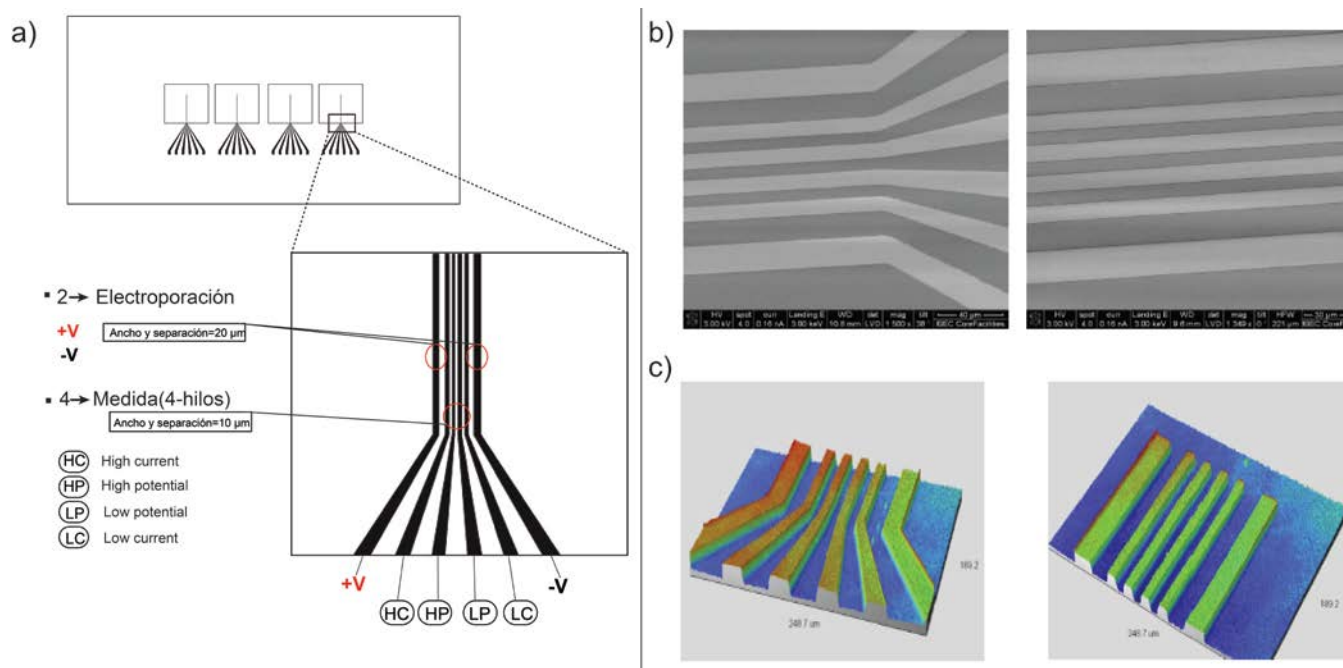


Fig. 1. Topología de microelectrodos utilizada. a) Esquema de conexiones, b) Imágenes SEM del resultado, c) Imagen interferométrica del resultado

pistas rectas paralelas, las dos externas son utilizadas para la aplicación de los pulsos de campo eléctrico mientras que las 4 interiores son las encargadas de la medida de impedancia a 4 hilos (ver Fig. 1a). Los electrodos se realizaron en sala blanca mediante la técnica RIE (Reactive-ion etching) sobre substratos de vidrio cubiertos de ITO (Indium Tin Oxide). El patrón fue transferido a los substratos mediante litografía utilizando la resina SU8-10 y tras el proceso de RIE se obtuvieron los electrodos con un grosor final de 45 nm. En las Fig. 1b y 1c se observan imágenes SEM e interferométrica del resultado final.

Una vez terminados los microelectrodos fueron limpiados (acetona/propanol), activados (Piranha etch) y encapsulados utilizando μslides adhesivos (Ibidi). Las conexiones fueron realizadas mediante epoxy conductora (Circuit-Works). Para su esterilización se procedió al lavado con etanol y posterior exposición durante 15 minutos a radiación ultravioleta.

2.3. Protocolo experimental

Los experimentos mostrados se realizaron con la línea celular CHO-K1 (chinese hamster ovary). La células fueron cultivadas durante 24 h en incubadora humidificada a 37°C, 5% CO₂ utilizando el medio Ham'F12 (Gibco) suplementado con 10% FBS+1% PSF hasta alcanzar una confluencia cercana al 100 %.

Para la aplicación de los pulsos de campo eléctrico, se utilizó un buffer de baja conductividad, usualmente utilizado en electroporación consistente en 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 1 mM MgCl₂ y 250 mM sucrosa. Finalmente para comprobar el grado de permeabilización de las células tratadas se utilizó yoduro de propidio 0,15 mM para marcar el núcleo de las células permeabilizadas.

Para la realización de los experimentos el medio de cultivo fue retirado, a continuación las células fueron lavadas con PBS y se añadieron 150 μl del buffer con yoduro de propidio. Después de 5 min a temperatura ambiente, necesarios para la estabilización de las células, 8 pulsos rectangulares bipolares con una duración de 100 μs y una frecuencia de repetición de 1 Hz fueron aplicados a las células utilizando diferentes amplitudes de campo eléctrico para diferentes condiciones. La secuencia de la señal de medida y pulsos de electroporación se representa esquemáticamente en la Fig. 2. 5 min después de las medidas, las células fueron lavadas dos veces con PBS e inspeccionadas bajo microscopio invertido de fluorescencia (Leica, DMI 4000B).

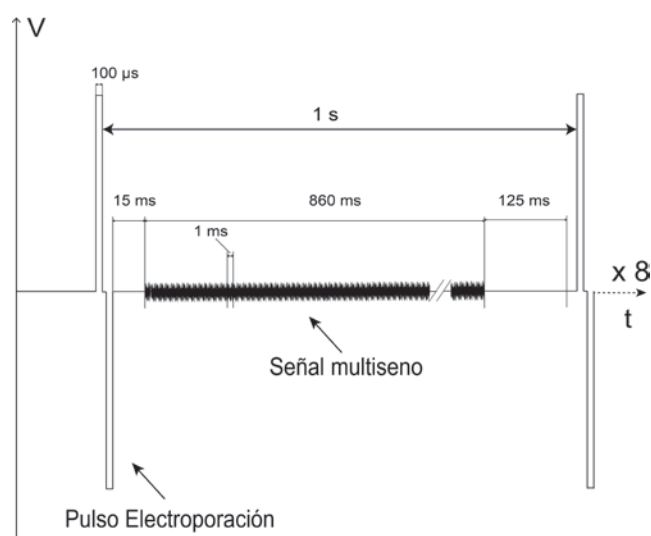


Fig. 2. Secuencia de Electroporación + Medida de impedancia

3. Resultados

3.1. Monitorización del crecimiento celular

En la Fig. 3 se muestra un ejemplo de monitorización continua de la impedancia del cultivo durante 24 horas de crecimiento celular. Se observa como el módulo de impedancia aumenta gradualmente con el tiempo. Este incremento se da claramente a baja frecuencia mientras que a medida que la frecuencia aumenta la variación de impedancia es menor. Esto es debido al aumento en la presencia de membranas celulares actuando como aislantes a baja frecuencia. El aumento en fase se produce en la banda de frecuencias intermedias correspondiendo a la frecuencia central de la relajación. Se observa como existe una acumulación de valores al final del proceso indicando que los electrodos estaban completamente cubiertos por material celular, es decir, el cultivo llegó a confluencia. Las medidas confirman cómo es posible la monitorización continua de cultivos celulares con un método no invasivo como son las medidas de impedancia [8].

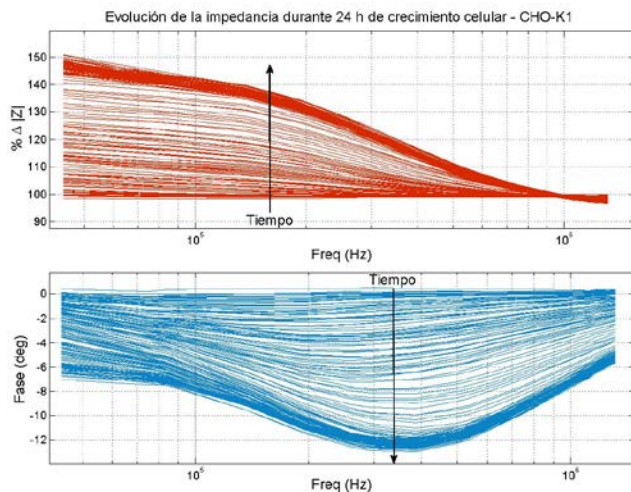


Fig. 3. Monitorización del crecimiento celular de cultivo durante 24 h. Variación de módulo en % respecto a estado inicial. Variación de fase en grados.

3.2. Medidas durante electroporación

En la Fig. 4 se muestra la evolución del módulo y la fase durante la aplicación de pulsos de electroporación con una amplitud de 50V sobre una monocapa de células para todas las frecuencias registradas. Con esta amplitud la tasa de permeabilización de la monocapa es cercana al 100% como se comprobó mediante la detección de yoduro de propidio en el interior celular bajo el microscopio de fluorescencia. La respuesta de impedancia muestra claramente un comportamiento diferente a baja y alta frecuencia. En el rango de frecuencias más bajo se observa una doble dinámica; una recuperación rápida de la impedancia inmediatamente después de cada pulso y un efecto acumulado durante todo el proceso. La primera dinámica corresponde con la recuperación o cierre de los poros de vida corta formados durante la electroporación. En acuerdo con otros autores [5,9], estos

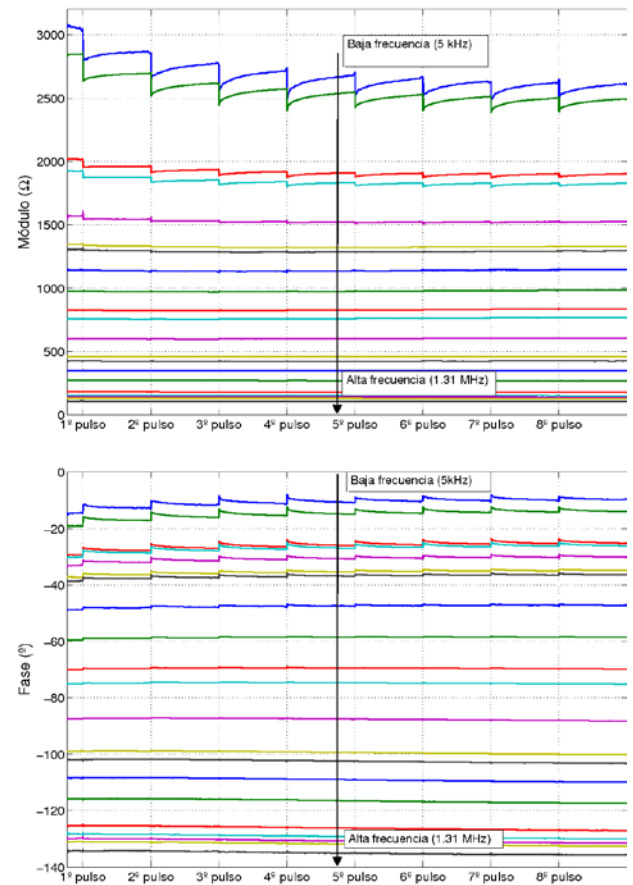


Fig. 4. Evolución del módulo y la fase de la impedancia durante la aplicación de los pulsos de electroporación ($V=50V$).

poros comienzan a cerrarse inmediatamente después de que el campo eléctrico cesa con tiempos de vida en el orden de milisegundos.

Por otro lado, se observa un efecto mantenido a lo largo del tiempo que corresponde con los descritos por otros autores como poros de vida larga [9] y que son los responsables del estado de permeabilidad celular después de la aplicación de los pulsos con tiempos de vida de minutos.

A alta frecuencia únicamente se observa una leve disminución de la impedancia en un proceso con dinámica lenta. Según la teoría de impedancia, las corrientes a alta frecuencia no se ven afectadas por la presencia de membranas celulares por lo que el comportamiento observado no responde a ningún cambio de la membrana. Sin embargo, una variación en la composición del medio extracelular afectaría tanto a las medidas de alta y baja frecuencia. Este cambio de composición ha sido observado previamente durante la electroporación como consecuencia de la salida de iones a través de los poros desde el medio intracelular por difusión pasiva debido al gradiente de concentraciones [9-10].

El uso de medidas de impedancia multifrecuenciales con resolución temporal de 1 ms durante la aplicación de los pulsos de campo eléctrico, revela que es posible diferen-

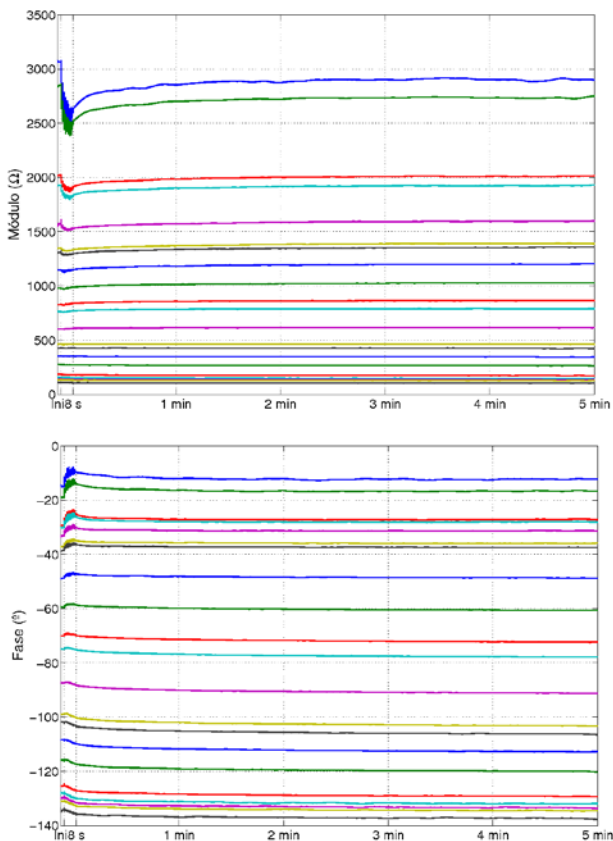


Fig. 5. Evolución de módulo y fase de la impedancia durante 5 min post-electroporación.

ciar diversos procesos que tienen lugar en el sistema al mismo tiempo.

3.3. Medidas post electroporación

Inmediatamente después de la aplicación del campo eléctrico la impedancia de la monocapa celular fue monitorizada durante 5 minutos adicionales (1 medida/2s). En la Fig. 5 se muestra la evolución de módulo y fase para el mismo experimento de la Fig. 4. A la vista de los resultados obtenidos es posible observar una recuperación de la impedancia a baja frecuencia que corresponde con la recuperación de la membrana celular, es decir, el cierre de los poros de vida larga. Esta recuperación es relativamente rápida durante los primeros segundos, pasando posteriormente a un proceso de recuperación más lento. Como se observa, la impedancia no se recupera hasta el valor inicial en 5 min, esto puede significar que la membrana necesita más tiempo para cerrarse completamente. Además, otras variaciones producidas en el sistema como el ya comentado cambio de conductividad pueden hacer que no sea posible alcanzar el valor final nuevamente.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se muestra una estructura de microelectrodos diseñada específicamente para su aplicación a medidas de espectroscopia de impedancia así como electroporación en cultivos celulares adherentes. Con el sistema propuesto es posible monitorizar no invasivamente el estado celular desde el momento inicial

de cultivo, durante el tratamiento de electroporación así como su estado posterior.

Además este estudio preliminar pone de manifiesto como las medidas dinámicas de impedancia basadas en señales multisenso son adecuadas para monitorizar procesos celulares rápidos. El estudio de todo el espectro de frecuencias en oposición a medidas a una única frecuencia tiene la ventaja de aportar información adicional sobre diferentes procesos presentes en el sistema.

El trabajo futuro irá encaminado a extender las medidas a otras líneas celulares, así como variar diferentes parámetros experimentales. Por otro lado el ajuste de las medidas a modelos de impedancia como el conocido modelo de Cole podrían suponer un método idóneo para caracterizar completamente el sistema haciendo uso de toda la información del espectro de impedancias.

Referencias

- [1] Weaver, J.C. and Y.A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1996. 41(2): p. 135-160.
- [2] Yarmush, M.L., et al., *Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2014. 16(1): p. 295-320.
- [3] Teissie, J., M. Golzio, and M.P. Rols, Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2005. 1724(3): p. 270-280.
- [4] Krassen, H., U. Pliquet, and E. Neumann, Nonlinear current-voltage relationship of the plasma membrane of single CHO cells. *Bioelectrochemistry*, 2007. 70(1): p. 71-77.
- [5] Ghosh, P.M., C.R. Keese, and I. Giaever, Monitoring electroporation in the plasma membrane of adherent mammalian cells. *Biophysical Journal*, 1993. 64(5): p. 1602-1609.
- [6] Stolwijk, J.A., et al., Impedance analysis of adherent cells after in situ electroporation: Non-invasive monitoring during intracellular manipulations. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 26(12): p. 4720-4727.
- [7] Ivorra, A. and B. Rubinsky, In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry*, 2007. 70(2): p. 287-95.
- [8] Sarró, E., et al., Electrical impedance spectroscopy measurements using a four-electrode configuration improve on-line monitoring of cell concentration in adherent animal cell cultures. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. 31(1): p. 257-263.
- [9] Pavlin, M. and D. Miklavcic, Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation - Relation between short-lived and long-lived pores. *Bioelectrochemistry*, 2008. 74(1): p. 38-46.
- [10] Zaharoff, D.A., et al., Mechanistic analysis of electroporation-induced cellular uptake of macromolecules. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008. 233(1): p. 94-105.