

Interrupción de la replicación de células cancerosas por la acción de campos eléctricos alternos

Eilon D. Kirson,¹ Zaya Gurvich,¹ Rosa Schneiderrnan,¹ Erez Dekel,¹ Aviran Itzhaki,¹ Yoram Wasserman,^{1,4} Rachel Schatzberqer/¹ y Yoram Palti.²

¹*Departamento de Ingeniería biomédica, NovoCure Ud., Haifa, Israel;* ²*Facultad de medicina B. Rappaport, Instituto de tecnología Technion-israel, Haifa, Israel;* ³*Departamento de biología molecular celular, Instituto Weizmann de ciencias, Rehovot, Israel;* y ⁴*"Centro médico Elisha, Haifa, Israel.*

RESUMEN

Campos eléctricos alternos de baja intensidad y frecuencia intermedia (100-300 kHz) suministrados mediante electrodos aislados tienen un profundo efecto inhibitorio sobre la tasa de crecimiento de diversas líneas de células tumorales en seres humanos y en roedores (Patricia C, U-118, U-8?, H-1299, MDA231, PC3, B16F1, F-98, C-6, RG2 Y CT-26) y de tumores malignos en animales. Este efecto, que se ha demostrado que no es térmico, afecta selectivamente a las células en división mientras quedan intactas las células inactivas. Estos campos actúan de dos formas: deteniendo la proliferación celular y destruyendo las células mientras se dividen. Ambos efectos se demuestran cuando se aplican tales campos durante 24 horas a células que se encuentran en el proceso de mitosis y se orientan aproximadamente en la dirección del campo. El primer modo de acción se manifiesta por la interferencia con la formación correcta del huso mitótico, mientras que el segundo produce una rápida desintegración de las células en división. Ambos efectos, dependientes de la frecuencia, son coherentes con las fuerzas direccionales calculadas ejercidas por estos campos específicas sobre cargas y dipolos dentro de las células en división. El tratamiento *in vivo* de tumores en ratones C57BU6 y BALB/c (modelos tumorales singeneicos B16F1 y CT-26 respectivamente) produjeron una reducción significativa de la velocidad de crecimiento del tumor y una destrucción extensa de células tumorales en el término de 3-6 días. Estos hallazgos demuestran la aplicabilidad potencial de los campos eléctricos descritos como una nueva modalidad terapéutica para tumores malignos.

INTRODUCCIÓN

En el marco del laboratorio y en la práctica clínica, los campos eléctricos alternos muestran una amplia gama de efectos sobre los tejidos vivos. A frecuencias muy bajas (por debajo de 1 kHz), los campos eléctricos alternos estimulan los tejidos excitables mediante la despolarización de la membrana (1). La transmisión de dichos campos por radiación es insignificante y por consiguiente se aplican por lo general directamente mediante electrodos de

contacto, aunque algunas aplicaciones también han empleado electrodos aislados. Algunos ejemplos bien conocidos de tales efectos son la estimulación de nervios, músculos y corazón por la acción de campos eléctricos alternos (1, 2). Además, se ha afirmado que los campos eléctricos de baja frecuencia por pulsos estimulan el crecimiento óseo y aceleran la curación de fracturas (3). Sin embargo, a medida que aumenta la frecuencia del campo eléctrico por encima de 1 kHz, el efecto estimulante disminuye. En estas condiciones, aunque penetre en las células una fracción mayor de los campos, debido a la naturaleza resistencia-capacitor paralela de todas las membranas biológicas, el poder estimulador disminuye enormemente a medida que los ciclos alternos de hiperdespolarización de la membrana celular se integran, de modo que el efecto neto queda anulado. A frecuencias muy elevadas (es decir, por encima de muchos MHz), aunque la integración se hace cada vez más efectiva, se observa un efecto biológico completamente diferente. A estas frecuencias el calentamiento tisular se hace dominante debido a las pérdidas dieléctricas. Este efecto se intensifica a medida que aumenta la frecuencia, la intensidad del campo o el factor de disipación del tejido (4). Este fenómeno sirve de base para algunas modalidades de tratamiento médico de uso habitual incluida la ablación de tumores por diatermia y radio frecuencia, la cual se puede aplicar mediante electrodos aislados (5). Los campos eléctricos de frecuencia intermedia (es decir, de decenas de kilohercios a megahercio) alternan demasiado rápido para provocar estimulación nerviosa y muscular y suponen sólo insignificantes pérdidas dieléctricas (calentamiento). Se considera normalmente que dichos campos de intensidades baja a moderada no tienen efecto biológico (4). Sin embargo, se han descrito varios efectos no térmicos de consecuencias biológicas sin importancia incluso a intensidades de campo bajas. Entre estas se incluye la alineación de partículas microscópicas (es decir, el efecto de collar de perlas; Ref. 6) y rotación celular (7,8). Con campos eléctricos por pulsos de 10^3 V/cm y duración de los pulsos de 100 ms, aparece la formación reversible de poros en la membrana celular, un fenómeno conocido normalmente como electroporación (9).

En el presente estudio demostramos por primera vez, que nosotros sepamos, que campos eléctricos alternos de muy baja intensidad (≈ 2 V/cm) y frecuencia intermedia (100-300 kHz), inducidos por electrodos aislados, tienen efectos inhibidores específicos sobre células en división en cultivo. Demostramos que aplicando estos campos a células cancerosas se consigue la detención de la proliferación y la destrucción celular. Cuando se aplican a modelos tumorales de ratones singeneicos, estos campos para el tratamiento de tumores (*Tumor Treating Fields* - campos TTF) provocan una reducción significativa en la tasa de crecimiento del tumor sin efectos secundarios significativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Montaje del experimento in vitro. Los cultivos se crecieron en placas de cultivo estándar (cámaras de cultivo de células de 4 pocillos; SN 138121; Nalge Nunc International). Los campos TTF se generaron por pares de hilos de 15 mm de longitud completamente aislados (P/N K-30-1000; VT Corporation; de 0,5 mm de diámetro externo, grosor del aislamiento con etileno

tetrahidroetileno, 0,125 mm; ruptura dieléctrica 1800 V/mil) fijados a la parte inferior de cada placa separadas entre sí una distancia de 1 mm. Los hilos se conectaron a un oscilador (GFG8219A; Instek) y un amplificador de alto voltaje (A303; A. A. Lab Systems Ud.) que generaba las señales de ondas senoidales requeridas (intervalo, 300-800 V). Las células se sembraron en placa untando cuidadosamente 10 μ l de DME;M (Biological Industries Ud., Beit Haernek, Israel) que contenían $1,5 \times 10^4$ células a lo largo del hueco entre los hilos (Fig. 1A). Una vez que las células se habían asentado y fijado a la superficie de la placa, se añadieron 500 μ l de DMEM a cada placa de cultivo y luego se transfirieron a un incubador humidificado con 5% de CO₂ mantenido a 36 °C. Se incubó el cultivo durante un período de control de 24 horas antes del tratamiento. El medio de cultivo se sustituyó manualmente cada 24 horas a lo largo de todo el experimento. Luego se aplicaron los campos TTF conectando los hilos a un amplificador de alto voltaje accionado por un generador de señales con controles de frecuencia y amplitud. La simulación por elementos finitos de los campos TTF generados entre los hilos demostró que el campo que se encontraba en las proximidades del cultivo de células era homogéneo (no mostrado). Se sometieron a campos TTF once tipos diferentes de líneas celulares cancerosas. Se incluyeron líneas celulares cancerosas humanas de melanoma (Patricia), glioma (U-118, U-87), pulmón (H-1299), próstata (PC3) y mama (MDA231), así como líneas celulares de melanoma de ratón (B16F1), glioma de rata (F-98, C-6 y RG2) Y adenocarcinoma de ratón (CT-26) (todas ellas de la American Type Culture Collection, excepto en el caso de Patricia, que fue una generosa donación de Dr. Ruth Halaban, Departamento de dermatología, Escuela de medicina de la Universidad de Yale). Además, se hizo crecer una línea celular no cancerosa (BHK) en condiciones que dificultaban la replicación celular (FCS al 0,1%) Y luego se sometieron a campos TIF. También se sometieron a los campos *in vitro* segmentos de mesenterio y diafragma extirpados de rata. Se realizaron recuentos de células por colorimetría cada 24 horas después de la siembra empleando el método estándar de hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio para medir la proliferación celular como se describió previamente (10) empleando un kit de ensayo de proliferación celular (Biological Industries, Beit Haernek, Israel). En resumen, los medios de cultivo se sustituyeron por 0,2 ml de reactivo de hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en un incubador con atmósfera de CO₂ al 5%. Después de la incubación y de agitación suave, se transfirieron 0,15 ml de la solución de reacción a una placa de 96 pocillos (SN 92696; TPP, Trasandigen, Suiza). Se leyó después la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Tecan ELISA Reader; 450 nm). Las mediciones calorimétricas en cada punto se normalizaron con respecto a la medición realizada inmediatamente antes de empezar el tratamiento. Para comprobar que las evaluaciones colorimétricas eran exactas, se realizaron recuentos visuales directos de células en placas de cultivo de muestras. A las densidades ópticas empleadas (0,2-2) la densidad óptica tenía una relación lineal con el número de células presentes en las placas de cultivo ($n = 10$; $r = 0,99$). Se calculó la tasa de crecimiento tanto de los cultivos tratados (GR_t) como de los de control (GR_c) para cada experimento representando gráficamente los valores de densidad óptica en escala logarítmica y ajustando una línea de regresión lineal a los valores. La tasa de

crecimiento de cada placa de cultivo era la pendiente de esta regresión lineal. Se calculó la relación de mejora terapéutica (TER) como la proporción de la disminución en la tasa de crecimiento de las células tratadas en comparación con la tasa de crecimiento de las células de control $[(GR_c - GR_t)/GR_c]$. De tal modo que si el incremento en el número de células tratadas es igual al de los controles, $TER = 0$; si el incremento en el número de células es menor en los cultivos tratados que en los controles, $TER > 0$; Y si el número de células en los cultivos tratados disminuye drásticamente, $TER < 0$.

En los experimentos con microfotografías tomadas a intervalos, las líneas celulares se hicieron crecer en una placa de cultivo estándar de 35 mm (SN 430165; Coming Inc.) sembrando en placa 3×10^4 células en 2,5 ml de DMEM con HEPES 25 mM. La temperatura de las placas de Petri se controló a 34 °C (B16F1) o a 37 °C (todas las demás líneas celulares). Posteriormente se colocaron dos hilos aislados paralelos sobre la parte inferior de la placa distanciados 1 mm a través de los cuales se aplicaban los campos TTF. Todo el montaje se colocó en un microscopio invertido (Eclipse TS-100; Nikon) y se tomaron videomicrofotografías de 200 aumentos con una cámara VCR estándar (Handicam X 320; Sony). Las fotografías se capturaron con un ordenador personal cada 60-120 s durante 6-10 h/cultivo.

Marcado fluorescente de α -tubulina, actina y ADN. Se hicieron crecer células de melanoma de ratón sobre cubreobjetos y se sometieron a la acción de campos TTF durante 24 horas. Después del tratamiento se retiró el medio y se lavaron las células en una solución tampón [ácido 4-morfolinotanosulfónico 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM y glucosa 5 mM (pH 6,1)], se permeabilizaron y se fijaron con Triton X-100 al 0,5% y glutaraldehído al 0,25% (Sigma) durante 5 minutos y luego se fijaron con glutaraldehído al 1% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron las células en PBS y borohidruro sódico 1 mM (Sigma) para eliminar la autofluorescencia. Después se incubaron los cubreobjetos con un clon de anticuerpos primarios para α -tubulina (DMIA; Sigma) durante 30 minutos, se lavaron y se incubaron durante 30 minutos con un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón Alexa Fluor; Molecular Probes). Se añadió faloidina conjugada con rodamina (Sigma) con el anticuerpo secundario para teñir los filamentos de actina. Después se lavaron las células y se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (Molecular Probes) para teñir el ADN. Después de la tinción, los cubreobjetos se montaron y visualizaron con un microscopio de fluorescencia a 630 aumentos y se fotografiaron.

Medición del campo eléctrico. La intensidad del campo eléctrico en el medio de cultivo se midió por medio de una sonda consistente en dos hilos aislados (de 0,25 mm de diámetro) con extremos expuestos separados 0,5 mm, que se sumergieron en el medio de cultivo. Los hilos se conectaron a un amplificador diferencial de alta impedancia de entrada que convertía la amplitud de las ondas en un voltaje fijo calibrado que se registraba digitalmente. En todo el registro, las intensidades del campo se expresan en amplitud máxima de voltaje por centímetro (V/cm). Se tuvo cuidado de eliminar cualquier recogida del campo procedente del exterior del medio de cultivo. También se podría vigilar el campo de modo continuo midiendo la caída de potencial a través de

una resistencia de 100 Ω colocada en serie con uno de los hilos generadores del campo. La caída de voltaje en esta resistencia tenía una correlación lineal con la intensidad del campo ($r = 0,96$). Para comprobar que los montajes experimentales no estaban expuestos a campos magnéticos significativos, se midió la radiación electromagnética en la vecindad inmediata de los cultivos tratados empleando una antena de bucle (EMCO 6507 1 kHz a 30 MHz) conectada a un analizador de espectro (Anritsu 9 kHz a 2,2 GHz). La radiación electromagnética en el intervalo de 100-300 kHz dentro de los incubadores que contenían las placas de cultivo tratadas fue de 10^{-12} Tesla y dentro de las jaulas de animales que contenían ratones tratados con campo TTF, 10^{-14} Tesla, es decir, insignificante.

Simulación por elementos finitos de la distribución del campo eléctrico.

Los cálculos del campo eléctrico dentro de las células se basan en la malla de elementos finitos (11), utilizando una descripción simplificada de la morfología celular (véase la Fig. 7). En todos los cálculos, la constante dieléctrica, tanto del citoplasma como del medio, fue 80, su conductancia fue 0,3 S/m, el diámetro de la célula fue 10 μm y el espesor de la membrana 3 nm (con una constante dieléctrica de 3). Se estableció la distribución espacial de la intensidad del campo eléctrico dentro de la célula teniendo en cuenta la amplitud (1 V/cm), la frecuencia (100 kHz) y la onda (seno) del campo eléctrico aplicado al cultivo de células. La fuerza ejercida por un campo no homogéneo, tal como el creado dentro de las células en un dímero único de tubulina, se calculó considerando la interacción directa entre el campo eléctrico y el dipolo. La fuerza ejercida sobre un orgánulo microscópico polarizable se calculó mediante la siguiente ecuación (12):

$$(F) = 2\pi r^3 \epsilon_m \text{Re}[K(\omega)] \nabla E_{\text{RMS}}^2 \quad (1)$$

donde (F) es el valor esperado del vector de fuerza, Re simbolizaba el componente real de la variable, ∇ es la divergencia de la variable, ϵ_m es la constante dieléctrica del citoplasma, r es la longitud del dímero de tubulina o el radio de la partícula, E_{RMS} es el valor de RMS del campo eléctrico y $K(\omega)$ es el factor de Clausius-Mossotti:

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \quad (2)$$

$$E = E_0 - \frac{e}{W}$$

donde ϵ_p , ϵ_m son las constantes dieléctricas complejas de la partícula y el citoplasma respectivamente, cada una de las cuales se calcula a partir de la constante dieléctrica (E) y la conductancia (e) en función de la frecuencia (ω). $K(\omega)$ en este caso es siempre positivo a las frecuencias relativamente bajas empleadas (es decir, 100 kHz), suponiendo que, a estas frecuencias, $\epsilon_p > \epsilon_m$.

Esto significa que la fuerza que actúa sobre una partícula polarizable siempre actuará en la dirección de la convergencia de las líneas del campo eléctrico. La velocidad terminal de las partículas debida a estas fuerzas se calculó empleando la ley de Stoke.

Montaje del experimento *in vivo*. Se aplicó el tratamiento con campo TIF por medio de pares de hilos aislados paralelos de 1 mm de longitud (diámetro externo, 0,5 mm, espesor del aislamiento, 0,125 mm, Tefzel) colocados intradérmicamente en el dorso de un ratón. Se colocó otro par de hilos idénticos paralelo al primer par en cada ratón, con una separación de 5 mm entre los pares. Se inyectaron inóculos de líneas celulares (4×10^5 células) por vía intradérmica entre los dos miembros de cada par de hilos implantados. Luego se conectó sólo uno de los pares a un amplificador de voltaje para aplicar un tratamiento con campo TTF de 100 kHz a un tumor. El otro par de hilos se dejó desconectado y el tumor que quedaba entre ellos sirvió como control parejo (véase la Fig. 18). Los tumores se midieron empleando un calibrador. El tamaño de los tumores se calculó multiplicando la longitud máxima del tumor por la anchura máxima del tumor. Los experimentos con animales se realizaron siguiendo las directrices del Instituto de tecnología Technion-Israel en cuanto al cuidado de los animales de laboratorio.

RESULTADOS

Efecto de los campos TTF sobre células en cultivo. Se expusieron a campos TTF más de 500 placas de cultivo. El número de células en cada placa de tratamiento se evaluó periódicamente mediante determinaciones colorimétricas (como se describe en "Materiales y métodos"). Dado que en las condiciones de control, la mayoría de las líneas celulares tenían tiempos de duplicación de menos de 24 horas (intervalo de 17-24 horas; excepto en el caso de PC-3 en las que el tiempo de duplicación fue de 73 h), la duración del tratamiento fue de al menos 24 horas. La exposición comenzó 24 horas después de la siembra y se continuó hasta 72 h. En todas las líneas celulares examinadas, la exposición de 24 horas a los campos TTF a 100 kHz (a una intensidad de 1,0-1,4 V/cm) provocó una inhibición significativa de la proliferación celular (intervalo TER, 0,14-0,96; $P < 0,05$; Fig. 1C). Este efecto duró más que el tiempo de exposición de las células a los campos TTF. De hecho, en algunos experimentos (por ejemplo en el melanoma maligno), el crecimiento del cultivo se detuvo durante un período de hasta 72 horas después de finalizar la exposición al campo TTF (Fig. 2A).

A continuación comprobamos si los cultivos y tejidos sin replicación resultaban afectados por los campos TIF. Cultivos de BHK se mantuvieron en condiciones de bajo contenido en suero (FCS al 0,1%) para disminuir su velocidad de replicación. Estos cultivos se expusieron luego a campos TTF de 100 kHz (a una intensidad de 1,2 V/cm) durante 24 horas. No se observaron diferencias significativas en el número de células entre los cultivos de control y los tratados con campo TTF en estas condiciones ($P = 0,97$). Después de devolver estos cultivos a medios normales (FCS al 10%), se reanudó la replicación normal tanto en los cultivos expuestos a campos TTF como en los de control. También

comprobamos el efecto del tratamiento con campo TTF en el número de células viables en tejidos sin replicación extirpados de ratas. Cuatro segmentos de mesenterio de rata y cuatro segmentos de diafragma de rata se expusieron a campos TTF de 100 kHz a una intensidad de 1,2 V/cm durante 24 horas. No se observaron diferencias entre el número de células viables en los tipos de tejidos tratados en comparación con los tejidos de control (mesenterio, $P = 0,3$; diafragma, $P = 0,54$).

Para estudiar la relación entre la intensidad del campo TTF y la inhibición de la proliferación celular, se expusieron líneas celulares de melanoma de ratón (B16F1) y glioma de rata (F-98) a campos TTF de diferentes intensidades de entre 1 y 2,5 V/cm. El efecto inhibitorio de los campos TTF sobre la proliferación celular se incrementaba a medida que aumentaba la intensidad (Fig. 28) hasta conseguirse una detención total de la proliferación a intensidades de 1,4 y 2,25 V/cm en las células de melanoma y glioma respectivamente.

Es de esperar que los efectos de los campos TTF sean dependientes de la frecuencia dada la dependencia de la impedancia eléctrica de la membrana con la frecuencia (debido a la capacitancia de la membrana celular). Estos cambios en la impedancia hacen que la fracción de campo que penetra en las células sea función de la frecuencia. Por consiguiente, estudiamos la dependencia de la frecuencia del efecto inhibitorio de los campos TTF sobre la tasa de crecimiento de células cultivadas de melanoma (B16F1) y glioma (F-98). La comparación entre la eficacia de los campos TTF a diferentes frecuencias se realizó normalizando la TER para la intensidad del campo eléctrico. Como se puede ver en la Fig. 2C, el efecto inhibitorio de los campos TTF era dependiente de la frecuencia. Es interesante destacar que la frecuencia a la que se consiguió la máxima inhibición fue diferente para los distintos tipos de células (120 kHz frente a 200 kHz para melanoma y glioma respectivamente).

Efectos de los campos TTF sobre procesos celulares y moleculares en células en proliferación. Para entender mejor los procesos celulares por los que los campos TTF afectan a la proliferación celular, se hicieron microfotografías a intervalos mientras se estaban aplicando los campos TTF a cultivos de melanoma de ratón (véase "Materiales y métodos"). Varios procesos únicos se hicieron evidentes en la microfotografía a intervalos de los cultivos tratados con campos TTF. El fenómeno más destacado fue la prolongación de la mitosis. En las células tratadas, la mitosis parecía comenzar normalmente, pero se prolongaba durante períodos de tiempo variables antes de terminarse la escisión en dos células hijas. La Fig. 3A muestra una mitosis típica en una célula tratada con campos TTF. Como se ve en la célula tratada, la mitosis no se terminó en 3 horas. Debido a esta detención de la proliferación, en cultivos tratados, la mitosis duraba como promedio 124 ± 91 minutos (media \pm DE, $n = 53$; intervalo, 40-541 min), mientras que en las condiciones de control, la duración promedio de la mitosis fue de 62 ± 8 min desde la redondez de la célula hasta la citocinesis (media \pm DE, $n = 12$; intervalo, 47-78 min). Esta prolongación es estadísticamente significativa ($P < 0,01$, test U de Mann-Whitney).

El segundo fenómeno importante, observado en los cultivos de melanoma tratados con campos TTF fue que una cuarta parte de las células que experimentaban la mitosis eran destruidas cuando la formación del surco de escisión se acercaba a la separación celular completa. Durante este proceso, la membrana celular se rompía y se formaban muchas pequeñas vesículas de membrana, de modo similar a la muerte celular apoptótica después de la mitosis (13). En la Fig. 3 B Y C se muestran ejemplos de células en el proceso de sufrir dicha destrucción. Los efectos destructivos se observaron sólo en células mitóticas, mientras que las células inactivas permanecían intactas tanto morfológica como funcionalmente.

El tercer fenómeno, observado únicamente en cultivos tratados con campos TTF, fue la rotación nuclear. En las fases precoces de la mitosis, después de producirse la redondez celular, se pueden observar los núcleos rotando dentro de la célula. Una rotación completa duraba como promedio 15 minutos. Este efecto se asemeja a la rotación de la célula entera previamente descrito durante la exposición a campos eléctricos alternos de frecuencia intermedia (7, 8).

Una característica fundamental de los campos eléctricos es que en cualquier punto del espacio tienen una orientación definida correspondiente a la dirección de la fuerza que ejercen sobre cargas y elementos polares. Con respecto a estos últimos, la fuerza ejercida por el campo es máxima cuando el dipolo está orientado en la dirección del campo. Con respecto a lo anterior hay dos diferencias estructurales principales entre las células inactivas y en división. Una es que las últimas contienen microtúbulos sumamente polares y orientados espacialmente y que desarrollan una morfología celular direccional en forma de reloj de arena durante la fase de citocinesis. A la vista de estos hechos, se podría esperar que las fuerzas del campo eléctrico tuvieran un efecto máximo sobre el proceso mitótico cuando está orientado a lo largo de las líneas de fuerza del campo. Para investigar este punto fijamos cultivos de células de melanoma y las teñimos con azul de toluidina inmediatamente después de las 24 horas de tratamiento con el campo TTF, para demostrar las mitosis y distinguir las células vitales de las dañadas o muertas. Las células mitóticas vivas y dañadas (en el momento de la fijación) estaban agrupadas según la orientación de su eje de escisión con respecto a la dirección del campo eléctrico. Se contaron las células por separado en cada uno de cuatro sectores iguales formando ángulos de 0° , 45° (dos sectores, 45° y 135°) y 90° con respecto a la dirección del campo. Como se puede ver en la Fig. 4A, las células vivas estaban distribuidas al azar en todos los sectores. En cambio, una proporción mucho más elevada de las células dañadas tenían su eje de división orientado a lo largo del campo: 56% a 0° frente a un promedio del 15% en cada una de las otras orientaciones. Sorprendentemente, el número de células por unidad de superficie en los dos sectores de 45° eran la mitad de las del sector de 0° . Este hecho puede servir de indicación de un efecto adicional de los campos TTF: orientación de la división celular en la dirección del campo. Las células de cada uno de los grupos orientados espacialmente anteriormente definidos se dividieron luego atendiendo a las fases de la mitosis en el momento de la fijación. En todas las fases, una mayor proporción de células dañadas tenían su eje de división orientado a lo largo del campo. Además, el

74% de las células orientadas en paralelo resultaban dañadas mientras se encontraban en metafase (Fig. 4B).

El huso mitótico organizado espacialmente, que se forma en las células en división, consta de microtúbulos que tienen momentos dipolares eléctricos muy grandes (14) y por eso se pueden desorientar por las fuerzas de campos eléctricos (15, 16). Los filamentos de actina también son polares, sin embargo, no tienen una orientación espacial definida dentro de las células y por esa razón no se espera que resulten significativamente afectados por los campos. Esto nos impulsó a estudiar si los campos TTF interrumpían la mitosis interfiriendo con la formación, orientación y movimiento normal de los microtúbulos en comparación con los filamentos de actina de la manera siguiente: se trataron cultivos de células de melanoma con campos TTF durante 24 horas. Después del tratamiento, las células se fijaron, se tiñeron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los microtúbulos y los filamentos de actina, así como para el ADN y después se estudiaron por microscopía de fluorescencia (véase "Materiales y métodos"). En los cultivos de control, el 95% de las células que estaban experimentando la mitosis presentaban las fases normales de mitosis con husos mitóticos intactos. Sin embargo, en los cultivos tratados con campo TTF, más de la mitad de las mitosis eran anormales.

La Fig. 5 muestra ejemplos de diferentes formas de mitosis anormal observados con un tratamiento de campos TTF. Entre dichos ejemplos se incluían células polipoides en profase, células mal separadas, de huso múltiple y de huso único en metafase, anafases asimétricas, y una gran proporción de células en metafase (>20%) con grupos de cromosomas en forma de rosetón. En la Fig. 5G se resumen y se comparan las etapas normales y anormales de la mitosis en cultivos de control y tratados con campos TTF. En general, estas anomalías pueden servir como una indicación de interferencia de campos TTF con el comportamiento normal de los microtúbulos. En cambio, la coloración para filamentos de actina no mostró ninguna diferencia entre cultivos tratados con campos TTF y cultivos de control.

Efecto de campos TTF en tumores *in vivo*. Para comprobar si los campos TTF son eficaces a la hora de destruir células tumorales *in vivo*, probamos su efecto en dos modelos animales de tumores: ratones C57BL/6 inoculados intradérmicamente con células de melanoma maligno (B16F1) y ratones BALB/c inoculados intradérmicamente con células de adenocarcinoma (CT-26). Se generaron campos TTF entre hilos implantados (intradérmicos) totalmente aislados a ambos lados del tumor (véase la Fig. 1B). Los ratones con electrodos implantados fueron tratados durante 3 - 6 días de forma continua, comenzando 1 día después de la inoculación de la línea celular. Descubrimos que 100-200 kHz de campos TTF a bajas intensidades de <2 V/cm inhibían de forma eficaz el crecimiento del melanoma maligno en comparación con el crecimiento de tumores de control no tratados. En la Fig. 6 se proporcionan fotografías de ejemplos de tumores de melanoma maligno tratados y no tratados para su comparación. Los tumores tratados eran significativamente más pequeños que los tumores de control al final del tratamiento (el tamaño medio del tumor tratado fue un 47% del tamaño del tumor de control; $n = 78$ ratones, $P < 0,0001$; prueba t de Student). Un análisis histopatológico de tumores tratados mostró una amplia necrosis con agregaciones de restos

cariorréticos y cariollticos (Fig. 6F). Para probar si los campos TTF son eficaces en diferentes tipos de tumor, se trataron ratones BALB/c con adenocarcinomas intradérmicos con los mismos parámetros de campo. En la Fig. 68 se proporcionan fotografías de ejemplos de dichos tumores de adenocarcinoma tratados y no tratados para su comparación. El efecto medio de los campos TTF en los ratones con adenocarcinoma fue menos drástico que el observado para el melanoma maligno (el tamaño medio del tumor tratado fue un 73% del tamaño del tumor de control al final del tratamiento; n = 14 ratones). Después del tratamiento, los tumores y sus tejidos adyacentes se fijaron, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se analizaron histopatológicamente. No se detectó ningún daño en los tejidos cercanos.

COMENTARIO

En este estudio hemos mostrado que, cuando se ajustan apropiadamente, los campos eléctricos de muy baja intensidad y de frecuencia intermedia (campos TTF) detienen el crecimiento de células cancerosas. Hemos demostrado este efecto inhibitorio en todos los tipos de células en proliferación probados, mientras que las células y tejidos no proliferantes no se vieron afectados. De manera interesante, diferentes tipos de células cancerosas mostraron una intensidad específica y dependencias de frecuencia de inhibición de campos TTF. Hemos demostrado que a nivel celular se producen dos procesos principales durante la exposición a campos TTF: la detención de la proliferación y la destrucción celular. Se mostró que el daño causado por campos TTF a estas células en replicación depende de la orientación del proceso de división en relación con los vectores de campo, lo que indica que este efecto es no térmico. De hecho, las mediciones de temperatura realizadas en las placas de cultivo durante el tratamiento y en la piel sobre tumores tratados *in vivo*, no mostraron ningún aumento significativo de temperatura en comparación con cultivos/ratones de control. Del mismo modo, los campos TTF hicieron que las células en división se orientaran en la dirección del campo aplicado de un modo similar al descrito en células epiteliales cultivadas de la córnea humana expuestas a campos eléctricos constantes (17). A nivel subcelular, hemos encontrado pruebas que indican que los campos TTF interrumpen el proceso normal de polimerización-despolimerización de los microtúbulos durante la mitosis. De hecho, las configuraciones mitóticas anormales descritas observadas tras una exposición a campos TTF son similares a las anomalías morfológicas observadas en células tratadas con agentes que interfieren directa (18, 19) o indirectamente (20-22) con la polimerización microtubular (p. ej. Taxol).

Para explicar cómo los campos TTF causan un daño dependiente de la orientación a las células cancerosas en división e interrumpen la formación adecuada del huso mitótico, modelamos las fuerzas ejercidas por campos TTF en cargas intracelulares y partículas polares utilizando simulaciones de elementos finitos (véase "Materiales y métodos". Identificamos dos mecanismos principales mediante los cuales los campos eléctricos pueden afectar a las células en división. El primero hace referencia al efecto de campo en la orientación macromolecular polar. Dentro de este marco, durante las

fases tempranas de mitosis, es decir, en la pre-te lofase, cuando la polimerización-despolimerización de la tubulina impulsa el proceso de proliferación, el campo eléctrico obliga a cualquier dímero de tubulina colocado a más de 14 nm del extremo creciente de un microtúbulo a orientarse en la dirección del campo (Fig. 7A). Este momento de fuerza (10^{-5} pN) que actúa sobre los dímeros es suficiente para interferir con el proceso adecuado de montaje y desmontaje de los microtúbulos, que resulta esencial para la alineación y separación de los cromosomas (23). Este efecto puede explicar la detención mitótica de las células tratadas con campos TTF (24). El segundo mecanismo, que interfiere con la división celular y lo más probable es que desempeñe un papel importante en la destrucción celular, se vuelve dominante durante la escisión. Como se observa en las simulaciones representadas en la Fig. 7B, el campo eléctrico dentro de las células inactivas es homogéneo, mientras que el campo dentro de las células mitóticas durante la citocinesis no es homogéneo. Observamos una mayor concentración de línea de campo (lo que indica una mayor intensidad de campo) en el surco, un fenómeno que se parece mucho al enfoque de un rayo de luz por parte de una lente. Esta inhomogeneidad en la intensidad de campo ejerce una fuerza eléctrica unidireccional en todas las entidades intracelulares cargadas y polares, arrastrándolas hacia el surco (sin tener en cuenta la polaridad de campo). Por ejemplo, para un surco de escisión que alcanza un diámetro de 1 μm en un campo externo de tan sólo 1 V/cm, la fuerza ejercida en los microtúbulos se encuentra en torno a 5 pN. Esta magnitud es compatible con las fuerzas mencionadas necesarias para paralizar la polimerización microtubular, que son de 4,3 pN (25). Con respecto a otras partículas, como los organelos citoplasmáticos, son polarizados por el campo dentro de las células en división. Una vez polarizadas, las fuerzas que actúan sobre estas partículas pueden alcanzar valores de hasta aproximadamente 60 pN, lo que da como resultado su movimiento hacia el surco a velocidades que puede aproximarse a 0,03 $\mu\text{m/s}$. A dicha velocidad, los organelos citoplasmáticos se acumularían en el surco de escisión en unos pocos minutos, interfiriendo con la citocinesis y posiblemente dando lugar a la destrucción celular. También descubrimos que las fuerzas eléctricas que actúan sobre las partículas intracelulares son máximas cuando el eje de división está alineado con el campo externo. Esto es coherente con la dependencia del efecto destructivo de campos TTF en el ángulo entre el eje de división y el campo (Fig. 4). Además, la dependencia calculada de la magnitud de esta fuerza sobre la frecuencia (datos no mostrados) es coherente con la dependencia de frecuencia determinada de forma experimental del efecto inhibitorio de campos TTF sobre la proliferación celular de melanoma y glioma (Fig. 2C).

Como conclusión, hemos demostrado que los campos TTF inhiben tanto la proliferación de células malignas en cultivo como el crecimiento de tumores en ratones, al mismo tiempo que no muestran efectos secundarios generales o daño histopatológico local. El mecanismo de acción de los campos depende, al menos en parte, de la interrupción de los microtúbulos del huso mitótico y las fuerzas eléctricas resultantes del enfoque del campo en las células en división. Los efectos muy específicos de estos campos sobre las células en división, junto con el caso relativo de aplicarlos, enfocarlos y monitorizar a partir de

ellos, los convierte en un atractivo candidato para servir como una nueva modalidad de tratamiento del cáncer.

•