

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**  
**Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado**  
**Grupo de Electroterapia. Departamento de Investigaciones**

**VOLUMEN TUMORAL Y DENSIDAD DE CORRIENTE ELÉCTRICA  
GENERADA POR UN SISTEMA DE ARREGLOS DE ELECTRODOS  
CON CORRIENTE ELÉCTRICA DIRECTA:  
ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Héctor Manuel Camué Ciria

Tutores: Dr.C. Luis Enrique Bergues Cabrales  
Dr.Sc. Victoriano Gustavo Sierra González  
Dr.C. Carla Holandino Quaresma

**Santiago de Cuba**  
**2010**

# **PENSAMIENTO**

“Las grandes obras no son hechas con la fuerza, sino con la perseverancia”.

Samuel Jhonson.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecerle a mis padres Héctor Camué y Carmen Ciria, por permitirme nacer, por todo su amor, comprensión y apoyo durante todos estos años de mi vida.

A mi hermana Mumusita por todas sus preocupaciones conmigo.

A mi esposa por haber permanecido siempre junto a mí, apoyándome y ayudándome.

Mi hijo Manuel Alejandro por llenarme de alegría y ocurrencias el alma.

A mi tutor Dr.C. Luis Enrique Bergues Cabrales, que más que eso es mi amigo incondicional, gracias por todo su apoyo, sus consejos y por haber contribuido en mi crecimiento profesional.

Al Dr.C. Victoriano Gustavo Sierra González, mi otro tutor, por su confianza en nuestro trabajo, por toda su ayuda y sus valiosos aportes, sin los que hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A la Dr.C. Carla Holandino Quaresma por haber compartido conmigo su casa y su laboratorio.

Al Dr. José Luis García Cuevas por su confianza y apoyo total al grupo de investigación.

A todos los integrantes del Grupo de Electroterapia por su apoyo y confianza. Gracias por estar con nosotros todos estos años.

A Andrés Ramírez, Javier González y Emilio Suárez por el apoyo y ayuda desinteresada.

A la familia De los Reyes-Ferrer, porque a pesar de haber llegado hace poco tiempo a mi vida, es como si los conociera desde siempre. Les agradezco haberme brindado su hogar y hacerme sentir como parte de la familia.

A Cary por toda su ayuda, no me alcanzarían las palabras para expresarle cuanto le agradezco su apoyo en el último tramo de este largo camino.

A mi amiga Gema por brindarme su amistad siempre y seguir recordándome a pesar de estar tan lejos.

A la familias Silva-Girón y González-Gómez por nuestra amistad de muchos años.

A todos mis compañeros de trabajo del CNEA. A los que están y a los que, por una razón u otra, ya no están con nosotros.

Al Instituto Finlay por todo su apoyo y acogida a los miembros del grupo de investigación.

A todos los profesores del Dpto. de Biología de la Universidad de Oriente que de una forma u otra contribuyeron a mi formación como estudiante y profesional.

A los Drs. Kalet León y Fidel Gilart por sus valiosos comentarios.

Gracias a todos aquellos que a pesar de que su nombre no está aquí, no dejan de ser importantes para mi, al contrario siempre tendrán un espacio en mi corazón.

Héctor Camué Ciria.

# DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis queridos padres que han sido mi mayor inspiración.

A mi adorada hermana, por estar atenta a cada uno de mis pasos.

A mi esposa por su comprensión, preocupación y paciencia conmigo.

A mi hijo Alejandro por haber cambiado mi vida.

A mi amigo y tutor Luis por ser mi mejor ejemplo a seguir como profesional, esperar siempre lo mejor de mi y brindarme su amistad.

A Cary por sus consejos y preocupación, por demostrarme que hay que ser valiente siempre.

A Gema por su amistad de siempre.

Héctor Camué Ciria

## Abreviaturas empleadas en la tesis

CED:	Corriente eléctrica directa
CG1:	Grupo control (tumor de Ehrlich)
CG2:	Grupo control (tumor Fibrosarcoma Sa-37)
MPRESS:	Suma de cuadrados del error residual múltiple pronosticado
PRESS:	Suma de cuadrados del error residual pronosticado
PT <sub>1</sub> :	Fase de transición entre las fases de células tumorales en suspensión y tumor sólido.
PT <sub>2</sub> :	Fase de transición entre el tumor sólido activo y el tumor destruido completamente.
REG-I:	Parte de la cinética de crecimiento tumoral antes del tratamiento con corriente eléctrica directa.
REG-II:	Parte de la cinética de crecimiento tumoral después del tratamiento con corriente eléctrica directa.
REG-IIa y REG-IIb:	Subregiones de REG-II para TG2.
REG-IIc y REG-IId:	Subregiones de REG-II para TG3.
SE:	Error estándar
SSE:	Suma del cuadrado de los errores
SI:	Primera etapa en la cinética de crecimiento tumoral del grupo control.
SII:	Segunda etapa en la cinética de crecimiento tumoral del grupo control.
SIII:	Tercera etapa en la cinética de crecimiento tumoral del grupo control.
TD:	Tiempo de doblaje promedio del volumen tumoral.
TG1-1:	Grupo tratado con 6,7 mA durante 45 min (tumor de Ehrlich).
TG1-2:	Grupo tratado con 11,7 mA durante 45 min (tumor de Ehrlich).
TG1-3:	Grupo tratado con 17,0 mA durante 45 min (tumor de Ehrlich).
TG2-1:	Grupo tratado con 6,7 mA durante 45 min (tumor Fibrosarcoma Sa-37).
TG2-2:	Grupo tratado con 11,7 mA durante 45 min (tumor Fibrosarcoma Sa-37).

TG2-3:	Grupo tratado con 14,8 mA durante 45 min (tumor Fibrosarcoma Sa-37).
$t_{ob}$ :	Tiempo para el cual es observado $V_{ob}$ .
$\Delta t$ :	Intervalo de tiempo.
$V_o$ :	Volumen inicial para el cual es aplicada la DEC.
$V_{ob}$ :	Primer valor no cero del volumen tumoral.
$V_m$ :	Volumen tumoral más pequeño, medible.
$V_f$ :	Volumen final de la cinética de crecimiento tumoral.
$V_i$ :	Punto de inflexión en la cinética de crecimiento tumoral.
$V_s$ :	Volumen tumoral que separa SI y SII.
$V_{ic}$ :	Volumen tumoral que separa SII y SIII.
$V_{min-abs}$ :	Volumen tumoral para el cual FDTV alcanza su valor mínimo.
$V_{c1}$ :	Volumen crítico para el cual ocurre $PT_1$ .
$V_{c2}$ :	Volumen crítico para el cual ocurre $PT_2$ .

## *Síntesis*

### **Síntesis**

El cáncer es un serio problema científico y de salud, para el cual se usan terapias convencionales y alternativas. La electroterapia con corriente eléctrica directa de baja intensidad se encuentra entre estas últimas. En esta Tesis se estudia, de forma experimental y/o teórica, los comportamientos del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que se genera por un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y eléctricos. Para esto, se realiza un experimento en el que se evalúa la influencia de la intensidad de la corriente eléctrica directa en las cinéticas de crecimiento de los tumores experimentales de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 en ratones BALB/c. Se propone una modificación a la ecuación de Gompertz convencional, que se denomina Ecuación de Gompertz Modificada, para describir las cinéticas de crecimiento de los tumores no tratados y tratados después de la aplicación de la electroterapia. También, se propone un modelo matemático para visualizar las distribuciones de potenciales, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica, generadas por un sistema de arreglos de electrodos. Los resultados de esta Tesis demuestran que: 1) Existe un umbral de corriente eléctrica directa por cada tipo de tumor (Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37) a partir del cual ocurre su remisión completa. También, el porcentaje de regresión de estos tumores y la supervivencia de los ratones BALB/c se incrementan con el aumento de la intensidad de corriente eléctrica directa. 2) La Ecuación de Gompertz Modificada es factible para describir y revelar nuevas informaciones de las cinéticas de crecimiento de los tumores no tratados y tratados con corriente eléctrica directa (después de la aplicación de esta). 3) La aproximación matemática predice en cierta aproximación cómo dependen las distribuciones de potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica en función de la forma y tamaño del arreglo de electrodos, posicionamiento y polaridad de estos, y de las diferencias de conductividades entre el tumor y su tejido sano circundante, hecho que permite discernir acerca del lugar más conveniente para colocar los electrodos durante la terapia. La descripción de los comportamientos del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que genera un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y/o eléctricos permitirá iniciar la estandarización de esta terapia experimental.

# ÍNDICE

	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	<b>CAPÍTULO 1: ASPECTOS TEÓRICOS</b>	<b>7</b>
1.1	Cinética de crecimiento de los tumores malignos	7
1.2	Uso terapéutico de la corriente eléctrica directa en la medicina y el cáncer: antecedentes históricos	10
	1.2.1 Estudios <i>in vitro</i>	11
	1.2.2 Estudios en animales	12
	1.2.3 Estudios clínicos	15
1.3	Simulación matemática y su importancia en la planificación terapéutica	18
	1.3.1 Modelación matemática en el tema de electroterapia y cáncer	20
1.4	Problemáticas existentes	23
	<b>CAPÍTULO 2: MÉTODOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS</b>	<b>24</b>
2.1	Características generales de la investigación	24
2.2	Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 tratados con diferentes intensidades de la corriente eléctrica directa	25
	2.2.1 Réplicas de la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 tratado con diferentes intensidades de corriente eléctrica directa	28
2.3	Modificación de la ecuación de Gompertz convencional	28
2.4	Modelación de las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos	34
	2.4.1 Un medio de conductividad constante (tumor plano)	34
	2.4.1.1 Solución analítica	35
	2.4.1.2 Solución numérica	39
	2.4.2 Dos medios (tumor plano y el tejido sano circundante)	40
	2.4.2.1 Criterios para la diferenciación entre las distribuciones de densidad de corriente eléctrica	43
	2.4.2.2 Diferenciación de las distribuciones $J^0(x,y)$ y $J^1(x,y)$	43
	2.4.2.3 Influencia de la relación $\sigma_1/\sigma_2$ sobre la distribución de la densidad de corriente eléctrica	44
	2.4.2.4 Influencia del posicionamiento del arreglo de electrodos, respecto a $\Gamma_{21}$ , sobre la distribución de la densidad de corriente eléctrica	44
	<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
3.1	Resultados	46
	3.1.1 Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 tratados con diferentes intensidades de la corriente eléctrica directa	46
	3.1.2 Modificación de la ecuación de Gompertz convencional	48
	3.1.3 Modelación y visualización de las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos	57
	3.1.3.1 Un medio de conductividad constante (tumor plano)	57
	3.1.3.2 Dos medios (tumor plano y su tejido sano circundante)	60
3.2	Discusión de los resultados	64
	3.2.1 Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 después de la aplicación de diferentes intensidades de corriente eléctrica directa	64
	3.2.2 Modificación de la ecuación de Gompertz convencional	71
	3.2.3 Distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generados por un arreglo elíptico de electrodos	83
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>92</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>93</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>114</b>

## **INTRODUCCIÓN**

El cáncer se define como un conglomerado de células con autonomía, denominado tumor, que crece de modo incontrolado, e invade tejidos vecinos y alejados, lo cual causa grandes daños al organismo en el que se desarrolla [1]. La carcinogénesis es el proceso que explica la formación del cáncer a partir de una célula normal [1, 2-5].

Esta enfermedad es la segunda causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y se le atribuyen 7,9 millones de defunciones (aproximadamente el 23 % del total de muertes en el mundo) ocurridas en el año 2007, según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud [6] y la Unión Internacional contra el Cáncer [7]. Estos organismos internacionales preveen que en el año 2020 el número de casos nuevos y de defunciones aumenten a 16 y 10 millones, respectivamente. En Cuba, el cáncer constituye el 23,9 % del total de defunciones y en Santiago de Cuba el 22,7 % [8], lo que la ubica como la primera causa de mortalidad en nueve de las catorce provincias del país y el municipio especial Isla de la Juventud. Estos datos indican la grave situación epidemiológica de esta enfermedad como problema social, su insuficiente conocimiento, y la necesidad de procedimientos terapéuticos y actitudes diferentes para mejorar la sobrevida y calidad de vida del paciente con cáncer.

Las terapias convencionales para el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia [1], las cuales son costosas, invasivas, inducen efectos adversos graves en el organismo y no han dado solución completa a la cura del cáncer, a pesar de sus éxitos. En la actualidad se desarrollan diferentes procedimientos terapéuticos alternativos para esta enfermedad, los cuales trabajan a menudo como adyuvantes a los tradicionales. Entre estos pueden mencionarse: las terapias génica [9] y antiangiogénica [10], vacunas anticáncer [11], tratamiento con megadosis de ácido ascórbico [12], hipertermia [13], electroquimioterapia [14] y electroterapia o terapia electroquímica [15, 16]. La electroterapia consiste en la aplicación de una corriente eléctrica directa de baja intensidad (CED), a través de dos o más electrodos que se insertan en el interior del tumor y/o en su vecindad [15-18].

La electroterapia tiene cuatro formas de aplicación: 1) la terapia anódico-catódica (los ánodos y cátodos se insertan en el interior del tumor), 2) la terapia de campo (ánodos y cátodos se insertan en el tejido sano a una distancia de 8 a 10 mm del borde del tumor), 3) la terapia anódica (los ánodos se insertan en el interior del tumor y los cátodos en el tejido sano) y 4) la

terapia catódica (los cátodos se insertan en el interior del tumor y los ánodos en el tejido sano) [15-18].

En 1776, Eason propone por primera vez que la electricidad puede tener un papel importante en el tratamiento del cáncer [19]. En la década del 60-70, Schauble y Habal establecen los primeros fundamentos científicos y tecnológicos de la electroterapia en el cáncer [20]. En 1978, Nordenström aplica por primera vez la electroterapia en pacientes con cáncer de pulmón [21]. A partir de estos estudios, se observa un número creciente de investigaciones experimentales (*in vitro*, *in vivo* y clínicos) y teóricas (modelaciones matemáticas) [17, 22, 23]. Xin y cols. [18] reportan la experiencia en el tratamiento de tumores benignos y malignos con CED en más de 20 000 pacientes, en China. Los resultados de este trabajo son notables, pero con insuficientes avances en lo referente a fundamentos, mecanismos y estandarización del procedimiento terapéutico.

Los estudios *in vitro* demuestran que el tratamiento anódico induce apoptosis y el tratamiento catódico produce lisis celular [24, 25]; las alteraciones en las estructuras celulares varían en dependencia del tiempo de duración de la terapia y la polaridad de los electrodos [26]; el medio alrededor del cátodo es básico mientras que alrededor del ánodo es ácido [27]; la apoptosis se inicia por la generación de especies reactivas del oxígeno inducidas por la CED [28].

Los estudios *in vivo* evidencian la ocurrencia de diferentes alteraciones bioquímicas alrededor del ánodo y del cátodo [29]; presencia de necrosis en el área tratada [30]; variación de la toxicidad celular en dependencia de la distancia entre los electrodos y la polaridad [31]; incremento de la destrucción tumoral y disminución de los daños en el organismo, cuando los electrodos se insertan en la base del tumor, en secuencia de ánodos y cátodos [32]; diferencia de sensibilidad de los diferentes tipos de tumores, a la CED [33]; presencia de apoptosis y necrosis alrededor del ánodo, y solo necrosis alrededor del cátodo [34]. Resultados similares se reportan en estudios clínicos en tumores malignos superficiales y viscerales [35, 36]. Los estudios *in vitro* e *in vivo* (animales y humanos) demuestran que la electroterapia es segura, efectiva, poco traumática, de bajo costo, con efectos colaterales mínimos y compatible con otros procedimientos terapéuticos. También, esta terapia experimental se emplea cuando los métodos convencionales fracasan o no pueden aplicarse debido al bajo estado de validez física

del paciente [35, 36]. Es importante destacar que la electroterapia generalmente se aplica una sola vez.

Estas investigaciones se han encaminado fundamentalmente a la evaluación de la efectividad antitumoral de la CED y de los efectos adversos que se inducen en el organismo por la acción citotóxica de esta; así como a la explicación de sus posibles mecanismos de acción antitumoral. Sus resultados demuestran que el efecto antitumoral de la CED depende de la posición de los electrodos y la carga eléctrica que se aplica [37], y este se potencia cuando la CED se combina con otras opciones terapéuticas como la quimioterapia [38], inmunoterapia (por ejemplo, TNF- $\alpha$ ) [39], radioterapia [40], hipertermia [41], láser [42], ultrasonido [43] y soluciones salinas [44].

La muerte celular que se observa en el tumor tratado con CED se debe a la inducción de apoptosis y/o necrosis en este [45, 46]. La misma se ha intentado explicar a partir de diferentes mecanismos antitumorales de la CED, tales como: inducción de fuerzas bioeléctricas en el tumor [17, 20]; cambios en el potencial bioeléctrico [47]; cambios en el pH y la temperatura del tumor [48, 49]; cambios en el potencial transmembrana de las células tumorales [50, 51]; ionización del tejido tumoral [52]; producción de sustancias tóxicas provenientes de las reacciones electroquímicas [22]; deposición del material del electrodo en el tumor [53]; estimulación del sistema inmune [54]; extracción de agua del tejido por electro-ósmosis [22, 48]; y las reacciones electroquímicas (fundamentalmente aquellas que involucran a las especies reactivas del oxígeno) y la estimulación del sistema inmune [17].

Estos posibles mecanismos antitumorales de la CED se proponen a partir de las diferentes condiciones experimentales que establecen cada autor. En cada uno de estos estudios, se reporta el uso de una dosis de CED, un tiempo de exposición y una configuración específica de electrodos. En los estudios que reportan el uso de más de una intensidad y tiempo de exposición de la CED, y la combinación de esta con otros procedimientos terapéuticos, generalmente, no se observa la remisión completa en todos los tumores, salvo en un número pequeño de animales.

Lo antes expuesto sugiere que no existe un consenso en cuanto al uso de los parámetros que se emplean para la aplicación de la terapia ni los mismos se han optimizado. El establecimiento de estos parámetros óptimos mediante la realización de experimentos resulta costoso en tiempo y recursos materiales. Una vía que permite proponer, en minutos u horas,

configuraciones de arreglos de electrodos y dosis de CED óptimos, o los más cercanos a estos, son las modelaciones matemáticas.

En la Oncología, los modelos matemáticos se usan en la simulación de: la cinética de crecimiento de los tumores [55, 56], el crecimiento espacial y temporal de la fase avascular del tumor [57, 58], la interacción y competencia del tumor con el sistema inmune [58, 59], entre otros. Los modelos Logístico, Richards, Weibull, Bertalanffy y Gompertz se aplican para describir la cinética de crecimiento tumoral, siendo este último el que más se emplea [55, 56].

En el campo de la electroterapia, las modelaciones matemáticas están encaminadas a explicar diferentes procesos que se inducen en el tumor después que se aplica la CED, tales como: cambios de pH [23]; reacciones físico-químicas alrededor de los electrodos [60], disipación de potencia en el tumor después de aplicada la CED [61]. También, en este campo, las modelaciones se emplean para describir las cinéticas de los tumores tratados después de la aplicación de la CED [17, 62] y diseñar configuraciones de electrodos [63]. Ninguno de estos modelos relaciona los parámetros eléctricos de la electroterapia con los cinéticos del tumor. Tampoco abordan las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica en función de las diferencias de conductividades y permitividades existentes entre el tumor y el tejido sano circundante y de los parámetros del arreglo de electrodos (posicionamiento, número y polaridad de los electrodos, tamaño y geometría) que permita la máxima destrucción del tumor con el mínimo daño al organismo.

Lo antes mencionado sugiere que a pesar de los resultados promisorios de la electroterapia en tumores malignos y benignos, existen dos razones fundamentales que impiden que esta se establezca en la Oncología clínica como un procedimiento terapéutico oncoespecífico más: 1) el pobre entendimiento del mecanismo de acción antitumoral de la CED; y 2) la falta de estandarización de la terapia por tipo de tumor, tamaño y estadio. Esta última razón se debe a que no se ha establecido el rango de dosis de CED ni el arreglo de electrodos óptimo que permitan lograr la máxima destrucción del tumor con el mínimo daño al organismo. Estas problemáticas sugieren que se hace necesario proponer experimentos y modelos matemáticos que aborden estas problemáticas.

### **Problema científico**

¿Cuáles son los comportamientos, de forma experimental y/o teórica, del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que se genera por un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y eléctricos de manera tal que se pueda iniciar la estandarización de esta terapia experimental?

### **Hipótesis**

La descripción de los comportamientos del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que genera un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y/o eléctricos permitiría iniciar la estandarización de esta terapia experimental.

### **Objetivo general**

Estudiar, de forma experimental y/o teórica, los comportamientos del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que se genera un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y eléctricos.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la influencia de la corriente eléctrica directa en las cinéticas de crecimiento de los tumores malignos de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, en ratones BALB/c, después de la aplicación de la misma.
2. Proponer una modificación al modelo de Gompertz convencional para el ajuste de los datos experimentales de la cinética de crecimiento de los tumores malignos de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 después de la aplicación de la corriente eléctrica directa.
3. Modelar las distribuciones de potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica, generadas por un arreglo elíptico de electrodos, en el tumor y el tejido sano circundante, visualizándola mediante el uso de un programa de cálculo.

**Novedad científica del tema y aportes del autor**

1. Por primera vez, se demuestra, de forma experimental y teórica, la existencia de un umbral de corriente eléctrica directa para el cual los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 alcanzan sus remisiones completas después de la aplicación de la misma, manteniendo constante los otros parámetros de la terapia.
2. Por primera vez, se hace una modificación a la ecuación de Gompertz convencional para describir las cinéticas de crecimiento de diferentes tipos de tumores experimentales después de la aplicación de la corriente eléctrica directa y la obtención de informaciones nuevas en la cinética de los mismos.
3. Por primera vez, se propone un modelo físico-matemático que visualiza cómo dependen las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y la densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos en función de las diferencias de conductividades existentes entre el tumor y el tejido sano, el posicionamiento, polaridad y cantidad de electrodos. También este modelo permite proponer la posible configuración óptima del arreglo de electrodos y su generalización a cualquier cónica.

Esta Tesis se estructura en: Aspectos teóricos (Capítulo 1), Métodos experimentales y teóricos (Capítulo 2), y Resultados y Discusión (Capítulo 3). Se exponen también: Introducción, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias bibliográficas citadas y las del autor, y Anexos.

## CAPÍTULO 1: ASPECTOS TEÓRICOS

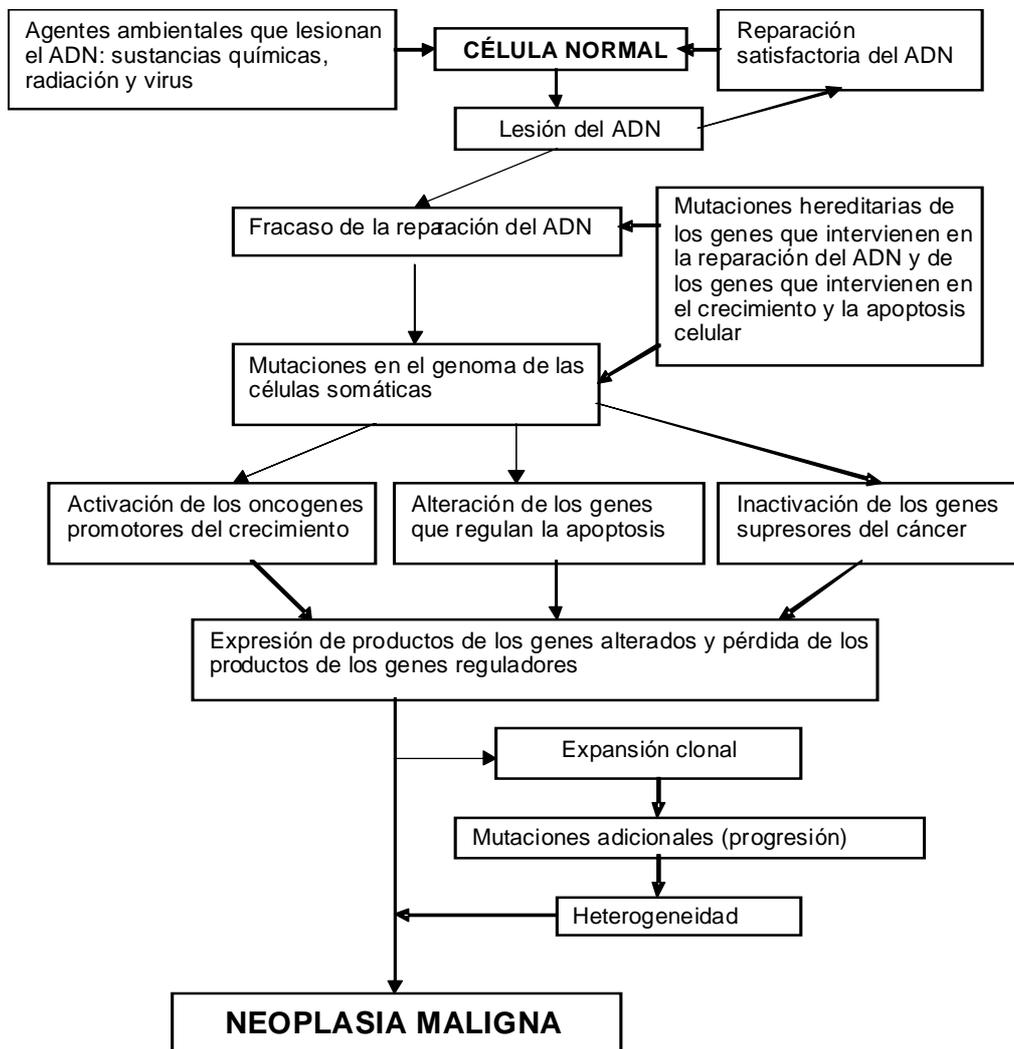
### 1.1. Cinética de crecimiento en tumores malignos

Los tumores malignos están constituidos por células cancerosas, y el comportamiento anormal de los mismos es el reflejo de lo que ocurre en las unidades que lo conforman. Estas células cancerosas, a diferencia de las normales, se distinguen por poseer: multiplicación incontrolada, comportamiento invasivo, alto consumo energético, predominio del metabolismo anaerobio, modificaciones de las propiedades inmunológicas, microambiente ácido e hipóxico, potencial transmembrana menor, entre otras [1, 2-5, 64].

La transformación de la primera célula normal, en célula cancerosa desencadena la formación de la neoplasia maligna mediante el proceso de carcinogénesis, el cual consta de varias etapas. Cada una de las etapas de este proceso está acompañada de diferentes cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos [1, 3, 4].

La figura 1 representa las posibles etapas y diferentes eventos moleculares que se involucran en la carcinogénesis, una vez que se induce una lesión genética por un agente carcinógeno químico, biológico y/o físico [1-3, 65, 66]. De forma general, gran parte de la comunidad científica internacional acepta dos teorías que intentan explicar el desarrollo primario del cáncer: la teoría de las especies reactivas del oxígeno y radicales libres; y la teoría genética. La primera establece que el proceso de carcinogénesis se puede iniciar por el daño que inducen las especies reactivas del oxígeno y radicales libres en el ácido desoxirribonucleico, a nivel de las bases púricas y pirimídicas. También los radicales libres se relacionan con la apoptosis y las alteraciones del ciclo celular [1, 67-69]. La teoría genética revela que las mutaciones críticas, supresiones o translocaciones que producen los carcinógenos antes mencionados, ocurren en un conjunto de tumores malignos y se relacionan específicamente con los genes. Los oncogenes (por ejemplo, *v-src*, *v-ras*) y los genes oncosupresores (por ejemplo, *p53*) abren una alternativa para explicar los mecanismos de la carcinogénesis [1, 63].

Capítulo 1: Aspectos teóricos



**Figura 1.** Esquema simplificado que ilustra las etapas y eventos moleculares involucrados en la carcinogénesis [1].

La formación de una masa tumoral a partir de una célula transformada es un proceso complejo en el que intervienen factores tales como: la cinética del crecimiento de las células cancerosas, la angiogénesis, la progresión y heterogeneidad de los tumores malignos, entre otros [1, 5]. El crecimiento progresivo y la velocidad de crecimiento en los tumores malignos están determinados por el exceso de producción de células, en relación con la pérdida de estas [1].

Los estudios preclínicos y clínicos indican que durante la etapa inicial del crecimiento tumoral la mayoría de las células transformadas están en proliferación. A medida que el tumor crece, las células lo abandonan en número siempre creciente, por desprendimiento o por carencia de nutrientes, por diferenciación o por inversión hacia la fase  $G_0$  (quiescente) o  $G_1$  (crecimiento) del ciclo celular. Por tanto, cuando el tumor se hace detectable clínicamente, la mayoría de las células (80 %) no forman parte del conjunto de células proliferantes [1, 2].

El tiempo de doblaje del volumen del tumor constituye un factor importante para el estudio del crecimiento tumoral. Este factor se emplea para cuantificar la velocidad de crecimiento del tumor, el cual es un parámetro que se utiliza con fines de pronóstico y para la evaluación de los efectos terapéuticos de las diferentes modalidades de tratamiento existentes [1]. El tiempo de doblaje del volumen del tumor depende del tiempo del ciclo celular de las células proliferantes (en muchos tumores es igual o incluso más largo que el de las células normales correspondientes), la fracción de crecimiento y los factores de pérdida celular (apoptosis, necrosis, exfoliación y metástasis), según la ecuación de Steel [70]. La velocidad de crecimiento de los tumores es proporcional a su grado de diferenciación, por lo que los tumores más malignos crecen de forma más rápida. Esta velocidad depende fundamentalmente de la fracción de crecimiento, del grado de desequilibrio entre la producción y la pérdida celular, y de la angiogénesis [1, 2].

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Este es un proceso complejo en el que se encuentran implicados distintos tipos de células, factores u hormonas paracrinas, receptores, moléculas de señalización y de la matriz extracelular. El mismo también involucra procesos que comprenden la movilización y migración de las células endoteliales, los factores proangiogénicos y la reorganización vascular en estructuras tubulares. Diferentes experimentos demuestran que el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* depende de la angiogénesis, la cual tiene un efecto doble en el crecimiento y propagación del cáncer ya que por una parte aporta elementos nutritivos y

oxígeno, y por otra, las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes [1, 64, 71, 72].

Los tumores no pueden crecer más de 2 mm de diámetro si no están vascularizados, siendo esta probablemente la máxima distancia de difusión del oxígeno y los nutrientes a partir de los vasos sanguíneos. El tumor no puede seguir creciendo sin la angiogénesis debido a que la hipoxia provocaría la apoptosis a través de la activación del gen *p53* (inhibe la angiogénesis a través de la estimulación de la síntesis de la molécula antiangiogénica trombospondina-1) [1, 71-73].

En un tumor sólido, al igual que en los tejidos normales, los vasos sanguíneos nutren a las células tumorales. Sin embargo, a diferencia de los vasos sanguíneos normales, la vasculatura del tumor tiene organización, estructura, y función anormales. La microcirculación anormal en los tumores también lleva a la aparición de un microambiente caracterizado por la hipoxia y acidosis, las cuales impiden la efectividad de tratamientos antitumorales como la radioterapia y la quimioterapia [74].

En los tumores malignos se han establecido dos fases cronológicas: la fase avascular y la fase vascular. Las capacidades de invasión y metástasis del tumor dependen de la angiogénesis. El aumento de la masa tumoral, la neoformación vascular y el carácter fenestrado de los neovasos, favorecen el paso de células tumorales a la circulación sanguínea. La potencialidad angiogénica de las células tumorales se encuentra distribuida de forma heterogénea en los diferentes clones celulares que integran el tumor, por esta razón el proceso de metástasis y su posterior crecimiento en el órgano diana, dependerá de la capacidad angiogénica de los clones celulares que pasen a la circulación sistémica [71-74].

Los vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral por lo que la angiogénesis constituye un factor pronóstico en muchas neoplasias humanas. Por este motivo, en la Oncología clínica, se considera que existe una correlación importante entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos, con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente con el grado de malignidad tumoral. Estudios recientes sugieren que las células tumorales no solo producen factores angiogénicos, sino que también producen moléculas antiangiogénicas (trombospondina 1 y proteína HIV-1 Tat) o inducen su producción en otras células. De esta forma queda controlado el crecimiento de los tumores por un equilibrio entre los factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis [1, 71-74].

El conocimiento de las causas y las bases moleculares del cáncer, permitirá trazar acciones médicas más racionales para su profilaxis y terapéutica en un futuro inmediato [1].

## **1.2. Uso terapéutico de la corriente eléctrica directa en la medicina y el cáncer: antecedentes históricos**

Los estudios sobre la electricidad tienen sus inicios en los trabajos de Thales, en el año 600 a.n.e., quien descubre que el ámbar, cuando se frota, atrae cuerpos ligeros. En el año 1660, el Dr. Gilbert publica el libro *De Magnete* [19, 75]. En el siglo XVIII, se dan importantes acontecimientos sobre el uso de la electricidad, entre los cuales se encuentran los trabajos de Galvani, Volta, Ohm y Ampere, entre otros. En los años 20 del siglo XIX, se sientan las bases de la teoría de la electricidad, impulsándose el uso de la CED en las diferentes ramas de la ciencia y la técnica. En 1920, Ingvar demuestra que las células *in vitro* reaccionan bajo la acción de la corriente galvánica. Este es el primer intento para explicar el modo de acción de este agente físico sobre el tejido biológico [19, 75].

El uso de la electroterapia en la Medicina comienza en los años 70 del siglo XVIII con los trabajos de Le Dru, Maundayt de la Verenne, Bertolon y Mesmer, quienes utilizan esta terapia para la cura de algunas enfermedades [17, 75-77]. En 1776, Eason propone por primera vez que la electricidad puede tener un papel importante en el tratamiento del cáncer [19]. Reis y Henninger demuestran en 1953 el efecto antitumoral de la CED en el tumor de Ansen y concluyen que esta se puede utilizar en el tratamiento de las neoplasias malignas [78]. En 1959, Humphrey propone por primera vez una aproximación biofísica para explicar la marcada regresión de los tumores malignos cuando se les aplica CED [47]. En las décadas de los 60 y 70, Schauble y Habal [20] explican que la regresión de las neoplasias malignas se debe a fuerzas bioeléctricas que se inducen en los tumores tratados con CED. A partir estos trabajos iniciales, el uso de la CED en el tratamiento cáncer y el desarrollo tecnológico asociado a estas tienen un auge vertiginoso, que se evidencia en el creciente número de estudios realizados *in vitro* [25, 79-82], en animales [83-87] y en humanos [88-91] sobre el efecto antitumoral de la CED.

**¿Por qué la Electroterapia en tumores?**

- Los tumores tienen biopotenciales negativos mientras los del tejido sano son positivos [17, 20, 77].
- Los tumores tienen menor impedancia, mayor conductividad y permitividad eléctrica, y menor potencial transmembrana que su tejido sano circundante [17, 44, 77].
- Las células cancerosas tienen un campo microeléctrico negativo en su entorno, además del bioquímico [22, 35, 77, 92].
- Los tumores malignos y benignos son más sensibles a la CED que el tejido sano que los rodea porque son más conductores desde el punto de vista eléctrico [79-95].
- El grado de malignidad de las células cancerosas, el fallo del mecanismo de inhibición por contacto, entre otras alteraciones biológicas del tumor se asocian con el incremento de la conductividad eléctrica y el potencial transmembrana bajo [17, 77].

**1.2.1. Estudios *in vitro***

Veiga y cols. [24] reportan los efectos del tratamiento catódico (cátodo en contacto con las células) y anódico (ánodo en contacto con las células) con electroterapia en células HL60. Estos autores aplican una CED de 2 mA y tiempos de exposición de 2; 4; 6; 8 y 10 minutos. El tratamiento catódico produce predominantemente lisis celular; sin embargo, el tratamiento anódico induce apoptosis y provoca daño irreversible de la membrana. El estudio muestra que la necrosis es el mecanismo principal de muerte celular. Estos resultados indican que la naturaleza de los productos de las reacciones catódicas o anódicas influye en los mecanismos de muerte celular inducidos por los compuestos tóxicos derivados de la acción de la CED. También, este grupo de investigación [26] emplea las mismas condiciones experimentales para evaluar las reacciones que ocurren en células mastocitoma P815. Con los resultados de este estudio concluyen que este tratamiento afecta la viabilidad celular y produce marcadas alteraciones en las estructuras vitales de las células, las cuales varían en dependencia de la duración del estímulo y la polaridad de los electrodos.

Kurokawa y cols. [25] aplican la variante anódico-catódica con electroterapia para valores de intensidad de CED de 0; 0,03; 0,2; 0,5; 2, 4 ó 5 mA y tiempos de aplicación de 0-90 minutos en las líneas celulares de leucemia humana HL-60, ML-1, U-937, MUDAR-4 y EOL-1. Estos investigadores reportan regresión tumoral y muerte celular por apoptosis.

Tang y cols. [27] emplean cuatro variantes (5 V + 5 C, 10 V + 5 C, 5 V + 10 C y 10 V + 10 C) para evaluar el mecanismo de la electroterapia en células HeLa. Los resultados demuestran que el medio alrededor del cátodo es básico y en este se elevan los niveles de los cationes  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , mientras que alrededor del ánodo el medio resulta ácido y se reduce el anión  $Cl^-$ . También, observan aumento del porcentaje de células en la fase  $G_1$  del ciclo celular, disminución de la población celular en la fase de S, reducción de los niveles de ciclina D1 y no detectan cambios significativos en los niveles de las ciclinas B1, CDK1 o CDK4. Estos investigadores demuestran que la eficacia de la electroterapia se puede correlacionar con el grado de ionización y la alteración en la escala del pH.

Wartenberg y cols. [28] reportan que la apoptosis que se observa en los tumores durante y después de la aplicación de la CED se inicia a partir de las especies reactivas del oxígeno inducidas por este agente físico.

### 1.2.2. Estudios en animales

Li y cols. [29] utilizan un ánodo y un cátodo para aplicar una CED con intensidad de 30 mA durante 69 minutos. Estos investigadores demuestran la existencia de diferentes alteraciones bioquímicas, alrededor del ánodo y del cátodo, en el tumor tratado. Alrededor del ánodo se observa hemoglobina ácida, hidratación del tejido, presencia de iones hidrógeno producto de la electrólisis del agua, y desprendimiento de oxígeno y cloro, a partir de los cuales explican la formación del ácido clorhídrico, responsable del pH ácido ( $pH = 2$ ); mientras en el cátodo reportan hemoglobina básica, deshidratación del tejido, presencia de iones hidróxido producto de la electrólisis del agua, y desprendimiento de hidrógeno, a partir de los cuales explican la formación del hidróxido de sodio, responsable del pH básico ( $pH = 12$ ). En la zona intermedia entre los electrodos y las alejadas de estos, no se encuentran diferencias significativas entre el pH y la concentración de agua en los tumores tratados con CED y los no tratados. Se concluye que el efecto electroquímico de la electroterapia ocurre solamente alrededor de los electrodos. Von Euler y cols. [31] estudian los hallazgos macroscópicos, histopatológicos y ultraestructurales en hígado. Para esto, aplican una CED de 1; 5 y 25 mA de intensidad y utilizan dos tipos de arreglos de electrodos: con dos electrodos (ánodo y cátodo) y 4 electrodos (dos ánodos y dos cátodos). Los resultados demuestran que después de aplicada la CED se

observa apoptosis y necrosis en el tumor, alrededor del ánodo, mientras que en torno al cátodo solo se observa necrosis.

Gu y cols. [92] utilizan dos electrodos (un cátodo y un ánodo) y aplican una intensidad de CED de 10 mA durante 100; 500 y 1 000 segundos, respectivamente. Estos investigadores reportan apoptosis seis horas después que se aplica la terapia y el número máximo de células apoptóticas a las 12 horas post-tratamiento. También, sus resultados muestran que la necrosis incrementa linealmente con el tiempo durante las primeras 96 horas después de aplicada la CED. Este último hallazgo es consistente con el que reporta Bergues [17].

Chou y cols. [32] emplean diferentes variantes para estudiar la efectividad de la electroterapia, donde colocan los electrodos perpendiculares al tumor: 1) un ánodo y un cátodo para aplicar 5; 8; 10 y 20 C durante 60 minutos; 2) cuatro ánodos con un cátodo en el centro (10 ó 15 C); 3) cuatro cátodos con un ánodo en el centro (10 ó 15 C). Luego, estos investigadores cambian la orientación de los electrodos y los colocan paralelos al tumor. Para ello, utilizan las siguientes variantes: 1) un cátodo insertado en la base del tumor y un ánodo a través del centro de este y 2) dos cátodos insertados en la base del tumor y dos ánodos a través del centro de este. En este caso la carga eléctrica aplicada fue de 4,1-15 C. Los resultados de este estudio confirman que la inserción de los electrodos en la base del tumor y el uso de la secuencia alterna de ánodos y cátodos, inducen un campo eléctrico uniforme en todo el tumor que incrementa significativamente su destrucción y disminuye los daños en el organismo después de aplicada la electroterapia. También, estos autores reportan la relación número de electrodos/tamaño del tumor, en función del área de necrosis efectiva alrededor de los electrodos (2 cm). A partir de este estudio, la inmensa mayoría de los investigadores utilizan este tipo de configuración de electrodos [17, 29, 83, 84].

Ren y cols. [37] investigan la influencia del espacio entre los electrodos y la dosis al aplicar la electroterapia en tumores de mama MTF-7, en ratas. Para realizar este estudio, colocan los electrodos paralelos a la base del tumor y en secuencia alterna. El número de electrodos que utilizan depende del tamaño del tumor. Para aplicar la electroterapia emplean una carga de 0; 40; 60; 80 y 100 C. Los resultados muestran que la terapia induce la necrosis tumoral. También, reportan que las respuestas del tumor a esta terapia, el control local, la tasa de supervivencia, y los porcentajes de la necrosis incrementan significativamente con el aumento de la dosis de CED.

Turler y cols. [93] estudian la efectividad de la electroterapia, en función de la polaridad y la dosis de CED, en metástasis de hígado en ratas. Estos autores aplican la CED a través de cinco electrodos de platino colocados dentro del tumor y emplean cuatro variantes de tratamiento: ánodo en el centro (60 y 80 C/cm<sup>3</sup>) y cátodo en el centro (60 y 80 C/cm<sup>3</sup>). El análisis histológico de los hígados revela una destrucción significativa de las metástasis, con presencia de necrosis en todos los grupos tratados. Los mejores resultados se obtienen en el grupo tratado con un ánodo en el centro y una dosis de 80 C/cm<sup>3</sup>. Este grupo concluye que el daño en el tumor se relaciona con la dosis de CED y no con la polaridad del electrodo central.

Griffin y cols. [96] utilizan dos variantes de tratamiento: 1) ánodo en el interior del tumor y cátodo fuera de este y 2) cátodo en el interior del tumor y ánodo fuera de este fuera de este. En ambos casos, la intensidad de CED aplicada es de 1-4 mA durante 30-90 minutos. Estos investigadores reportan que el porcentaje de necrosis del tumor incrementa de forma lineal con la intensidad de la CED (hasta 5 mA). Esta misma dependencia la reportan Wemyss- Holden y cols. [97] pero hasta 10 mA. En estos dos estudios, ni en los restantes de la literatura [79-95], no se evidencia si esta dependencia es lineal o no por encima de 10 mA. Tampoco reportan el umbral de intensidad de CED a partir del cual se obtiene el 100 % de necrosis tumoral con el daño mínimo al organismo inducido por la acción citotóxica de la CED.

Serša y cols. [54] reportan que en los organismos inmunocompetentes la efectividad antitumoral de la CED es mayor que la obtenida en los inmunodeficientes. Este resultado indica que el sistema inmune puede estar involucrado en la destrucción de los tumores malignos; sin embargo, en este estudio no se discuten a profundidad las causas de la activación de este sistema después de aplicada la electroterapia. Jarm y cols. [98] explican este hecho por el proceso de isquemia/reperfusión que se observa en los tumores tratados con CED.

En los estudios preclínicos se emplean diferentes modelos de animales (ratones, ratas, hámsters, perros, cerdos) y tumores experimentales (Ehrlich, fibrosarcomas, sarcomas, melanoma B16, SV-40, Adeno-12, AML-4, Hepatoma Morris, 3924-A) [79-98]. Los resultados de estos estudios se corroboran en las investigaciones clínicas y se verifican mediante el empleo de diferentes técnicas hematológicas e inmunológicas [99, 100], histopatológicas [101, 102] y mediante técnicas de imagenología tales como: Resonancia

Magnética Nuclear de Imágenes (RMNI) [90, 103], Espectroscopia Infrarroja Cercana [98], Bioimpedancia Eléctrica [104] y Bioimpedancia Magnética [105].

### **1.2.3. Estudios clínicos**

En 1978, el Dr. Nordenström [21] reporta el primer trabajo sobre el uso clínico de la electroterapia en pacientes con cáncer de pulmón. Este autor atribuye el efecto antitumoral de esta terapia a los productos tóxicos provenientes de las reacciones electroquímicas que se inducen en el tumor. A partir de este trabajo, el uso y estudio de la electroterapia se ha extendido con éxito a pacientes con otros tipos de tumores malignos viscerales y superficiales, en diferentes países tales como: China, Alemania, Suecia, Corea, Japón, Argentina, Eslovenia, Francia, Israel, Australia, Grecia, España, Dinamarca, EE.UU, Brasil, Venezuela, Cuba, Rusia, México y Egipto [15, 88-91, 94, 95].

El trabajo más completo que se realiza en la clínica es el de Xin y cols. [18, 94], quienes han tratado más de 20 000 pacientes con diferentes tipos de tumores. Ellos modifican la metodología de colocación de los electrodos propuesta por el Dr. Nordenström, mediante la inserción de varios ánodos en el centro del tumor y el mismo número de cátodos en la parte externa del tumor. Luego, Xin y cols. [18, 94] modifican su técnica por medio de la inserción de los ánodos y cátodos dentro del tumor (ánodos en el centro y cátodos en la periferia) para potenciar el efecto antitumoral y proteger al tejido sano circundante de la acción citotóxica de la CED. Finalmente, estos investigadores modifican otra vez este proceder terapéutico mediante la inserción de ánodos y cátodos en forma alterna (separados a 2 cm) a lo largo del diámetro mayor del tumor [18, 94]. Los resultados de este estudio muestran que la electroterapia se puede emplear satisfactoriamente en pacientes con tumores benignos y malignos inoperables o en los cuales fracasan la cirugía, radioterapia y/o quimioterapia.

Xin y cols. [18, 94] reportan que la efectividad del tratamiento en los tumores benignos es mayor que en los malignos. Este grupo también evidencia que la efectividad de la terapia es mayor en los tumores superficiales que en los viscerales. También, demuestran que la efectividad terapéutica de la CED es significativamente superior en pacientes con tumores malignos de estadios I y II (90,7 %) que en estadios III y IV (68,8 %). En ese trabajo se sugiere que la electroterapia se debe combinar con la radioterapia, quimioterapia y/o

inmunoterapia para aumentar su efectividad en el tratamiento de neoplasias malignas primarias y metástasis [18, 94].

Liu y cols. [95] investigan el mecanismo y la efectividad de la electroterapia en 33 pacientes con cáncer en fase avanzada. Los resultados muestran que las células tumorales de las fases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M, S del ciclo celular y las células aneuploides son eliminadas y que la proporción de apoptosis es muy elevada después de aplicada la terapia. Ellos concluyen que esta terapia puede eliminar células tumorales de forma no selectiva e inducir apoptosis, en concordancia con los resultados que reportan Gu y cols. [92] en ratones portadores del tumor SCC-7.

En Alemania [106], reportan el uso de la electroterapia (hasta el año 2004) en 608 pacientes con tumores malignos y benignos. Los resultados de este estudio muestran 82 % de respuesta completa (407 pacientes), 9 % de respuesta parcial (55 pacientes) y 7 % de enfermedad estable (46 pacientes).

Respecto a las variables propias de esta terapia experimental, se utilizan diferentes dosis de CED (intensidad y tiempo de aplicación), número y posición de electrodos, número de aplicaciones, tipos de terapia, y aplicación de la CED sola o combinada con las modalidades terapéuticas convencionales para el tratamiento del cáncer [15, 16, 41, 46, 107, 108].

Todo los estudios in vitro, in vivo y clínicos expuestos anteriormente muestran la diversidad de criterios que existen en cuanto al modo de utilización y combinación de los diferentes parámetros que conforman la electroterapia (ver Anexo 1). Esta falta de consenso en lo referente al uso de los parámetros de la terapia impide su estandarización e posterior implementación en la Oncología clínica.

### **Ventajas de la electroterapia**

- 1- La electroterapia es segura, efectiva, induce efectos (o eventos) adversos mínimos al organismo, de bajo costo y se aplica cuando los métodos convencionales (cirugía, quimioterapia y radioterapia) y otros en experimentación (inmunoterapia, vacunas terapéuticas, hipertermia) fracasan (no dan la respuesta objetiva esperada) o no pueden aplicarse (bajo estado de validez física del paciente) [15, 18, 21, 35, 36, 77, 94].
- 2- Los efectos o eventos adversos que se reportan son mínimos: 1) Ligero dolor durante la terapia; 2) Fiebre debido al marcado proceso inflamatorio que se induce en el tumor;

- 3) Infección de la úlcera post-tratamiento por necrosis y 4) Daños a los vasos sanguíneos si los electrodos se insertan cerca de los mismos [15, 18, 21, 94].
- 3- En Cuba, el costo de producción del estimulador de CED oscila entre 500 USD (si no es automatizado con una PC) y 1 000.00 USD (con salida a una PC) [17]. Además, estos equipos se pueden fabricar, mantener y reparar por cualquier institución que fabrique o repare aborden los equipos médicos. El costo de estos equipos en el mercado internacional oscila entre 1 000.00 y 10 000.00 USD porque se le incluyen otros módulos para el monitoreo de la frecuencia cardíaca y respiratoria, presión sanguínea, entre otros parámetros [18, 94].
- 4- Las dosis que habitualmente se usan en quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia se reducen de 1/8 a 1/10 cuando se combina con la electroterapia [21, 22, 27, 38].
- 5- Existe una buena correspondencia entre los resultados de la preclínica y la clínica en cuanto a las dosis que se usan en esta terapia experimental y a los hallazgos histopatológicos del tumor e histológicos del tejido sano que se inducen en estos durante y después de la aplicación de la CED [83-95].

A pesar de los resultados promisorios y las ventajas de la electroterapia en el cáncer, no existe un consenso entre los autores en cuanto a su mecanismo de acción antitumoral por lo que se han propuesto varios, entre que se encuentran:

- La inducción de fuerzas bioeléctricas en el tumor [17, 20].
- Cambios en el potencial bioeléctrico [17, 73, 109, 110].
- Cambios en el pH del tumor alrededor de los electrodos [34, 35, 77, 80].
- Inducción de apoptosis [28, 45, 92].
- Cambios en el potencial transmembrana de las células tumorales [17, 35, 77, 111].
- Ionización del tejido tumoral [112].
- Producción de sustancias tóxicas provenientes de las reacciones electroquímicas [29, 35, 77, 101].
- Deposición del material del electrodo en el tumor debido a la aplicación de la electroterapia [53, 113].
- Estimulación del sistema inmune [17, 77, 114].
- Extracción de agua del tejido por electro-ósmosis [22, 48, 92].

- Acción simultánea de las reacciones electroquímicas que ocurren en el tumor (fundamentalmente las que involucran a las especies reactivas del oxígeno) y la potenciación del sistema inmune [17].

### **1.3. Simulación matemática y su importancia en la planificación terapéutica**

La revolución en las ciencias naturales, ocurrida en los últimos dos siglos, ha sido posible en gran medida al uso de las matemáticas como una herramienta poderosa para describir los fenómenos naturales. El progreso en esta dirección requiere del esfuerzo de grupos multidisciplinarios formados por matemáticos, físicos y químicos que colaboran estrechamente con biólogos y médicos. La relación entre el experimento y la teoría, permite que los modelos sean más realistas, esto conduce a un entendimiento más profundo de los procesos biológicos. La Oncología matemática, nueva rama de la matemática aplicada, tiene como objetivo principal desarrollar herramientas para la simulación que contribuyan al entendimiento de la dinámica de crecimiento de los tumores no perturbados y perturbados, y propuesta de estrategias de tratamiento óptimas individualizadas [55].

Las técnicas estadísticas que se aplican a los datos experimentales pueden revelar si un procedimiento particular produce una respuesta significativa o si existe correlación entre los fenómenos observables. Al establecer las causas de la aparición de estas correlaciones surgen los requerimientos para el postulado de las hipótesis, en las cuales están involucrados los procesos físicos y la forma en que estos interactúan. Los experimentos biológicos necesitan probar tales hipótesis que en muchas ocasiones consumen tiempo, son costosas y/o imposibles de verificar con las tecnologías existentes. En tales casos, la modelación matemática puede tener un papel intermediario para proporcionar una verificación independiente de la consistencia de la hipótesis. Si un modelo es incapaz de reproducir el experimento, entonces la hipótesis original se debe revisar antes de continuar. También, los modelos matemáticos pueden mejorar el diseño experimental, resaltando las mediciones y la información adicional que se necesitan para probar una teoría particular [57, 58].

En el caso particular del cáncer se han desarrollado diferentes modelos físico-matemáticos, que se dirigen fundamentalmente a la simulación de: la carcinogénesis e incidencia del cáncer [57, 58, 115], los mecanismos de adhesión en la metástasis del cáncer [58, 116], las interacciones dinámicas y estáticas entre el endotelio y las células circulantes en el cáncer

[58], la modelación matemática de invasión del tejido [58, 59, 116], el crecimiento espacial y temporal de la fase avascular del tumor [57, 58, 116, 117], la interacción y competencia del tumor con el sistema inmune [58, 59, 116], la matriz extracelular [58, 116, 118], el desarrollo de la angiogénesis tumoral y de la antiangiogénesis [57, 58, 116, 119, 120], el análisis multi-escala de la dinámica de las terapias antiangiogénica [58, 116, 120], la influencia del microambiente en el crecimiento tumoral [58, 121], el transporte intersticial en los tumores sólidos [58], el análisis de la hipersensibilidad a la quimioterapia en un modelo autómatas celular al sistema inmune [58], los sistemas reacción-difusión [58], la cinética de crecimiento de los tumores [55-58, 116, 122-125], entre otros. Byrne [57] reporta, en el período comprendido entre 1954 y 2004, las etapas y los trabajos más relevantes en la historia de la modelación matemática en el cáncer.

Modelos como el logístico, Gompertz, Richards, Weibull y Bertalanffy son extensamente estudiados y se aplican a una gama amplia de estudios médicos y biológicos [54, 55]. Precisamente, el modelo de Gompertz es el que más se utiliza para describir la dinámica de crecimiento de los tumores no tratados [55-58, 70, 116, 122-128]. La ecuación de Gompertz convencional se obtiene de resolver la siguiente ecuación diferencial (1) con la condición inicial  $V_{GC}(t=0) = V_0$ , dada por:

$$\frac{dV_{GC}}{dt} = \alpha V_{GC} - \beta V_{GC} \ln\left(\frac{V_{GC}}{V_0}\right) \quad (1)$$

y su solución es

$$V_{GC}(t) = V_0 e^{\frac{\alpha}{\beta}(1-e^{-\beta t})} \quad (2)$$

donde  $V_{GC}(t)$  (en  $\text{mm}^3$ ) describe la dependencia temporal ( $t$ , en días) del volumen del tumor maligno no tratado con un agente externo y  $V_0$  (en  $\text{mm}^3$ ) su volumen inicial. El parámetro  $\alpha$  (en  $\text{días}^{-1}$ ) es la velocidad de crecimiento intrínseca del cáncer (relacionada con la razón de mitosis inicial de las células tumorales) y  $\beta$  (en  $\text{días}^{-1}$ ) se interpreta como su velocidad de retardo del crecimiento (que se relaciona de forma importante con el proceso de antiangiogénesis [1, 71-73]). La sobre-expresión de la angiostatina en los tumores malignos incrementa la apoptosis de las células cancerosas y disminuye la densidad de sus vasos sanguíneos, lo cual puede permitirle al sistema inmune, vencer la resistencia inmune del cáncer [1, 2, 71-73].

Una relación explícita entre los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se puede establecer si en la ecuación (2) se sustituye la condición  $V_{GC}(t = TD) = 2V_0$ , dada por

$$\alpha = \frac{\beta \ln 2}{(1 - e^{-\beta TD})} \quad (3)$$

donde TD (tiempo de doblaje promedio del volumen del tumor), es el tiempo que transcurre para que el tumor duplique su volumen inicial y se obtiene de forma directa a partir de la cinética de crecimiento de los tumores malignos no tratados. El TD se relaciona con los parámetros cinéticos que caracterizan el crecimiento tumoral, de acuerdo con la ecuación de Steel [70].

### 1.3.1. Modelación matemática en el tema de electroterapia y cáncer

La modelación matemática en el tema de electroterapia en cáncer se ha explotado muy poco y queda mucho por hacer [62, 129-135]. Nilsson y cols. [129, 130] modelan los procesos de transporte, las diferentes reacciones electroquímicas y los cambios de pH que ocurren alrededor de los electrodos durante el tratamiento con electroterapia. En estos trabajos se demuestra la validez del modelo para predecir el perfil de pH alrededor del cátodo después que se aplica la CED. Los resultados de las simulaciones revelan la fuerte correlación existente entre los perfiles de pH y el tamaño de las lesiones medidas experimentalmente.

Turjanski y cols. [23, 60] trabajan en la modelación de las variaciones de pH y el transporte de iones. Estos autores proponen un modelo que predice un perfil de pH neutro inicial que evoluciona hacia alcalino en el cátodo y ácido en el ánodo, excluyendo la existencia de una región de pH biológico entre ellos. Este modelo también predice que el aumento del campo eléctrico, provoca el crecimiento de la escala de pH. Estos investigadores proponen que las áreas de necrosis se pueden correlacionar con las zonas alcalinas y ácidas, con el fin de predecir la magnitud de la destrucción del tumor y evaluar la efectividad de la electroterapia.

Telló y cols. [131, 132] proponen un modelo conductor para la neoplasia maligna. En este modelo las fuerzas bioeléctricas que se inducen en el tumor juegan el papel antitumoral fundamental. Sin embargo, dicho modelo no tiene en cuenta el potencial finito en el centro del tumor maligno, medido por Miklavčič y cols. [133]. El hecho de que el tejido tumoral maligno sea más electronegativo que su tejido sano circundante no lleva necesariamente a concluir que las fuerzas bioeléctricas sean las responsables de la regresión de los tumores malignos, según

los resultados experimentales de Schauble y Habal [20]. Estos resultados no explican la destrucción espacio-temporal que se induce en el tumor y evidencian la contradicción acerca del papel de estos biopotenciales en el crecimiento de los tumores tratados.

Vodovnik [111] explica el cambio en el potencial transmembrana por la inducción en la membrana de una corriente eléctrica no lineal que provoca una repolarización del tejido, alrededor del cátodo, y una despolarización alrededor del ánodo; sin embargo, en este trabajo no se hace una discusión de un modelo biofísico que explique tales resultados ni tampoco a partir de estos se puede explicar la destrucción espacio-temporal que se induce en el tumor.

Miklavčič y cols. [134] propone un cálculo, por elementos finitos, de la densidad de corriente eléctrica y densidad de potencia que se induce en el tumor por la acción de la CED. Sin embargo, este estudio no muestra la forma en que dependen estos dos parámetros en función de los otros que forman parte de la electroterapia.

Existen dos trabajos que intentan describir la cinética de crecimiento de los tumores perturbados con CED [17, 62] y un trabajo muy reciente que propone un nuevo tipo de configuración de electrodos [135].

Un primer intento por ajustar los datos de la cinética de crecimiento de los tumores tratados con electroterapia es el que proponen Miklavčič y cols. [62], quienes demuestran que la inclusión de un polinomio de segundo grado en esta ecuación permite ajustar los datos experimentales de crecimiento de los tumores tratados con CED sola. Este último análisis revela la existencia de dos procesos antitumorales cada uno con una constante de tiempo. También, estos autores incluyen un polinomio de tercer grado para ajustar los datos experimentales cuando la CED se combina con la bleomicina. Ninguno de estos dos modelos muestra las dependencias explícitas de los parámetros de la terapia (dosis y tiempo de exposición) cuando esta se aplica sola o combinada con la bleomicina. Tampoco los mismos describen las diferentes respuestas de los tumores malignos tratados con CED sola o combinada, ni a partir de estos se puede establecer una ley (o dependencia) única del volumen tumoral en función de los parámetros de la terapia. Este último hecho se puede explicar porque a polinomios de grados 2 y 3 le pueden corresponder una o más funciones matemáticas y como un resultado la cinética de crecimiento de los tumores tratados con CED se puede describir para más de una función matemática. Esto sugiere que el problema no tiene una solución única, aspecto que se considera muy poco probable en el orden biofísico.

Bergues [17] propone una modificación a la ecuación de Gompertz convencional que relaciona el volumen del tumor tratado con CED en función de los parámetros de la terapia y del tumor. Esta modificación describe bien los datos experimentales en tumores murinos y es el primer intento de establecer una dependencia explícita entre el volumen del tumor después de que de la aplicación de la CED con los parámetros cinéticos del tumor y los de la terapia. Este autor asume que los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  de la ecuación (2) dependen de la intensidad de la CED y concluye que las diferentes respuestas post-tratamiento de los tumores dependen de la razón de la intensidad de la CED ( $i$ ) y la corriente que se induce en el tumor ( $i_0$ ), que se denomina ( $i/i_0$ ). También, Bergues [17] reporta una dependencia explícita del parámetro modificado  $\beta$  con ( $i/i_0$ ) en la cual aparecen picos para determinados valores de esta razón, los cuales pueden mimetizar una posible transición de fase o la potenciación de elementos antiangiogénicos que se manifiesta de forma rápida. Sin embargo, este modelo presenta las siguientes limitaciones: 1) es empírico y se ajusta directamente sobre los datos experimentales. 2) Ninguno de los trabajos teóricos y experimentales que se publican en los temas de CED y cáncer, angiogénesis y antiangiogénesis, revelan la existencia de tales picos. Olaiza y cols. [135] proponen un nuevo tipo de configuración de electrodos para estudiar los frentes de pH de uno y dos electrodos separados a 1 mm; sin embargo, en este estudio no se aborda las dependencias del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica con los parámetros del arreglo de electrodos ni tampoco como estos influyen en la cinética de crecimiento de los tumores.

Por otro lado, se reportan dos trabajos que modelan las distribuciones del potencial y la intensidad del campo eléctrico en un tumor plano, generadas por una configuración circular de seis electrodos para tratar el cáncer con electroquimioterapia (terapia que combina las drogas terapéuticas con un campo eléctrico de alta intensidad) [63, 136]. Aunque estos trabajos no se relacionan de forma directa con la electroterapia, el formulismo matemático que proponen estos autores se puede extender para el diseño de arreglos de electrodos que se usan en electroterapia. En este caso, el mismo tiene las siguientes limitaciones: 1) considera al tumor circular y como un solo medio; sin embargo, la mayoría de los tumores planos en los estudios preclínicos y clínicos desarrollan una forma elíptica y los mismos están embebidos en el tejido sano [1, 17, 18]. 2) No tienen en cuenta las diferencias de conductividades entre el tumor y el

tejido sano circundante, que se miden por la técnica experimental de Bioimpedancia eléctrica [105, 137-140].

#### **1.4. Problemáticas existentes**

A pesar de todas las bondades a las que se han hecho referencia, cabe preguntar ¿Por qué la electroterapia no se ha establecido en la Oncología Clínica como una terapia definitiva? Luego de realizar una revisión crítica exhaustiva de los resultados experimentales y teóricos que se citan en la literatura especializada, se encuentra que:

- El mecanismo de acción antitumoral de la CED es poco entendido.
- La electroterapia no se ha estandarizado por las dos razones siguientes: 1) no se conoce de forma experimental ni teórica la dosis umbral de CED, por tipo de tumor, para la cual el tumor alcanza su remisión completa. 2) También, no se conoce de forma experimental ni teórica el arreglo de electrodos óptimo que maximice la destrucción del tumor con el mínimo daño al organismo.

Es por lo anterior que en esta Tesis se propone el siguiente problema científico: ¿Cuáles son los comportamientos, de forma experimental y/o teórica, del volumen tumoral y la densidad de corriente eléctrica que se genera por un sistema de arreglos de electrodos con corriente eléctrica en función de parámetros cinéticos y eléctricos de manera tal que se pueda iniciar la estandarización de esta terapia experimental?

## **CAPÍTULO 2. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS**

### **2.1. Características generales de la investigación**

Es importante señalar que esta Tesis se sustenta a partir de dos de las recomendaciones que se proponen a la anteriormente defendida [17], que se relacionan con el esclarecimiento en el orden experimental y teórico de la influencia de la intensidad de CED y su forma de distribución, a través de los electrodos que se insertan en el tumor, en la destrucción eficiente de este con el mínimo daño al organismo. Esta Tesis se apoya en una extensa revisión bibliográfica, fundamentalmente en el período entre el 2000 hasta el año en curso.

El Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio suministra el biomodelo experimental (ratón inmunocompetente e isogénico BALB/c). Su transportación, conservación (en cajas plásticas dentro de un local climatizado, a una temperatura de  $20 \pm 3$  °C, y una humedad relativa entre el 62 y 65 %) y control microbiológico, se realizan según las Normas de Calidad que se establecen en la institución proveedora y se verifica mediante el Certificado de Salud que emite la misma. El cuidado y uso de los animales se realiza según las guías que se muestran en [141]. El sacrificio de los animales se realiza por dislocación cervical acorde a la Norma ISO 10993-2 [142].

El Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología y el Centro de Inmunología Molecular suministran los modelos de tumores experimentales de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, respectivamente. Estos se transportan en termos especiales con nitrógeno líquido.

El tumor de Ehrlich es un carcinoma mamario que se caracteriza por poseer extensas áreas de necrosis, gran número de células anaplásicas, estroma escaso y alto índice mitótico [143].

El tumor fibrosarcoma Sa-37 se origina a partir del tejido conectivo fibroso y está formado por fibroblastos inmaduros o células anaplásicas indiferenciadas [144].

En la parte experimental se realizan dos réplicas del experimento original para el tumor fibrosarcoma Sa-37, en los cuales se mantienen las mismas condiciones experimentales. El diseño y desarrollo de cada experiencia se hace de manera que se cumpla con la regla de las 3R (reducción, reproducibilidad y repetitividad) que rigen las buenas prácticas metodológicas.

En la figura 2 se muestra la metódica general que se sigue, a través del siguiente diagrama de flujo, que da cumplimiento a los objetivos que se proponen en esta Tesis.

Capítulo 2: Métodos experimentales y teóricos

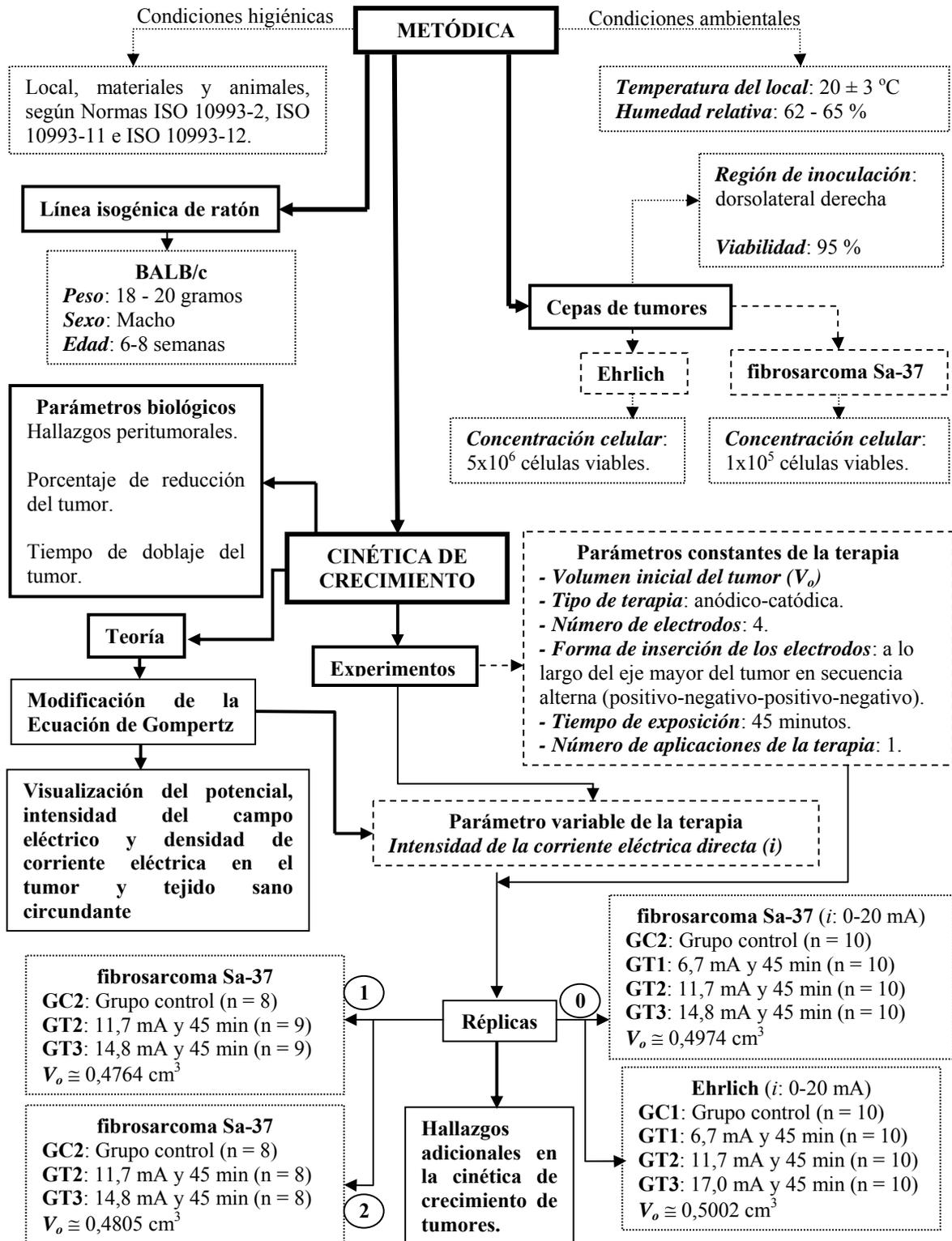


Figura 2. Diagrama de flujo.

## **2.2. Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 tratados con diferentes intensidades de corriente eléctrica directa**

Para darle cumplimiento al Objetivo 1, se realiza un estudio en 40 ratones BALB/c machos (6-8 semanas de edad y 18-20 gramos de peso) portadores del tumor de Ehrlich (Grupo 1) y en otros 40 ratones portadores del tumor fibrosarcoma Sa-37 (Grupo 2). Ambos grupos se dividen, de forma aleatoria, en cuatros subgrupos cada uno formado por 10 animales. Para el Grupo 1, los subgrupos que se forman son: subgrupo control (GC1), subgrupo tratado con 6,7 mA durante 45 min (GT1-1), subgrupo tratado con 11,7 mA durante 45 min (GT1-2) y subgrupo tratado con 17,0 mA durante 45 min (GT1-3). Para el Grupo 2, los subgrupos son: subgrupo control (GC2), subgrupo tratado con 6,7 mA durante 45 min (GT2-1), subgrupo tratado con 11,7 mA durante 45 min (GT2-2) y subgrupo tratado con 14,8 mA durante 45 min (GT2-3). También, la dosis de 19,5 mA durante 45 min se aplica en seis tumores de Ehrlich y seis tumores fibrosarcoma Sa-37. Otros valores de intensidad de CED, en el rango de 1 a 20 mA, se usan para el tratamiento de ambos tipos de tumores.

Se utiliza el arreglo anódico-catódico con cuatro electrodos: dos ánodos (electrodos con polaridad positiva) y dos cátodos (electrodos con polaridad negativa) que se insertan a lo largo del diámetro mayor del tumor a una distancia de 3 mm entre ellos, en secuencia alterna. También en el grupo control se insertan cuatro electrodos, en la base de los tumores, sin aplicar la CED (0 mA). Esta forma de inserción de los electrodos es la que más se emplea en estudios preclínicos [83-87] y clínicos [88-91].

Para la inserción de los electrodos se introducen los trocars (formados por un mandril rodeado de una cánula plástica) en la base del tumor. Luego, se retiran los mandriles y las cánulas plásticas quedan insertadas en el tumor. Los electrodos se pasan a través de las cánulas plásticas hasta que quedan completamente insertados en el tumor. Posteriormente, las cánulas plásticas se retiran hasta el borde del tumor con el objetivo de aislar al electrodo del tejido sano circundante. Con esto se garantiza que el electrodo solo este en contacto con el tumor.

Los electrodos Pt-Ir 90/10 (Medicotest, Dinamarca) son suministrados por el Departamento de Biofísica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia y a través de ellos se le aplica al tumor la CED generada por el electroestimulador ONCOCED B&E-00 [17]. El diámetro de los electrodos es 0,7 mm y su longitud 20 cm. Los mismos se limpian y esterilizan con alcohol antes de su uso.

El volumen inicial de los tumores para la aplicación de la terapia es aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^3$ . Cuando los tumores alcanzan aproximadamente este volumen, se aplica un solo estímulo de CED a los ratones BALB/c (día cero). La corriente se monitorea continuamente y se incrementa paso a paso, por intervalos de dos minutos, hasta alcanzar la intensidad de CED que selecciona el investigador, la cual se mantiene constante durante el tratamiento. El voltaje se monitorea de forma continua y se varía entre 5 y 25 V, acorde con el cambio de la resistencia del tejido, durante la aplicación de la CED. La carga eléctrica total volumétrica ( $Q$ , en  $\text{C/cm}^3$ ) se calcula en tiempo real mediante la expresión:  $Q = iT_{\text{exp}}/V_0$ , donde  $i$  es la intensidad de la CED que se aplica,  $T_{\text{exp}}$  es el tiempo de exposición de la terapia y  $V_0$  es el volumen inicial del tumor al aplicar la terapia. El tratamiento se detiene después que transcurre el tiempo de aplicación de la CED. En este caso, la CED se disminuye paso a paso, durante dos minutos, hasta que su intensidad es cero.

El promedio y el error estándar de la media (ES) de las variables bajo estudio se calculan en cada uno de los grupos experimentales. El ES se calcula mediante la fórmula  $ES = DS/\sqrt{n}$ , donde DS es la desviación estándar y  $n$  el número de muestras.

Los tumores sólidos de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 se preparan a partir de sus formas ascíticas, y se inician en la región dorsolateral derecha de los ratones BALB/c, por inoculación subcutánea de  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  células viables, respectivamente, en 0,2 ml de solución salina al 0,9 %. La viabilidad celular en ambos tipos de tumores es del 95 % y se determina por el método del azul tripán. El conteo celular se realiza mediante el empleo del hematocitómetro. Los cortes histológicos de cada tumor se realizan de acuerdo al diámetro mayor. Los mismos se fijan en una solución de formol al 10 % y se procesan por el método de la parafina. Cada corte se divide en cuatro campos microscópicos para calcular el porcentaje de necrosis a través de la lente panorámica. Este porcentaje se calcula como la relación entre el área de necrosis y el área total del tumor, multiplicada por 100 %.

La tinción con hematoxilina y eosina se utiliza para evaluar la presencia de necrosis. Las láminas teñidas se examinan bajo un microscopio de luz marca Olympus.

La conservación, inoculación y control microbiológico de los tumores; el establecimiento de las condiciones higiénicas (locales, materiales y animales de laboratorio); la recogida y conservación de la información (datos, tablas y gráficos); la determinación de los hallazgos peritumorales y del tumor; así como de los parámetros hematológicos y bioquímicos de la

sangre se realizan mediante los Procedimientos Operativos de Trabajo que se establecen en el Departamento de Investigaciones y los Servicios de Anatomía Patológica y Laboratorio Clínico, todos pertenecientes al Hospital Docente Oncológico “Conrado Benítez”, de Santiago de Cuba. También, se siguen las normas que establece la Guía para la Realización de Investigaciones Preclínicas Biológicas con Equipos Médicos [145].

En cada uno de los experimentos, el volumen de los tumores se calcula por la fórmula del volumen de un elipsoide.

$$V = \frac{\pi abc}{6} \quad (4)$$

donde a, b y c son los tres diámetros perpendiculares del tumor que se miden con un pie de rey de 0,05 mm de precisión. Además, se calcula el Porcentaje de Regresión, PR (en %), en cada grupo tratado mediante la fórmula:

$$PR = \left[ \frac{V_{\min} - V_0}{V_0} \right] 100\% \quad (5)$$

donde  $V_0$  es el volumen inicial y  $V_{\min}$  es el volumen mínimo que alcanza el tumor después de la aplicación de la CED. La fórmula (5) determina cuánto disminuye el volumen del tumor con respecto a  $V_0$  una vez que este alcanza  $V_{\min}$ .

Para la evaluación del papel de la intensidad de la CED en la cinética de crecimiento del tumor se varía solo este parámetro y se mantienen constantes los otros: tipo de organismo, tipo de tumor (tamaño y variedad histológica), arreglo de electrodos (cantidad, polaridad, posicionamiento y distribución de los electrodos), tiempo de exposición y número de aplicaciones de la terapia.

Para el análisis estadístico de los diferentes resultados se utiliza el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, 2005). Para la comparación de los volúmenes de los tumores tratados con CED y sus respectivos controles se utiliza el Criterio estadístico no paramétrico de suma de rango de Mann-Whitney de una cola, con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . El análisis de supervida de los animales tratados, con respecto a los controles, se realiza mediante el empleo del Criterio de Kaplan y Meier, para un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La razón de supervida (en %) de los ratones portadores de ambos tipos de tumores, se determina para cada grupo experimental y esta se define como la razón entre el número de animales vivos y el número total de animales.

### **2.2.1. Réplicas de la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 tratado con diferentes intensidades de corriente eléctrica directa**

Dos réplicas del experimento original se realizan en ratones BALB/c portadores del tumor fibrosarcoma Sa-37, manteniendo las mismas condiciones experimentales. En las mismas, sólo se hace un estudio cinético de los tumores con la finalidad de reproducir la posible existencia de una dosis umbral de CED. En cada réplica, se forman tres subgrupos experimentales: un subgrupo control, un primer subgrupo tratado con 11,7 mA durante 45 min y un segundo subgrupo tratado con 14,8 mA durante 45 min.

Para la Réplica 1 (R1), el número total de ratones es 26 y se subdividen en: 8 en el subgrupo control (GC-R1), 9 en el primer subgrupo tratado (GT2-2R1) y 9 en el segundo subgrupo tratado (GT2-3R1). La terapia se suministra cuando los tumores alcanzan un volumen inicial aproximado de  $0,4764 \text{ cm}^3$ .

Para la Réplica 2 (R2), el número total de ratones es 24 y se subdividen en: 8 en el subgrupo control (GC-R2), 8 en el primer subgrupo tratado (GT2-2R2) y 8 en el segundo subgrupo tratado (GT2-3R2). La terapia se suministra cuando los tumores alcanzan un volumen inicial aproximado de  $0,4805 \text{ cm}^3$ .

### **2.3. Modificación de la ecuación de Gompertz convencional**

Para darle cumplimiento al Objetivo 2, se propone una modificación a la ecuación de Gompertz convencional, para describir las cinéticas de crecimiento de los tumores después de la aplicación de la CED. En este caso, la cual se asume que:

1. El tumor es un sistema complejo que resulta de las complejas interacciones que acontecen en el mismo y las que este establece con el organismo [1, 146-148].
2. El parámetro  $\alpha$  en la ecuación (1) se modifica porque este parámetro se afecta durante y después de la aplicación de la CED por la inducción de necrosis y/o apoptosis en el tumor [17, 29-32, 41, 48, 81-92].
3. El parámetro  $\beta$  no se modifica, en una primera aproximación, por la falta de evidencias experimentales y teóricas que demuestran que la efectividad antitumoral de la CED está directamente relacionada con la estimulación del proceso de antiangiogénesis [24, 32, 77].

4. La ecuación diferencial de Gompertz modificada coincide con la convencional para el caso particular de ausencia de la intensidad de CED,  $i = 0$  (principio de correspondencia de la Física).
5. La existencia de una corriente de polarización ( $i_0$ ) en el tumor sólido en analogía a un dieléctrico real (permitividad mayor que 1 y conductividad eléctrica mayor que 0), si se tienen en cuenta los resultados experimentales con el uso de la Bioimpedancia eléctrica [137, 138, 149-151].
6. Las diferentes tipos de respuestas del tumor tratado con CED dependen de la razón  $i/i_0$ .
7. El tumor se relaja exponencialmente ( $e^{-\gamma t}$ ) mediante el mecanismo de la relajación dieléctrica. En este caso, la polarización desaparece cuando el agente externo se retira.

Estas consideraciones permiten modificar la ecuación diferencial de Gompertz convencional (1) dada por

$$\frac{dV^*(t)}{dt} = \left[ \alpha + \frac{1}{\alpha} \left( \frac{\alpha^{*'}}{\alpha^*} \right) \ln \left( \frac{V^*(t)}{V_0} \right) \right] V^*(t) - \beta V^*(t) \ln \left( \frac{V^*(t)}{V_0} \right) \quad (6)$$

con

$$\alpha^* = \left[ a_1 (1 - e^{-\gamma t}) + a_2 \right] \alpha \quad (6a)$$

$$a_1 = \left( \frac{i}{i_0} \right) \left( 2 - \frac{i}{i_0} \right) \quad (6b)$$

$$a_2 = \left( 1 - \frac{i}{i_0} \right) \quad (6c)$$

donde  $V^*(t)$  representa el volumen del tumor en el tiempo después de la aplicación de la CED. El parámetro  $\alpha^*$  es la razón de crecimiento modificada del tumor debido a la acción de la CED. El parámetro  $\alpha^{*'}$  es la derivada de  $\alpha^*$  con respecto al tiempo  $t$ . La razón  $\alpha^{*'}/\alpha^*$  es la velocidad de cambio de  $\alpha^*$ . Los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se definen en la ecuación (2). El parámetro  $i$  ( $i > 0$ ) es la intensidad de la CED que fluye a través del tumor por la diferencia de potencial que se aplica entre los electrodos. El parámetro  $i_0$  ( $i_0 > 0$ ) es la corriente de polarización que aparece en el tumor debido a la polarización inducida en este durante la aplicación de la terapia. El parámetro  $\gamma$  es la razón de decrecimiento exponencial del efecto neto inducido en el tumor después que se aplica la CED. El inverso de  $\gamma$  es una constante de tiempo que

caracteriza la duración de tal efecto.  $a_1$  y  $a_2$  son parámetros adimensionales que dependen solo de la razón  $i/i_0$ .

La razón  $\alpha^*/\alpha^*$  se introduce en la ecuación (6a) para describir el proceso de expansión ( $\alpha^*/\alpha^* > 0$ ) o contracción ( $\alpha^*/\alpha^* < 0$ ) del volumen tumoral después que se aplica la CED.

La estructura de  $\alpha^*$  se propone para describir la primera parte [ $a_1(1 - e^{-\gamma t})a_2$ ] de la cinética de crecimiento de los tumores tratados después de la aplicación de la CED y segunda parte

La Ecuación de Gompertz Modificada (EGM) resulta de resolver la ecuación (6) con la condición inicial  $V^*(t = 0) = V_0$ , dada por

$$V^*(t) = V_0 e^{\left(\frac{\alpha^*}{\beta}\right)(1 - e^{-\beta t})} \quad (7)$$

La EGM es válida para después que se aplica de la CED; sin embargo, en cierta aproximación esta ecuación se puede aplicar desde el momento que termina la aplicación de la CED porque el tiempo de exposición de la terapia (20 minutos - 3 horas) se desprecia al ser comparado con el tiempo de observación en estudios preclínicos (1-20 días) [17, 22, 83-87, 92] y clínicos (30 días - 10 años) [15, 18, 22, 94]. Otro aspecto de interés es que el volumen tumoral no cambia significativamente durante la aplicación de la terapia por lo que se puede asumir, en una buena aproximación,  $V_0$  es el mismo al inicio y final de la terapia.

Las dependencias explícitas de los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  con  $i$ , en la ecuación (7), y las que estos establecen entre sí, no se conocen de forma experimental ni teórica. Este hecho permite considerar, en una primera aproximación, que los mismos son constantes y no dependen de  $i$ . Además, los valores de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  son los que tiene el tumor después de la aplicación de la CED.

La ecuación (7) revela que la EGM es multiparamétrica ya que contiene cuatro parámetros:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$ . Para evaluar su factibilidad en el ajuste de los datos experimentales de las curvas de crecimiento de los tumores no tratados y tratados después de la aplicación de la CED, se tienen en cuenta los siguientes criterios estadísticos:

(a) La suma del cuadrado de los errores (SSE, del inglés Sum Square Error) es la medida de cuanto varía  $V^*$  respecto a  $\hat{V}^*$ , dada por:

$$SSE = \sum_{j=1}^n (\hat{V}_j^* - V_j^*)^2 \quad (8)$$

donde  $V_j^*$  es la  $j$ -ésima medición del volumen medido en un tiempo discreto  $t_j, j = 1; 2; \dots; n$ .  $\hat{V}_j^*$  es el  $j$ -ésimo valor del volumen estimado del tumor,  $n$  es el número de puntos experimentales. La menor suma de los cuadrados de los errores se obtiene cuando SSE se minimiza en un algoritmo de optimización Marquardt-Levenberg [152].

(b) El error estándar (SE, del inglés Standard Error) es el SSE normalizado que resulta de la eliminación de los efectos de un número de puntos experimentales ( $n$ ) y un número de parámetros del modelo ( $k$ ). La expresión matemática de SE es

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\hat{V}_j^* - V_j^*)^2}{n - k}} \quad (9)$$

(c) El objetivo del análisis de regresión es encontrar un modelo que sea simple (relativamente pocos parámetros) y proporcione un buen ajuste de los datos. El coeficiente ajustado de determinación múltiple ( $r_a^2$ ) se emplea para balancear el costo del uso de más parámetros contra la ganancia en el coeficiente de determinación múltiple o bondad de ajuste ( $r^2$ ), dado por

$$r_a^2 = 1 - \frac{n-1}{n-k} (1 - r^2) = \frac{(n-1)r^2 - k + 1}{n-k} \quad (10)$$

donde  $k$  es el número de parámetros.  $r^2$  se calcula por la siguiente expresión

$$1 - r^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (\hat{V}_j^* - V_j^*)^2}{\sum_{j=1}^n (V_j^*)^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{j=1}^n V_j^* \right)^2} \quad (11)$$

El ajuste se considera satisfactorio cuando  $r_a^2 \geq 0,98$ . Altos valores de  $r_a^2$  significa un buen ajuste.

(d) La suma de cuadrados del error residual pronosticado (PRESS, del inglés Predicted Residual Error Sum of Squares) es una medida de cuan bien un modelo de regresión predice los datos ausentes y se calcula mediante la suma de los cuadrados de los errores de predicción (las diferencias entre los valores pronosticados y observados) para cada observación (excepto la inicial), con ese punto eliminado del cálculo de la ecuación de regresión. En el caso de las  $n$  mediciones del volumen tumoral en el tiempo, la prueba se ejecuta  $(n-1)$  veces y se calcula el promedio:

$$PRESS = \frac{\sum_{j=1}^{n-1} \left[ (\hat{V}_j^*) - V_j^* \right]^2}{n - k} \quad (12)$$

donde  $(\hat{V}_j^*)$  es el valor estimado de  $V_j^*$  cuando el modelo se obtiene sin la  $j$ -ésima observación, y  $n$  es el número de puntos experimentales.

(e) La suma de cuadrados del error residual múltiple pronosticado (MPRESS, del inglés Multiple Predicted Residual Sum Error of Square), mide la capacidad del modelo de predecir la dinámica del proceso del volumen tumoral después de cierto período de observación. En contraste a PRESS, el cual remueve solo una medición de un conjunto de datos experimentales, MPRESS [ecuación (13)] remueve las últimas  $(n-m)$  mediciones. El modelo se ajusta a los primeros  $m$  puntos experimentales medidos ( $m = 3; 4$  ó  $5$ ) y entonces a partir de los parámetros del modelo calculado, el error entre los valores del volumen tumoral estimado y medido en los  $(n-m)$  puntos restantes se calcula. MPRESS se determina para un período de observación de 60 días.

$$MPRESS (m) = \frac{\sum_{j=m+1}^n \left[ (\hat{V}_j^*) - V_j^* \right]^2}{n - m} \quad (13)$$

El valor medio ( $\bar{A}$ ) y su error estándar de la media ( $EE_A$ ) del volumen del tumor en el tiempo, de los parámetros de la EGM y de los errores de cada uno de estos parámetros se reportan por cada grupo experimental. Las fórmulas que se utilizan para el cálculo de los mismos vienen dadas por:

$$\bar{A} = \frac{\sum_{j=1}^n A_j}{n} \quad (14)$$

$$EE_A = \frac{DE_A}{\sqrt{n}} \quad (15)$$

donde  $DE_A$  es la desviación estándar, dada por

$$DE_A = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n \left( \bar{A} - A_j \right)^2}{n-1}} \quad (16)$$

En este caso,  $A$  puede ser  $V(t)$ ,  $V_0$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $i_0$ ,  $SSE$ ,  $SE$ ,  $r_a^2$ ,  $PRESS$ ,  $MPRESS$ , y los errores de cada parámetro. Los parámetros de la EGM y sus errores se obtienen del ajuste individual de cada cinética de crecimiento en cada grupo experimental.

La cinética de crecimiento tumoral completa (desde el momento de la inoculación de las células tumorales en el organismo hasta el fin del experimento) es posible describirla a partir de la EGM y los datos experimentales de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 (Tópico 2.2). Para esto, la misma se divide en dos regiones bien definidas: REG-I y REG-II. La REG-I (definida antes de la aplicación de la CED) comprende el tiempo desde la inoculación de las células tumorales ( $t = 0$  días) hasta el momento en que el tumor se perturba con CED, lo cual ocurre cuando este alcanza un volumen  $V_0$  (volumen inicial seleccionado por el investigador). La REG-II (definida después de la aplicación de la CED) incluye el tiempo desde que el tumor se perturba con CED hasta el final del experimento.

Para la descripción de la cinética de crecimiento tumoral completa se sigue la siguiente metodología: primeramente se interpolan los datos experimentales que corresponden a la REG-II para cada grupo experimental, con diferentes intervalos de tiempo,  $\Delta t$  (1; 1/3; 1/8; 1/24 y 1/48 días). Luego, se reconstruye la REG-I del grupo control mediante la extrapolación de datos. En este caso, se usan los mismos valores de  $\Delta t$  (1; 1/3; 1/8; 1/24 y 1/48 días) y se tienen en cuenta los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $V_0$  que se obtienen del ajuste de los datos experimentales del grupo control con el uso de la EGM. Además, de los métodos de interpolación y extrapolación se emplean diferentes estrategias gráficas, tales como: 1) el comportamiento de la primera derivada del volumen tumoral en función del volumen del tumor y 2) el gráfico del volumen tumoral evaluado en el tiempo  $t$  ( $V(t)$ ) contra el mismo volumen evaluado en el tiempo  $(t - \Delta t)$ ,  $V((t - \Delta t))$ . Los mismos se implementan para revelar posibles procesos que no se obtienen directamente de los datos experimentales.

Para esto se introduce en la ecuación (7) el término  $\tau$ . La inclusión de  $\tau$  en esta ecuación permite que la misma se reescriba en la forma

$$V^*(t) = \begin{cases} V_o e^{\left(\frac{\alpha}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & 0 \leq t \leq \tau \\ V_o e^{\left(\frac{\alpha^*}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & \tau \leq t \leq \tau + t' \end{cases}, \quad (17)$$

donde  $\tau$  es el tiempo de retardo que representa el intervalo de tiempo desde que se inoculan las células tumorales en el hospedero hasta que el tumor sólido alcanza  $V_o$ .  $t$  es el tiempo que transcurre desde que las células tumorales se inoculan en el hospedero ( $t = 0$ ), hasta el final del experimento.  $t'$  es el tiempo que transcurre desde el momento de la aplicación de la CED, hasta el final del experimento.

Las expresiones (6)-(17) y los métodos de interpolación y extrapolación, así como las estrategias gráficas se implementan en el programa de computación Matlab®R2008a.

#### 2.4. Modelación de las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos

Para dar cumplimiento al Objetivo 3, primero se propone un modelo matemático que permite visualizar, en una cierta aproximación, las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos en un medio (el tumor) y luego se aborda esta problemática en dos medios (tumor y el tejido sano circundante), teniendo en cuenta este modelo matemático.

##### 2.4.1. Un medio de conductividad constante (tumor plano)

Si se asume que:

1. N electrodos se ubican en un arreglo elíptico de radio mayor,  $b_1$ , y de radio menor,  $b_2$ .  $b_1$  y  $b_2$  se relacionan mediante la excentricidad de la elipse ( $e$ ), según la expresión ( $b_1 = b_2 / \sqrt{1 - e^2}$ ).
2. Los electrodos son largos, de sección transversal uniforme, se insertan a través del tumor, y se representan como círculos de radio  $a$ . Esto permite considerar el potencial bidimensional

lejos de las puntas de los electrodos y por tanto es posible examinar su distribución en un plano.

3. El tumor se puede considerar como un medio de conductividad constante y como un resultado, el potencial  $\Phi_R(x,y)$  en la región completa fuera de los electrodos es la solución de la ecuación de Laplace,  $\nabla^2\Phi_R(x,y) = 0$ , donde  $\Phi_R(x,y)$  se anula en el infinito y toma los valores prescritos en las fronteras de los electrodos.
4. La variable compleja  $z = x + iy$  se introduce por las siguientes razones: a) las soluciones de la ecuación de Laplace son armónicas y por ende analíticas dentro del dominio en que se satisface la ecuación y como un resultado estas se pueden desarrollar en series de potencia. b) El análisis de las funciones complejas es notablemente diferente al de las reales, ya que las primeras permiten revelar nuevas informaciones que no se observan en el gráfico de las variables reales y estas, poseen un considerable grado de regularidad que no se encuentra generalmente en funciones de una variable real; además de hacer comentarios muy exactos sobre la conducta global y convergencia de otras funciones complejas.

#### 2.4.1.1. Solución analítica

De lo anterior, se puede considerar una función analítica compleja  $\Phi(z)$ , tal que su parte real,  $\Re_e[\Phi(z)]$ , tenga los valores prescritos en los electrodos y automáticamente satisfaga la ecuación de Laplace en la región. La solución es  $\Phi_R(x,y) = \Re_e[\Phi(z)]$  que se obtiene para una distribución de N electrodos que se distribuyen en una elipse. El potencial total es la suma de los potenciales generados por cada electrodo, dado por

$$\Phi(z) = \sum_{n=1}^N \Phi_n(z) \quad (18)$$

donde

$$\Phi_n(z) = C_n \ln\left(\frac{a}{z - z_n}\right) + \sum_{k=1}^{\infty} A_{nk} \left(\frac{a}{z - z_n}\right)^k \quad (18a)$$

con

$$z_n = r_n e^{i\varphi_n}, \quad (18b)$$

$$r_n = \sqrt{b_1^2 \cos^2(\varphi_n) + b_2^2 \sin^2(\varphi_n)}, \quad (18c)$$

$$\varphi_n = (n-1)\theta \quad (18d)$$

$\Phi_n(z)$  es el potencial que genera el  $n$ -ésimo electrodo,  $r_n$  es la distancia desde el centro del arreglo elíptico de electrodos hasta el  $n$ -ésimo.  $\varphi_n$  es la posición angular del  $n$ -ésimo electrodo respecto al radio mayor (eje x) y  $\theta$  es la separación angular entre dos electrodos adyacentes.

En la ecuación (18a), el primer término es el potencial que genera una fuente monopolar y los términos con  $k = 1; 2; \dots$ , corresponden a los momentos dipolar, cuadrupolar, etc, de la distribución de cargas desigual en el  $n$ -ésimo electrodo, se definen por Dev y cols. [136]. Para  $b_1 \geq b_2 > a$ , el efecto de estos términos decrece muy rápidamente con  $k$  y de esta forma se obtiene una buena aproximación con solo dos términos.

A partir de las ideas de Dev y cols. [136] se puede establecer que el potencial de orden cero,  $\Phi^0(z)$ , que generan  $N$  electrodos que atraviesan completamente el tumor, está dado por:

$$\Phi^0(z) = \sum_{n=1}^N C_n \ln \left( \frac{a}{z - z_n} \right) \quad (19)$$

$C_n$  en la ecuación (19) son constantes que se determinan a partir de las condiciones de frontera, las cuales se pueden calcular mediante el siguiente sistema de ecuaciones lineales

$$V_j = \sum_{\substack{n=1 \\ j \neq n}}^N C_n \ln \left| \frac{a}{z_{jn} + ae^{i\varphi}} \right|, \quad (20)$$

donde  $V_j$  es el potencial en el  $j$ -ésimo electrodo y  $z_{jn} = |z_j - z_n|$ . Aquí, la posición de cualquier punto en esta frontera (contorno del  $j$ -ésimo electrodo) se puede especificar como  $z = z_j + ae^{i\varphi_j}$  y como un resultado  $z - z_n = z_{jn} + ae^{i\varphi_j}$ . Si se cumple  $z_{jn} > ae^{i\varphi_j}$ , entonces  $z_j - z_n = z_{jn}$  ya que  $ae^{i\varphi_j}$  se desprecia con respecto a  $z_{jn}$ .

Derivando la ecuación (19) con respecto a  $z$ , se obtiene la aproximación de orden cero para la intensidad del campo eléctrico  $E^0(z)$ , dada por:

$$E^0(z) = \sum_{n=1}^N C_n \left( \frac{1}{z - z_n} \right) \quad (21)$$

La corrección de primer orden a la solución incluye los términos del momento dipolar (es decir, los términos de la suma en la ecuación (18a) correspondiente a  $k = 1$ ) y se desprecian

los términos de orden superior del desarrollo (18a). Entonces, la solución que incluye los términos de orden cero y primer orden, denominado  $\Phi^1(z)$ , es

$$\Phi^1(z) = \sum_{n=1}^N C_n \ln\left(\frac{a}{z - z_n}\right) + a \sum_{n=1}^N \frac{A_{n1}}{z - z_n} \quad (22)$$

Los coeficientes  $A_{n1}$  se determinan a partir del potencial constante prescrito en la superficie de los electrodos. Aquí se muestra en detalle el cálculo de  $A_{j1}$  ( $j = 1; \dots; N$ ). El potencial en un punto de la superficie del electrodo  $j$ , es decir, en  $z = z_j + ae^{i\varphi_j}$ , es

$$\Phi^1(z_j + ae^{i\varphi_j}) = \sum_{n=1}^N C_n \ln\left(\frac{a}{z_{jn} + ae^{i\varphi_j}}\right) + \sum_{n=1}^N A_{n1} \frac{a}{z_{jn} + ae^{i\varphi_j}} \quad (23)$$

los  $A_{j1}$  se determinan a partir de las condiciones de frontera

$$\Re_e \left[ \sum_{n=1}^N A_{j1} \frac{a}{z_{jn} + ae^{i\varphi_j}} \right] = 0, \text{ para todo } \varphi_j \quad (24)$$

La expresión (24) se obtiene si se tiene en cuenta que  $\ln(z_{jn} + ae^{i\varphi_j}) \approx \ln z_{jn} + (ae^{i\varphi_j} / z_{jn})$  y  $\Re_e [A_{j1} e^{-i\varphi_j}] = \Re_e [A_{j1}^* e^{i\varphi_j}]$ .

Con todos los coeficientes determinados se resuelve el sistema de ecuaciones lineales homogéneas (24), la expresión exacta de la intensidad del campo eléctrico en orden uno,  $E^1(z)$  se puede calcular diferenciando la ecuación (24) con respecto a  $z$ , dada por:

$$E^1(z) = \sum_{n=1}^N \frac{C_n}{z - z_n} + a \sum_{n=1}^N \frac{A_{n1}}{(z - z_n)^2} \quad (25)$$

Las unidades del potencial (ecuaciones (19) y (22)) y de la intensidad del campo eléctrico (ecuaciones (21) y (25)) son dadas en V y V/m, respectivamente.

La factorización triangular general del método de Gauss se usa para resolver los sistemas de ecuaciones lineales (20) y (24) por ser cuadrados [152-154].

La comparación entre las diferencias de  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$ , y  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$  en función de sus parámetros se hace mediante el uso de dos criterios para cada valor de  $\epsilon$ : la Distancia máxima ( $D_{\text{máx}}$ ) y el Error de la Raíz Media Cuadrática (RMSE, del inglés Root Mean Square Error), entre el  $i$ -ésimo valor calculado en la corrección de primer orden ( $F_i$ ) y el  $i$ -ésimo valor

calculado en la aproximación de orden cero ( $G_i$ ) para el potencial (la intensidad del campo eléctrico), dadas por:

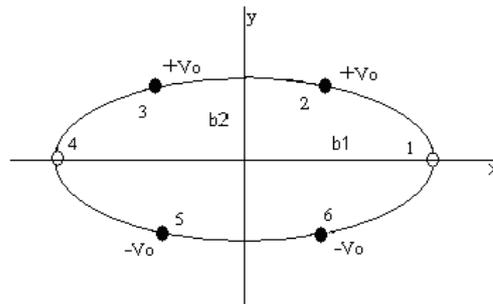
$$D_{m\acute{a}x} = \text{m\acute{a}x}|F_i - G_i| \quad (26)$$

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^M \frac{(F_i - G_i)^2}{M}} \quad (27)$$

donde  $M$  es el número de puntos interiores al arreglo de electrodos.  $RMSE$  es adimensional y se usa frecuentemente para estimar la diferencia entre los valores pronosticados por un modelo y aquellos observados. También,  $RMSE$  es muy útil cuando los errores grandes no se desean.

$D_{m\acute{a}x}$  [ecuación (26)] y  $RMSE$  [ecuación (27)] además se usan para comparar las distribuciones del potencial y el campo eléctrico en la aproximación de orden cero generado por un arreglo elíptico de electrodos y uno circular. En este caso,  $F_i$  y  $G_i$  son los  $i$ -ésimos valores calculados para el potencial (intensidad del campo eléctrico) generado por un arreglo elíptico de electrodos y uno circular, respectivamente.

En este estudio se usa una configuración de seis electrodos equidistantes en una elipse (Figura 3) para comparar las distribuciones del potencial y el campo eléctrico en ambas aproximaciones generadas por los electrodos ubicados en los arreglos elíptico y circular. Como  $e$  varía de 0 (caso circular) a 0,99, si  $b_2 = 5$  mm,  $b_1$  varía de 5 a 35,44 mm. Los otros parámetros son fijos:  $a = 0,215$  mm,  $V_o = 0,5$  V y  $\theta = 60^\circ$ . Los electrodos 2 y 3 se mantienen a potencial  $+V_o$ , los electrodos 5 y 6 a  $-V_o$ , y los electrodos 1 y 4 a cero.



**Figura 3.** Arreglo de seis electrodos de radio  $a$  colocados de forma equidistante en una elipse de radio mayor  $b_1$  y radio menor  $b_2$ . Los círculos negros representan las secciones transversales de los electrodos activos, que se mantienen a potenciales  $+V_o$  (electrodos 2 y 3) o  $-V_o$  (electrodos 5 y 6), y los círculos blancos representan las secciones transversales de los electrodos que se mantienen en potencial cero (electrodos 1 y 4).

### 2.4.1.2. Solución numérica

Se desarrolla el programa de computación ONCOMAPET<sup>®</sup> para plotear las distribuciones de las magnitudes del potencial y la intensidad de campo eléctrico, que se obtienen a partir de las soluciones analíticas (19; 21; 22 y 25). También, en este programa se implementan las fórmulas de  $D_{\text{máx}}$  [ecuación (26)] y RMSE [ecuación (27)], y el método de las diferencias finitas para estimar numéricamente estas dos magnitudes físicas. ONCOMAPET<sup>®</sup> se ejecuta en una PC de 512 Mb de memoria RAM y 3 Gb de microprocesador. El tiempo de cálculo es de 3 horas aproximadamente.

El método de las diferencias finitas es un método numérico básico para resolver ecuaciones diferenciales parciales y este se basa en la sustitución de la derivada por un cociente de diferencias. Los métodos que aproximan las derivadas como cocientes de diferencias se pueden usar para resolver problemas de valores de frontera de segundo orden, como la ecuación de Laplace sujeta a condiciones de frontera prescritas. Esta ecuación se resuelve para un cuadrado de lado  $D_{\text{exterior}}$  ( $4b_1$  y  $6b_1$ ) y se discretiza para reemplazar las segundas derivadas parciales por las diferencias finitas, dadas por

$$\left( \frac{\partial^2 \Phi}{\partial^2 x} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial^2 y} \right) \Big|_{i,j} = \frac{\Phi_{i+1,j} - 2\Phi_{i,j} + \Phi_{i-1,j}}{h^2} + \frac{\Phi_{i,j+1} - 2\Phi_{i,j} + \Phi_{i,j-1}}{h^2} \quad (28)$$

El método de las diferencias finitas considera una malla regular en la región de interés y aproxima la ecuación de Laplace en cada punto de la malla. Las ecuaciones resultantes se resuelven por iteración. El Método de gradiente conjugado [152-154] se usa para resolver el sistema de ecuaciones. Este método considera una malla bidimensional de puntos, cada uno separados a una distancia  $h$  de sus cuatro vecinos más cercanos, y el potencial en una posición  $(x,y)$  es  $\Phi(x,y)$ . En la ecuación (31),  $\Phi_{i+1,j}$ ,  $\Phi_{i,j}$ ,  $\Phi_{i-1,j}$ ,  $\Phi_{i,j+1}$  y  $\Phi_{i,j-1}$  son los valores de  $\Phi(x,y)$  en los puntos  $(i+1,j)$ ,  $(i,j)$ ,  $(i-1,j)$ ,  $(i,j+1)$  y  $(i,j-1)$ , respectivamente, establecidos para la ecuación de Laplace. Se conoce que si  $\Phi(x,y)$  satisface la ecuación de Laplace, entonces  $\Phi(x,y)$ , en cualquier punto del dominio  $D$ , es el promedio del valor de  $\Phi(x,y)$  en los cuatro puntos circundantes. Este es el punto de partida y la base del método iterativo.  $H = R_{\text{exterior}}/K$  ( $R_{\text{exterior}} = D_{\text{exterior}}/2$ ). Los valores de  $R_{\text{exterior}}$  que se utilizan son  $2b_1$  y  $3b_1$ . El programa se ejecuta para una malla de  $1\,000 \times 1\,000$  ( $K = 1\,000$ ). Las condiciones de frontera de Dirichlet son dadas como datos. Para las condiciones de frontera el modelo prescrito es bueno y el error máximo es 0,00001. También, las dimensiones de los electrodos y del arreglo son las

mismas que las que se usan en la solución analítica. Las superficies de los electrodos se representan como círculos y se les asignan las condiciones de frontera de Dirichlet con un potencial constante de 0,5 o  $-0,5$  V para los cuatro electrodos activos y 0 V para los dos electrodos restantes.

$D_{\text{máx}}$  [ecuación (26)] y RMSE [ecuación (27)] se usan también para cuantificar la diferencia entre las soluciones analítica y numérica para el potencial y la intensidad del campo eléctrico dentro del arreglo de electrodos como una función de  $e$  y la posición a lo largo de tres regiones diferentes: 1) región entre los electrodos 2 y 6; 2) región entre los electrodos del centro del arreglo; y 3) región entre los electrodos 2 y 3. En este caso  $F_i$  y  $G_i$  son los valores del potencial (intensidad de campo eléctrico) en el  $i$ -ésimo cálculo que se obtiene para la solución numérica ( $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  y  $3b_1$ ) y la solución analítica, respectivamente.

La norma euclidiana se utiliza para cuantificar la dependencia de las distribuciones de potencial e intensidad del campo eléctrico en función de cada uno de sus parámetros.

#### 2.4.2. Dos medios (tumor plano y el tejido sano circundante)

La expansión multipolar [ecuación (18)] no tiene en cuenta la diferencia de conductividad eléctrica entre el tumor y el tejido sano circundante, hecho que se reporta de forma experimental [16, 32, 102]. En este caso, la visualización de las distribuciones de densidad de corriente eléctrica en estas dos regiones planas con diferentes conductividades eléctricas es posible si se tiene en cuenta las ecuaciones (19), (21), (22) y (25) y las siguientes consideraciones:

1. Existe un medio conductivo heterogéneo formado por dos regiones isotrópicas, lineales homogéneas, separadas por la frontera  $\Gamma_{21}$ : región 1 (tejido tumoral) con una conductividad constante  $\sigma_1$ , en S/m, y región 2 (tejido sano circundante) con una conductividad constante  $\sigma_2$ , en S/m, como se muestra en la figura 4. Esto se justifica a partir de hechos experimentales que demuestran que la conductividad eléctrica de un tumor sólido es mayor que la del tejido sano circundante [77, 138-140, 151].
2. Los tumores sólidos son planos y elípticos si se tiene en cuenta la forma clínica que presentan algunos tumores como: carcinoma basocelular de la piel, linfoma cutáneo, cáncer gástrico en su forma de delinitis, y melanoma en su extensión clínica superficial. También, se considera que el tejido sano circundante es un plano infinito porque sus dimensiones son

mucho mayores que las del tumor sólido. Estas dos consideraciones permiten el uso del formulismo bidimensional que se propone en el tópico 2.4.1, para visualizar la distribución de la densidad de corriente eléctrica en un plano que contiene las regiones 1 y 2. Se fijan el tamaño del tumor: 5 mm de radio menor y para los valores de  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$ , los valores de su radio mayor son 5; 9,492 y 35,444 mm, respectivamente.

3. La forma elíptica y excentricidad del arreglo de electrodos coincide con las del tumor sólido.
4. Los campos y cargas no varían en el tiempo.
5. El campo magnético que se origina por la corriente eléctrica se desprecia, y por consiguiente, la reacción de este con la corriente.
6. El aumento de la temperatura ( $\leq 0,6$  °C) que se observa en los tumores tratados con CED no induce en estos un calentamiento significativo. Esto se verifica de forma experimental por Miklavčič y cols. [133].
7. La densidad de corriente eléctrica inherente a los tumores sólidos es considerablemente menor que la que genera el arreglo elíptico de electrodos [17, 20, 133]. Esta consideración se satisface en la práctica [32, 77].

Estas consideraciones indican que en  $\Gamma_{21}$ , se satisfacen ciertas condiciones de frontera que se obtienen de las ecuaciones de Maxwell. De acuerdo con la consideración 1, la ecuación Laplace para el potencial ( $\Phi$ ) se aplica a todos los puntos en el medio. Las condiciones de frontera en la superficie que separa las regiones 1 y 2 [153, 154] están dadas por

$$J_{1n} - J_{2n} = \sigma_1 E_{1n} - \sigma_2 E_{2n} = \frac{\partial \rho_s}{\partial t} \quad (29)$$

$$\frac{J_{t2}}{\sigma_2} = \frac{J_{t1}}{\sigma_1} (E_{t2} = E_{t1}) \quad (30)$$

$$\begin{cases} \Phi_1 = \Phi_2 \\ \sigma_1 \frac{\partial \Phi_1}{\partial n} = \sigma_2 \frac{\partial \Phi_2}{\partial n} \end{cases} \quad (31)$$

donde  $\rho_s$  es la densidad de carga superficial total en  $\Gamma_{21}$  incluyendo las cargas “libres”, impuestas externamente y las cargas de polarización.  $\partial \rho_s / \partial t$  es la distribución de la densidad de carga total superficial en el tiempo,  $t$ , en  $\Gamma_{21}$ .  $J_{1n}$  y  $J_{1t}$  son las componentes normal y tangencial a la superficie del vector densidad de corriente eléctrica en la región 1,

respectivamente.  $J_{2n}$  y  $J_{2t}$  son esas magnitudes, pero en la región 2.  $E_{1n}$  y  $E_{1t}$  son las componentes normal y tangencial a la superficie del vector intensidad del campo eléctrico en la región 1, respectivamente.  $E_{2n}$  y  $E_{2t}$  son esas magnitudes pero en la región 2.  $\Phi_1$  y  $\partial\Phi_1/\partial n$  son el potencial y la derivada del potencial tangencial en la región 1, respectivamente.  $\Phi_2$  y  $\partial\Phi_2/\partial n$  son esas magnitudes, pero en la región 2. La unidad normal a la superficie ( $\vec{n}_{21}$ ) se dirige de la región 1 a la región 2.

La ecuación (29) expresa que la componente normal de la densidad de corriente eléctrica es discontinua por una cantidad exactamente igual a  $\partial\rho_s/\partial t$ . La ecuación (30) indica que la presencia de conductividad no altera la conducta de las componentes tangenciales del campo eléctrico. La ecuación (31) indica que la continuidad de las derivadas normales de los potenciales es equivalente a la continuidad del propio potencial.

El término  $\partial\rho_s/\partial t$  en la ecuación (29) es cero si se tiene en cuenta la consideración 4, hecho que se puede asumir en una primera aproximación porque en los estudios preclínicos y clínicos no existe evidencia experimental ni teórica que justifique que  $\rho_s$  varía con  $t$  en  $\Gamma_{21}$  cuando se aplica la CED. Como un resultado, la densidad de corriente eléctrica es continua a través de esta interfase, que es  $J_{2n} = J_{1n}$  ( $E_{2n}/E_{1n} = \sigma_1/\sigma_2$ ), donde  $\sigma_1/\sigma_2$  es la relación entre las conductividades del tumor y su tejido sano circundante. La densidad de corriente eléctrica en ambas regiones se puede calcular analíticamente mediante la Ley de Ohm y las ecuaciones (21) y (25), dada por

$$\begin{cases} J_i^0(x, y) = \sigma_i E_{ni}^0(x, y) \\ J_i^1(x, y) = \sigma_i E_{ni}^1(x, y) \end{cases} \quad (32)$$

donde  $i$  indica si la región es 1 ( $i = 1$ ) o 2 ( $i = 2$ ).  $E_{ni}^0(x, y)$  y  $E_{ni}^1(x, y)$  son las componentes normales de la parte real de las ecuaciones (21) y (25), en cada región, respectivamente.  $J_i^0(x, y)$  es la densidad de corriente eléctrica de orden principal y  $J_i^1(x, y)$  el término de primera corrección en ambas regiones. Se utiliza el Sistema Internacional de unidades. Las unidades de  $b_1$ ,  $b_2$  y  $a$ , dadas en milímetros (mm), se convierten en metros (m). La unidad de  $J^0(x, y)$  y  $J^1(x, y)$  es el A/m<sup>2</sup>. La unidad para la conductividad eléctrica es el S/m.

La configuración de electrodos insertada en  $\Gamma_{21}$ , se denomina Configuración 1 y se utiliza como referencia. Esto garantiza que cuando los electrodos se insertan exactamente en  $\Gamma_{21}$ , los radios mayor y menor del tumor son exactamente iguales a  $b_1$  y  $b_2$ , respectivamente

(Figura 4a). En el tópico 2.4.1 se usa la Configuración 1 con  $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$ ,  $a = 0,215$  mm;  $\theta = 60^\circ$ ;  $b_2 = 5$  mm;  $V_o = 0,5$  V; los electrodos 2 y 3 mantienen el potencial  $+V_o$ ; los electrodos 5 y 6 a  $-V_o$ ; y los electrodos 1 y 4 a cero (Figura 4a). Si se tiene en cuenta la consideración 3 y los tres valores representativos de  $e$  (0; 0,85 y 0,99), los valores de  $b_1$  son 5; 9,492 y 35,444 mm, respectivamente.

#### 2.4.2.1. Criterios para la diferenciación entre las distribuciones de densidad de corriente eléctrica

Para cuantificar las diferencias entre las distribuciones de densidad de corriente eléctrica para  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  y los diferentes valores de  $e$ , relación de  $\sigma_1/\sigma_2$  y Configuraciones 1; 2 y 3, se emplean  $D_{\text{máx}}$  (en  $A/m^2$ ) y RMSE (en  $A/m^2$ ), expuestos en el tópico 2.4.1. En este caso,  $M$  en la ecuación (27) es el número de puntos que se mantienen en una región elíptica dentro de las Configuraciones 1; 2 y 3, que se denominan  $R_1$ . Si se tiene en cuenta la consideración 3, para los tres valores de  $e$  arriba mencionados y el radio menor de  $R_1$  fijo en 3 mm, los valores de su radios mayores son 3 mm (para  $e = 0$ ); 5,695 mm (para  $e = 0,85$ ); y 21,261 mm (para  $e = 0,99$ ).

#### 2.4.2.2. Diferenciación de las distribuciones $J^0(x,y)$ y $J^1(x,y)$

Este estudio permite demostrar analíticamente si existen diferencias significativas entre las distribuciones  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  con el objetivo de conocer cual es la contribución a los términos de corrección de orden principal y primer orden en la expansión multipolar.  $D_{\text{máx}}$  [ecuación (26)] y RMSE [ecuación (27)] se utilizan para calcular las diferencias, entre las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$ , para cada valor de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y  $e$ , aunque los resultados se muestran solamente para  $e = 0$ ; 0,85 y 0,99; las Configuraciones 1; 2 y 3 y la relación  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10. En este caso,  $G_i$  es el  $i$ -ésimo valor calculado de  $J^0(x,y)$  y  $F_i$  son aquellos para  $J^1(x,y)$ .

### 2.4.2.3. Influencia de la relación $\sigma_1/\sigma_2$ sobre la distribución de densidad de corriente eléctrica

Este estudio permite comprender si es conveniente en el orden terapéutico diferenciar el tumor de su tejido sano circundante desde el punto de vista eléctrico. Con el objetivo de evaluar la influencia de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  en las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  en las regiones 1 y 2, la Configuración 1 se toma como referencia y en este trabajo se varía la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  entre 1 y 10, teniendo en cuenta los resultados que se reportan en [77, 139], para un valor dado de  $\sigma_2$ . Este estudio se lleva a cabo para cada valor de  $e$ , aunque los resultados sólo se muestran para  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$ , Configuraciones 1; 2 y 3, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10.

Es importante señalar que aunque la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  se varía entre 1 y 10, se muestran los resultados para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10 con el fin de simular la distribución de la corriente eléctrica en el tumor, para los casos en que este se diferencia y no se diferencia del tejido sano circundante, respectivamente. El primer caso puede corresponder a un tumor diferenciado (menos agresivo) mientras que el segundo caso, a un tumor indiferenciado (más agresivo) [1]. Este hecho se puede argumentar porque existe una relación estrecha entre los parámetros bioeléctricos y fisiológicos de los tejidos [139].

$D_{\text{máx}}$  [ecuación (26)] y RMSE [ecuación (27)] también se emplean para calcular las diferencias encontradas al comparar las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para diferentes valores de  $\sigma_1/\sigma_2$ , con respecto a  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ . En este caso,  $G_i$  son los *i-ésimo* valores calculados de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  ( $\sigma_1 = \sigma_2 = 1$  S/m), y  $F_i$  son aquellos para  $\sigma_1/\sigma_2 \neq 1$  ( $\sigma_1$  varía entre 2 y 10 S/m y  $\sigma_2 = 1$  S/m).

### 2.4.2.4. Influencia del posicionamiento del arreglo de electrodos, respecto a $\Gamma_{21}$ , sobre la distribución de la densidad de corriente eléctrica

Este estudio permite demostrar si en la planificación terapéutica es conveniente insertar los electrodos dentro, en o fuera de  $\Gamma_{21}$ . La Configuración 1 también se toma como referencia y se discuten dos configuraciones elípticas de electrodos adicionales: el arreglo de electrodos elíptico colocado dentro de  $\Gamma_{21}$ , que se denomina Configuración 2 (Figura 4b) o fuera de  $\Gamma_{21}$ , que se denomina Configuración 3 (Figura 4c). Este estudio se realiza para cada valor de  $e$  y relación de  $\sigma_1/\sigma_2$ , aunque los resultados sólo se muestran para  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$  y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10.

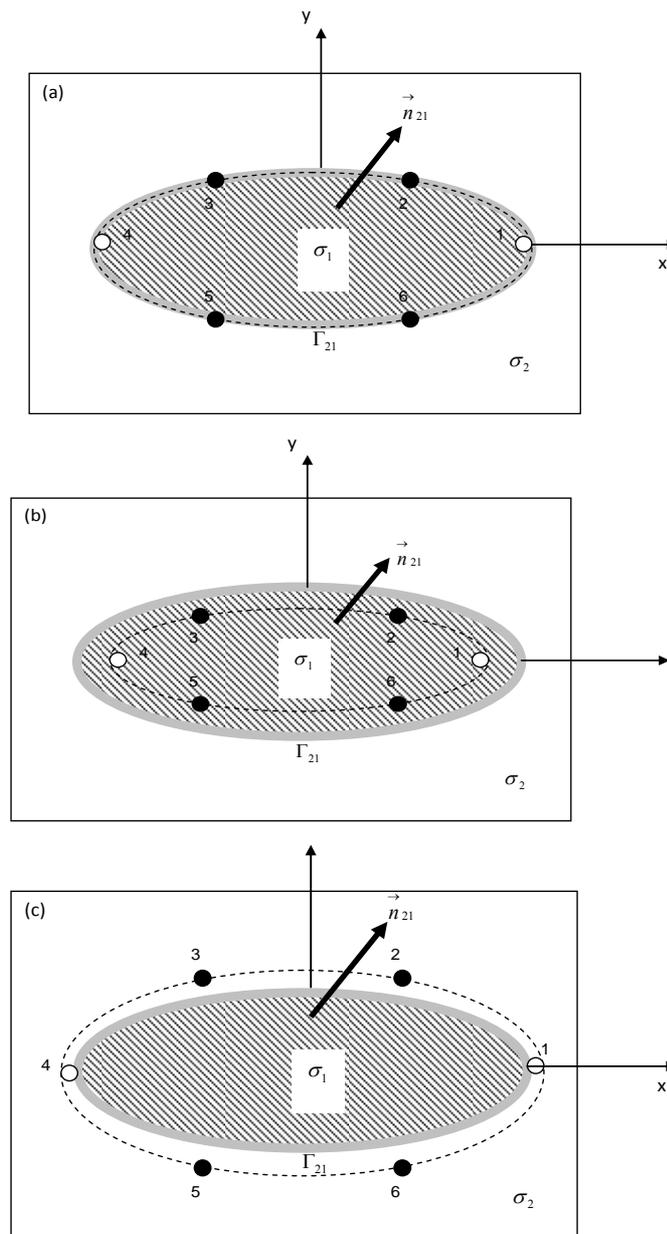
Para las Configuraciones 2 y 3, los parámetros de  $e$ ,  $a$ ,  $\theta$ ,  $V_o$  y la polaridad de los electrodos 1-6 son los mismos de la Configuración 1. Para la Configuración 2 se fija  $b_2$  en 4 mm y para  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$  sus respectivos valores de  $b_1$  son 4; 7,593; y 28,355 mm si se tiene en cuenta la consideración 3. Para la Configuración 3, se usa  $b_2 = 6$  mm; y para  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$  los valores de  $b_1$  son 6; 11,390; y 45,532 mm, respectivamente. La Configuración 2 garantiza que los electrodos estén completamente insertados dentro del tumor y la Configuración 3 garantiza que los electrodos estén completamente insertados fuera del tumor.

$D_{\text{máx}}$  [ecuación (26)] y RMSE [ecuación (27)] se usan para cuantificar las diferencias encontradas en las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  cuando se comparan las Configuraciones 2 y 3, con respecto a la Configuración 1. En este caso,  $G_i$  son los *i-ésimos* valores calculados de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  generados por la Configuración 1, y  $F_i$  son aquellos para la Configuración 2 (Configuración 3), para diferentes valores de  $\sigma_1/\sigma_2$ .

La norma euclidiana se utiliza para cuantificar la dependencia de las distribuciones de potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica en función de cada uno de sus parámetros.

Para la visualización y comparación de las distribuciones de la densidad de corriente eléctrica en función de  $e$ , relación de  $\sigma_1/\sigma_2$ , y Configuraciones 1; 2 y 3, las ecuaciones (19), (21), (22), (25)-(28), la condición  $J_{2n} = J_{1n}$  y la norma euclidiana se implementan en el programa de computación ONCOMAPET<sup>®</sup>, mediante el uso del programa de computación Matlab<sup>®</sup>R2008a.

CAPÍTULO 2: Métodos Experimentales y Teóricos



**Figura 4.** Arreglo de seis electrodos de radio  $a$  que se colocan equidistantemente en una elipse de radio mayor  $b_1$  y de radio menor  $b_2$ . Los electrodos se insertan en: (a) la interfase tumor-tejido sano circundante  $\Gamma_{21}$  (Configuración 1), (b) dentro  $\Gamma_{21}$  (Configuración 2), y (c) fuera  $\Gamma_{21}$  (Configuración 3).  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  representan las conductividades del tumor y el tejido sano circundante, respectivamente.  $\vec{n}_{21}$  es el vector unitario normal a la superficie y dirigido del medio 1 al 2. Los círculos negros representan las secciones transversales de los electrodos activos, que se mantienen a potenciales  $+V_o$  (electrodos 2 y 3) ó  $-V_o$  (electrodos 5 y 6), y los círculos blancos representan las secciones transversales de los electrodos a potencial cero (electrodos 1 y 4).

## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

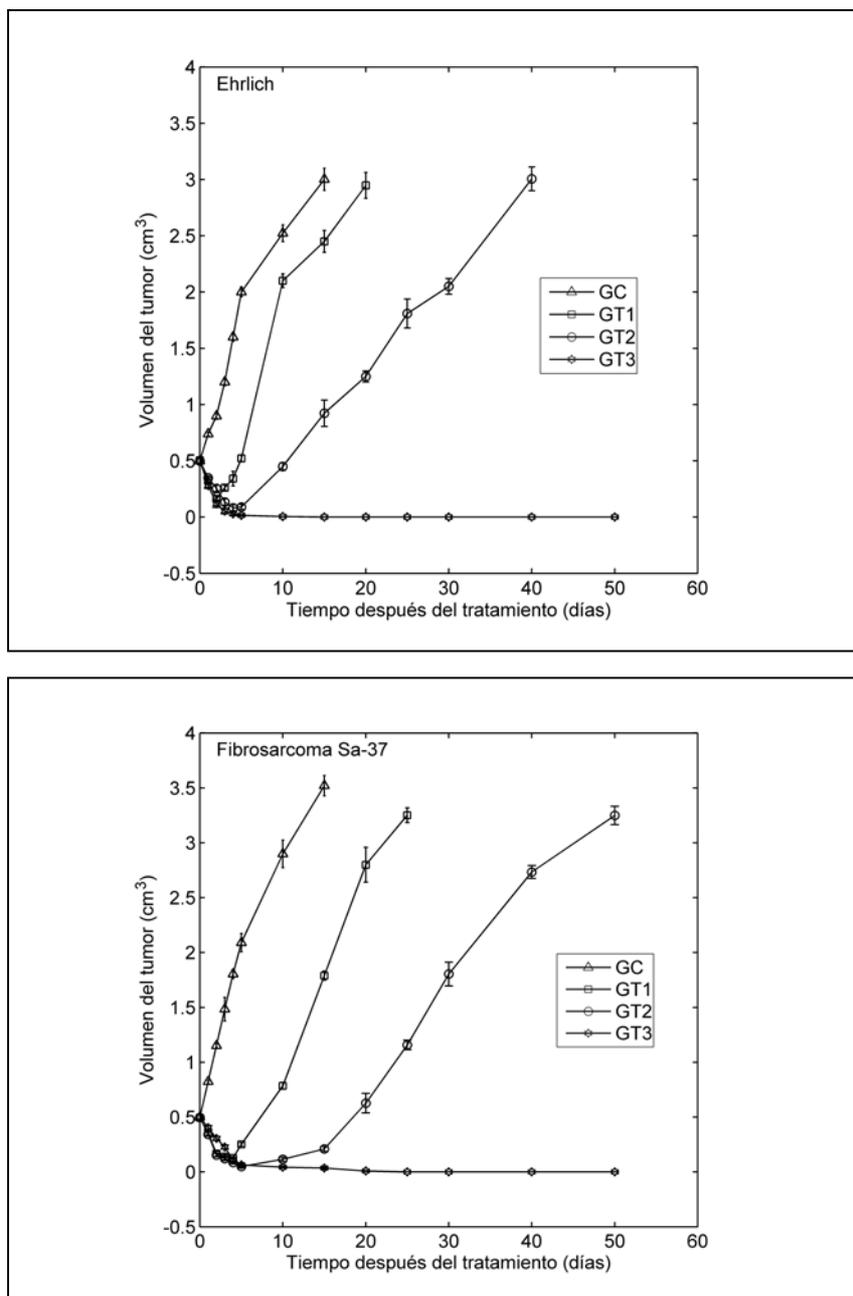
### 3.1. Resultados

#### 3.1.1. Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 tratados con diferentes intensidades de la corriente eléctrica directa

La figura 5 muestra la comparación de los crecimientos de los volúmenes de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, 24 horas después de la aplicación de diferentes intensidades de CED, en relación con sus grupos controles. En las tablas 1 y 2 se representan las medias y sus correspondientes desviaciones estándar de los tiempos de doblaje (TD, en días) y los valores absolutos de los porcentajes de regresión, PR, ecuación (5), de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 para sus correspondientes grupos experimentales, respectivamente. Estas tablas y la figura 5 evidencian que los volúmenes de estos dos tipos de tumores tratados con CED son inhibidos significativamente con respecto a aquellos no tratados ( $P = 0,02$ ). Para cada tumor, en cada ratón, se observa esta inhibición de su crecimiento post-tratamiento ( $P = 0,008$ ). También se observa que la electrosensibilidad de ambos tipos de tumores aumenta con el incremento de la intensidad de la CED, siendo más marcada para el tumor fibrosarcoma Sa-37. La remisión completa del tumor de Ehrlich se obtiene a los 25 días después del tratamiento para la dosis de 17,0 mA durante 45 min ( $92 \text{ C/cm}^3$ ); sin embargo, la del tumor fibrosarcoma Sa-37 se observa a los 15 días post-tratamiento para 14,8 mA durante 45 min ( $80 \text{ C/cm}^3$ ).

En la figura 6 se representan las razones de supervivencia de los ratones BALB/c portadores de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, divididos en sus correspondientes grupos experimentales. Las mismas son significativamente mayores para los ratones tratados con CED con respecto a las de sus controles en ambos tipos de tumores. Esta figura muestra que las razones de supervivencia son 80 % (8/10) para el tumor de Ehrlich (GT1-3) y 90 % (9/10) para el tumor fibrosarcoma Sa-37 (GT2-3). Los ratones curados se sacrifican a los 100 días post-tratamiento. Antes del sacrificio, los animales están activos y en buenas condiciones físicas con el peso corporal adecuado; además tienen conducta y apariencia normales. Después del sacrificio, los hallazgos histopatológicos de los tumores en cada ratón muestran necrosis completa.

### CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 5.** Efecto de la CED en las curvas de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 para cada subgrupo experimental. Los datos se representan por sus medias  $\pm$  errores estándar de la media (barras verticales). Para el tumor de Ehrlich, GC, GT1, GT2 y GT3 se corresponden con los subgrupos experimentales GC1, GT1-1, GT1-2 y GT1-3, respectivamente. Para el tumor fibrosarcoma Sa-37, GC, GT1, GT2 y GT3 se corresponden con los subgrupos experimentales GC2, GT2-1, GT2-2 y GT2-3, respectivamente.

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 1.** Tiempo de doblaje (TD) de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa 37, por subgrupo experimental, antes y después de la aplicación de la CED

Parámetros	Tumor de Ehrlich				Tumor fibrosarcoma Sa-37			
	GC1	GT1-1	GT1-2	GT1-3	GC2	GT2-1	GT2-2	GT2-3
TD <sup>1</sup>	2,4 ± 0,3	6,8 ± 0,7	16,9 ± 2,4	∞ <sup>3</sup>	1,6 ± 0,2	11,2 ± 1,3	23,6 ± 3,8	∞ <sup>3</sup>
$\frac{TD_{GT}}{TD_{GC}}$ <sup>2</sup>	-	2,9	7,1	∞ <sup>3</sup>	-	7,0	14,9	∞ <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Los datos (n = 10) son las medias ± desviaciones estándar.

<sup>2</sup> $\frac{TD_{GT}}{TD_{GC}}$  representa el coeficiente que caracteriza el retardo del crecimiento del tumor en cada

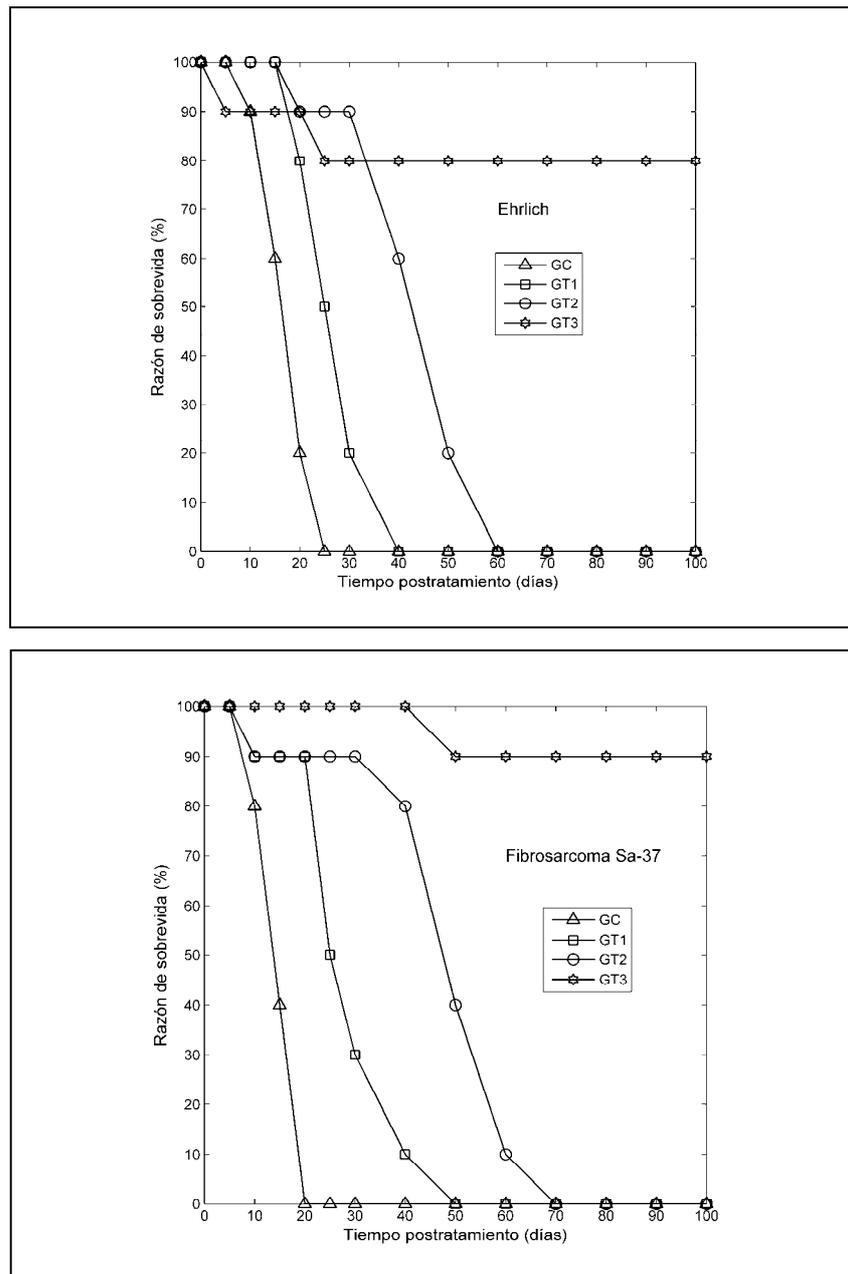
grupo tratado (TD<sub>GT</sub>) con respecto a su grupo control (TD<sub>GC</sub>) para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37.

<sup>3</sup> El símbolo ∞ significa que el tiempo de doblaje es infinito (ver resultados).

**Tabla 2.** Media del porcentaje de regresión (PR) de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa- 37 tratados con CED para cada subgrupo experimental

Porcentaje de regresión	Tumor de Ehrlich			Tumor fibrosarcoma Sa-37		
	GT1-1	GT1-2	GT1-3	GT2-1	GT2-2	GT2-3
PR (%)	69,4	85,9	100	74,1	89,9	100

### CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

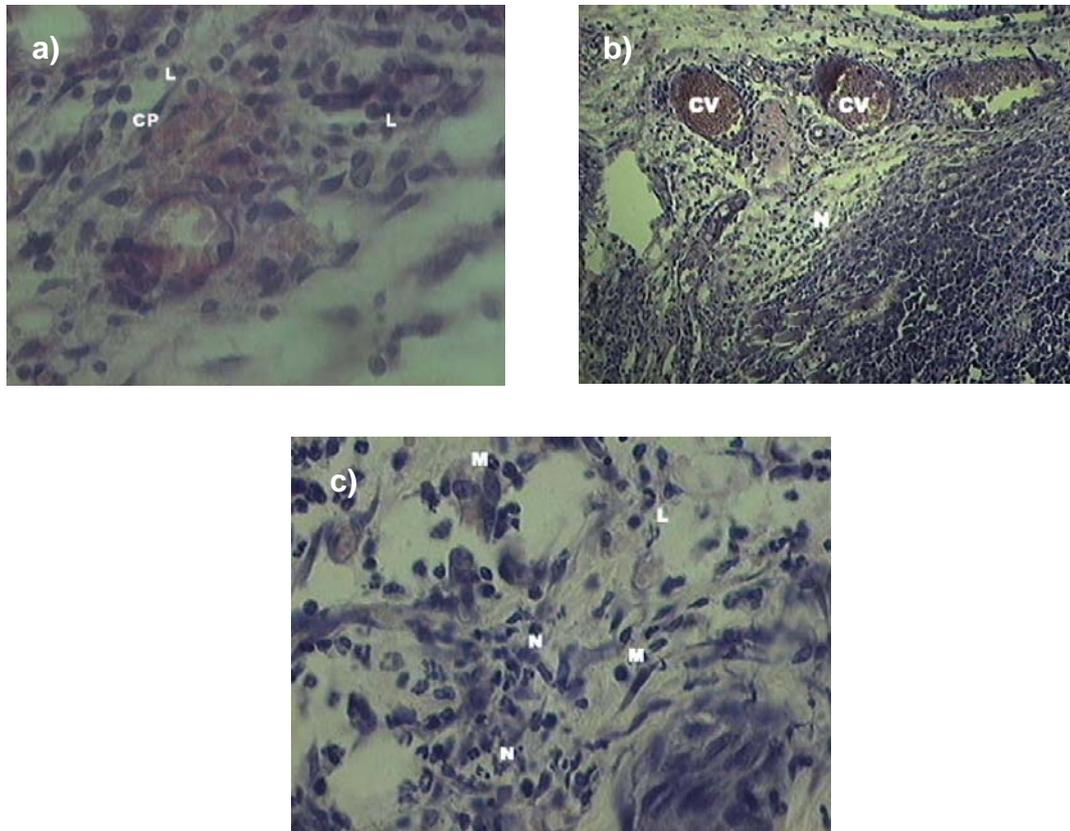


**Figura 6.** Razones de supervivencia en los ratones BALB/c portadores de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 para cada subgrupo experimental. Para el tumor de Ehrlich, GC, GT1, GT2 y GT3 se corresponden con los subgrupos experimentales GC1, GT1-1, GT1-2 y GT1-3, respectivamente. Para el tumor fibrosarcoma Sa-37, GC, GT1, GT2 y GT3 se corresponden con los subgrupos experimentales GC2, GT2-1, GT2-2 y GT2-3, respectivamente.

En las figuras 8a y 8b se muestran las cinéticas de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 no tratado (GC) y tratado con CED (GT2-2,3) para las réplicas 1 y 2, respectivamente. La remisión completa de este tipo de tumor para 14,8 mA durante 45 minutos ( $80 \text{ C/cm}^3$ ) se observa a partir de los 15 y 20 días para las Réplicas 1 (GT2-3R1) y 2 (GT2-3R2), respectivamente.

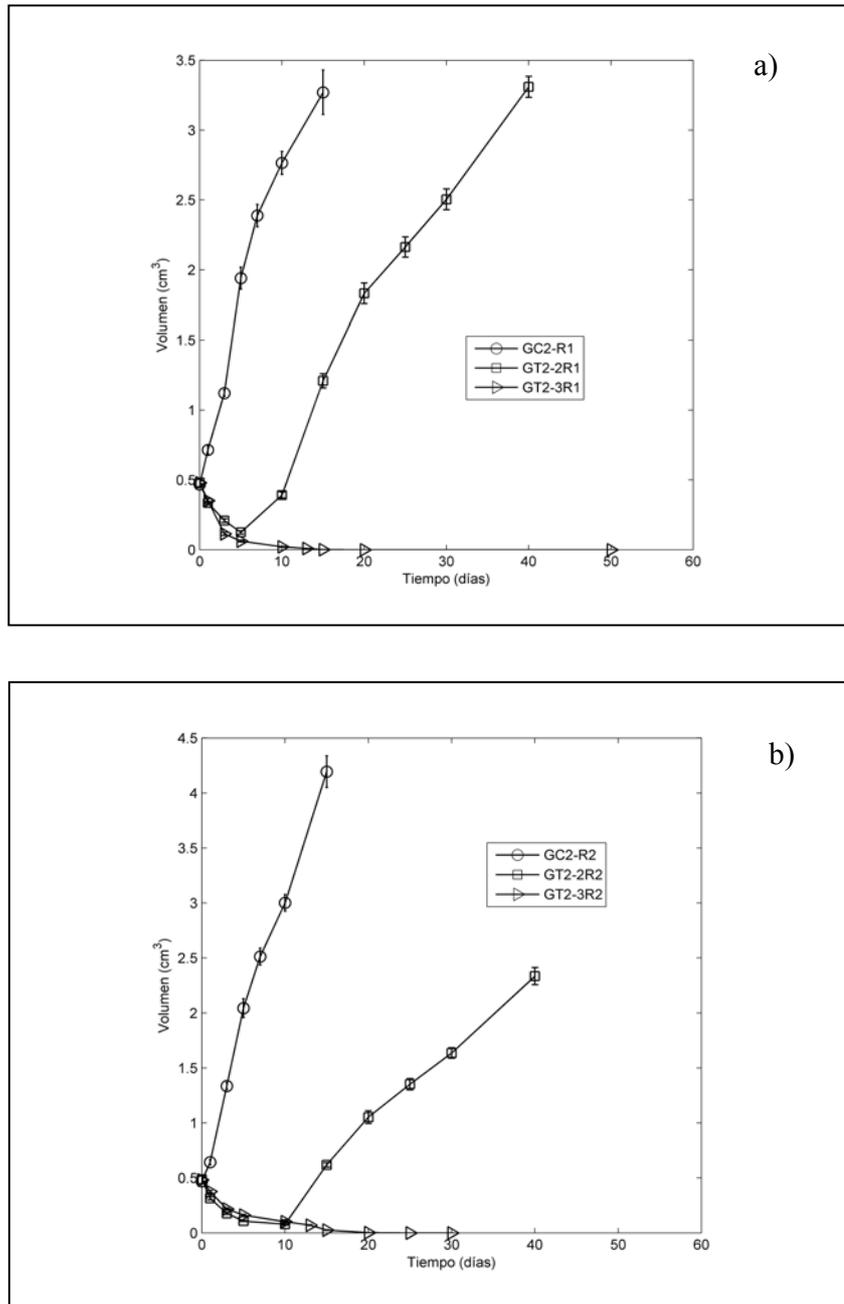
En las tablas 3 y 4 se muestran las medias y sus respectivas desviaciones estándar para el TD y el PR en los tres subgrupos experimentales de las réplicas 1 y 2, respectivamente. Estas tablas revelan que estos dos parámetros no se diferencian significativamente ( $P > 0,05$ ) cuando se compara con el experimento original para el tumor fibrosarcoma Sa-37. Sin embargo, cuando se compara la Réplica 1 con el experimento original existen diferencias significativas ( $P = 0,045$ ) entre estos dos parámetros.

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*



**Figura 7.** a) Infiltrado linfoplasmocitario en tumores no tratados y tratados con CED: células plasmáticas (CP) y linfocitos (L); aumento = 400X. b) Patrón de respuesta inflamatoria aguda que se observa a las 24, 48 y 96 horas después de la aplicación de la CED: congestión vascular (CV) y neutrófilos (N); aumento = 100X. c) Hallazgos peritumorales que se observan 24 horas post-tratamiento: monocitos (M), neutrófilos (N) y linfocitos (L); aumento = 400X.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 8.** Réplicas 1 (a) y 2 (b) de las curvas de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 tratado con CED para cada subgrupo experimental. Los datos se representan por sus medias  $\pm$  sus errores estándar de la media (barras verticales).

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 3.** Tiempo de doblaje (TD) del tumor fibrosarcoma Sa 37 tratado con CED en cada grupo experimental para las réplicas 1 y 2

Parámetro	Réplica 1			Réplica 2		
	GC2-R1	GT2-2R1	GT2-3R1	GC2-R2	GT2-2R2	GT2-3R2
TD <sup>1</sup> (D)	1,8 ± 0,8	15,7 ± 5,9	∞ <sup>3</sup>	1,9 ± 0,6	20,3 ± 3,6	∞ <sup>3</sup>
$\frac{TD_{GT}^2}{TD_{GC}}$	-	8,7	∞ <sup>3</sup>	-	10,7	∞ <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Los datos son las medias ± desviaciones estándar para cada uno de los grupos experimentales de cada réplica.

<sup>2</sup>  $\frac{TD_{GT}}{TD_{GC}}$  representa el coeficiente que caracteriza el retardo del crecimiento del tumor

fibrosarcoma Sa-37 en cada grupo tratado (TD<sub>GT</sub>) con respecto a su grupo control (TD<sub>GC</sub>) para las réplicas 1 y 2.

<sup>3</sup> El símbolo ∞ significa que el tiempo de doblaje es infinito (ver resultados).

**Tabla 4.** Media del porcentaje de regresión (PR) del tumor fibrosarcoma Sa 37 tratado con CED en cada grupo experimental para las réplicas 1 y 2

Porcentaje de regresión	Réplica 1		Réplica 2	
	GT2-2R1	GT2-3R1	GT2-2R2	GT2-3R2
PR (%)	63,1	100	71,4	100

### 3.1.2. Modificación de la ecuación de Gompertz convencional

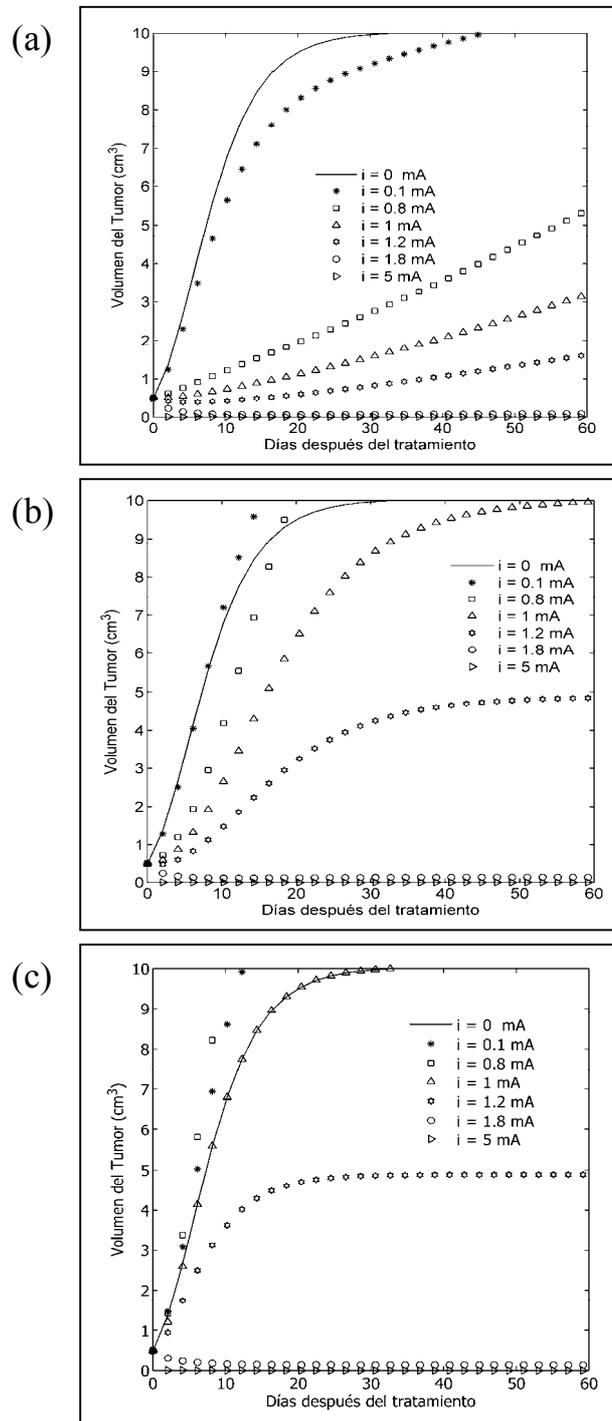
Aunque es posible hacer una discusión analítica de la EGM, en la práctica es imprescindible usar un programa de computación para simular esta ecuación multiparamétrica debido al número de parámetros que posee, de lo contrario su evaluación es muy tediosa. La EGM coincide con la ecuación convencional de Gompertz para el caso particular de  $i = 0$ ; sin embargo, diferentes tipos de comportamientos de la cinética de crecimiento del tumor se observan después de la aplicación de la CED ( $i \neq 0$ ).

Tres estudios se realizan con la finalidad de evaluar en la cinética de crecimiento la influencia de: 1) la intensidad de la CED en tumores con dos valores del parámetro  $\beta$ , para tres valores del parámetro  $\gamma$ , y  $\alpha$ ,  $i_0$  y  $V_0$  constantes (Figuras 9 y 10); 2) la intensidad de la CED en tumores con tres valores del parámetro  $\alpha$ , dos valores del parámetro  $\gamma$ , y  $\beta$ ,  $i_0$  y  $V_0$  constantes (Figura 10-I); 3) el parámetro  $\alpha$  en tumores con tres valores de la intensidad de la CED, dos valores del parámetro  $\gamma$ , y  $\beta$ ,  $i_0$  y  $V_0$  constantes (Figura 10-II).

En las figuras 9 y 10 se muestran los resultados de la simulación de la EGM para  $\beta = 0,2 \text{ días}^{-1}$  y  $0,4 \text{ días}^{-1}$ , respectivamente. En ambas figuras, se fijan los valores  $\alpha = 0,6 \text{ días}^{-1}$ ,  $i_0 = 1 \text{ mA}$ ,  $V_0 = 0,5 \text{ cm}^3$  y los diferentes valores de  $i$  (0; 0,1; 0,8; 1; 1,2; 1,8; 5 mA), para valores de  $\gamma$  (a)  $0,016 \text{ días}^{-1}$ , (b)  $0,1 \text{ días}^{-1}$  y (c)  $1 \text{ días}^{-1}$ . El rango de valores de  $i$  (0,1-5 mA) se utiliza con mucha frecuencia en la literatura [24-26, 39, 54, 79, 89]. El valor de  $i_0$  se fija en un valor arbitrario en este rango de variación de  $i$  para corroborar que la efectividad de la CED depende de la razón  $i/i_0$ . En estas figuras se observan diferentes comportamientos del tumor después de la aplicación de la CED que dependen de  $i$  y por ende de la razón  $i/i_0$ . La remisión completa del tumor se obtiene para  $i/i_0 > 2$ . Un tipo de respuesta, que se denomina respuesta parcial estacionaria, se observa para la razón  $i/i_0$  entre 1,8 y 2, para la cual el volumen tumoral disminuye hasta un cierto valor, el cual se mantiene constante en el tiempo. Estos dos tipos de respuestas se observan independientemente del valor de  $\gamma$ .

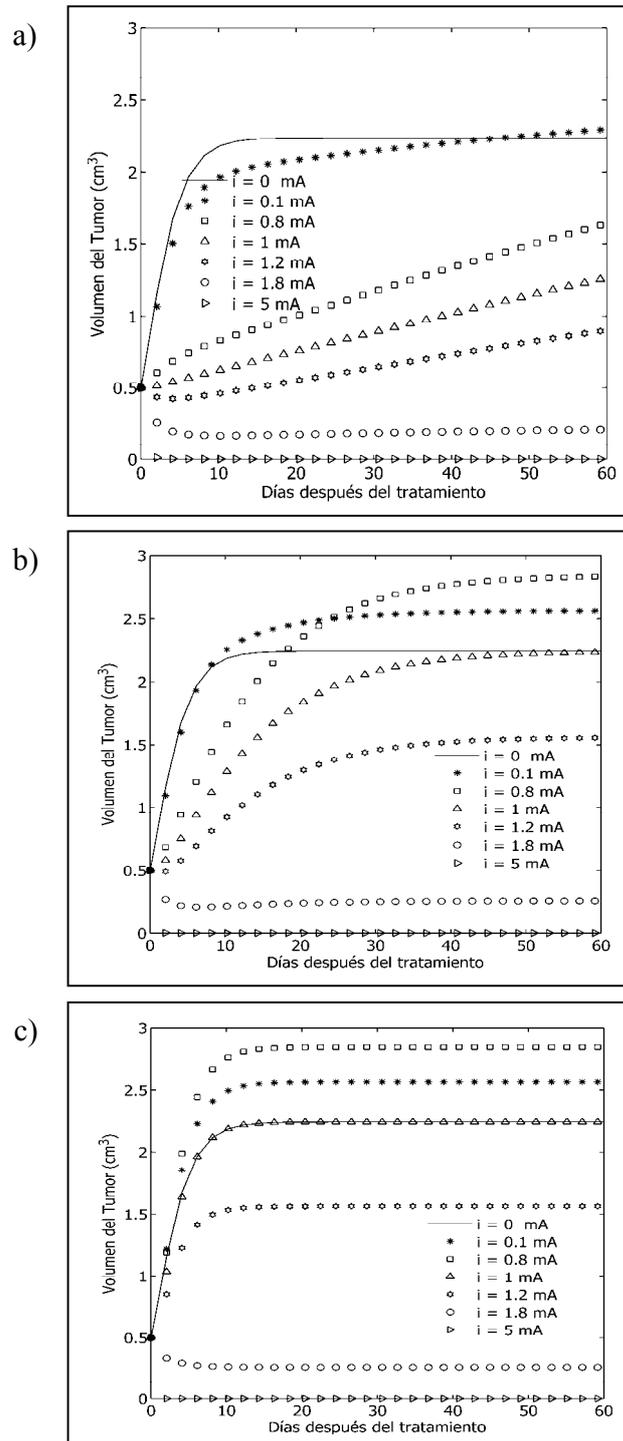
Una disminución del volumen del tumor hasta su valor mínimo y luego un crecimiento de este se observa cuando  $1,5 \leq i/i_0 \leq 1,8$ . Este tipo de comportamiento simula el que se observa de forma experimental para los subgrupos GT1-1 y GT1-2 (Figura 5a), GT2-1 y GT2-2 (Figura 5b), GT2-2R1 (Figura 8a) y GT2-2R2 (Figura 8b). Este tipo de comportamiento depende del valor de  $\gamma$  y de cuán próximo  $\beta$  está de  $\alpha$  (Figuras 9 y 10).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 9.** Simulación de la ecuación de Gompertz modificada para tres valores de  $\gamma$ : (a)  $0,016$  días<sup>-1</sup>, (b)  $0,1$  días<sup>-1</sup> y (c)  $1$  días<sup>-1</sup> con  $\alpha = 0,6$  días<sup>-1</sup>,  $\beta = 0,2$  días<sup>-1</sup>,  $i_0 = 1$  mA,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup> y diferentes valores de  $i$  (0; 0,1; 0,8; 1; 1,2; 1,8; 5 mA).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 10.** Simulación de la ecuación de Gompertz modificada para tres valores de  $\gamma$ : (a)  $0,016$  días<sup>-1</sup>, (b)  $0,1$  días<sup>-1</sup> y (c)  $1$  días<sup>-1</sup> con  $\alpha = 0,6$  días<sup>-1</sup>,  $\beta = 0,4$  días<sup>-1</sup>,  $i_0 = 1$  mA,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup> y diferentes valores de  $i$  (0; 0,1; 0,8; 1; 1,2; 1,8; 5 mA).

El volumen tumoral alcanza su valor mínimo ( $V_{\min}^*$ ) en un tiempo  $T_{\min}$ , siempre que se satisfaga que  $1,5 \leq i/i_0 \leq 1,8$ . El par  $(T_{\min}, V_{\min}^*)$  se puede determinar directamente en la curva y/o analíticamente a partir de la ecuación (7). En este último caso, se iguala a cero la primera derivada de  $V^*(t)$  y resulta una ecuación trascendente que permite calcular analíticamente  $T_{\min}$ , para los valores dados de  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i/i_0$ , dada por

$$a_1 \gamma e^{-\gamma t} + \beta (a_1 + a_2) e^{-\beta t} - a_1 (\gamma + \beta) e^{-\gamma t} e^{-\beta t} = 0 \quad (33)$$

El valor de  $V_{\min}^*$  se calcula si se sustituye  $T_{\min}$  en la ecuación (7).

En la tabla 5 se muestran los valores de los pares ordenados  $(T_{\min}, V_{\min}^*)$  para  $i = 1,2$  mA,  $i_0 = 1$  mA,  $\alpha = 0,6$  días<sup>-1</sup>,  $\beta = 0,2$  y  $0,4$  días<sup>-1</sup>,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup>, y tres valores del parámetro  $\gamma$  (0,016; 0,1 y 1 días<sup>-1</sup>). Esta tabla corrobora que el aumento del parámetro  $\gamma$  trae consigo que se incremente el retardo del crecimiento del volumen tumoral después de la aplicación de la CED, para los valores constantes de  $i$ ,  $i_0$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ . Para  $\gamma < 1$  días<sup>-1</sup>, el tumor sólido que se perturba con CED que posea una diferencia entre los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  (condición que simula un tumor más agresivo) alcanza los valores más bajos de  $V_{\min}^*$  y los valores más largos de  $T_{\min}$  en comparación con un tumor que posea una pequeña diferencia entre estos parámetros (condición que simula un tumor menos agresivo). Esta diferencia es más marcada para los valores más pequeños de  $\gamma$ ; sin embargo, no se observan diferencias para los valores de  $(T_{\min}, V_{\min}^*)$  en estos tipos de tumores para  $\gamma \geq 1$  días<sup>-1</sup>.

**Tabla 5.** Mínimo de la ecuación de Gompertz modificada  $(T_{\min}, V_{\min}^*)$  para tres valores del parámetro  $\gamma$  (0,016; 0,1 y 1 días<sup>-1</sup>), manteniendo constantes los valores de  $i$  (1,2 mA),  $i_0$  (1 mA),  $\alpha$  (0,6 días<sup>-1</sup>),  $\beta$  (0,2 y 0,4 días<sup>-1</sup>),  $V_0$  (0,5 cm<sup>3</sup>)

$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$(T_{\min}, V_{\min}^*)$	
	$\alpha = 0,6$ días <sup>-1</sup> , $\beta = 0,2$ días <sup>-1</sup>	$\alpha = 0,6$ días <sup>-1</sup> , $\beta = 0,4$ días <sup>-1</sup>
0,016	(5,0857; 0,3936)	(3,9771; 0,4226)
0,1	(1,0682; 0,4712)	(1,0089; 0,4738)
1	(0,1127; 0,4967)	(0,1120; 0,4968)

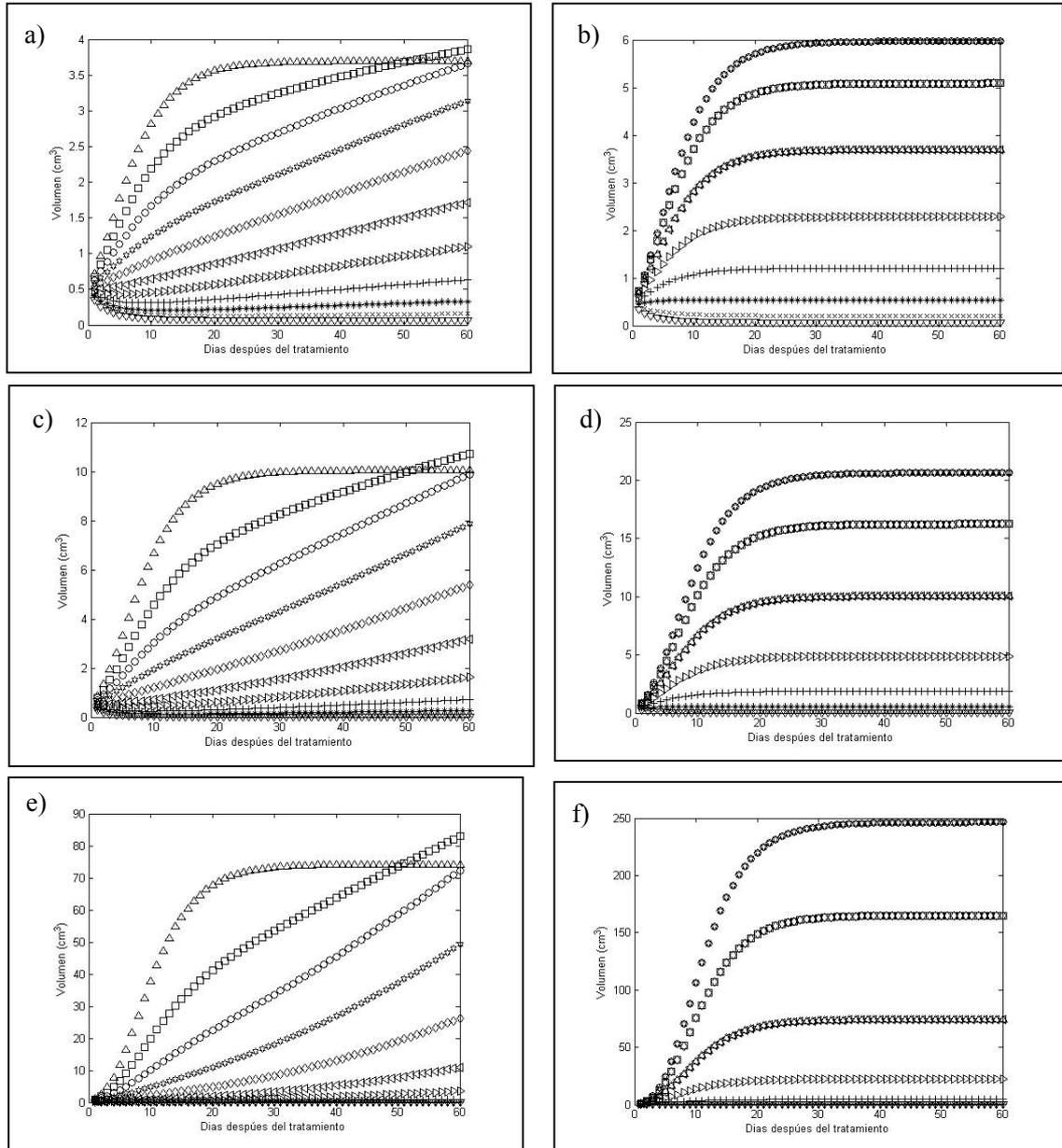
Un crecimiento rápido del tumor se observa después de la aplicación de la CED para  $0 \leq i/i_0 \leq 1,2$ , siendo más evidente para el valor de  $\gamma = 1 \text{ días}^{-1}$ . El mismo puede ser similar o más rápido al del grupo control (Figuras 9 y 10).

Las respuestas completa y parcial estacionaria se observan siempre que  $i/i_0 > 2$  y  $i/i_0 > 2$ , para todo valor de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente (Figuras 10-I y 10-II). Los otros tipos de comportamientos de las cinéticas de los tumores que se tratan con CED dependen de los valores de  $\alpha$  respecto a  $\beta$  y de  $\gamma$ . El mínimo de la remisión parcial de los tumores (en el rango  $1,2 \leq i/i_0 < 1,8$ ) se observa para todo valor de  $\alpha$ , siendo el más pequeño para el mayor valor de este parámetro y el menor valor de  $\gamma$  (Figura 10-IIa). Sin embargo, los tumores con el mayor valor del parámetro  $\alpha$  son los que más rápido crecen cuando el valor de  $\gamma$  es el más grande.

En la figura 11 se muestra que la EGM es factible para ajustar los datos experimentales de los tumores de Ehrlich (Figura 5a) y fibrosarcoma Sa-37 (Figura 5b) para sus respectivos grupos experimentales. Estos ajustes se hacen para cada tumor individual, por grupo experimental, y de esta forma se obtienen los valores de los parámetros  $i_0$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  para cada tumor. El valor promedio  $\pm$  su error estándar de la media, por grupo experimental, se calcula a partir de estos valores individuales, como se evidencia para los tumores de Ehrlich (Tabla 6) y fibrosarcoma Sa-37 (Tabla 7).

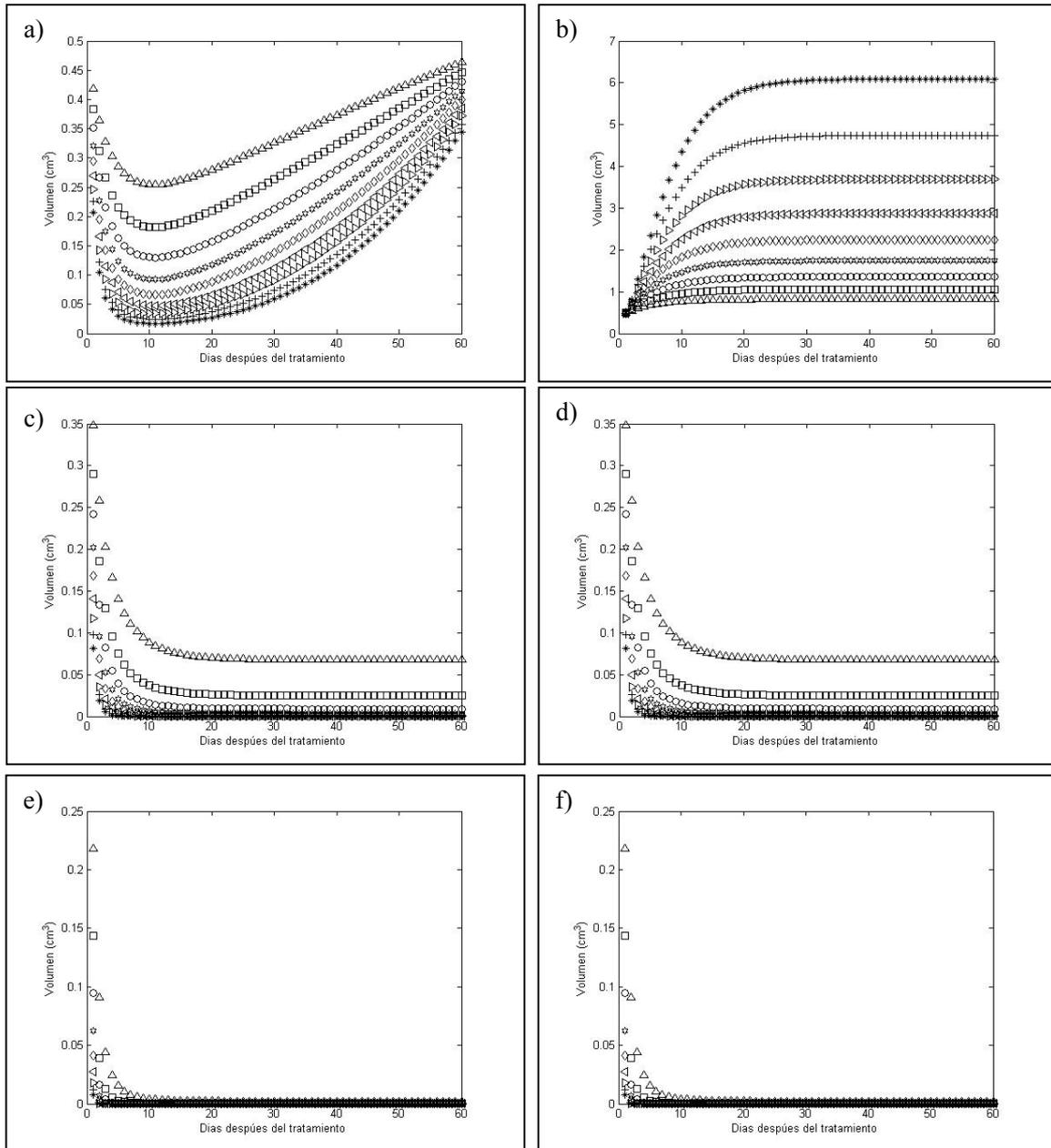
Las tablas 6 y 7 muestran que la razón  $\alpha/\beta$  para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 no tratados es 1,82 y 1,95; respectivamente. Esto corrobora que el tumor fibrosarcoma Sa-37 es más agresivo que el Ehrlich. También, estas tablas evidencian que los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  dependen de  $i$ , para estos dos tipos de tumores experimentales después de la aplicación de la CED. Las diferencias de los parámetros  $\alpha$  e  $i_0$  entre los grupos experimentales son significativas ( $P = 0,001$ ), para los mismos, no siendo tan así para los parámetros  $\beta$  y  $\gamma$ . La comparación entre todos los grupos experimentales, para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, revela que las diferencias mínima y máxima del parámetro  $\beta$  son 0,004 y 0,27  $\text{días}^{-1}$ , respectivamente. Para el parámetro  $\gamma$ , estas diferencias respectivas son 0,005 y 0,223.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



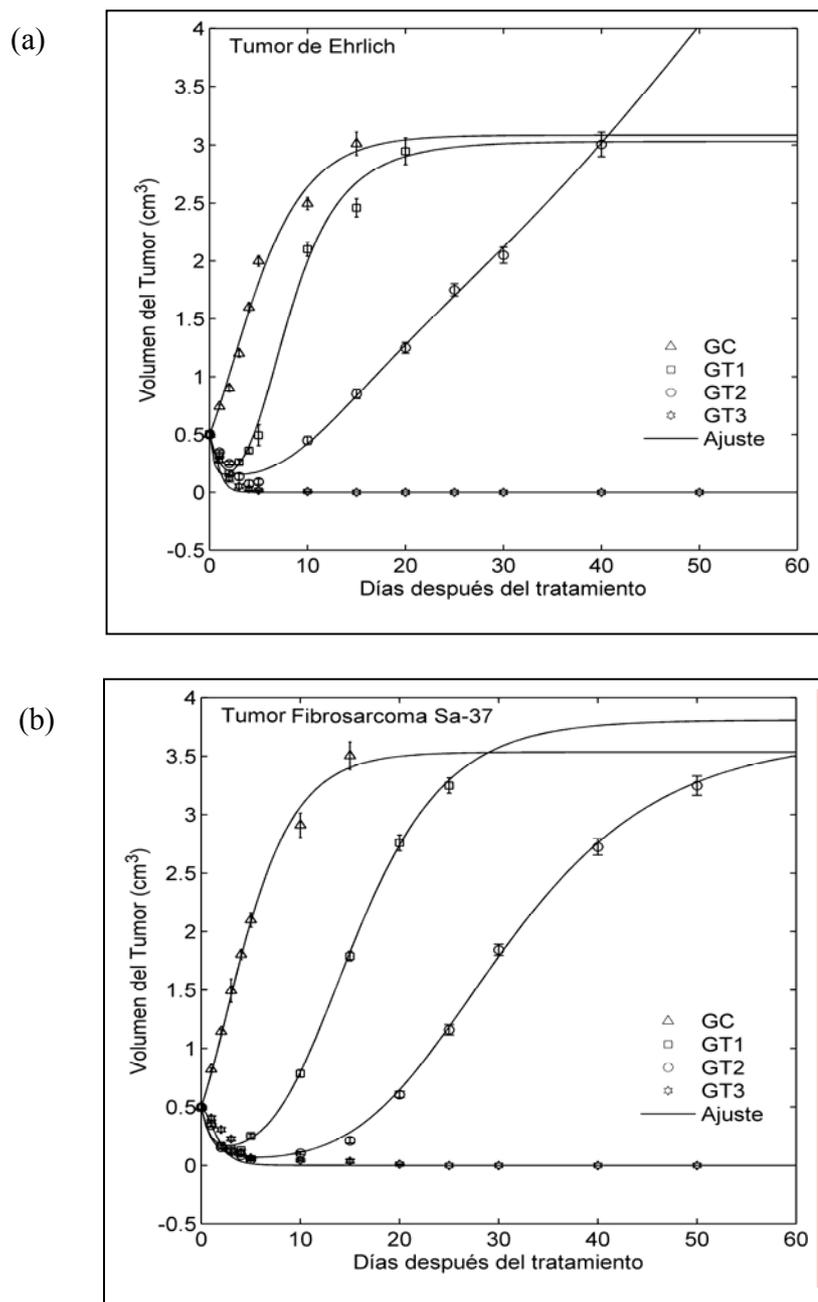
**Figura 10-I:** Simulación de la ecuación de Gompertz modificada para  $\beta = 0,2 \text{ días}^{-1}$ ,  $i_0 = 1 \text{ mA}$ ,  $V_0 = 0,5 \text{ cm}^3$  y diferentes valores de  $i$ : 0 mA (triángulo con la punta hacia arriba); 1,1 mA (cuadrado); 1,2 mA (circulo); 1,3 mA (estrella); 1,4 mA (rombo); 1,5 mA (triángulo con la punta hacia la izquierda); 1,6 mA (triángulo con la punta hacia la derecha); 1,7 mA (+); 1,8 mA (\*); 2,0 mA (x); 2,5 mA (triángulo con la punta hacia abajo). (a)  $\alpha = 0,4 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 0,016 \text{ días}^{-1}$ , (b)  $\alpha = 0,4 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 1 \text{ días}^{-1}$ , (c)  $\alpha = 0,6 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 0,016 \text{ días}^{-1}$ , (d)  $\alpha = 0,6 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 1 \text{ días}^{-1}$ , (e)  $\alpha = 1 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 0,016 \text{ días}^{-1}$  y (f)  $\alpha = 1 \text{ días}^{-1}$  y  $\gamma = 1 \text{ días}^{-1}$ .

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 10-II:** Simulación de la ecuación de Gompertz modificada para  $\beta = 0,2$  días<sup>-1</sup>,  $i_0 = 1$  mA,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup> y diferentes valores de  $\alpha$ :  $0,4$  días<sup>-1</sup> (triángulo con la punta hacia arriba);  $0,6$  días<sup>-1</sup> (cuadrado);  $0,8$  días<sup>-1</sup> (circulo);  $1,0$  días<sup>-1</sup> (estrella);  $1,2$  días<sup>-1</sup> (rombo);  $1,4$  días<sup>-1</sup> (triángulo con la punta hacia la izquierda);  $1,6$  días<sup>-1</sup> (triángulo con la punta hacia la derecha);  $1,8$  días<sup>-1</sup> (x) y  $2,0$  días<sup>-1</sup> (\*). (a)  $i = 1,5$  mA y  $\gamma = 0,016$  días<sup>-1</sup>, (b)  $i = 1,5$  mA y  $\gamma = 1$  días<sup>-1</sup>, (c)  $i = 2,0$  mA y  $\gamma = 0,016$  días<sup>-1</sup>, (d)  $i = 2,0$  mA y  $\gamma = 1$  días<sup>-1</sup>, (e)  $i = 2,5$  mA y  $\gamma = 0,016$  días<sup>-1</sup> y (f)  $i = 2,5$  mA y  $\gamma = 1$  días<sup>-1</sup>.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 11.** Datos experimentales (media  $\pm$  error estándar de la media) y curvas de crecimiento ajustadas con la ecuación de Gompertz modificada para los tumores de Ehrlich (a) y fibrosarcoma Sa-37 (b) después de la aplicación de la CED. Para el tumor de Ehrlich, GC, GT1, GT2 y GT3 corresponden con los grupos experimentales GC1, GT1-1, GT1-2 y GT1-3, respectivamente. Para el tumor fibrosarcoma Sa-37, GC, GT1, GT2 y GT3 corresponden con los grupos experimentales GC2, GT2-1, GT2-2 y GT2-3, respectivamente.

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 6.** Media  $\pm$  error estándar de la media de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento del tumor de Ehrlich, 24 horas después de la aplicación de la CED

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
GC1	0,449 $\pm$ 0,005	0,247 $\pm$ 0,002	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
GT1-1	3,552 $\pm$ 0,127	0,189 $\pm$ 0,013	0,430 $\pm$ 0,012	4,255 $\pm$ 0,006
GT1-2	1,491 $\pm$ 0,022	0,017 $\pm$ 0,002	0,248 $\pm$ 0,002	7,316 $\pm$ 0,002
GT1-3	0,057 $\pm$ 0,016	0,291 $\pm$ 0,128	0,207 $\pm$ 0,072	1,598 $\pm$ 0,294

GC1: grupo control; GT1-1: grupo tratado con  $i = 6,7$  mA por 45 min. TG1-2: grupo tratado con  $i = 11,7$  mA por 45 min. GT1-3: grupo tratado con  $i = 17$  mA por 45 min. Cada grupo experimental está formado por 10 ratones.

**Tabla 7.** Media  $\pm$  error estándar de la media de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37, 24 horas después de la aplicación de la CED

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
GC2	0,513 $\pm$ 0,009	0,262 $\pm$ 0,006	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
GT2-1	1,793 $\pm$ 0,028	0,142 $\pm$ 0,006	0,184 $\pm$ 0,003	4,342 $\pm$ 0,007
GT2-2	1,584 $\pm$ 0,030	0,076 $\pm$ 0,002	0,107 $\pm$ 0,001	7,431 $\pm$ 0,003
GT2-3	0,006 $\pm$ 0,001	0,207 $\pm$ 0,002	0,189 $\pm$ 0,016	1,080 $\pm$ 0,210

GC2: grupo control; GT2-1: grupo tratado con  $i = 6,7$  mA por 45 min. TG2-2: grupo tratado con  $i = 11,7$  mA por 45 min. GT2-3: grupo tratado con  $i = 14,8$  mA por 45 min. Cada grupo experimental está formado por 10 ratones.

Las tablas 6 y 7 evidencian que las razones  $\alpha/\beta$  para los grupos GT1-1, GT1-2 y GT1-3 (para el tumor de Ehrlich) son 18,79; 87,64 y 0,19; respectivamente. Para el tumor fibrosarcoma Sa-37, estas razones son 12,62; 20,84 y 0,029 para los grupos GT2-1, GT2-2 y GT2-3, respectivamente. Para el tumor de Ehrlich, diferentes razones de  $i/i_0$  se observan entre los grupos tratados: 1,57 (GT1-1); 1,60 (GT1-2) y 10,64 (GT1-3). También, este hecho se observa para el tumor fibrosarcoma Sa-37: 1,54 (GT2-1); 1,57 (GT2-2) y 13,70 (GT2-3). Estos resultados indican que los tumores experimentales de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 alcanzan sus remisiones completas para  $i/i_0 > 2$  (GT1-3 y GT2-3). La remisión parcial de estos tumores (disminución del volumen del tumor hasta alcanzar su valor mínimo y luego un crecimiento de este) se obtiene para  $1,50 < i/i_0 < 1,60$ , como se observa en las simulaciones hechas con la EGM (Figuras 9; 10; 10-I y 10-II).

En la remisión parcial (GT1-1, GT2-1, GT1-2 y GT2-2) se observa que el volumen tumoral alcanza su mínimo en  $(T_{\min}, V_{\min}^*)$ , los cuales se muestran en la tabla 8 para estos grupos experimentales. Esta tabla revela que  $V_{\min}^*$  y  $T_{\min}$  dependen de la dosis de CED y el tipo de tumor. Para el tumor fibrosarcoma Sa-37 se observan los menores valores de  $V_{\min}^*$  y los mayores de  $T_{\min}$ , en comparación con el tumor de Ehrlich, siendo más evidente para 11,7 mA. En la tabla 9 se muestra el error para cada parámetro de la EGM que se obtiene del proceso de ajuste de las cinéticas de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, para cada grupo experimental. En esta tabla se observa que estos errores son pequeños. El uso del algoritmo de optimización Marquardt-Levenberg, en el ajuste de estas cinéticas, revela que no existe problema con la convergencia y que esta se alcanza de forma rápida.

La capacidad de la EGM para ajustar los datos experimentales del crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, para cada grupo experimental, se demuestra a través de los criterios estadísticos cuantitativos [ecuaciones (8)-(13)] (Tablas 10 y 11). Los resultados revelan que los valores de  $r_a^2$  son cercanos a la unidad y los de SSE, SE, PRESS y MPRESS ( $m = 3; 4; 5$ ) son pequeños, siendo más marcado para los grupos GT1-3 y GT2-3.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 8.** Mínimo de la ecuación de Gompertz modificada ( $T_{\min}, V_{\min}^*$ ) para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37

Grupo	$(T_{\min}, V_{\min}^*)$	
	Ehrlich	fibrosarcoma Sa-37
Grupo Control	No existe	No existe
Grupo Tratado 1*	(1,4757; 0,1523)	(2,7500; 0,1708)
Grupo Tratado 2**	(3,3343; 0,1578)	(5,5663; 0,0698)
Grupo Tratado 3***	No existe	No existe

\*Grupo tratado 1 corresponde al GT1-1 (Ehrlich) y GT1-2 (fibrosarcoma Sa-37)

\*\* Grupo tratado 2 corresponde al GT1-2 (Ehrlich) y GT1-2 (fibrosarcoma Sa-37)

\*\*\* Grupo tratado 3 corresponde al GT1-3 (Ehrlich) y GT1-3 (fibrosarcoma Sa-37)

**Tabla 9.** Media  $\pm$  error estándar de cada parámetro de la ecuación de Gompertz modificada que se obtiene del ajuste de los datos de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 para cada grupo experimental

Grupos	Parámetros	Errores de los parámetros	
		Tumor de Ehrlich	Tumor fibrosarcoma Sa-37
Grupo Control	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,021 $\pm$ 0,005	0,034 $\pm$ 0,004
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,014 $\pm$ 0,003	0,024 $\pm$ 0,002
Grupo Tratado 1	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,202 $\pm$ 0,003	1,129 $\pm$ 0,017
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,017 $\pm$ 0,003	0,054 $\pm$ 0,001
	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	0,014 $\pm$ 0,0002	0,065 $\pm$ 0,0006
	$i_0$ (mA)	0,026 $\pm$ 0,0006	0,037 $\pm$ 0,0003
Grupo Tratado 2	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,246 $\pm$ 0,011	0,317 $\pm$ 0,011
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,017 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001
	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	0,0251 $\pm$ 0,0006	0,030 $\pm$ 0,003
	$i_0$ (mA)	0,724 $\pm$ 0,070	0,019 $\pm$ 0,002
Grupo Tratado 3	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,0005 $\pm$ 0,0000 <sup>1</sup>	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>2</sup>
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,017 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001
	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	0,113 $\pm$ 0,009	0,022 $\pm$ 0,002
	$i_0$ (mA)	0,021 $\pm$ 0,003	0,052 $\pm$ 0,002

<sup>1</sup> Error del parámetro  $\alpha = 0,0005 \pm 0,00004$ .

<sup>2</sup> Error del parámetro  $\beta = 0,0004 \pm 0,00001$ .

\*Grupo tratado 1 corresponde al GT1-1 (Ehrlich) y GT1-2 (fibrosarcoma Sa-37)

\*\* Grupo tratado 2 corresponde al GT1-2 (Ehrlich) y GT1-2 (fibrosarcoma Sa-37)

\*\*\* Grupo tratado 3 corresponde al GT1-3 (Ehrlich) y GT1-3 (fibrosarcoma Sa-37)

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 10.** Media  $\pm$  error estándar de los criterios estadísticos SSE, SE,  $r_a^2$ , PRESS y MPRESS que se obtienen del ajuste de los datos experimentales del tumor de Ehrlich

Grupos	Tumor de Ehrlich				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
GC1	0,060 $\pm$ 0,019	0,091 $\pm$ 0,016	0,999 $\pm$ 0,000 <sup>a</sup>	0,009 $\pm$ 0,003	0,012 $\pm$ 0,004
GT1-1	0,025 $\pm$ 0,002	0,064 $\pm$ 0,003	1,000 $\pm$ 0,000 <sup>b</sup>	0,003 $\pm$ 0,0002	0,002 $\pm$ 0,0003
GT1-2	0,030 $\pm$ 0,002	0,058 $\pm$ 0,002	1,000 $\pm$ 0,000 <sup>c</sup>	0,003 $\pm$ 0,0001	0,002 $\pm$ 0,0002
GT1-3	0,004 $\pm$ 0,0003	0,021 $\pm$ 0,0009	1,000 $\pm$ 0,000 <sup>d</sup>	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>e</sup>	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>f</sup>

Las leyendas de GC1, GT1-1, GT1-2 y GT1-3 para el tumor de Ehrlich están dadas en la figura 5a.

<sup>a</sup>  $r_a^2 = 0,999 \pm 2,99 \times 10^{-9}$

<sup>b</sup>  $r_a^2 = 1,000 \pm 1,61 \times 10^{-10}$ .

<sup>c</sup>  $r_a^2 = 1,000 \pm 1,40 \times 10^{-10}$ .

<sup>d</sup>  $r_a^2 = 1,000 \pm 1,49 \times 10^{-9}$ .

<sup>e</sup> PRESS = 0,0003  $\pm$  0,00003.

<sup>f</sup> MPRESS = 0,0003  $\pm$  0,00002.

**Tabla 11.** Media  $\pm$  error estándar de los criterios estadísticos SSE, SE,  $r_a^2$ , PRESS y MPRESS que se obtienen del ajuste de los datos experimentales del tumor fibrosarcoma Sa-37

Grupos	Tumor fibrosarcoma Sa-37				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
GC2	0,095 $\pm$ 0,015	0,123 $\pm$ 0,009	0,999 $\pm$ 0,000 <sup>a</sup>	0,014 $\pm$ 0,002	0,018 $\pm$ 0,004
GT2-1	0,105 $\pm$ 0,011	0,143 $\pm$ 0,007	0,999 $\pm$ 0,000 <sup>b</sup>	0,013 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,002
GT2-2	0,047 $\pm$ 0,004	0,076 $\pm$ 0,003	0,999 $\pm$ 0,000 <sup>c</sup>	0,004 $\pm$ 0,0003	0,004 $\pm$ 0,0003
GT2-3	0,001 $\pm$ 0,0001	0,008 $\pm$ 0,001	1,000 $\pm$ 0,000 <sup>d</sup>	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>e</sup>	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>f</sup>

Las leyendas de GC2, GT2-1, GT2-2, GT2-3 para el tumor fibrosarcoma Sa-37 están dadas en la figura 5b.

<sup>a</sup>  $r_a^2 = 0,999 \pm 2,82 \times 10^{-9}$ .

<sup>b</sup>  $r_a^2 = 0,999 \pm 1,75 \times 10^{-9}$ .

<sup>c</sup>  $r_a^2 = 0,999 \pm 4,93 \times 10^{-10}$ .

<sup>d</sup>  $r_a^2 = 1,000 \pm 8,08 \times 10^{-10}$ .

<sup>e</sup> PRESS = 0,00006  $\pm$  0,00001.

<sup>f</sup> MPRESS = 0,00002  $\pm$  0,000005.

En la figura 12 se muestran las cinéticas del volumen del tumor fibrosarcoma Sa-37 con sus respectivos ajustes con la EGM para las Réplicas 1 (a) y 2 (b). Esta figura revela que las dos réplicas del experimento original reproducen comportamientos similares a los que se muestran en la figura 11b para GC2, GT2-2 y GT2-3.

En las tablas 12 y 13 se muestran los valores medios y sus errores estándar de la media para los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  para las Réplicas 1 y 2, respectivamente. Los mismos no se diferencian significativamente de los que se muestran en la tabla 5.

Las tablas 12 y 13 confirman que los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  dependen de  $i$ , siendo más marcado para  $\alpha$  e  $i_0$ , por las razones antes mencionadas. Estas tablas evidencian que las diferencias mínimas y máximas del parámetro  $\beta$  entre los grupos experimentales, para el tumor fibrosarcoma Sa-37, son 0,058 y 0,70 días<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas respectivas diferencias son 0,074 y 0,178 para el parámetro  $\gamma$ . Para los parámetros  $\beta$  y  $\gamma$ , estas diferencias no son significativas en comparación con las que se obtienen de la tabla 7.

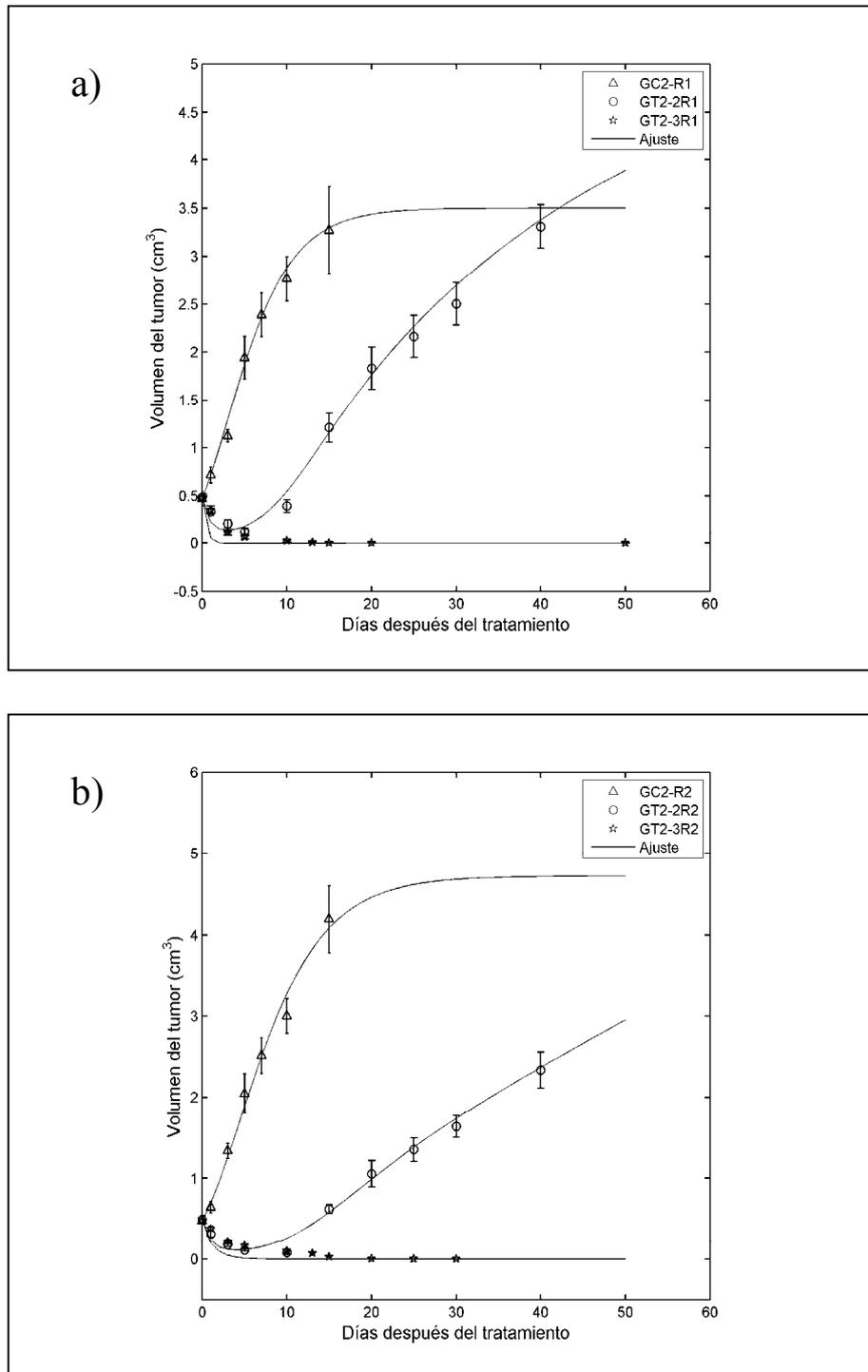
En la tabla 14 se muestran la media  $\pm$  error estándar de la media de los errores con los que se estiman los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  para estas dos réplicas, por grupo experimental. Las tablas 15 y 16 muestran los valores medios de SSE, SE,  $r_a^2$ , PRESS y MPRESS y sus respectivos errores estándar de la media, por cada uno de estos grupos experimentales, para las Réplicas 1 y 2, respectivamente. Los valores que se presentan en estas tablas no muestran diferencias significativas con respecto a los de las tablas 9-11.

El uso de un programa de computación para estos fines permite que en menos de 3 minutos se obtengan todos los resultados que se muestran en las tablas 6-11; 12-16 y las figuras 11 y 12. Este programa permite dar los resultados por cada animal y por cada grupo experimental.

Los resultados de los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  que se muestran en las tablas 6 (tumor de Ehrlich), 7 (tumor fibrosarcoma Sa-37), 12 (Réplica 1) y 13 (Réplica 2) se obtienen para una tolerancia  $\leq 10^{-10}$ . También, los números de iteraciones y funciones máximas a evaluar son de  $10^{40}$ . Estos valores se usan con el fin de buscar la mejor curva que ajusta a los datos experimentales de cada grupo experimental.

El mínimo volumen tumoral que se observa en GT2-2R1 GT2-2R2 se observan para (3 días, 0,1861 cm<sup>3</sup>) y (4 días, 0,1347 cm<sup>3</sup>), respectivamente.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 12.** Datos experimentales (Media  $\pm$  error estándar de la media) y curvas de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 ajustadas con la ecuación de Gompertz modificada, 24 horas después de la aplicación de la CED. Réplica 1 (a) y Réplica 2 (b).

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 12.** Media  $\pm$  error estándar de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 (Réplica 1), 24 horas después de la aplicación de la CED

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
GC2-R1	0,472 $\pm$ 0,027	0,234 $\pm$ 0,011	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
GT2-2R1	1,793 $\pm$ 0,067	0,045 $\pm$ 0,004	0,256 $\pm$ 0,007	7,352 $\pm$ 0,008
GT2-3R1	0,002 $\pm$ 0,001	0,747 $\pm$ 0,047	0,118 $\pm$ 0,002	0,209 $\pm$ 0,055

GC-R1: grupo control (n = 8); TG2-2R1: grupo tratado con  $i = 11,7$  mA por 45 min (n = 9). GT2-3R1: grupo tratado con  $i = 14,8$  mA por 45 min (n = 9). n representa el número de ratones.

**Tabla 13.** Media  $\pm$  error estándar de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 (Réplica 2), 24 horas después de la aplicación de la CED

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
GC2-R2	0,426 $\pm$ 0,024	0,285 $\pm$ 0,001	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
GT2-2R2	1,644 $\pm$ 0,054	0,227 $\pm$ 0,012	0,080 $\pm$ 0,003	7,791 $\pm$ 0,028
GT2-3R2	0,004 $\pm$ 0,002	0,790 $\pm$ 0,048	0,006 $\pm$ 0,002	0,226 $\pm$ 0,075

GC-R2: grupo control (n = 8); TG2-2R2: grupo tratado con  $i = 11,7$  mA por 45 min (n = 8). GT2-3R2: grupo tratado con  $i = 14,8$  mA por 45 min (n = 8). n representa el número de ratones.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 14.** Promedio  $\pm$  error estándar de la estimación de la exactitud de los parámetros (error del parámetro) obtenido del ajuste de los datos de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 para cada grupo experimental y las Réplicas 1 y 2

Grupos	Parámetros	Errores de los parámetros	
		Réplica 1	Réplica 2
Grupo Control	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,080 $\pm$ 0,009	0,091 $\pm$ 0,001
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,051 $\pm$ 0,005	0,055 $\pm$ 0,005
Grupo Tratado 2	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,393 $\pm$ 0,034	0,249 $\pm$ 0,028
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,079 $\pm$ 0,009	0,050 $\pm$ 0,004
	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	0,044 $\pm$ 0,003	0,058 $\pm$ 0,004
	$i_0$ (mA)	0,012 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,001
Grupo Tratado 3	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	0,0003 $\pm$ 0,0001	0,0001 $\pm$ 0,0000
	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	0,027 $\pm$ 0,007	0,045 $\pm$ 0,017
	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	0,016 $\pm$ 0,005	0,023 $\pm$ 0,005
	$i_0$ (mA)	0,028 $\pm$ 0,019	0,012 $\pm$ 0,007

**Tabla 15.** Media  $\pm$  error estándar de los criterios estadísticos para la valoración del modelo de Gompertz modificado que se usa en el ajuste de los datos experimentales del tumor fibrosarcoma Sa-37 para la Réplica 1

Grupos	Criterios estadísticos				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
GC2-R1	0,086 $\pm$ 0,026	0,122 $\pm$ 0,018	0,987 $\pm$ 0,003	0,013 $\pm$ 0,004	0,011 $\pm$ 0,004
GT2-2R1	0,087 $\pm$ 0,001	0,118 $\pm$ 0,008	0,989 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001
GT2-3R1	0,0004 $\pm$ 0,0001	0,008 $\pm$ 0,001	0,998 $\pm$ 0,001	0,00005 $\pm$ 0,00001	0,00003 $\pm$ 0,00001

**Tabla 16.** Media  $\pm$  error estándar de los criterios estadísticos para la valoración del modelo de Gompertz modificado que se usa en el ajuste de los datos experimentales del tumor fibrosarcoma Sa-37 para la Réplica 2

Grupos	Criterios estadísticos				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
GC2-R2	0,202 $\pm$ 0,041	0,191 $\pm$ 0,023	0,978 $\pm$ 0,004	0,031 $\pm$ 0,006	0,039 $\pm$ 0,009
GT2-2R2	0,064 $\pm$ 0,012	0,101 $\pm$ 0,009	0,982 $\pm$ 0,002	0,004 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,0006
GT2-3R2	0,002 $\pm$ 0,0001	0,020 $\pm$ 0,001	0,980 $\pm$ 0,001	0,00000 $\pm$ 0,00000	0,00000 $\pm$ 0,00000

La cinética completa del tumor fibrosarcoma Sa-37 no perturbado se obtiene de la interpolación de los datos experimentales en la REG-II y de la extrapolación de la REG-I, mediante el uso de la ecuación (17) y los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$  y  $V_0$  para el GC2 (Tabla 7), como se muestra en la figura 13 para  $\Delta t = 1/3$  días. La figura 13 muestra las dependencias del volumen tumoral en el tiempo (Figura 13a) y la primera derivada del volumen del tumor ( $dV/dt$ ) en función del volumen del tumor (Figura 13b). Estas dependencias no difieren significativamente de las que se obtienen para los otros valores de  $\Delta t$  ( $P = 0,082$ ).

La figura 13a revela que la cinética de crecimiento del tumor no tratado tiene una forma característica de S con tres etapas bien definidas (SI, SII y SIII). Cada una de estas etapas se ajusta a una recta para estimar su velocidad de crecimiento, mediante el valor de la pendiente  $m$  (Tabla 17). Los resultados muestran que SI es no lineal ( $r^2 = 0,2803$ ) y que existen dos puntos de intercepción que separan cada una de las etapas. El primer punto ( $V_s$  en Figura 13) se obtiene de la intercepción entre SI y SII y representa el principio de SII (disparo de la cinética de crecimiento tumoral). La tabla 17 corrobora que SII es la etapa más rápida de crecimiento tumoral porque el valor de su pendiente es mucho mayor en comparación a la de las etapas SI y SIII. El segundo punto ( $V_{ic}$  en Figura 13) se obtiene de la intercepción de SII y SIII, y representa el inicio de SIII (la cinética de crecimiento tumoral tiende asintóticamente a un valor límite, que se denomina  $V_f$ ). La EGM estima los puntos  $V_s$ ,  $V_{ic}$  y  $V_f$  en (12,34 días;  $0,069 \text{ cm}^3$ ), (25,99 días;  $3,169 \text{ cm}^3$ ), y (60 días;  $3,536 \text{ cm}^3$ ) para todo valor de  $\Delta t$ , respectivamente.

**Tabla 17.** Ajuste lineal de las etapas SI, SII y SIII de la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 no tratado (Grupo control, GC2)

Etapas de TGK	N	$m \pm e_m$	$n \pm e_n$	$r^2$
SI	10	$(9,25 \pm 12,00) \times 10^{-21}$	$(- 8,20 \pm 21,51) \times 10^{-21}$	0,2803
SII	20	$0,259 \pm 0,011$	$- 3,197 \pm 0,193$	0,9840
SIII	10	$(2,14 \pm 0,20) \times 10^{-5}$	$3,535 \pm 0,000$	0,9854

N: número de puntos interpolados.

m: pendiente de la recta  $\pm$  su error ( $e_m$ ).

n: intercepción de la recta  $\pm$  su error ( $e_n$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

P: probabilidad con intervalo de confianza de 95 %.

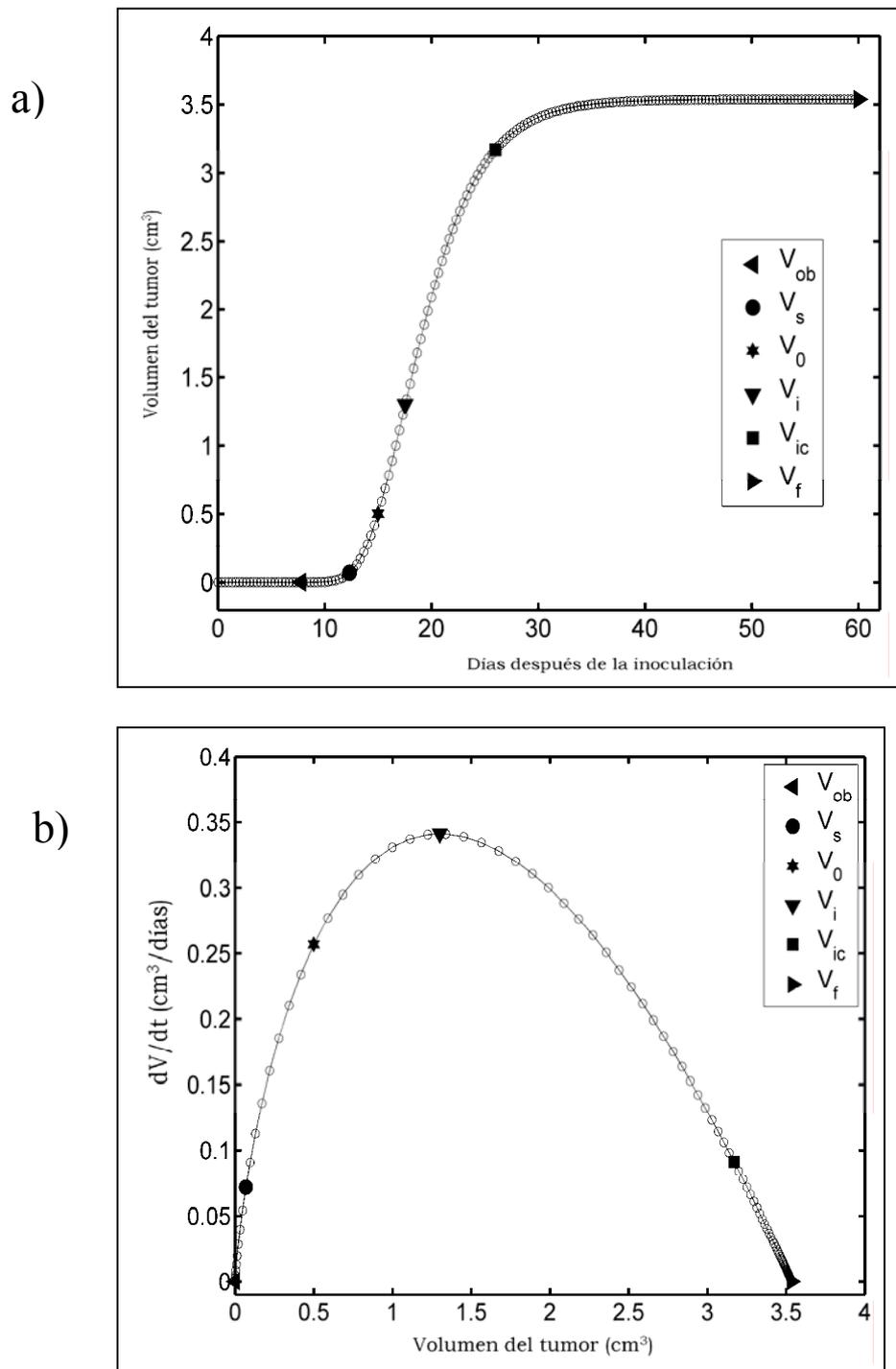
El análisis de la cinética del tumor fibrosarcoma Sa-37 no perturbado revela la existencia de un punto de inflexión en (17,56 días; 1,301 cm<sup>3</sup>), que se denomina  $V_i$ , el cual se puede determinar analíticamente si la segunda derivada de la EGM se iguala a cero e  $i = 0$ .  $V_i$  es un punto de la cinética de crecimiento tumoral en el cual ocurre un cambio de curvatura de cóncavo a convexo. La figura 13c muestra que el máximo de la primera derivada del volumen tumoral se observa cuando el volumen tumoral es  $V_i$  y que la cinética de este tumor tiene una fase rápida de crecimiento (desde cero hasta  $V_i$ ) y otra lenta (desde  $V_i$  hasta  $V_f$ ), independientemente que el volumen aumente desde 0 hasta  $V_f$ .

La extrapolación de la REG-I estima dos volúmenes del tumor fibrosarcoma Sa-37 que se observan en el experimento durante su crecimiento, los cuales son: 0,02 cm<sup>3</sup> (menor volumen tumoral medible, que se denomina  $V_m$ ) a los 11,29 días y 0,03 cm<sup>3</sup> a los 11,60 días. En el experimento,  $V_m$  se observa a los 12 días después de la inoculación de las células tumorales en el ratón BALB/c. La diferencia entre los valores de tiempo que se observa de forma experimental y el que estima la EGM (17) es de 0,71 días, lo cual no es significativo para el análisis de la cinética de crecimiento de un tumor.

El tumor fibrosarcoma Sa-37 se observa macroscópicamente por primera vez (primer volumen diferente de cero, que se denomina  $V_{ob}$ ) a los 8 días después de la inoculación de las células tumorales en el ratón BALB/c.  $V_{ob}$  es observable y palpable pero no medible. La ecuación (17) estima este volumen tumoral en 0,000016 cm<sup>3</sup> (0,031 cm de diámetro) a los 8 días (Figura 13a).

En la tabla 18 se muestran los volúmenes iniciales en  $t = 0$  (momento en el que se aplica la CED) para cada uno de los grupos experimentales de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 (incluyendo las réplicas). También, se muestran las diferencias de los mismos de los grupos tratados con CED con sus respectivos controles (GC). Estas diferencias (valores entre paréntesis en la Tabla 18) se calculan mediante la fórmula:  $[V_i(0) - V_x(0)/V_x(0)]$ , donde  $V_i(0)$  y  $V_x(0)$  son los volúmenes iniciales en  $t = 0$  de los grupos control y tratados, respectivamente. Esta tabla revela que no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre estos volúmenes iniciales.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 13.** Cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 no perturbado (GC2) para los parámetros  $i = 0$  mA,  $\alpha = 0,513$  días<sup>-1</sup>,  $\beta = 0,262$  días<sup>-1</sup>,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup> y  $\Delta t = 1/3$  días. (a) Dependencia del volumen tumoral en el tiempo. (b) Dependencia de la primera derivada del volumen del tumor (dV/dt) contra el volumen tumoral.

**Tabla 18.** Volúmenes iniciales de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 por grupo experimental en el momento de la aplicación de la CED

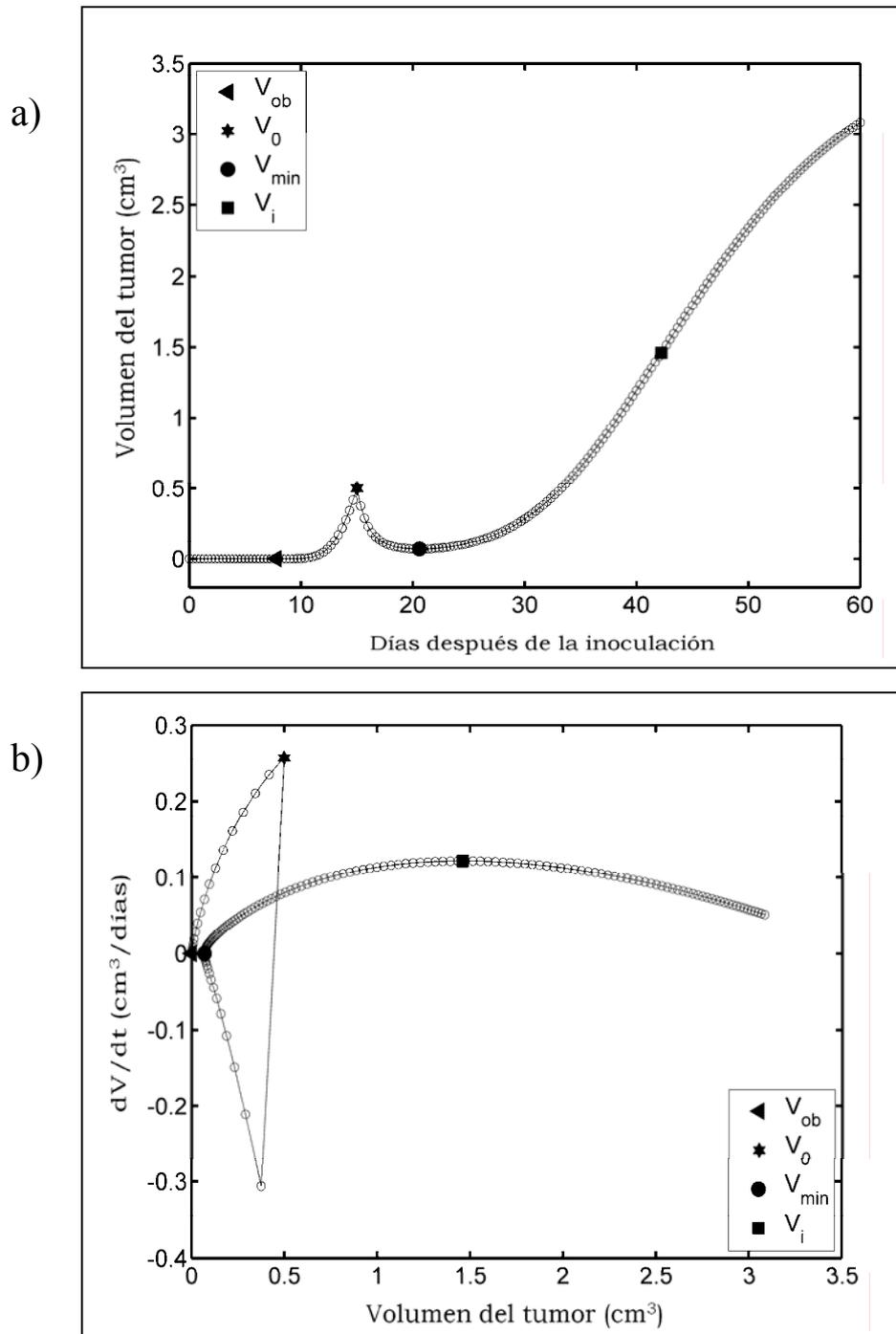
Grupos experimentales	Volúmenes iniciales (cm <sup>3</sup> )			
	Tumor Ehrlich	Tumor fibrosarcoma Sa-37		
		Experimento original	Réplica 1	Réplica 2
<b>GC</b>	0,4999 ± 0,0040 (-)	0,4999 ± 0,0040 (-)	0,4671 ± 0,0257 (-)	0,4704 ± 0,0130 (-)
<b>GT1</b>	0,5040 ± 0,0090 (0,0081)	0,4929 ± 0,0022 (0,0142)	-	-
<b>GT2</b>	0,4970 ± 0,0041 (0,0058)	0,4967 ± 0,0041 (0,0064)	0,4826 ± 0,0105 (0,0321)	0,4884 ± 0,0176 (0,0369)
<b>GT3</b>	0,4999 ± 0,0056 (0,0000)	0,5000 ± 0,0051 (0,0002)	0,4794 ± 0,0134 (0,0257)	0,4826 ± 0,0148 (0,0253)

Los resultados de la tabla 18 sugieren, en una buena aproximación, que la REG-I de la cinética del tumor tratado con CED es la misma que la del grupo control.

Las figura 14 muestra la cinética completa del tumor fibrosarcoma Sa-37 tratado con 11,7 mA durante 45 minutos (GT2-2) para  $\Delta t = 1/3$  días (Figura 14a) y la dependencia de la primera derivada del volumen tumoral ( $dV/dt$ ) contra el volumen del tumor (Figura 14b). Resultados similares a los que se muestran en esta figura se obtienen para  $\Delta t = 1; 1/8; 1/24$  y  $1/48$  días (resultados que no se muestran). Esta figura revela que la cinética de crecimiento tumoral en la REG-II (desde  $V_0$  hasta el final del experimento) se caracteriza por la presencia de dos subregiones (REG-IIa y REG-IIb). En la REG-IIa, el volumen del tumor disminuye desde  $V_0$  hasta su volumen mínimo, que se denomina  $V_{min}$ , mientras que en la REG-IIb, este aumenta desde  $V_{min}$  hasta el último volumen tumoral que se mide (fin del experimento).

$V_{min}$  se estima en  $0,069 \text{ cm}^3$  a los 20,58 días, para todo valor de  $\Delta t$ , como muestra la figura 14a para  $\Delta t = 1/3$  días. También,  $V_{min}$  se puede obtener por vía analítica si se sustituyen los valores de  $\alpha, \beta, \gamma, i$  y  $i_0$  para el GT2-2 (Tabla 7) en las ecuaciones (33) y (7).  $V_{min}$  se observa experimentalmente para  $0,07 \text{ cm}^3$ , 21 días después de la inoculación. Las diferencias entre estos volúmenes tumorales y tiempos (que se estiman y los experimentales) son  $0,001 \text{ cm}^3$  y 0,42 días, respectivamente, las cuales no son significativas en el orden experimental.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 14.** Cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 perturbado con CED (GT2-2) para los parámetros  $i = 11,7 \text{ mA}$ ,  $\alpha = 0,513 \text{ días}^{-1}$ ,  $\beta = 0,262 \text{ días}^{-1}$ ,  $\gamma = 0,107 \text{ días}^{-1}$ ,  $i_0 = 7,431 \text{ mA}$ ,  $V_0 = 0,5 \text{ cm}^3$  y  $\Delta t = 1/3 \text{ días}$ . (a) volumen tumoral en el tiempo. (b) primera derivada del volumen tumoral ( $dV/dt$ ) contra el volumen del tumor.

El gráfico de la primera derivada del volumen tumoral ( $dV/dt$ ) contra el volumen tumoral para el GT2-2 (Figura 14b) revela que la primera derivada del volumen tumoral tiene un cambio de signo (de positivo a negativo) en el punto ( $0,375 \text{ cm}^3$ ;  $-0,3058 \text{ cm}^3/\text{días}$ ). Este valor de volumen está entre los volúmenes experimentales  $V_0$  ( $0,5 \text{ cm}^3$ ) y  $V_{\min}$  ( $0,07 \text{ cm}^3$ ), el cual no se observa en el gráfico de volumen del tumor contra el tiempo (Figura 14a).  $V_{\min}$  en la figura 14b se estima en ( $0,069 \text{ cm}^3$ ;  $-0,00000098 \text{ cm}^3/\text{días}$ ).

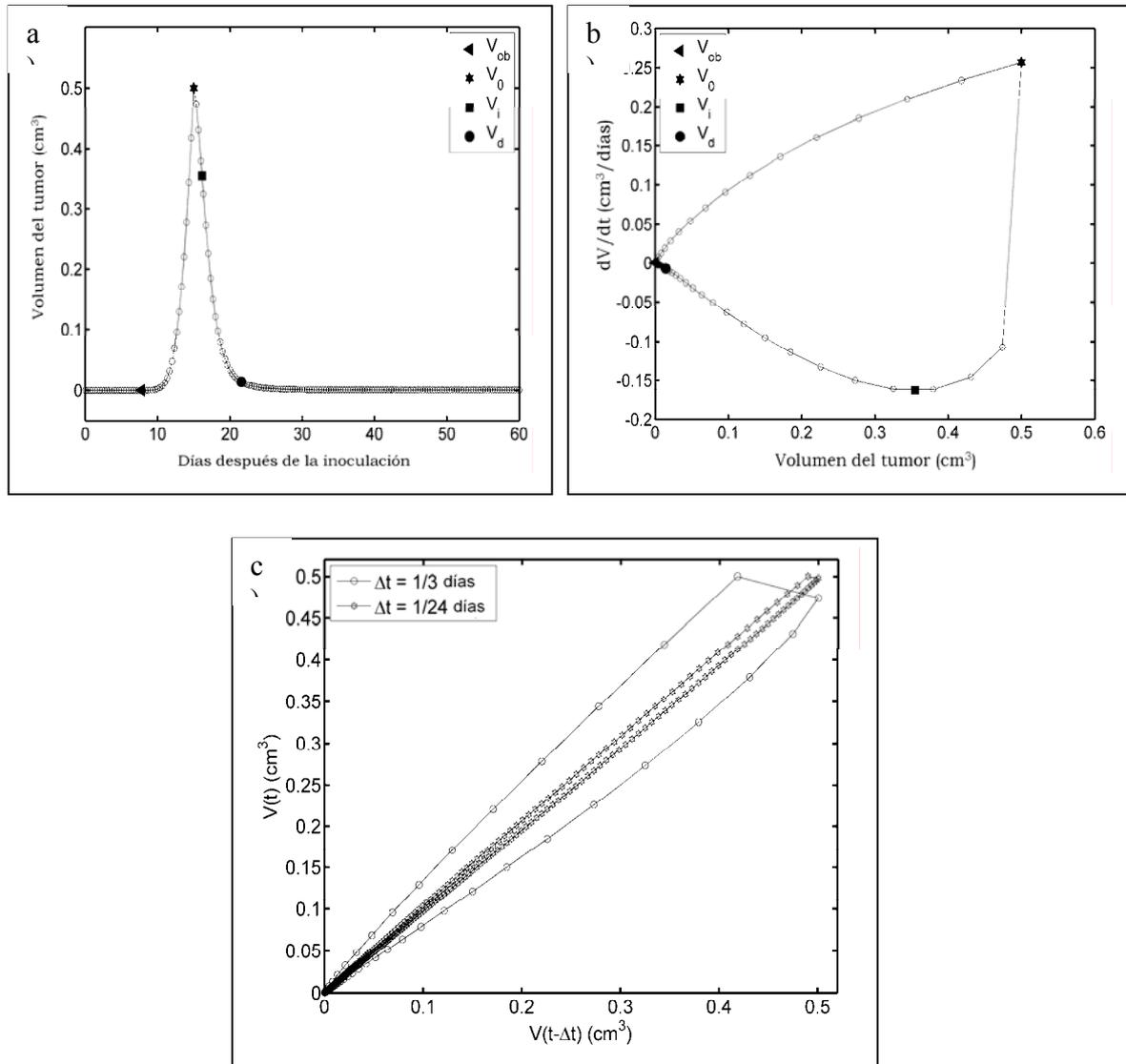
Una imagen completamente diferente se observa en la REG-II de la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 perturbado con CED para GT2-3 (Figura 15). Esta figura muestra los comportamientos del volumen tumoral en el tiempo (Figura 15a), la primera derivada del volumen tumoral contra el volumen tumoral (Figura 15b) y la del volumen tumoral que se evalúa en el instante  $t$ ,  $V(t)$ , contra este volumen que se evalúa en el instante  $(t - \Delta t)$ ,  $V(t - \Delta t)$ . La figura 15a, para  $\Delta t = 1/3$  días, muestra que la cinética de crecimiento tumoral se caracteriza por la disminución del volumen del tumor desde  $V_0$  hasta  $0 \text{ cm}^3$  con dos sub-regiones bien definidas (REG-IIc y REG-IIId).

En REG-IIc, el volumen del tumor fibrosarcoma Sa-37 varía rápidamente desde  $V_0$  hasta  $V_d$  (que se estima en  $0,014 \text{ cm}^3$  a los 21,58 días); sin embargo, en la REG-IIId, este varía desde  $V_d$  hasta cero, valor que se estima a los 30 días después de la inoculación (15 días después de la aplicación de la CED). Resultado similar al que se muestra en esta figura se observa para los otros valores de  $\Delta t$ . Esta figura revela que en la REG-IIc existe un punto de inflexión  $V_i$ , que se estima en (16,15 días;  $0,355 \text{ cm}^3$ ).

El gráfico de la primera derivada del volumen tumoral ( $dV/dt$ ) contra el volumen del tumor (Figura 15b) revela que estas dos magnitudes disminuyen desde  $V_0$  hasta 0 con cambio de pendiente de la primera derivada pero no de signo. El cambio de pendiente ocurre cuando el volumen del tumor alcanza el valor  $V_i$ , el cual se estima en ( $0,355 \text{ cm}^3$ ;  $0,163 \text{ cm}^3/\text{día}$ ). El uso de la EGM permite estimar  $V_d$  en ( $0,014 \text{ cm}^3$ ;  $-0,0072 \text{ cm}^3/\text{día}$ ).

El crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 es completamente reversible para todo valor de  $\Delta t$ , como se muestra en la figura 15c para  $\Delta t = 1/3$  y  $1/24$  días. Esto se evidencia porque la cinética de crecimiento del grupo GT2-3 es un lazo cerrado después de la aplicación de la CED.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 15.** Cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 perturbado con CED (GT2-3) para los parámetros  $i = 14,8$  mA,  $\alpha = 0,513$  días<sup>-1</sup>,  $\beta = 0,262$  días<sup>-1</sup>,  $\gamma = 0,107$  días<sup>-1</sup>,  $i_0 = 1,080$  mA,  $V_0 = 0,5$  cm<sup>3</sup>. (a) volumen tumoral en función del tiempo para  $\Delta t = 1/3$  días. (b) primera derivada del volumen tumoral ( $dV/dt$ ) contra el volumen tumoral para  $\Delta t = 1/3$  días. (c) volumen tumoral evaluado en el tiempo  $t$  ( $V(t)$ ) contra el mismo volumen evaluado en el tiempo  $(t - \Delta t)$ ,  $V(t - \Delta t)$  para ( $\Delta t = 1/3$  y  $1/24$  días).

La figura 15c revela que las regiones REG-I y REG-II son proporcionales y no simétricas para el GT2-3, hecho que se demuestra analíticamente si ambas regiones se ajustan a una línea recta. Para la REG-I, la pendiente  $\pm$  su error y el intercepto  $\pm$  su error son  $0,724 \pm 0,011$  y  $-0,729 \pm 0,024$ , respectivamente. Estos respectivos parámetros, para la REG-II, son  $0,992 \pm 0,031$  y  $-0,524 \pm 0,068$ . La proporción de estas pendientes es 1,37.

Los resultados que se muestran de la cinética de crecimiento para el fibrosarcoma Sa-37 (Figuras 13-15) son similares a los del tumor de Ehrlich, para los tres grupos experimentales y los valores de  $\Delta t$ . Esta es la razón por la que esos resultados no se incluyen en esta Tesis.

### 3.1.3. Modelación y visualización de las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generadas por un arreglo elíptico de electrodos

#### 3.1.3.1. Un medio de conductividad constante (tumor plano)

Las figuras 16-18 muestran las distribuciones del potencial (a) y de la intensidad del campo eléctrico (b) generadas por un arreglo de electrodos con  $b_1 = 5$  mm y  $b_2 = 5$  mm ( $e = 0$ );  $b_1 = 9,49$  mm y  $b_2 = 5$  mm ( $e = 0,85$ ); y  $b_1 = 35,44$  mm y  $b_2 = 5$  mm ( $e = 0,99$ ), respectivamente, para los otros parámetros constantes. Las figuras 16a-18a comparan las soluciones exactas de orden principal y primer orden para el potencial,  $\Phi^0(x,y)$  [parte real de ecuación (19)] y  $\Phi^1(x,y)$  [parte real de ecuación (22)]. Las figuras 16b-18b comparan las soluciones exactas de orden principal y primer orden para la intensidad del campo eléctrico,  $E^0(x,y)$  [parte real de ecuación (21)] y  $E^1(x,y)$  [parte real de ecuación (25)].

Las líneas de contorno en las figuras 16b-18b son las líneas equipotenciales del campo eléctrico. Estas líneas se plotean para los mismos incrementos de potencial, por esta razón el espacio entre estas incrementa con la distancia. También, el espacio entre las mismas es una medida de la intensidad del campo eléctrico.

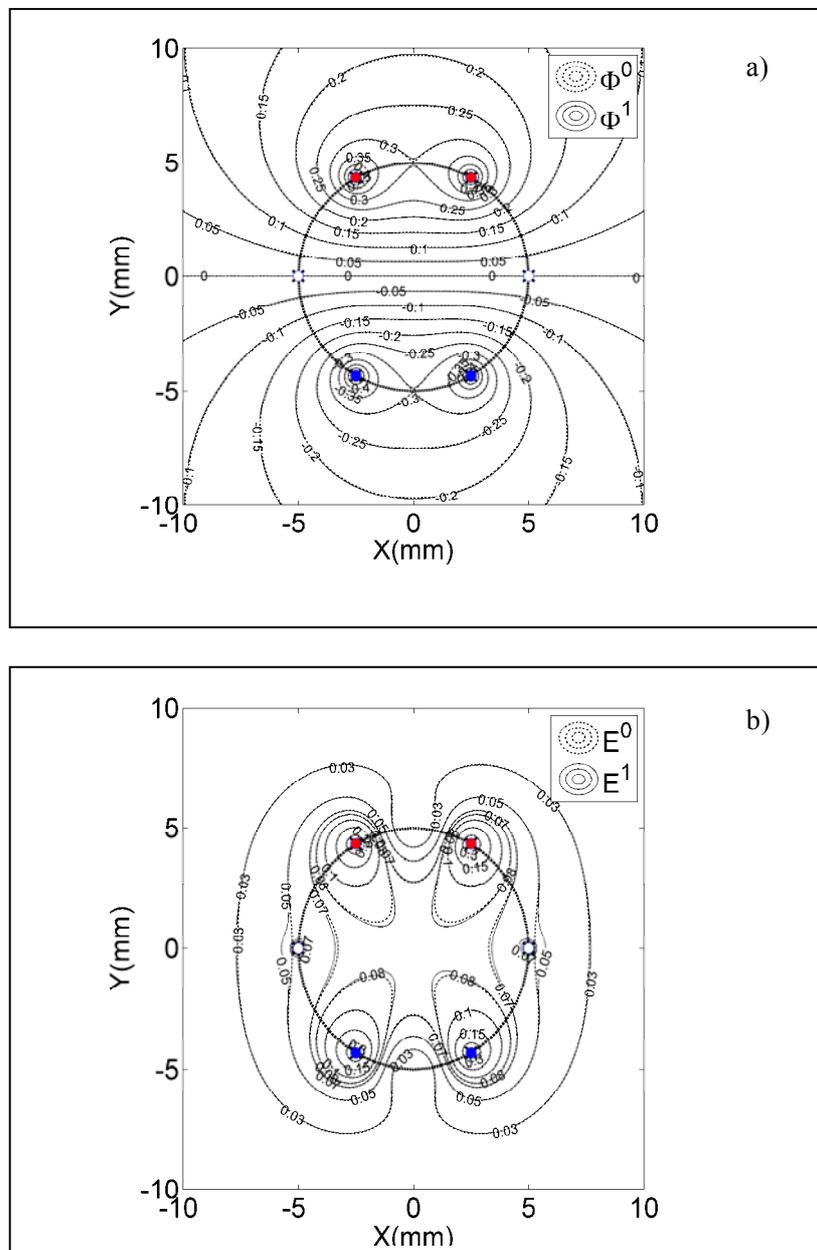
Las figuras 16-18 revelan que para cada valor de  $e$ , en la región dentro del arreglo de electrodos, existen pequeñas diferencias entre los dos gráficos de  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$  y  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$ , las cuales se cuantifican mediante  $D_{\text{máx}}$  y RMSE (Tabla 19). En estas figuras se observa que las magnitudes del potencial y campo eléctrico son más intensas en la superficie de los electrodos activos y estas disminuyen con la distancia entre los electrodos. Un hecho

interesante que se observa en las figuras 16b-17b es la pequeña perturbación existente en el campo eléctrico, cerca de los electrodos inactivos, la cual no se observa en la figura 18b alrededor de estos mismos electrodos.

Las figuras 16a,b muestran que las distribuciones del potencial y la intensidad del campo eléctrico cambian cuando los electrodos se insertan en un arreglo circular ( $b_1 = b_2 = 5$  mm). Estos resultados y las ecuaciones (18-18d; 19; 20; 24 y 25) concuerdan con los de Dev y cols. [136] (Figuras 16a,b).

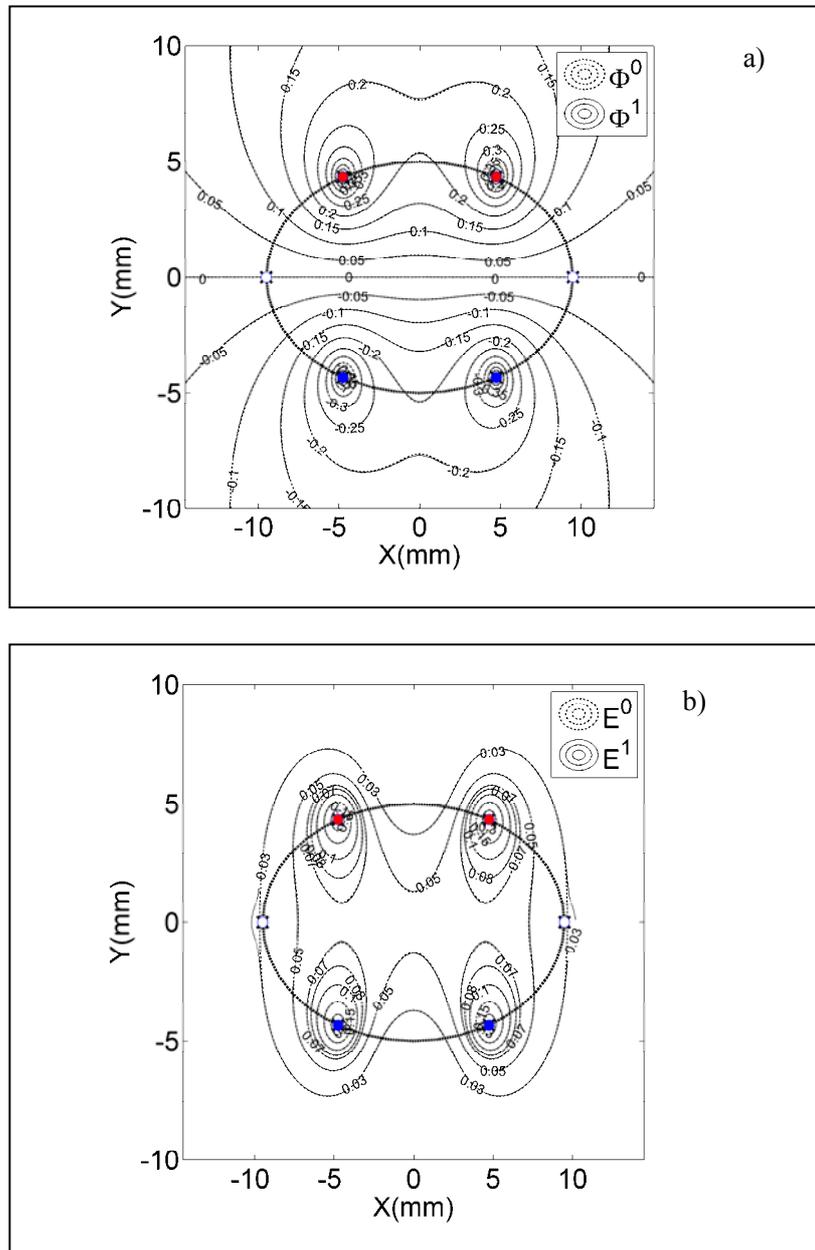
Se observan pequeñas diferencias entre  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$  (Figura 16a) y  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$  (Figura 16b). La diferencia máxima entre  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$  es 0,002 V mientras que entre  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$  es 0,005 V/mm. Las líneas equipotenciales en el medio del arreglo de electrodos son paralelas e igualmente espaciadas, lo que indica que el campo eléctrico es uniforme. Las distribuciones del potencial y el campo eléctrico (Figuras 16a,b) no se modifican con el aumento del radio del electrodo y se obtienen para  $a = 0,5$  mm,  $b_1 = 10$  mm y  $b_2 = 5$  mm, para los otros parámetros constantes. Sin embargo, las figuras 17 y 18 revelan patrones de distribución del potencial y el campo eléctrico diferentes a los que se muestran en la figura 16, siendo más marcado para el mayor valor de  $e$ . Estas diferencias se calculan mediante  $D_{\text{máx}}$  y RMSE para las distribuciones de  $\Phi^0(x,y)$  y  $E^0(x,y)$ , como se muestra en la tabla 20, la cual revela que  $D_{\text{máx}}$  y RMSE aumentan con el aumento de  $e$ . Similares diferencias de estos dos parámetros se encuentran para  $\Phi^1(x,y)$  y  $E^1(x,y)$  (resultados que no se muestran). Las figuras 17 y 18 muestran que no existen diferencias entre los gráficos de  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$  ni  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$ , e indican que las líneas equipotenciales en la región central del arreglo de electrodos no son paralelas ni están espaciadas igualmente. Esto sugiere que el campo eléctrico en esta región no es uniforme. Las simulaciones muestran que estas diferencias son más marcadas para valores pequeños de  $b_1$  y  $b_2$  ( $b_2 \leq b_1 \leq 3$  mm) y el radio mayor del electrodo que se utiliza en la electroterapia ( $a = 0,5$  mm). El radio del electrodo que se emplea en esta terapia experimental está en el rango de 0,25 a 0,5 mm.

Las distribuciones del potencial y la intensidad del campo eléctrico (Figuras 16-18) cambian con el aumento de  $V_o$ , salvo que los valores de sus isolíneas aumentan linealmente con el incremento de  $V_o$ .

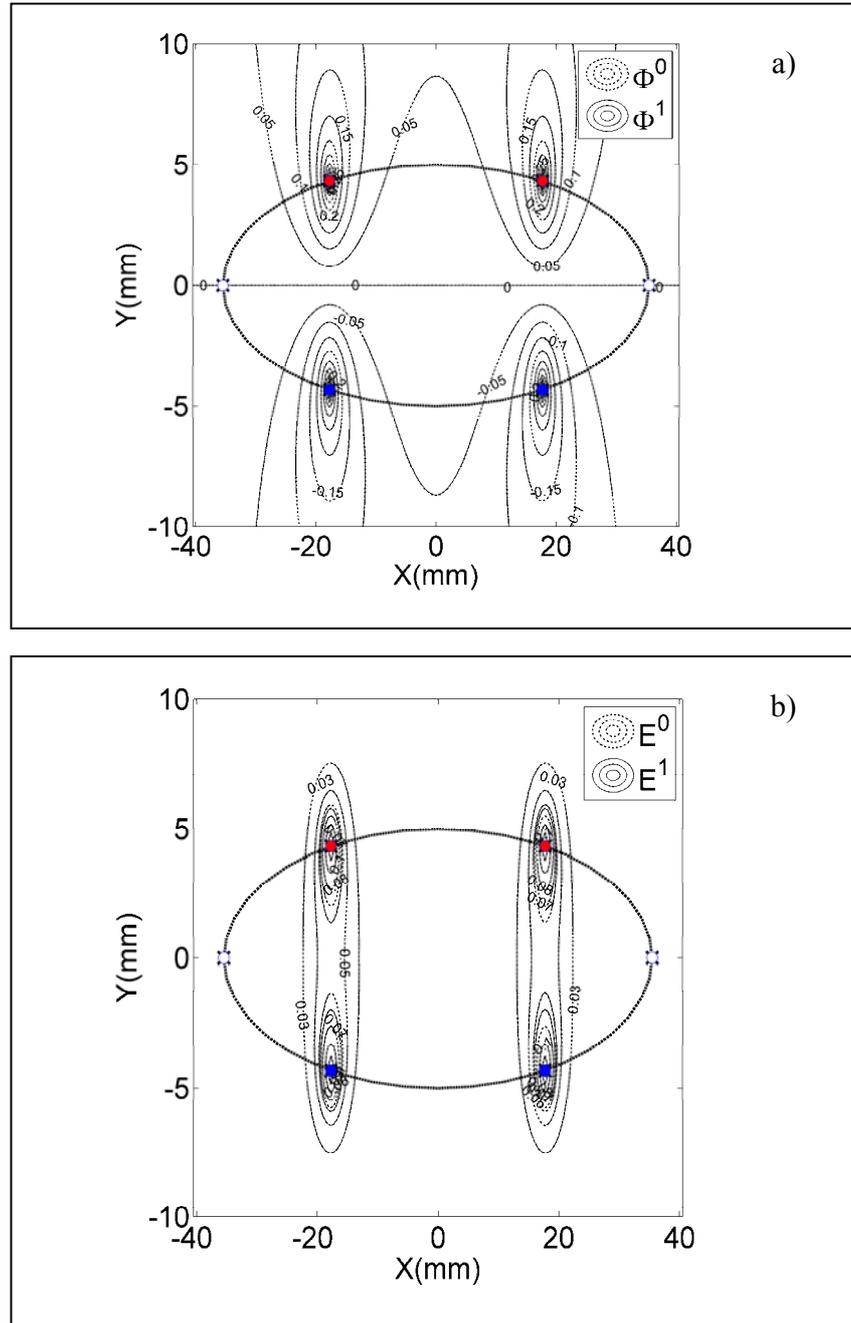


**Figura 16.** Distribuciones del (a) potencial, en orden cero del ( $\Phi^0$ ) y orden uno ( $\Phi^1$ ), y (b) intensidad del campo eléctrico, en orden cero ( $E^0$ ) y orden uno ( $E^1$ ), para un arreglo de electrodos circular. Las simulaciones se realizan para  $a = 0,215$  mm,  $b_1 = 10$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $\theta = 60^\circ$ ,  $V_o = +0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = -0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 17.** Distribuciones del (a) potencial, en orden cero ( $\Phi^0$ ) y orden uno ( $\Phi^1$ ), y (b) intensidad del campo eléctrico, en orden cero ( $E^0$ ) y orden uno ( $E^1$ ) para un arreglo de electrodos elíptico. Las simulaciones se realizan para  $a = 0,215$  mm,  $b_1 = 10$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $\theta = 60^\circ$ ,  $V_o = +0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = -0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4.



**Figura 18.** Distribuciones del (a) potencial, en orden cero del ( $\Phi^0$ ) y orden uno ( $\Phi^1$ ), y (b) intensidad del campo eléctrico, en orden cero ( $E^0$ ) y orden uno ( $E^1$ ) para un arreglo de electrodos elíptico. Las simulaciones se realizan para  $a = 0,215$  mm,  $b_1 = 35,444$  mm,  $b_2 = 5$  mm ( $e = 0,99$ ),  $\theta = 60^\circ$ ,  $V_o = +0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = -0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4.

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 19.** Error de la Raíz Media Cuadrática (RMSE) y Diferencia máxima ( $D_{\text{máx}}$ ) entre  $\Phi^0(x,y)$  y  $\Phi^1(x,y)$ , y  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$  para  $b_2 = 5$  mm y diferentes valores de excentricidad ( $e$ )

e	$b_1$ (mm)	$\Phi^0(x,y)$ y $\Phi^1(x,y)$		$E^0(x,y)$ y $E^1(x,y)$	
		$D_{\text{máx}}$ V	RMSE ( $\times 10^{-4}$ )	$D_{\text{máx}}$ (V/m)	RMSE ( $\times 10^{-3}$ )
0,00	5,0000	0,0023	4,5199	0,0084	1,1207
0,15	5,0572	0,0022	4,4581	0,0082	1,1011
0,25	5,1640	0,0021	4,3563	0,0096	1,0895
0,35	5,3376	0,0022	4,2415	0,0088	1,0637
0,45	5,5989	0,0021	4,0635	0,0077	1,0049
0,55	5,9868	0,0023	3,8859	0,0087	9,8359
0,70	7,0014	0,0051	4,0324	0,0403	1,4545
0,75	7,5593	0,0161	5,1139	0,8704	1,1924
0,80	8,3333	0,0309	6,8611	1,3913	2,0767
0,85	9,4916	0,0253	6,2651	1,1372	1,6920
0,89	10,966	0,0198	5,3139	0,8806	1,3395
0,91	12,060	0,0167	4,7617	0,7305	1,1400
0,93	13,603	0,0133	4,1555	0,5659	9,2133
0,95	16,013	0,0096	3,4818	0,4044	6,8079
0,97	20,567	0,0074	2,7081	0,2522	4,2124
0,99	35,444	0,0040	1,6863	0,0701	1,5919

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 20.** Error de la Raíz Media Cuadrática (RMSE) y Diferencia máxima ( $D_{\text{máx}}$ ) para  $\Phi^0(x,y)$  y  $E^0(x,y)$  generado por un arreglo elíptico de electrodos, para diferentes valores de excentricidad ( $e$ ) y  $b_2 = 5$  mm, comparado con aquellos generados por un arreglo circular de electrodos

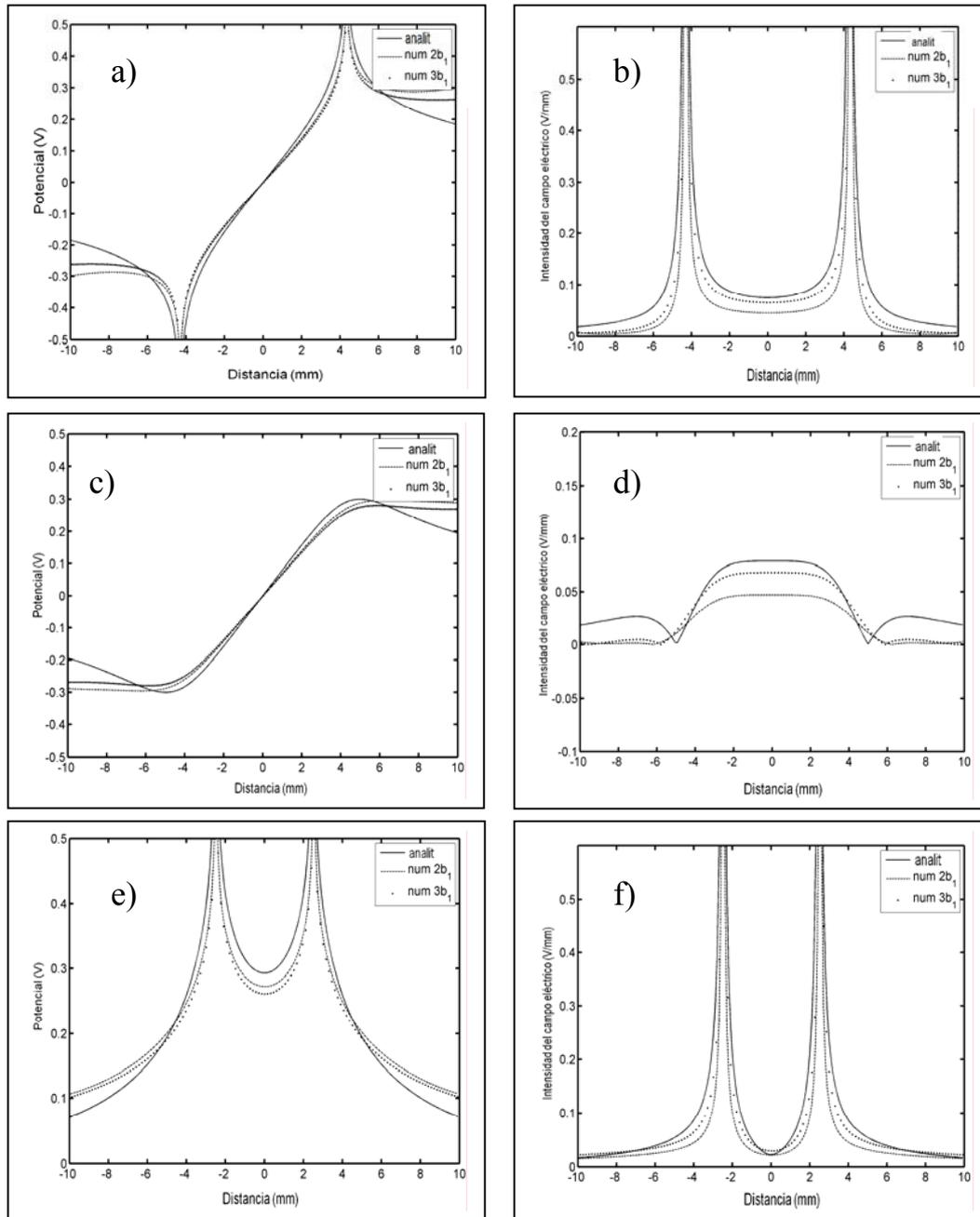
e	$b_1$ (mm)	$\Phi^0(x,y)$		$E^0(x,y)$	
		$D_{\text{máx}}$ (V)	RMSE	$D_{\text{máx}}$ (V/m)	RMSE
0,00	5,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,15	5,0572	0,0044	0,0352	0,0085	0,0319
0,25	5,1640	0,0123	0,1003	0,0231	0,0894
0,35	5,3376	0,0244	0,2052	0,0445	0,1777
0,45	5,5989	0,0415	0,3609	0,0721	0,2999
0,55	5,9868	0,0642	0,5862	0,1028	0,4602
0,70	7,0014	0,1116	1,1440	0,1506	0,7941
0,75	7,5593	0,1329	1,4318	0,1664	0,9416
0,80	8,3333	0,1587	1,8105	0,1812	1,1191
0,85	9,4916	0,1903	2,3312	0,1949	1,3440
0,89	10,966	0,2223	2,9156	0,2053	1,5839
0,91	12,060	0,2416	3,2944	0,2104	1,7375
0,93	13,603	0,2642	3,7559	0,2156	1,9257
0,95	16,013	0,2913	4,3292	0,2212	2,1631
0,97	20,567	0,3249	5,0556	0,2278	2,4697
0,99	35,444	0,3416	3,2945	0,2367	2,8711

Los gráficos de contorno del potencial y la intensidad del campo que se obtiene por el método FDM son muy similares a los que se muestran en las figuras 16-18 y por esta razón no se muestran.

Las figuras 19-21a,c,e comparan las soluciones numéricas para el potencial con la soluciones analíticas exactas de orden principal  $\Phi^0(x,y)$  y se grafican por tres vías diferentes, a través de: los electrodos 6 y 2, centro del arreglo de electrodos y los electrodos 3 y 2. En las figuras 19-21b,d,f se comparan las intensidades del campo eléctrico. La tabla 21 muestra las diferencias entre las soluciones analítica y numérica para el potencial y la intensidad del campo eléctrico, mediante RMSE y  $D_{\text{máx}}$ , para tres valores de  $e$ : 0 ( $b_1 = b_2 = 5$  mm), 0,85 ( $b_1 = 9,4916$  mm y  $b_2 = 5$  mm), y 0,99 ( $b_1 = 35,44$  mm y  $b_2 = 5$  mm). También, se calculan los valores de  $D_{\text{máx}}$  y RMSE, para una malla de 1 000 x 1 000 son mayores que los que se muestran en la tabla 21 (resultados que no se muestran).

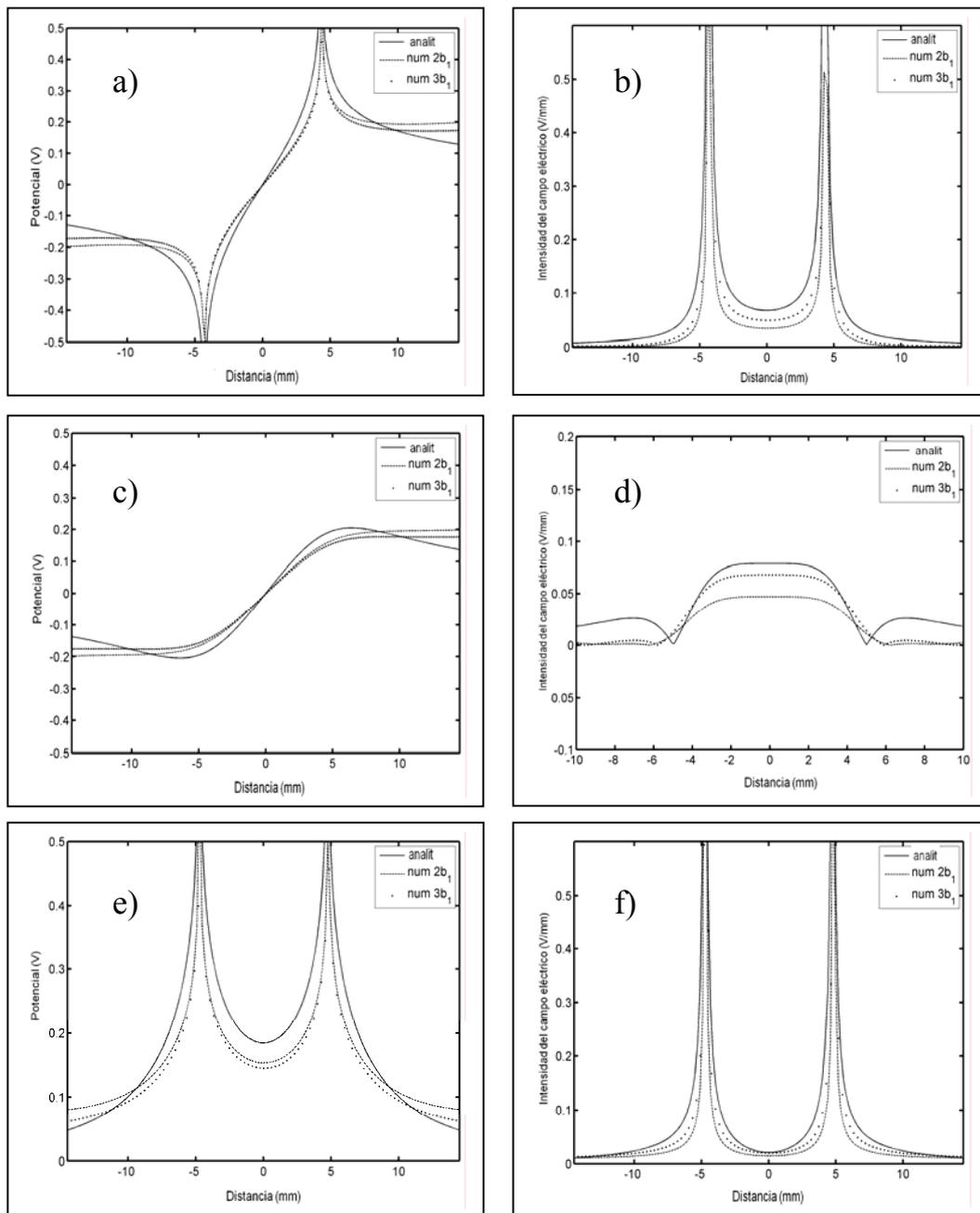
Las figuras 19-21 muestran que fuera del arreglo de electrodos existe una discrepancia entre las soluciones analítica y numérica para todos los valores de  $e$ , siendo más marcada para  $e = 0$ . Esta discrepancia se explica por Dev y cols. [136] y la misma disminuye si  $R_{\text{exterior}}$  aumenta. Estas figuras también muestran que la solución numérica para  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$  se aproxima más a la analítica que para  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$ , para cada valor de  $e$ , hecho que se verifica mediante RMSE (Tabla 21 y Figuras 19-21). La mayor concordancia entre las soluciones analítica y numérica, para  $e = 0,99$ , se observa para el mismo valor de  $R_{\text{exterior}}$  (Figuras 19-21 y Tabla 21). Los pequeños valores de RMSE para las soluciones numéricas ( $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  y  $3b_1$ ) indican que ambas soluciones se aproximan, siendo más marcado para  $e = 0,99$  (Tabla 21 y Figuras 19-21). Las soluciones numéricas para el potencial y la intensidad del campo eléctrico con la exactitud de primer orden revelan patrones como los que se muestran en las figuras 19-21. Con el uso de esta corrección, se reduce la discrepancia que se observa, entre estas dos magnitudes físicas, en el interior del arreglo de electrodos; sin embargo, esta permanece fuera del arreglo de electrodos (resultados que no se muestran).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



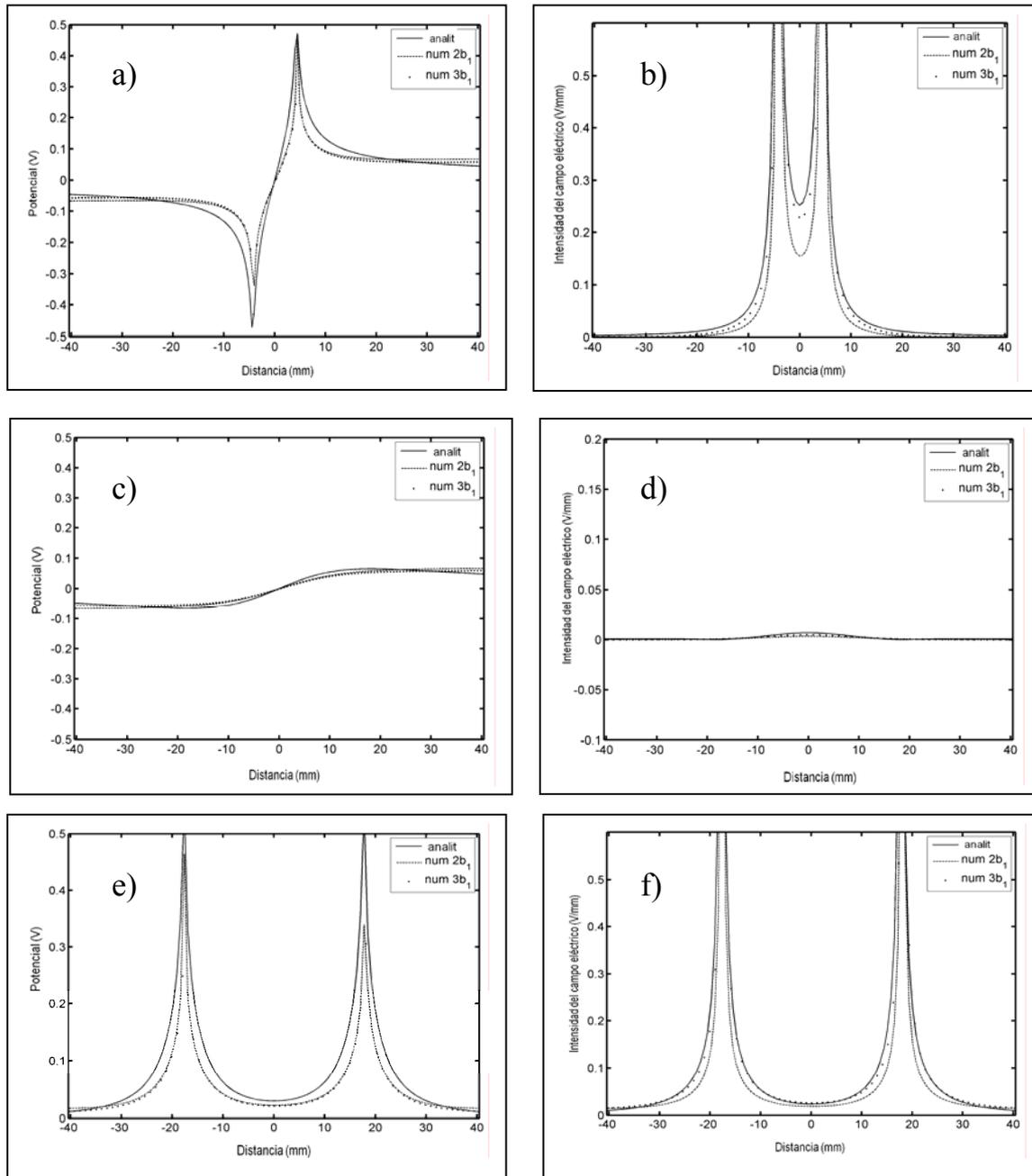
**Figura 19.** Soluciones analítica (línea sólida) y numérica para el potencial e intensidad del campo eléctrico en la aproximación de orden principal para el caso de  $e = 0$ , como función de posición a través de tres caminos diferentes: (a-b) electrodos 6 y 2, (c-d) centro del arreglo, y (e-f) electrodos 3 y 2. Para las soluciones numéricas se usan dos regiones de tamaño diferente  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  (líneas punteadas) y  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$  (puntos).

### CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 20.** Soluciones analítica (línea sólida) y numérica para el potencial e intensidad del campo eléctrico en la aproximación de orden principal para el caso de  $\epsilon = 0,85$ ; como función de posición a través de tres caminos diferentes: (a-b) electrodos 6 y 2, (c-d) centro del arreglo, y (e-f) electrodos 3 y 2. Para las soluciones numéricas se usan dos regiones de tamaño diferente  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  (líneas punteadas) y  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$  (puntos).

### CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 21.** Soluciones analítica (línea sólida) y numérica para el potencial e intensidad del campo eléctrico en la aproximación de orden principal para el caso de  $e = 0,99$ ; como función de posición a través de tres caminos diferentes: (a-b) electrodos 6 y 2, (c-d) centro del arreglo, y (e-f) electrodos 3 y 2. Para las soluciones numéricas se usan dos regiones de tamaño diferente  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  (líneas punteadas) y  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$  (puntos).

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*

**Tabla 21.** Error de la Raíz Media Cuadrática (*RMSE*) entre la solución analítica (AS) y numérica (NS) para  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  y  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$  y diferentes valores de  $e = 0$  ( $b_1 = 5$  mm y  $b_2 = 5$ mm),  $e = 0,85$  ( $b_1 = 9,4916$  mm y  $b_2 = 5$ mm) y  $e = 0,99$  ( $b_1 = 35,444$  mm y  $b_2 = 5$ mm)

e	AS y NS	RMSE					
		Camino a través de los electrodos 2-6 ( $\Phi$ )	Camino a través de los electrodos 2-6 (E)	Camino a través del centro del arreglo ( $\Phi$ )	Camino a través del centro del arreglo (E)	Camino a través de los electrodos 2-3 ( $\Phi$ )	Camino a través de los electrodos 2-3 (E)
0	AS-NS <sub>2b1</sub>	0,0331	0,0326	0,0229	0,0913	0,0472	0,1000
	AS-NS <sub>3b1</sub>	0,0272	0,0283	0,0169	0,0270	0,0371	0,1122
	NS <sub>2b1</sub> -NS <sub>3b1</sub>	0,0061	0,0369	0,0060	0,1151	0,0109	0,0496
0,85	AS-NS <sub>2b1</sub>	0,0580	0,0239	0,0253	0,0327	0,0662	0,0618
	AS-NS <sub>3b1</sub>	0,0524	0,0230	0,0207	0,0301	0,0587	0,0601
	NS <sub>2b1</sub> -NS <sub>3b1</sub>	0,0058	0,0051	0,0046	0,0614	0,0084	0,0126
0,99	AS-NS <sub>2b1</sub>	0,0073	0,0056	0,0046	0,0065	0,0048	0,0013
	AS-NS <sub>3b1</sub>	0,0070	0,0025	0,0039	0,0019	0,0048	0,0011
	NS <sub>2b1</sub> -NS <sub>3b1</sub>	0,0054	0,0034	0,0007	0,0084	0,0035	0,0024

NS<sub>2b1</sub> y NS<sub>3b1</sub> son las soluciones numéricas para  $R_{\text{exterior}} = 2b_1$  y  $R_{\text{exterior}} = 3b_1$ , respectivamente.  $\Phi$  es el potencial y E la intensidad del campo eléctrico.

### 3.1.3.2. Dos medios (tumor plano y su tejido sano circundante)

Las figuras 22-24 muestran las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  que genera un arreglo elíptico de electrodos con  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$ ; respectivamente, para diferentes valores de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y Configuraciones 1, 2 y 3. En estas figuras se observan varios patrones de distribución de densidad de corriente. En las mismas se puede observar que para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y Configuración 1, las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  que se muestran en las figuras 22-24a coinciden con las de  $E^0(x,y)$  y  $E^1(x,y)$ , y sólo difieren en el valor de la conductividad de los dos medios que se reportan en las figuras 16-18b, respectivamente.

Para la Configuración 1, las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$  se muestran en las figuras 22-24a y figuras 22-24d, respectivamente. Para la Configuración 2, las figuras 22-24b muestran estas distribuciones para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  mientras que las figuras 22-24e lo hacen para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ . Las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para los mismos valores de la relación de  $\sigma_1/\sigma_2$  y Configuración 3 se muestran en las figuras 22-24c y 22-24f, respectivamente. En estas figuras, el número de isolíneas es 1 000 y la cercanía de las líneas de densidad de corriente es una medida de la intensidad del vector densidad de corriente eléctrica. Las isolíneas de la densidad de corriente cercanas (distantes) indican una intensificación (debilitamiento) de esta magnitud (Tabla 22).

Las figuras 22-24 muestran pequeñas diferencias entre las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para todos los valores de  $e$ , relación  $\sigma_1/\sigma_2$ , y Configuraciones 1, 2 y 3, las cuales se cuantifican mediante  $D_{\text{máx}}$  y RMSE en  $R_1$  (Tabla 23), y es más evidente para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ,  $e = 0$  y Configuración 2. Esto se evidencia cuando se muestran estas distribuciones a lo largo de los ejes  $x$  y  $y$ ; para  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$ , como se muestra en las figuras 25-27, respectivamente.

Las figuras 25-27a,b muestran las distribuciones de  $J^1(x,y)$  a lo largo de los ejes  $x$  y  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , mientras que las figuras 27-29c,d muestran estas distribuciones para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ . Los valores de la densidad de corriente eléctrica a lo largo del eje  $x$  son más intensos que los que se obtienen a lo largo del eje  $y$ , y estos también dependen de  $e$ . Estas figuras revelan que el aumento de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  respecto a  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  provoca una mayor concentración de las líneas de densidad de corriente eléctrica en el tumor y su interfase  $\Gamma_{21}$ , para  $e$  y el tipo de configuración de electrodos fijos. Este hecho es más marcado para la Configuración 2 y  $e = 0$  (Figuras 22-24b,e). Como resultado, las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$ , difieren significativamente respecto a las de  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  para cualquier relación de  $\sigma_1/\sigma_2$  (Tabla 24).

También, estas líneas de densidad de corriente eléctrica se concentran más en el tumor y su interfase cuando se emplea la Configuración 2 (Figuras 22-27).

La inserción del arreglo de electrodos dentro o fuera de  $\Gamma_{21}$  trae consigo marcadas diferencias en las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  con respecto a las de la Configuración 1 (Tabla 24), hecho que se hace más evidente para  $e = 0$  y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ .

Las simulaciones revelan que las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  en el tumor no se afectan con el aumento de  $\sigma_2$ , cuando la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  es constante para cada valor de  $e$  y Configuraciones 1; 2 y 3. Sin embargo, en el tejido sano circundante se observa un reforzamiento de las magnitudes de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  directamente proporcional a  $\sigma_2$  (resultado que no se muestra).

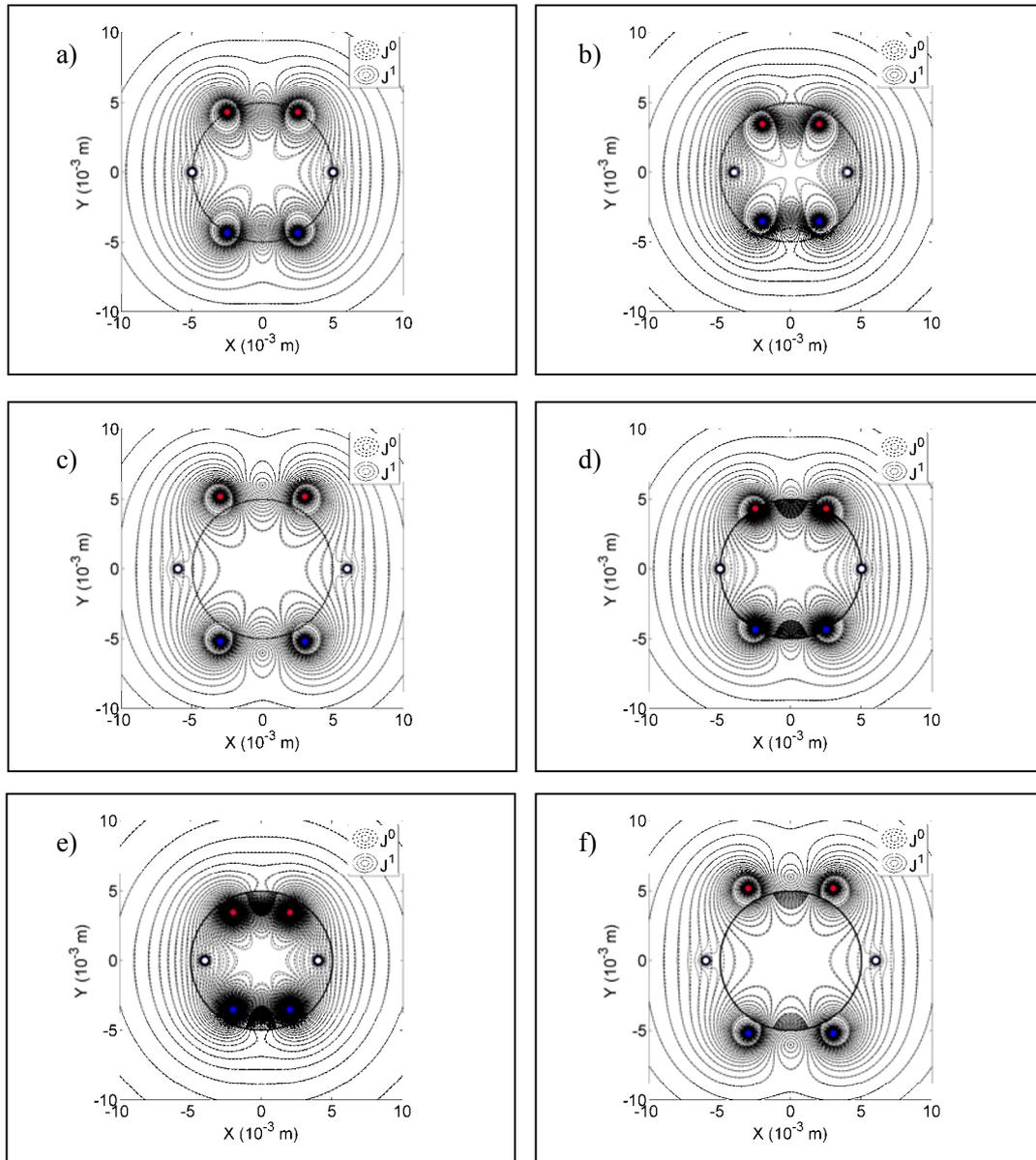
CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 22.** Valores máximos y mínimos de las isolíneas  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$ , para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; y 10,  $e = 0$ ; 0,85 y 0,99, y las Configuraciones 1, 2 y 3. El número de isolíneas es 1 000

e	$\sigma_1/\sigma_2$	Configuración 1		Configuración 2		Configuración 3	
		$J_{\min}$ (A/m <sup>2</sup> )	$J_{\max}$ (A/m <sup>2</sup> )	$J_{\min}$ (A/m <sup>2</sup> )	$J_{\max}$ (A/m <sup>2</sup> )	$J_{\min}$ (A/m <sup>2</sup> )	$J_{\max}$ (A/m <sup>2</sup> )
$J^0(x,y)$							
0	1	0,474	9,562e+003	0,907	2,260e+004	0,3700	5,904e+003
	10	0,474	5,181e+004	3,700	2,260e+005	0,3700	5,904e+003
0,85	1	0,151	6,612e+003	0,264	9,917e+003	0,098	5,469e+003
	10	0,151	6,612e+004	0,264	9,917e+004	0,098	5,469e+003
0,99	1	0,009	4,861e+003	0,016	2,859e+003	0,006	2,999e+003
	10	0,009	4,861e+004	0,016	2,859e+004	0,006	2,999e+003
$J^1(x,y)$							
0	1	0,571	1,084e+004	0,787	7,085e+004	0,405	8,849e+003
	10	0,571	7,681e+004	3,674	7,085e+005	0,405	8,849e+003
0,85	1	0,198	9,658e+003	0,296	1,973e+004	0,118	4,895e+003
	10	0,198	9,658e+004	0,296	1,973e+005	0,118	4,895e+003
0,99	1	0,011	5,799e+003	0,017	2,693e+003	0,008	2,547e+003
	10	0,011	5,799e+004	0,017	2,693e+004	0,008	2,547e+003

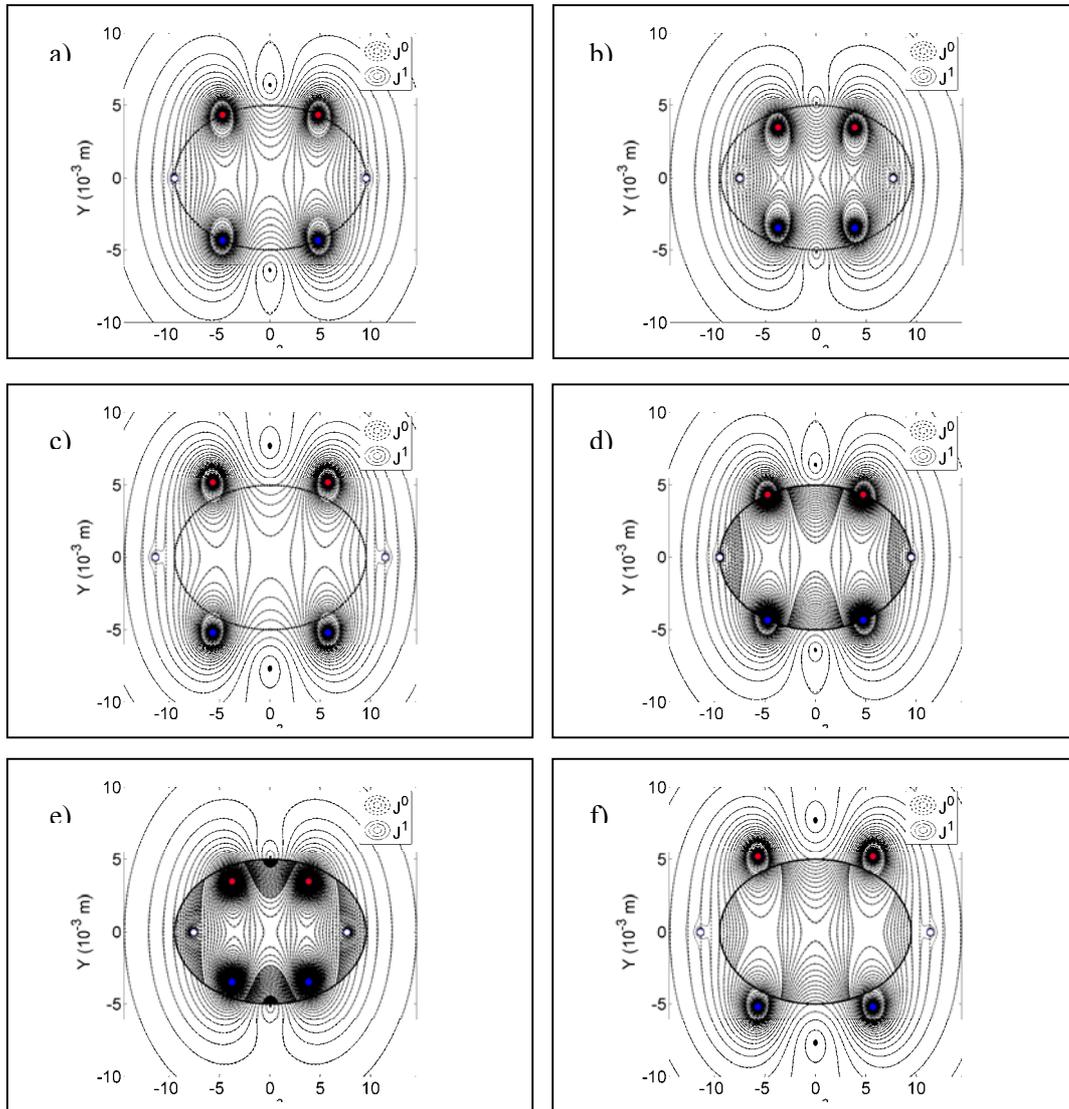
$J_{\min}$  y  $J_{\max}$  son las líneas más distantes y más cercanas de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$ , respectivamente (Figuras 25-27).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



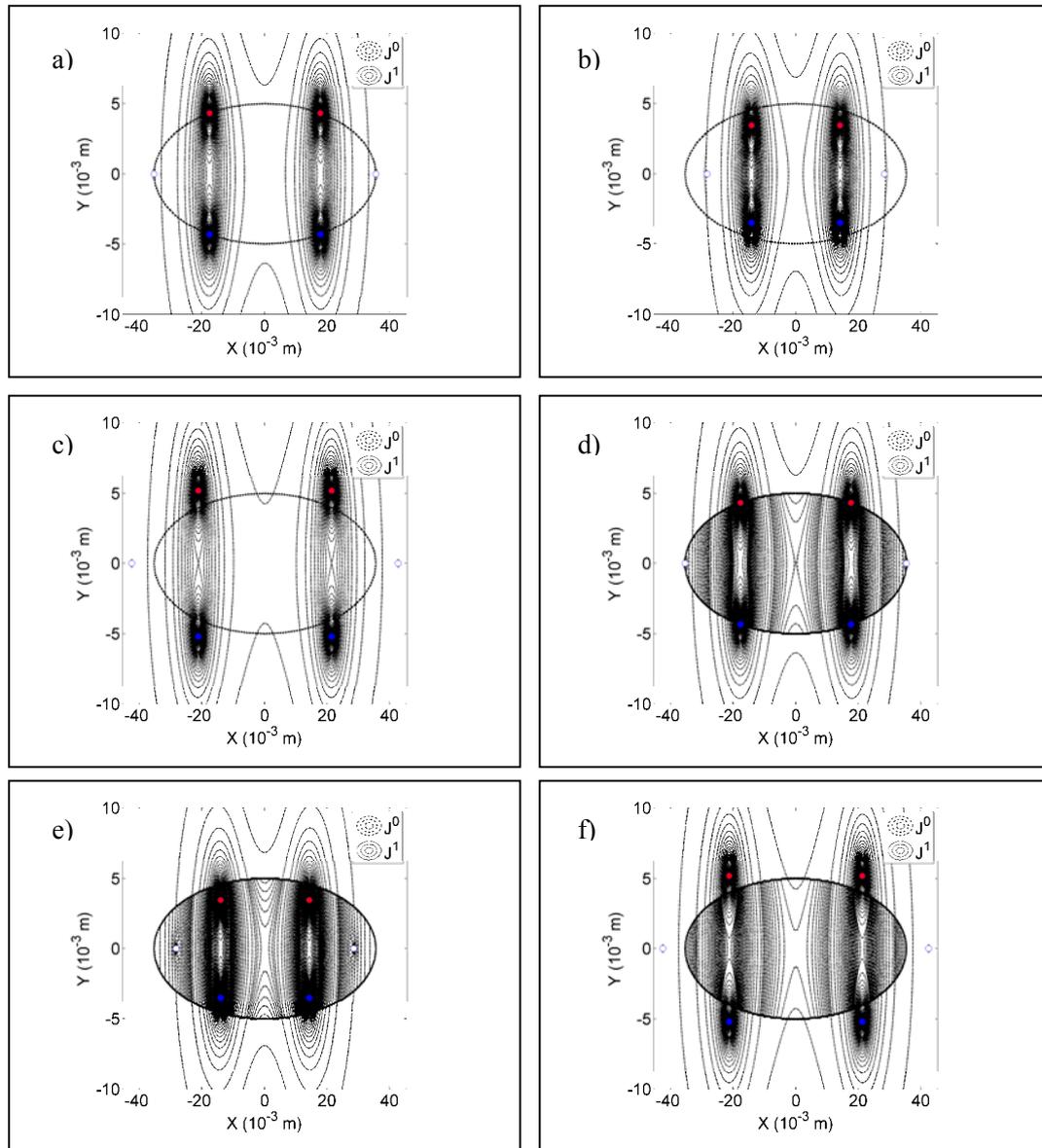
**Figura 22.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden cero,  $J^0(x,y)$ , y orden uno,  $J^1(x,y)$ , para un arreglo de electrodos elíptico con excentricidad  $e = 0$  para: (a) Configuración 1,  $b_1 = b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (b) Configuración 2,  $b_1 = b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (c) Configuración 3,  $b_1 = b_2 = 6$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (d) Configuración 1,  $b_1 = b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; (e) Configuración 2,  $b_1 = b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; y (f) Configuración 3,  $b_1 = b_2 = 6$  mm. Estas simulaciones son hechas para  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $V_o = + 0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = - 0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4. Las unidades de  $a$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  (en mm) se convierten a m.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 23.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden cero,  $J^0(x,y)$ , y orden uno,  $J^1(x,y)$ , para un arreglo de electrodos elíptico con excentricidad  $e = 0,85$  para: (a) Configuración 1,  $b_1 = 9,492$  mm y  $b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (b) Configuración 2,  $b_1 = 7,593$  mm y  $b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (c) Configuración 3,  $b_1 = 11,390$  mm y  $b_2 = 6$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (d) Configuración 1,  $b_1 = 9,492$  mm y  $b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; (e) Configuración 2,  $b_1 = 7,593$  mm y  $b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; y (f) Configuración 3,  $b_1 = 11,390$  mm y  $b_2 = 6$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ . Las simulaciones fueron hechas para  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $V_o = +0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = -0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4. Las unidades de  $a$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  (en mm) se convierten a m.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 24.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden cero,  $J^0(x,y)$ , y orden uno,  $J^1(x,y)$ , para un arreglo de electrodos elíptico con excentricidad  $e = 0,99$  para: (a) Configuración 1,  $b_1 = 35,444$  mm y  $b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (b) Configuración 2,  $b_1 = 28,355$  mm y  $b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (c) Configuración 3,  $b_1 = 45,532$  mm y  $b_2 = 6$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ ; (d) Configuración 1,  $b_1 = 35,444$  mm y  $b_2 = 5$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; (e) Configuración 2,  $b_1 = 28,355$  mm y  $b_2 = 4$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ ; y (f) Configuración 3,  $b_1 = 45,532$  mm y  $b_2 = 6$  mm, y  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ . Las simulaciones son hechas para  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $V_o = +0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = -0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4. Las unidades de  $a$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  (en mm) se convierten a m.

La influencia de los parámetros que se investigan ( $e$ , relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y tipo de configuración de electrodos) sobre las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  se pueden cuantificar a través de la norma euclidiana de distribución de densidad de corriente eléctrica dentro del tumor, que se denomina  $\|J_i\|$ , como se muestra en la figura 28. Se realizan tres estudios adicionales: en el primero, se fijan la posición de los electrodos y la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y se varía  $e$  entre 0 y 0,99 (Figura 28a); en el segundo, la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  se varía entre 0,5 y 10, y se fija la posición de los electrodos y  $e$  (Figura 28b); y en el tercero, se varía la posición de los electrodos entre 0,5 y 10 mm, y se mantiene constante la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y  $e$  (Figura 28c). Para estos tres estudios  $\|J_i\|$  se calcula en una región circular de 3 mm de radio.

La figura 28a muestra la dependencia de la excentricidad de  $\|J_i\|$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 5$ , Configuraciones 1; 2 y 3, para los valores constantes de  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $V_o = +0,5$  V (electrodos 2 y 3),  $V_o = -0,5$  V (electrodos 5 y 6), y  $V_o = 0$  V (electrodos 1 y 4). Los valores de  $b_1$  dependen de  $e$ . Esta figura revela que  $\|J_i\|$  disminuye con el aumento de  $e$ , lo cual es más evidente para  $e \geq 0,8$ . Los mayores valores de esta norma se obtienen para la Configuración 2, para los cuales existen diferencias significativas entre las Configuraciones 1; 2 y 3 por debajo de  $e = 0,85$ . Los valores de  $\|J_i\|$  para  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  no muestran diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), para estas configuraciones de electrodos. Se puede verificar que el comportamiento que se muestra en la figura 28a es similar para otros valores de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  para las Configuraciones 1; 2 y 3. En este caso,  $\|J_i\|$  aumenta con el aumento de esta relación.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 23.** Raíz de los errores cuadrados medios, RMSE, (en  $A/m^2$ ) y la diferencia máxima,  $D_{m\acute{a}x}$ , (en  $A/m^2$ ), empleada para cuantificar las diferencias entre las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  que se obtienen para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10,  $e = 0; 0,85$  y  $0,99$ ; y Configuraciones 1; 2 y 3

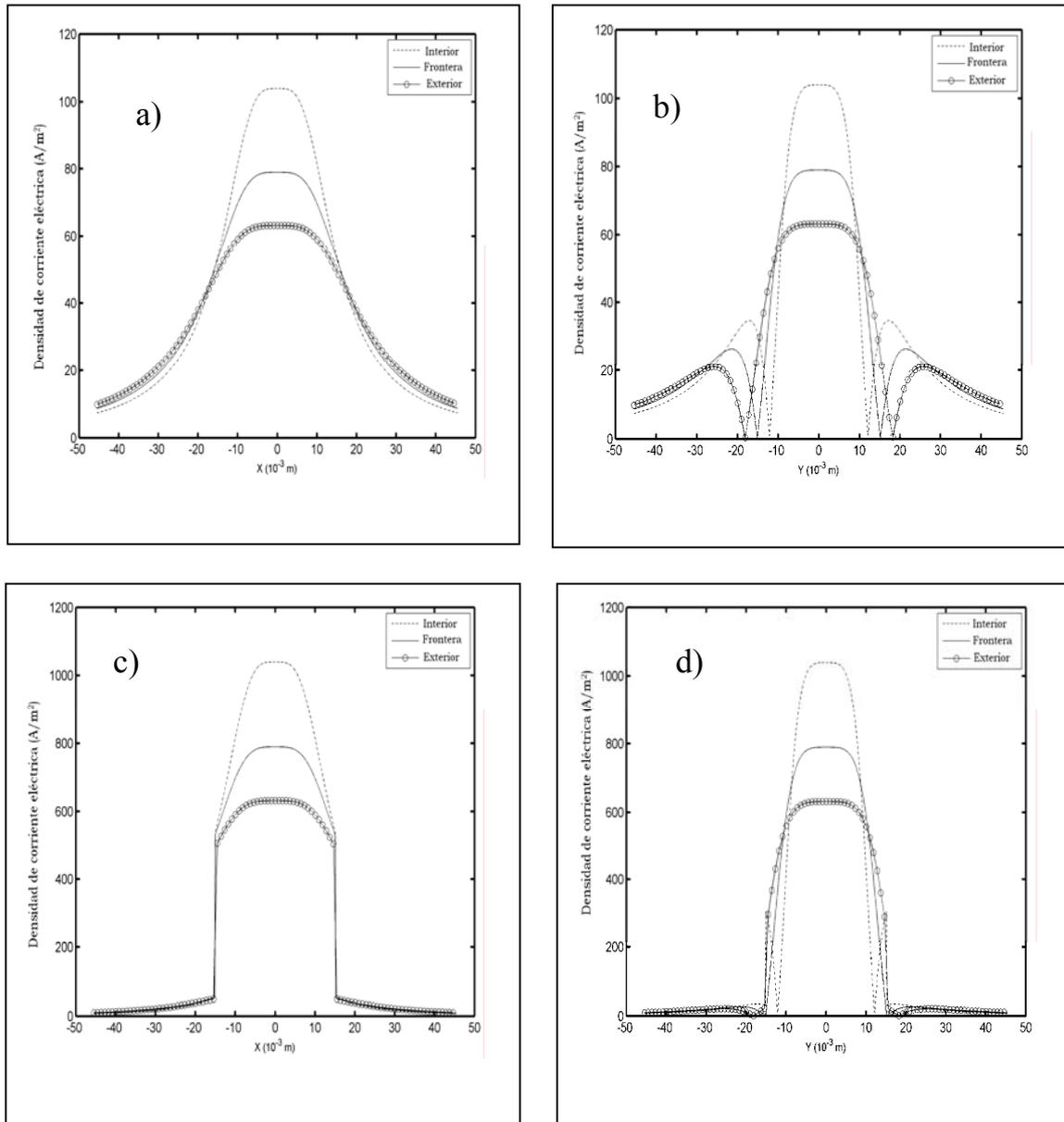
e	$\sigma_1/\sigma_2$	Configuración 1		Configuración 2		Configuración 3	
		$D_{m\acute{a}x}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )	$D_{m\acute{a}x}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )	$D_{m\acute{a}x}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )
0	1	2,478	0,750	3,453	1,394	1,9100	0,456
	10	24,776	7,500	34,532	13,939	19,097	4,562
0,85	1	0,770	0,186	1,169	0,356	0,483	0,108
	10	7,695	1,742	11,694	3,486	4,832	0,989
0,99	1	0,011	0,006	0,022	0,013	0,006	0,004
	10	0,107	0,041	0,219	0,094	0,060	0,023

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

**Tabla 24.** Raíz de los errores cuadrados medios,  $RMSE$ , (en  $A/m^2$ ) y la diferencia máxima,  $D_{\max}$ , (en  $A/m^2$ ) para cuantificar las diferencias entre las distribuciones de  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  que se obtienen de la comparación de  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$  respecto a  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , en  $R_1$ , manteniendo fijas las Configuraciones 1, 2 y 3. Esta tabla también muestra los valores de  $RMSE$  y  $D_{\max}$  para estas distribuciones que se obtienen de la comparación de las Configuraciones 2 y 3 con respecto a la Configuración 1. En ambas situaciones,  $\sigma_2 = 1$  S/m y el tamaño de  $R_1$  es  $b_1 = 3$  mm y  $b_2 = 3$  mm (para  $e = 0$ ),  $b_1 = 5,695$  mm y  $b_2 = 3$  mm (para  $e = 0,85$ ) y  $b_1 = 21,261$  mm y  $b_2 = 3$  mm (para  $e = 0,99$ )

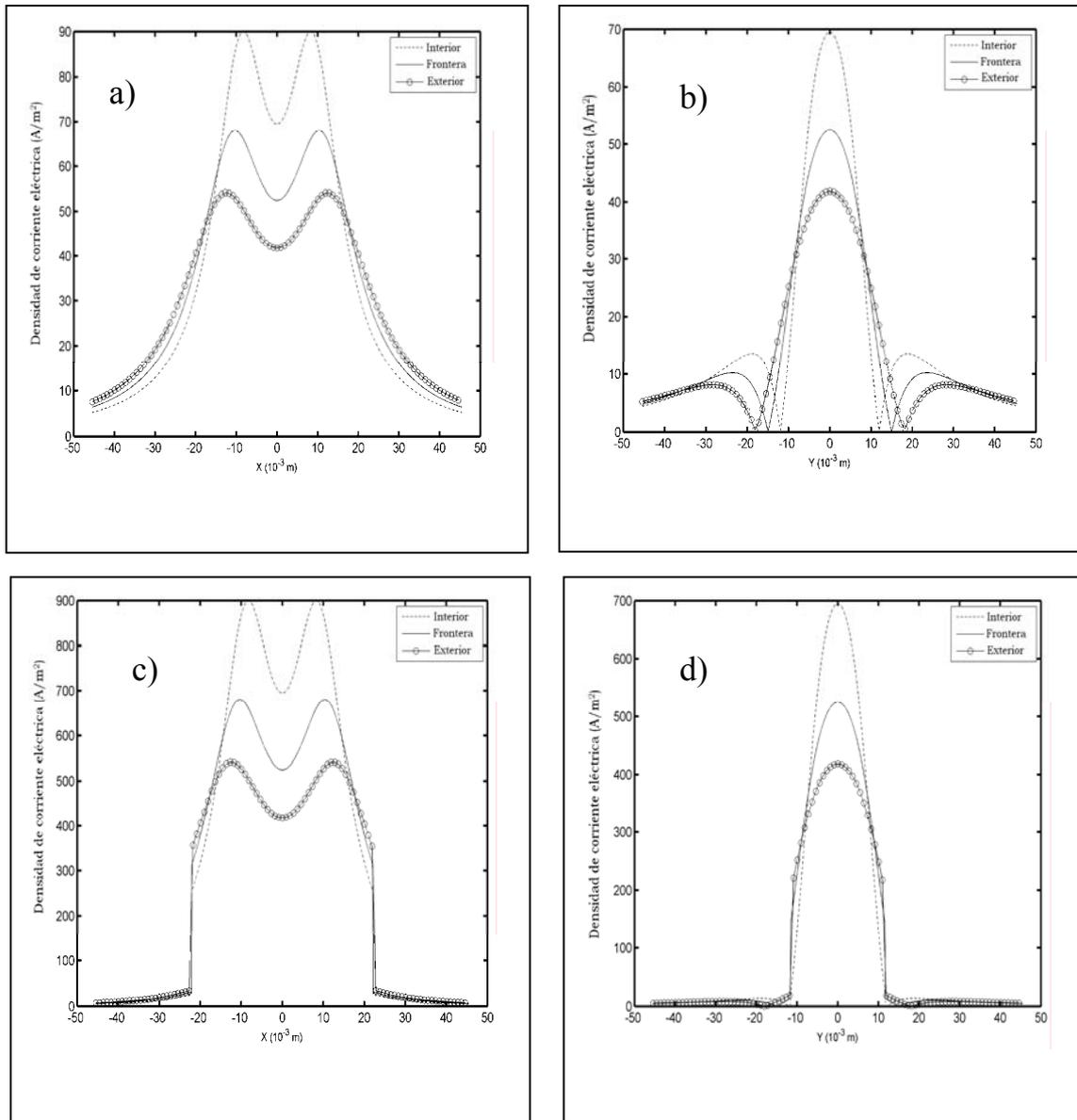
e	$\sigma_1/\sigma_2$	Configuración 1		Configuración 2		Configuración 3	
		$D_{\max}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )	$D_{\max}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )	$D_{\max}$ ( $A/m^2$ )	RMSE ( $A/m^2$ )
Comparación de $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ con respecto a $\sigma_1/\sigma_2 = 1$							
$J^0(x,y)$ en $R_1$							
0	1	0	0	0	0	0	0
	10	816,918	711,605	1382,112	946,922	606,051	568,571
0,85	1	0	0	0	0	0	0
	10	580,914	421,613	978,997	564,242	435,146	340,507
0,99	1	0	0	0	0	0	0
	10	67,641	32,936	93,693	42,971	52,542	26,459
$J^1(x,y)$ en $R_1$							
0	1	0	0	0	0	0	0
	10	823,075	716,672	1404,869	958,996	608,977	571,219
0,85	1	0	0	0	0	0	0
	10	582,998	423,061	988,170	567,241	436,023	341,298
0,99	1	0	0	0	0	0	0
	10	67,732	32,982	93,891	43,066	52,592	26,485
Comparación de las Configuraciones 2 y 3 con respecto a la Configuración 1							
$J^0(x,y)$ en $R_1$							
0	1	0	0	63,532	26,895	23,473	15,974
	10	0	0	635,316	268,949	234,730	159,742
0,85	1	0	0	46,146	17,424	17,326	9,692
	10	0	0	461,463	173,750	173,262	96,152
0,99	1	0	0	2,895	1,240	1,678	0,821
	10	0	0	28,947	11,261	16,776	7,237
$J^1(x,y)$ en $R_1$							
0	1	0	0	65,334	27,655	23,847	16,241
	10	0	0	653,344	276,552	238,470	162,410
0,85	1	0	0	46,9100	17,611	17,464	9,762
	10	0	0	469,099	175,597	174,644	96,864
0,99	1	0	0	2,907	1,245	1,682	0,823
	10	0	0	29,065	11,313	16,823	7,259

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



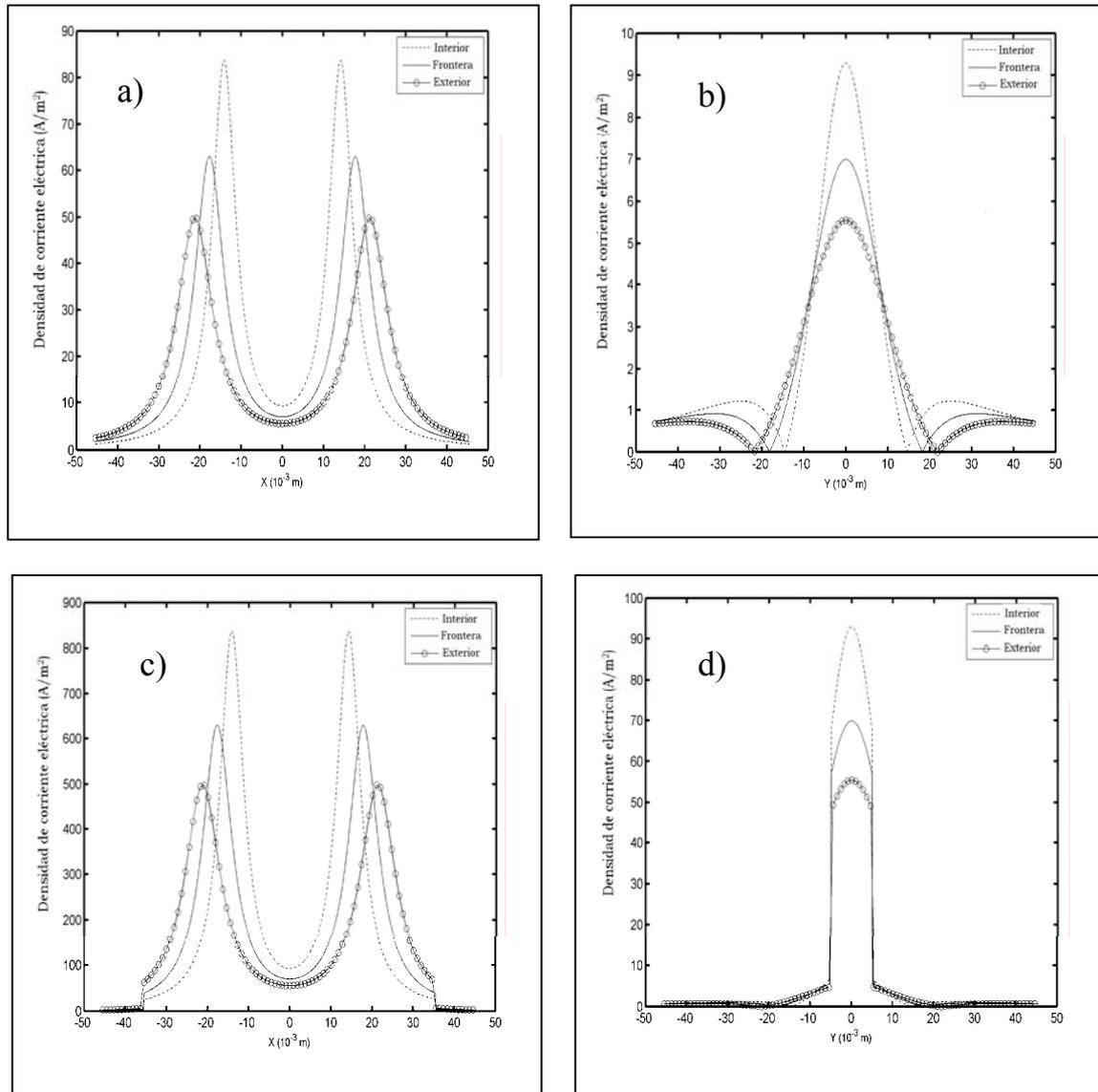
**Figura 25.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden uno,  $J^1(x,y)$ , a lo largo de los ejes  $x$  y  $y$  generadas por las Configuraciones 1 (sobre  $\Gamma_{21}$ ), 2 (dentro de  $\Gamma_{21}$ ) y 3 (fuera de  $\Gamma_{21}$ ) con excentricidad  $e = 0$  y valores de  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10. (a) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (b) eje  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (c) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$  y (d) eje  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ .

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 26.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden uno,  $J^I(x,y)$ , a lo largo de los ejes  $x$  y  $y$  generadas por las Configuraciones (sobre  $\Gamma_{21}$ ), 2 (dentro de  $\Gamma_{21}$ ) y 3 (fuera de  $\Gamma_{21}$ ) con excentricidad  $e = 0,85$  y valores de  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10. (a) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (b) eje  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (c) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$  y (d) ejes  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ .

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



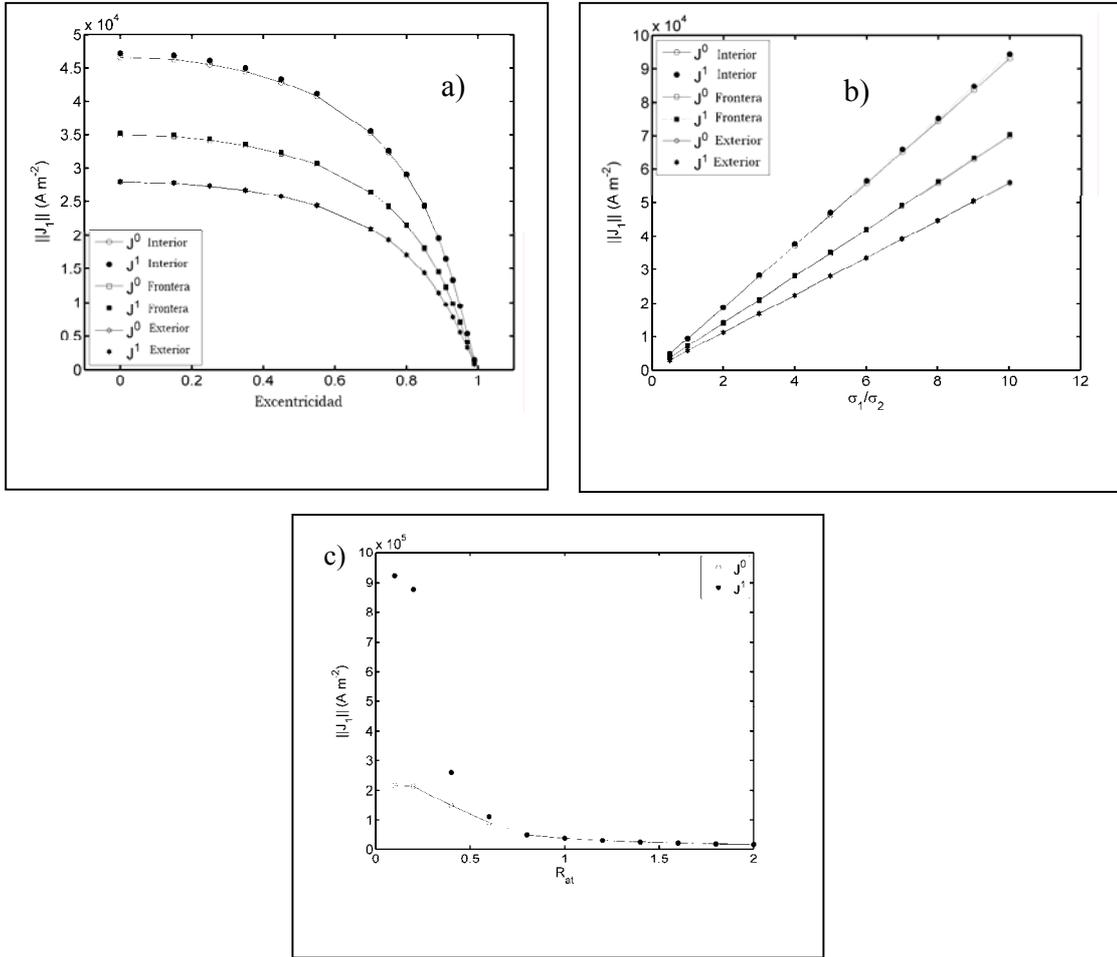
**Figura 27.** Distribuciones de la densidad de corriente eléctrica, en orden uno,  $J^1(x,y)$ , a lo largo de los ejes  $x$  y  $y$  generadas por las Configuraciones (sobre  $\Gamma_{21}$ ), 2 (dentro de  $\Gamma_{21}$ ) y 3 (fuera de  $\Gamma_{21}$ ) con excentricidad  $e = 0,99$  y valores de  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$  y 10. (a) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (b) eje  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 1$ , (c) eje  $x$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$  y (d) eje  $y$  para  $\sigma_1/\sigma_2 = 10$ .

La figura 28b muestra la dependencia de  $\|J_1\|$  contra la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  para  $e = 0$ , Configuraciones 1; 2 y 3, y los parámetros constantes  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $V_o = + 0,5$  V (electrodos 2 y 3),  $V_o = - 0,5$  V (electrodos 5 y 6), y  $V_o = 0$  V (electrodos 1 y 4). Los valores de  $b_1$  dependen de  $e$ .  $\|J_1\|$  aumenta linealmente con el aumento de la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  para las tres configuraciones de electrodos. Los mayores valores de esta norma se obtienen para la Configuración 2, existiendo diferencias significativas entre las Configuraciones 1, 2 y 3 para  $\sigma_1/\sigma_2 \geq 3$  ( $P < 0,05$ ). Los valores de  $\|J_1\|$  para  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  no muestran diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para estas configuraciones de electrodos. Este mismo comportamiento se muestra para otros valores de  $e$  y las Configuraciones 1; 2 y 3. En este caso,  $\|J_1\|$  disminuye con el aumento de  $e$  (resultado que no se muestra).

Como se indica en la figura 28c,  $\|J_1\|$  disminuye con el aumento de  $R_{at}$  ( $R_{at}$  es la relación entre el radio del arreglo de electrodos y el radio del tumor). Esta figura se obtiene para  $e = 0$ ,  $\sigma_1/\sigma_2 = 5$ , y los valores constantes de  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $V_o = + 0,5$  V (electrodos 2 y 3),  $V_o = - 0,5$  V (electrodos 5 y 6) y  $V_o = 0$  V (electrodos 1 y 4). Los valores de  $b_1$  dependen de  $e$ . De esta figura se puede observar que  $\|J_1\|$  tiende a cero para  $R_{at} \geq 2$  y no existen diferencias significativas en los valores de  $\|J_1\|$  para  $J^0(x,y)$  y  $J^1(x,y)$  para  $R_{at} \geq 0,8$ . Sin embargo,  $J^1(x,y)$  difiere de  $J^0(x,y)$  para  $R_{at}$  por debajo de 0,8; siendo la mayor diferencia para  $R_{at} = 0,1$ . Los valores de  $\|J_1\|$  para  $J^1(x,y)$  son mayores que aquellos para  $J^0(x,y)$ . Se puede demostrar que el comportamiento que se muestra en la figura 28c es el mismo para otros valores de  $e$  y la relación  $\sigma_1/\sigma_2$ . En este caso,  $\|J_1\|$  disminuye cuando  $e$  aumenta y/o  $\sigma_1/\sigma_2$  disminuye (resultados que no se muestran).

Con el uso del programa de computación ONCOMAPET<sup>®</sup> se puede hacer un estudio que muestre como las distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente se afectan si se cambian las polaridades, posición y número de electrodos. También, este programa de computación permite visualizar estas distribuciones para arreglos concéntricos de electrodos que se pueden usar cuando el volumen tumoral es grande ( $V_0 > 1$  cm<sup>3</sup>) (resultados que no se muestran).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 28.** Norma de la densidad de corriente eléctrica dentro del tumor ( $\|J_1\|$ ) en función de los parámetros investigados (excentricidad, relación  $\sigma_1/\sigma_2$  y tres configuraciones de electrodos). (a)  $\|J_1\|$  en función de la excentricidad para  $\sigma_1/\sigma_2 = 5$  y las Configuraciones 1; 2 y 3. (b)  $\|J_1\|$  contra  $\sigma_1/\sigma_2$  para  $e = 0$  y las Configuraciones 1; 2 y 3. (c)  $\|J_1\|$  en función de  $R_{at}$  para  $e = 0$  y  $\sigma_1/\sigma_2 = 5$ . En estas tres figuras, se mantienen constantes  $\theta = 60^\circ$ ,  $a = 0,215$  mm,  $b_2 = 5$  mm,  $V_o = + 0,5$  V para los electrodos 2 y 3,  $V_o = - 0,5$  V para los electrodos 5 y 6, y  $V_o = 0$  V para los electrodos 1 y 4. Los valores de  $b_1$  dependen de  $e$ .

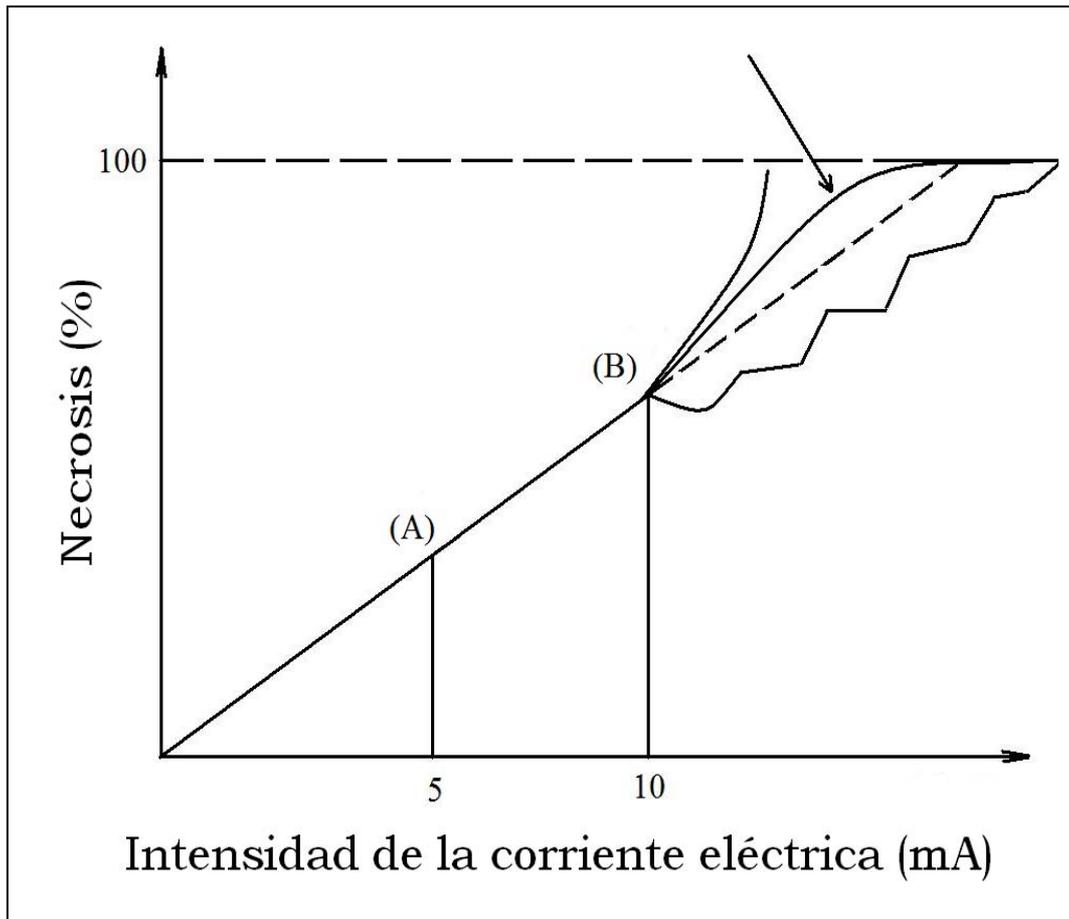
## 3.2. Discusión de los resultados

### 3.2.1. Cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 después de la aplicación de diferentes intensidades de corriente eléctrica directa

Los resultados demuestran que la CED tiene un marcado efecto antitumoral en los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 porque retarda significativamente sus crecimientos después de la aplicación de la CED al ser comparados con sus respectivos grupos controles. Esto se justifica porque el porcentaje de regresión en ambos tipos de tumores aumenta con el incremento de la cantidad de carga eléctrica (intensidad de la CED), aspecto que explica porque la necrosis que se induce en el tumor por la CED incrementa también con la intensidad de este agente físico, en concordancia con todos los resultados que se reportan en la literatura, después de la aplicación de la CED [15, 17, 18, 22, 32, 37, 94].

Los resultados de las Réplicas 1 y 2 son consistentes con los del experimento original para el tumor fibrosarcoma Sa-37 (Tablas 1-4 y Figuras 5 y 8).

Las cinéticas de crecimiento para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 (y sus réplicas) después de la aplicación de la CED evidencian el comportamiento de la necrosis que se induce en el tumor en función de la intensidad de la CED por encima de 10 mA, aspecto no esclarecido hasta el momento en la literatura. En esta Tesis se evidencia que este comportamiento es no lineal y asintótico como el que se muestra esquemáticamente en la figura 29 con la flecha. Este resultado está en correspondencia con el comportamiento no lineal del volumen del tumor (Figuras 5 y 8) y del porcentaje de regresión en función de  $i$  (Tablas 2 y 4). A diferencia de lo que se reporta en esta Tesis, Griffin y cols. [96] y Wemyss-Holden y cols. [97] reportan que el comportamiento de la necrosis en función de la intensidad de la CED es lineal hasta 5 y 10 mA, respectivamente.



**Figura 29.** Representación esquemática de la dependencia del porcentaje de necrosis en función de la intensidad de la CED. Comportamiento lineal hasta 5 mA (A) y 10 mA (B) que reportan Griffin y cols. [96] y Wemyss-Holden y cols. [97], respectivamente. Se representan posibles comportamientos no abordados en la literatura después de 10 mA. El comportamiento que se observa en esta Tesis se representa con la flecha.

A diferencia de la expresión (5), algunos autores emplean la siguiente expresión para calcular el porcentaje de reducción del tumor (en %) [39], dada por

$$PR = \left[ \frac{V_i(t) - V_x(t)}{V_x(t)} - \frac{V_i(0) - V_x(0)}{V_x(0)} \right] 100\%$$

donde  $V_i(0)$  y  $V_x(0)$  son los volúmenes iniciales en  $t = 0$  de los grupos control y tratados, respectivamente;  $V_i(t)$  y  $V_x(t)$  son los volúmenes de estos grupos en el tiempo  $t$  después de la aplicación de la CED. Esta fórmula determina cuánto disminuye el volumen del tumor tratado con la electroterapia, con respecto a su control, en cada instante de tiempo.

Los resultados de esta Tesis evidencian que los tumores, en los diferentes grupos experimentales, alcanzan en el mismo tiempo (15 días) volúmenes iniciales similares, a partir de los cuales se aplica la CED (Tabla 18). Estos resultados sugieren que la ecuación (5) y esta expresión son iguales ya que el segundo miembro de esta última ecuación tiende a cero (ver valores dentro del paréntesis en la Tabla 18).

Los hallazgos histopatológicos en los tumores (Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37) y los órganos; así como las condiciones físicas y vitalidad en los ratones a los 100 días después del tratamiento explican los altos porcentajes de supervivencia de estos ratones para la dosis umbral a partir de la cual estos dos tipos de tumores alcanzan la remisión completa. La supervivencia, por tipo de tumor, y para cada grupo experimental sugieren que esta incrementa con el aumento de la intensidad de la CED. Este hecho se explica porque el porcentaje de necrosis también aumenta con el incremento de la intensidad de la CED; sin embargo, los efectos (eventos) adversos son mínimos.

La desaparición completa de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, para 92 y 80  $C/cm^3$ , respectivamente, puede sugerir que cada tipo de tumor tiene su umbral de carga eléctrica para el cual es completamente destruido. La existencia de este umbral se verifica con las dos réplicas realizadas (Figuras 8a,b) y el mismo depende de la naturaleza eléctrica del tumor, de los parámetros de la electroterapia, las características fisiológicas del tumor (estadio, volumen y características histogénicas) y del organismo.

La remisión completa de estos dos tipos de tumores explica la cura de los ratones y el por qué los tumores no duplican sus volúmenes iniciales durante el tiempo de observación (tiempo de doblaje infinito, que se representa en Tabla 1 por el símbolo  $\infty$ ). Miklavčič y cols. [157] reportan que la cura completa de los animales ocurre cuando el volumen del tumor es cero

después de los 50 días post-tratamiento. Sin embargo, esta Tesis indica que la remisión completa puede aparecer antes de este tiempo (25 días para el tumor de Ehrlich y entre 15 y 20 días para el tumor fibrosarcoma Sa-37). Este hecho sugiere que la remisión completa depende de la variedad histológica del tumor y de la dosis umbral de CED, manteniendo constante los otros parámetros de la terapia. Si los otros parámetros de la terapia se varían, entonces la remisión completa de los tumores se puede alcanzar en días diferentes y a otras dosis a las que se reportan en esta Tesis. Este aspecto puede indicar que este tipo de respuesta depende de la variedad histológica del tumor y del esquema terapéutico que se propone, hecho que puede explicar la diversidad de esquemas terapéuticos que se emplean en la literatura [50, 79-89, 153].

Es interesante el hecho que la remisión completa se alcance entre 15 y 25 días después que se aplica la CED, en dependencia del tipo de tumor y del esquema terapéutico que se propone. Estos tiempos son consistentes con los que se observan en nuestro actual Estudio Piloto (en pacientes con cáncer de mama inoperable que fracasan a todos los métodos convencionales y a los que están en ensayo), para los cuales entre 20 y 60 días se alcanza la una remisión completa o da margen quirúrgico para que el mastólogo realice la mastectomía radical. Este intervalo de tiempo depende de la variedad histológica del cáncer de mama (ductal invasor, sarcoma o liposarcoma, entre otros).

La necrosis que se observa en los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37, 24 horas después de la aplicación de la CED, puede ser el mecanismo predominante de muerte celular. En estos se observa tumefacción, ruptura celular y de organelos y respuesta inflamatoria aguda. El tipo de necrosis es coagulativa porque se observa extravasación de células de sanguíneas, cariólisis nuclear y edema al menos durante los primeros 4 días post-tratamiento en todos los tumores tratados (Figuras 7b,c). Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Holandino y cols. [79] y Von Euler y cols. [34]. Griffin y cols. [96] explican la necrosis a partir de la isquemia que se observa en todos los tumores tratados con CED, la cual puede conducir a una lesión celular irreversible de las células tumorales y por consiguiente a la muerte celular. Otros autores observan la necrosis 24 horas después de la aplicación de la CED y sugieren que la misma está asociada a diferentes hallazgos experimentales tales como: la degradación de fosfolípidos, pérdida de fosfato de alta energía y aumento del calcio intracelular [35], daño de la membrana [32], desequilibrio iónico [22, 48], alteraciones mitocondriales [79] y lesión del

mecanismo de isquemia/reperfusión [96, 98]. Precisamente, la necrosis coagulativa que se observa en este estudio usualmente es isquémica debido a la presencia de las especies reactivas del oxígeno que se inducen en el tumor por las reacciones electroquímicas, como demuestra experimentalmente Watenberg y cols. [28] y previamente propuesto por Bergues [17].

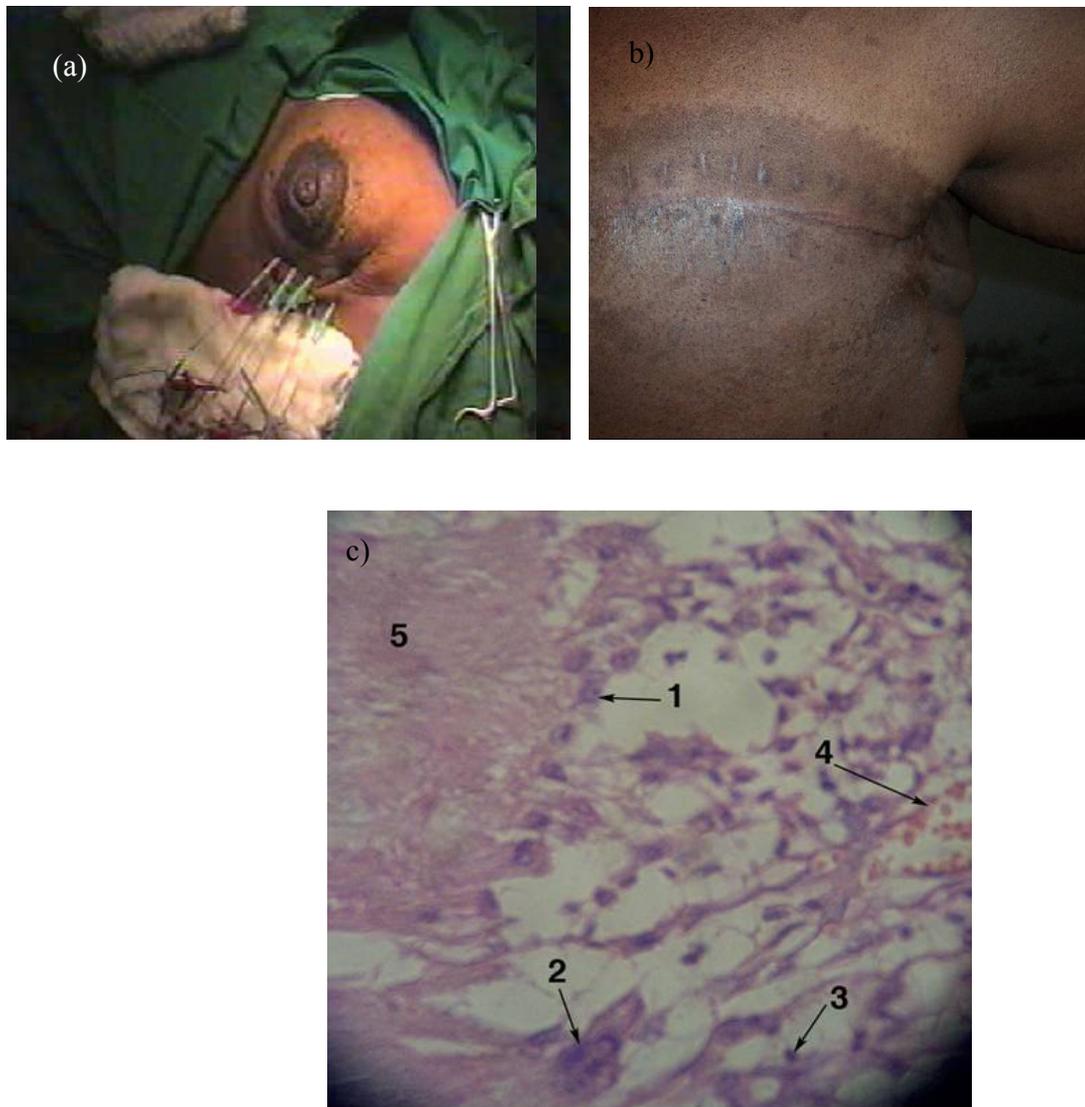
La inflamación aguda que se observa al menos durante los primeros cuatro días después del tratamiento con CED (Figuras 7b,c) se puede explicar por el infiltrado persistente de leucocitos que se observa en los hallazgos peritumorales (Figura 7c). Este infiltrado persistente de leucocitos (rasgo esencial de la respuesta inflamatoria) se convierte en un agente dañino porque durante la quimiotaxis amplifica los efectos del estímulo inflamatorio inicial a través de la liberación de mediadores potentes (enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos del oxígeno) lo que produce daños en el endotelio y el tejido. Este infiltrado de leucocitos también puede activar el sistema inmune [1, 17, 54, 157-159].

En todos estos procesos, las especies reactivas del oxígeno han mostrado tener un papel importante y pueden ser la causa inmediata de muerte celular en ambos tumores [1, 17, 22, 48]. Cabe señalar que estos aspectos se estudian con profundidad en una de las tesis de doctorado que se desarrolla en la actualidad.

La marcada necrosis tumoral y los hallazgos peritumorales que se reportan en esta Tesis son consistentes con los que se observan en el actual Estudio Piloto en pacientes con tumores de mama inoperables que se tratan con CED, como se muestra en la figura 30. Los porcentajes de reducción del tumor en estos pacientes varían entre el 60 y el 100 %, en concordancia con los datos que se muestran en las tablas 2 y 4. Este rango de variación del porcentaje de necrosis coincide con el que reportan Ren y cols. [37], Xin y cols. [18, 94], Wemyss-Holden y cols. [97], Von Euler y cols. [31, 34], entre otros. Esto sugiere que existe una buena correspondencia entre los resultados de los estudios preclínicos y clínicos.

La inmensa mayoría de los autores [15-18, 29-35, 39-44] reportan presencia de necrosis en el tumor, inducida por la acción de la CED; sin embargo, otros autores reportan apoptosis en el tumor, alrededor del ánodo, por la acción de este agente físico [22, 24, 28, 34, 45].

*CAPÍTULO 3: Resultados y discusión*



**Figura 30.** Paciente con carcinoma ductal invasor de mama. a) Evolución de la paciente durante el tratamiento con electroterapia b) Evolución de la paciente 21 meses después del tratamiento con CED c) Respuesta inflamatoria con predominio de macrófagos (1), células gigantes multinucleadas (2), linfocitos (3) y congestión vascular (4) en la proximidad de la zona de necrosis (5). Aumento = 40X.

Una posible explicación de la apoptosis es a partir de la inducción de las especies reactivas del oxígeno en el tumor debido a la acción de la CED [28]. Sauer y cols. [156] reportan que los niveles altos de especies reactivas del oxígeno se asocian con la apoptosis y muerte celular. Sin embargo, Bergues [17] propone que estas especies reactivas (dentro de las reacciones electroquímicas) y la estimulación del sistema inmune pueden ser los posibles mecanismos antitumorales que se inducen en el tumor debido a la CED.

La presencia de apoptosis y necrosis en el tumor puede ser debido a que la acción citotóxica de la CED estimula y/o amplifica la producción de especies reactivas del oxígeno en los polimorfonucleares y macrófagos que se observan en la zona peritumoral. En esta Tesis se observa la activación de otros elementos de la respuesta inmune específica e inespecífica, resultado que está en correspondencia con los que reportan Bergues [17], Miklavčič y cols. [157], Serša y cols. [54] y Simčič y cols. [158] y los que se observan en el actual Estudio Piloto. Además, Miklavčič y cols. [157], Serša y cols. [54] y Simčič y cols. [158] demuestran experimentalmente que estos elementos de la respuesta inmune inespecífica se activan por el mecanismo dependiente del oxígeno (estallido oxidativo). También, Miklavčič y cols. [157] y Bobanovič y cols. [159] reportan la estimulación de linfocitos T citotóxicos y aumento de la actividad de las células NK, respectivamente. Wartenberg y cols. [28] atribuyen esta estimulación al incremento de la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en estos tipos celulares.

Aunque no se reporta la inducción de citoquinas en las células de la respuesta inmune inespecífica y específica debido a la acción de la CED, el hecho que estos tipos celulares se activen por el mecanismo del estallido oxidativo sugiere que la CED puede activar y/o estimular en estos, de forma indirecta, la producción de estas citoquinas. Esto se puede sugerir porque experimentalmente se demuestra que cuando la CED se combina con el TNF- $\alpha$  [39], IL-2 [99] e interferón  $\alpha$  [100] se observa un marcado retardo del crecimiento tumoral que puede estar dado por el establecimiento de un sinergismo antitumoral entre la CED y las citoquinas antes mencionadas. Estos aspectos constituyen los objetivos de otras dos tesis de doctorado.

En esta tesis se demuestra que cuando la cantidad de carga volumétrica es mayor que  $100 \text{ C/cm}^3$  se observa muerte masiva de los animales porque existen daños importantes en el hígado y el riñón en correspondencia, con las observaciones de Griffin y cols. [96]. Estos

autores [96] explican este hecho porque la carga metabólica del tumor que se desprende debido a la gran masa necrótica que se induce en este por la CED daña de forma importante a estos dos órganos los cuales no tienen la capacidad para evacuar esta carga metabólica y ocurre una disfunción de los mismos que conlleva a la muerte del organismo. En la clínica, este hecho se observa cuando se usa la quimioterapia y en este caso se procede a aplicar medicamentos complementarios como el haloperidol, para evitar que se acumulen sedimentos a nivel renal [1]. Diferentes autores sugieren que la cantidad máxima de carga eléctrica que se le puede suministrar al tumor es  $100 \text{ C/cm}^3$  [48, 96]. Es interesante el hecho que las dosis umbrales de CED para los tumores de Ehrlich ( $92 \text{ C/cm}^3$ ) y fibrosarcoma Sa-37 ( $80 \text{ C/cm}^3$ ) estén entre  $80$  y  $100 \text{ C/cm}^3$ , rango de dosis para el cual se observan las mayores efectividades de la electroterapia [22, 48, 94]. Este resultado concuerda con el rango de dosis que el grupo de bioelectricidad emplea en el actual Estudio Piloto (Estudio Piloto en ejecución y autorizado por el Centro de Control Estatal de Equipos Médicos en el año 2007) que se realiza en pacientes con cáncer de mama inoperable en los cuales fracasan los métodos terapéuticos convencionales y los que se vienen estudiando.

Los resultados que se reportan en los estudios preclínicos [22, 84-87] y clínicos [15, 88-91] demuestran que la CED no induce alteraciones significativas en los parámetros hematológicos (hemoglobina y el conteo diferencial completo) ni en los órganos dianas (corazón, pulmón, hígado, riñón y bazo) con respecto al grupo control, excepto en el bazo en el cual se observa congestión vascular e incremento del peso. Lo que se observa en este último órgano, se puede atribuir a una posible activación del sistema inmune y se aprecia en todos los grupos tratados con CED para cualquier dosis y tiempo de exposición, configuración de arreglo de electrodos, y tipos de tumor y organismo utilizados. También estos estudios evidencian que los parámetros bioquímicos de la sangre (iones sodio y potasio) de los animales tratados con CED tienden a los del grupo control negativo (ratones sanos no tratados con CED). Por estas razones no se muestran los resultados de los hallazgos en órganos y ni de las variables hematológicas y bioquímicas de la sangre. Además, estos estudios demuestran una marcada destrucción tumoral y la presencia de elementos del sistema inmune que pudieran indicar una activación del mismo después de aplicada la CED (Figura 7).

Los estudios toxicológicos agudos (a corto plazo) demuestran que los daños que produce la CED (rango de  $0$  a  $20 \text{ mA}$ ) en el tejido sano y en el organismo son mínimos cuando se emplea

la terapia anódico-catódica. En este caso, no se observan alteraciones significativas ( $P > 0,05$ ) entre los hallazgos en los órganos de los ratones BALB/c portadores de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 tratados con CED y no tratados, en concordancia con lo que se reporta en la literatura [17, 22, 83, 85, 92, 93].

La necrosis que se observa en el tejido sano cuando los electrodos se insertan directamente en este (terapia anódica, catódica o de campo), es local (alrededor del electrodo) y desaparece en pocos días por los mecanismos de reparación y regeneración del organismo, en concordancia con los resultados de otros autores [17, 22, 83, 85, 92, 93, 94]. También, estos resultados están en concordancia con las guías para los límites de exposición a las corrientes eléctricas, campos eléctricos y campos magnéticos estáticos y variables en el tiempo (hasta 300 GHz), las cuales establecen que intensidades de CED por debajo de 20 mA no inducen riesgos a la salud [160]. A diferencia de lo que ocurre en el tejido sano, la distribución espacio-temporal de la necrosis que se induce en el tumor debido a la acción de la CED es extensiva y su porcentaje depende del arreglo de electrodo; la dosis y tiempo de exposición de la CED; y de la variedad histológica del tumor como se demuestra en esta Tesis, hecho que esta en concordancia con los resultados que reportan Bergues [17], Vijn [22], Xin y cols. [18, 94], Von Euler y cols. [34], entre otros.

Los estudios toxicológicos agudos en los ratones BALB/c que portan tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 muestran esplenomegalia en las primeras 96 horas después de la aplicación de la CED, este hecho probablemente se relaciona con la activación del sistema inmune, en concordancia con los resultados de Bergues [17], Miklavčič y cols. [157], Serša y cols. [54], Simčič y cols. [158] y Bobanovič y cols. [159].

Los estudios toxicológicos agudos en humanos [22, 48, 94, 162] evidencian que cantidades de carga eléctrica menores de  $100 \text{ C/cm}^3$  no inducen alteraciones significativas en los diferentes órganos de los pacientes, a excepción del bazo, en el cual se observa esplenomegalia. Este aumento de tamaño del bazo puede estar relacionado con la estimulación del sistema inmune, en concordancia con lo que reportan Xin y cols. [18, 94] y Haltiwanger [77], entre otros.

Los efectos adversos que se reportan en pacientes que se tratan con electroterapia son: ligero dolor durante la terapia (soportable por los pacientes y en dependencia del nivel de umbral del dolor), posible infección de la úlcera post-tratamiento por necrosis (se curan con abundante agua y si es necesario se usan los métodos convencionales para estos casos), fiebre debido al

marcado proceso inflamatorio que se induce en el tumor (en un número mínimo de pacientes), y posibles daños a los vasos sanguíneos (si los electrodos se insertan en ellos o cerca de los mismos) [15, 18, 48, 88, 89, 94]. Los dos primeros efectos adversos se observan en algunos pacientes del Estudio Piloto antes mencionado. Es importante destacar que los estudios toxicológicos crónicos en animales y humanos no evidencian ninguno de estos daños a largo plazo, con excepción de la recaída del paciente en caso que el esquema terapéutico seleccionado no sea el adecuado.

La muerte que se observa en dos animales tratados con CED a los 25 y 50 días postratamiento, se debe fundamentalmente al canibalismo que muestran estos animales, probablemente estimulado por la sangre presente en el tumor después de aplicada la CED. Esto se corresponde con la conducta normal de los ratones en presencia de sangre [31, 32]. La muerte de un animal, en uno de los grupos tratados, un día después del tratamiento con CED, ocurre porque la inserción de los electrodos en el tumor maligno induce daños en los pulmones debido a la cercanía de estos al tumor implantado, aspecto que se confirma en los estudios histopatológicos.

La respiración intranquila y rápida que se observa en los grupos control y tratados, durante la fijación de los ratones no tiene ninguna influencia en los resultados que se reportan en este estudio.

### **3.2.2. Modificación de la ecuación de Gompertz convencional**

Para la formulación de la EGM se asume que el tumor es un sistema complejo que resulta de las complejas interacciones que acontecen en el mismo y las de este con el organismo [1, 146, 147], aspecto que puede sugerir que la variedad histológica del tumor y el tipo de organismo están implícitos en esta ecuación.

Los resultados de esta Tesis demuestran que la EGM ajusta bien los datos experimentales de los grupos controles y tratados con CED (después de la aplicación de este agente físico) para los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 (incluyendo sus réplicas). También, estos resultados se corroboran cuando la EGM se usa para ajustar los datos experimentales de otros tipos de tumores experimentales (sarcoma Sa-1, melanoma B16 y Ehrlich) que reportan otros autores [162], como se muestra la figura A1 y tablas A3-A8 del Anexo 2. La remisión parcial que se observa en los tumores experimentales sarcoma Sa-1 (Sa1 1 en la Tabla A3 y Figura

A1), melanoma B16 (B16 1 en la Tabla A5 y Figura A1) y Ehrlich (Ehrlich 1 en la Tabla A7 y Figura A1) ocurre para las razones  $i/i_0$  1,57; 1,47 y 1,42, respectivamente. Estos valores de  $i/i_0$  están en correspondencia con los que se muestran en las tablas 6 (tumor de Ehrlich) y 7, 12 y 13 (tumor fibrosarcoma Sa-37) y los tipos de respuestas que se simulan con la EGM para el rango  $1,2 \leq i/i_0 < 1,8$  (Figuras 9, 10, 10-I y 10-II).

Los resultados experimentales y teóricos evidencian que el comportamiento del tumor después de la aplicación de la CED, en el cual se observa disminución del volumen tumoral hasta su valor mínimo y luego este vuelve a crecer, siempre se observa para  $1,2 \leq i/i_0 < 1,8$  para cualquier valor de  $\alpha$  (Figura 10-II). También, estos resultados evidencian que la remisión completa de los tumores se alcanza si esta razón es mayor que 2, para todo valor de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Las diferentes simulaciones de la EGM (Figuras 9; 10; 10-I y 10-II) sugieren que la misma simula diferentes tipos de respuestas de los tumores después de la aplicación de la CED, tales como remisión completa ( $i/i_0 > 2$ ), respuesta parcial ( $1,2 \leq i/i_0 < 1,8$ ), enfermedad estable y progresión de la enfermedad ( $1 \leq i/i_0 \leq 1,2$ ), que se observan en los estudios preclínicos y clínicos [18, 94]. También, esta Tesis revela que después de la aplicación de la CED se puede obtener la respuesta que se denomina parcial estacionaria ( $1,8 \leq i/i_0 \leq 2,0$ ).

Las tablas 6 y A7 revelan diferencias entre los valores del parámetro  $\alpha$  que se obtienen del ajuste de la cinética de crecimiento del tumor de Ehrlich no tratado con la EGM que se reporta en esta Tesis ( $\alpha = 0,449$  días<sup>-1</sup>) y el que se obtiene de los datos que reportan Serša y cols [162] ( $\alpha = 0,255$  días<sup>-1</sup>). La diferencia entre estos dos valores (0,194 días<sup>-1</sup>) se debe a que las condiciones experimentales que reportan estos autores ( $V_0 = 40$  mm<sup>3</sup>,  $1 \times 10^5$  células viables inoculadas en el ratón A/J) no son las mismas a las que se reportan en esta Tesis.

Por otro lado, los resultados del Anexo 2 muestran que la EGM falla en el ajuste de los datos experimentales de las cinéticas de crecimiento de tumores sarcoma Sa-1 (Sa1 2 en la Figura A1 y Tablas A3 y A4) y melanoma B16 (B16 2 en la Figura A1 y Tablas A5 y A6) cuando se combinan la CED y la bleomicina. Este hecho se explica porque la EGM no contiene la información de la otra terapia.

Los resultados demuestran que la EGM es factible, en cierta aproximación, para describir la cinética de crecimiento de los tumores experimentales y simula teóricamente los diferentes tipos de respuestas de un tumor después de la aplicación de la CED. También, los altos valores

de  $r_a^2$  y los pequeños valores de SSE, SE, PRESS, MPRESS y los valores de los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  justifican esta factibilidad y los mismos se pueden disminuir si se incrementa el número de muestras.

En esta Tesis se reporta de forma experimental la existencia de un umbral de intensidad de CED para el cual los tumores sólidos de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 alcanzan su remisión completa (tumores no palpables durante 100 días de observación). Esta respuesta se puede explicar porque el sistema inmune y el organismo como un todo, eliminan completamente las células que sobreviven a la acción de la CED. Este hecho sugiere la posible existencia de al menos dos mecanismos antitumorales que se involucran en la destrucción del tumor, como propone Bergues [17]. En el orden teórico y experimental se muestra que la remisión completa del tumor se obtiene siempre que  $i/i_0 > 2$ , para todo valor de  $V_0$ ,  $\alpha$  ( $\alpha > \beta$ ),  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$ .

Aunque en esta Tesis no se reporta, de forma experimental, la respuesta parcial estacionaria ( $1,8 \leq i/i_0 < 2$ ), que revela la simulación de la EGM para todo valor de  $V_0$ ,  $\alpha$  ( $\alpha > \beta$ ),  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$ , la misma se observa en la Clínica Oncológica no solo para la electroterapia [94] sino también para otros tipos de terapia (cirugía y quimioterapia) [1]. Este tipo de respuesta se puede explicar porque el sistema inmune y el organismo (como un todo) sostienen un equilibrio con la porción de tumor que sobrevive a la acción de la CED, una vez que este alcanza dicho volumen. Esto puede explicar por qué se observan pacientes que no hacen recaídas (por períodos mayores a 10 años o mueren por otra causa no asociada al cáncer), a pesar que el tumor maligno no se ha eliminado de forma completa. Este hecho puede sugerir que el cáncer se puede comportar como una enfermedad crónica que se puede controlar.

El hecho que  $i > i_0$  en los tumores experimentales (Ehrlich, fibrosarcoma Sa-37, sarcoma Sa-1, melanoma B16) después de la aplicación de la CED puede sugerir que estos se comportan como sistemas disipativos, como ocurre en los dieléctricos reales. Esto indica que la asunción de que los tumores sólidos se pueden considerar como dieléctricos es buena en cierta aproximación. También, la condición  $i > i_0$  que se obtiene del ajuste de la cinética de crecimiento de los tumores que se tratan con CED, mediante el uso de la EGM, puede ser un indicador de que la misma es buena en cierta aproximación para la descripción de los datos experimentales de estos tumores después de la aplicación de la CED.

Si el ajuste de los datos experimentales de los tumores tratados con CED mediante la EGM revela que  $i < i_0$ , entonces viola la ley de conservación de la energía porque la causa (aplicación de  $i$ ) nunca puede ser menor que el efecto (inducción de  $i_0$ ). La condición  $i < i_0$  no tiene sentido desde el punto de vista biofísico, aspecto que se corrobora mediante las simulaciones de la EGM para este rango de  $i$ , en el cual se observan variaciones muy rápidas del volumen tumoral en el tiempo. Estas variaciones rápidas pueden conducir a la ruptura de la relación tumor/huésped, aspecto que no se observa en los estudios preclínicos y clínicos [1, 70]. El parámetro  $i_0$  depende de  $i$ , de las propiedades eléctricas del tumor y del grado de heterogeneidad de este durante y después de la aplicación de la CED y se pueden asociar a: 1) desplazamientos finitos de cargas positivas y negativas que conducen a cambios electroquímicos alrededor de los electrodos (pH ácido, hidratación e hiperpolarización que aparecen alrededor del ánodo, y pH básico despolarización y deshidratación alrededor del cátodo) [22, 29, 94], y 2) orientación parcial de los momentos dipolares moleculares de las proteínas y otras macromoléculas en presencia de un campo eléctrico externo.

El gráfico del volumen del tumor contra el tiempo corrobora que la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 no tratado ( $i = 0$ ) muestra una forma de S con sus tres etapas bien definidas (SI, SII y SIII) (Figura 11). SI es común para cada grupo experimental y se asocia al establecimiento del tumor en el hospedero. SII se relaciona con el rápido crecimiento tumoral. SIII muestra que el crecimiento tumoral es lento y tiende asintóticamente a  $V_f$ . En SI,  $V_{ob}$  en la cinética de crecimiento del fibrosarcoma Sa-37 es observable y palpable a los 8 días, pero no medible; sin embargo, la EGM estima este valor en  $0,000016 \text{ cm}^3$  (0,031 cm de diámetro), en correspondencia con Nerterets y cols. [164]. Estos autores reportan que el volumen mínimo medible de un tumor es  $0,0000082 \text{ cm}^3$  (0,025 cm de diámetro) mediante el empleo de imágenes con rayos X con microscopía de contraste de fase y holografía. La extrapolación de SI estima este tamaño tumoral a los 7,79 días. Las diferencias entre los valores experimentales y los que se estiman son  $0,0000078 \text{ cm}^3$  para el volumen tumoral y 0,21 días para el tiempo, los cuales no son significativos en el análisis de la cinética de crecimiento de este tumor experimental.

$V_{ob}$  no es medible porque el diámetro del tumor correspondiente a este volumen es menor que el espesor de la piel del ratón (entre 0,1 y 0,2 cm), el cual se mide con un pie de rey (0,005 cm de precisión). Bergues [17] reporta que existe una buena correspondencia entre las medidas

del tamaño del tumor con el pie de rey y la que se obtiene por anatomía patológica para volúmenes tumorales mayores o iguales a  $0,02 \text{ cm}^3$ , no siendo así para volúmenes menores a este valor porque el espesor de la piel es comparable o mayor que el tamaño del tumor, siendo más evidente cuando el volumen tumoral se aproxima a  $V_{ob}$ .

La existencia de  $V_{ob}$  sugiere que la EGM no es continua desde el momento de la inoculación hasta el final del experimento sino a partir de este valor ya que las técnicas experimentales actuales no pueden dilucidar el comportamiento del volumen tumoral por debajo de  $V_{ob}$  esto sugiere que la EGM puede ser reescrita, en una primera aproximación como

$$V^*(t) = \begin{cases} 0 & \text{para } 0 \leq t \leq t_{ob} \\ V_o e^{\left(\frac{\alpha}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & \text{para } t_{ob} \leq t \leq \tau \\ V_o e^{\left(\frac{\alpha^*}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & \text{para } \tau \leq t \leq \tau + t' \end{cases}, \quad (34)$$

La estructura de la EGM sugiere su continuidad para  $t \geq t_{ob}$  ( $t_{ob}$ , tiempo para el cual el tumor alcanza  $V_{ob}$ ). De esta forma, la REG-I está formada por dos partes: de  $t = 0$  hasta  $t_{ob}$  y desde  $t_{ob}$  hasta  $\tau$ .  $V_{ob}$  y  $t_{ob}$  dependen de las características histogénicas del tumor, el tipo de hospedero y la concentración inicial de células tumorales inoculadas en el hospedero, en concordancia con otros autores [1, 17, 70].

En la cinética de crecimiento del tumor sólido fibrosarcoma Sa-37, se observa que este es esférico entre los 8 y 10 días, período de tiempo en que este es palpable y observable pero no medible. La EGM (17) estima que el volumen tumoral a los 10 días es  $0,0025 \text{ cm}^3$  (0,17 cm en diámetro). El rango de volumen (0,031 hasta 0,17 cm en diámetro) para el cual el tumor es esférico coincide con el que reportan otros autores para la fase avascular de forma experimental y teórica (0,025 hasta 0,2 cm en diámetro) [119, 120]. Komarova [120] reporta que el diámetro de muchas líneas tumorales varía entre 0,1 y 0,2 cm. La EGM estima que el diámetro de 0,2 cm ( $0,0042 \text{ cm}^3$ ) se alcanza a los 10,28 días. Las diferencias entre este volumen y el tiempo con respecto a aquellos que se estiman de la cinética del tumor fibrosarcoma Sa-37 son  $0,0017 \text{ cm}^3$  y 0,28 días, los cuales no son significativos para el análisis de esta cinética.

El hecho de que los tumores son esféricos (entre  $0,000016$  y  $0,0025$   $\text{cm}^3$ ) se puede explicar por la posible existencia de un campo central de fuerzas (tipo Coulomb) debido a que las células tumorales están cargadas negativamente [77]. En el experimento se observa que esta forma esférica de los tumores se pierde entre los 12 y 13 días después de inoculación, observándose una forma elipsoidal (tres diámetros bien definidos con una dirección preferencial de crecimiento a lo largo del diámetro mayor). Esto se puede explicar porque cuando el tumor crece, aumenta el número de células tumorales, se reduce la distancia entre ellas y por ende se repelen, ya que las mismas están cargadas negativamente. Como un resultado de este hecho, el tumor se deforma y tiene una dirección preferencial de crecimiento (diámetro mayor del tumor).

Es posible que el cambio de forma de los tumores (de esférico a elipsoidal) se pueda corresponder con la transición de la fase avascular del tumor a la vascular (predominio de la angiogénesis), en concordancia con otros trabajos [115-122, 127, 128, 164]. En estos estudios y en otros [1, 10, 70-74] se sustenta que la angiogénesis es el soporte necesario para que un tumor pueda crecer y metastatizar. Este hecho se corresponde, en buena medida, con  $V_s$  (inicio de la etapa II que se estima en  $0,069$   $\text{cm}^3$  a los 12,34 días), volumen del tumor a partir del cual se dispara la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37.

En la etapa II de la cinética de crecimiento del tumor fibrosarcoma Sa-37 no tratado, la EGM revela la existencia de  $V_i$ , el cual en el gráfico de la primera derivada del volumen tumoral contra el volumen del tumor indica que el crecimiento de este es rápido (entre  $V_s$  y  $V_i$ ) y luego es lento (entre  $V_i$  y  $V_f$ ). El cambio de concavidad (de cóncavo a convexo) en  $V_i$  puede tener implicaciones importantes desde el punto de vista biofísico, en concordancia con el trabajo de Molski y Konarski [165]. Estos autores demuestran la existencia de coherencia en el crecimiento del tumor no perturbado y que el potencial de interacción entre las células cancerosas es de tipo Morse, a partir de la segunda derivada de la ecuación de Gompertz convencional (2).

En el GT2-2, la REG-IIa (desde  $V_o$  hasta  $V_{\min}$ ) se relaciona con la inhibición rápida del volumen tumoral debido a la acción citotóxica de la CED y la REG-IIb (desde  $V_{\min}$  hasta  $V_f$ ) representa la prevalencia del tumor porque este vuelve a crecer después que este alcanza un volumen mínimo ( $V_{\min}$ ). Sin embargo, resulta interesante que mientras el volumen tumoral disminuye entre  $V_o$  hasta  $V_{\min}$ , la primera derivada del volumen tumoral cambia de signo y de

pendiente (primero disminuye hasta alcanzar su valor mínimo y luego aumenta a pesar de la disminución del volumen del tumor). Este hecho no se observa en el gráfico de la dependencia del volumen del tumor contra el tiempo y puede sugerir la existencia de dos procesos antagónicos en esta región: uno que se puede relacionar con el mecanismo antitumoral de la CED y el otro con autorganización del tumor.

El primer mecanismo se puede explicar porque en el tumor se induce necrosis, apoptosis, inflamación crónica, polimorfonucleares, monocitos, congestión vascular y productos tóxicos que provienen de las reacciones electroquímicas [15, 17, 22, 48, 94, 157-159]. El segundo mecanismo (autorganización del tumor) se puede explicar porque el tumor, como sistema complejo [146, 147], se autorganiza porque la dosis de CED no es la suficiente para inducir daños irreversibles en este que conduzca a su destrucción completa. Esta autorganización del tumor conlleva a que en este aparezcan variables emergentes que desde el punto de vista biofísico-químico se traduce en potenciación (amplificación, reorganización) de diferentes procesos inherentes al crecimiento tumoral [1, 15, 34, 48, 94, 147] y/o la inducción de otros procesos biofísico-químicos que conduzcan a la protección, crecimiento, metástasis y máxima supervivencia del tumor como sistema biológico complejo. Como consecuencia de este mecanismo, el tumor alcanza  $V_{\min}$  y luego crece.

La autorganización es una de las características de los sistemas disipativos, además de procesos que vienen acompañados de liberación y absorción de energía, entre otras [116, 128, 140, 147, 154]. El hecho que  $i > i_0$  sugiere que los tumores de Ehrlich, fibrosarcoma Sa-37, sarcoma

Sa-1, melanoma B16 son sistemas disipativos, como se menciona más arriba.

El punto donde la derivada cambia de signo y de pendiente puede sugerir que este es el momento exacto para repetir la electroterapia y no cuando el volumen tumoral es  $V_{\min}$ , como se recomienda en la literatura [15, 22, 94, 131, 132]. El conocimiento exacto este punto (o de uno próximo a este) puede traer consigo que el número de aplicaciones de esta terapia experimental sea el óptimo y/o donde la electroterapia se puede combinar con otras modalidades de tratamiento como la quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia. Esto probablemente impida que el tumor se autorganice. El grupo cubano de electroterapia cree que, en este punto, la efectividad antitumoral de la CED sea posiblemente mayor que la que se

obtiene cuando esta se combina con radioterapia [40], quimioterapia [38], inmunoterapia [39, 99, 100] y soluciones salinas [44], en  $t = 0$ .

Lo que se expone en el párrafo anterior es importante tenerlo en cuenta porque en la literatura especializada se reporta que la electroterapia en humanos generalmente se aplica una sola vez, pero cuando no se tiene la respuesta objetiva a la primera aplicación, la misma se puede repetir hasta tres veces [22, 18, 94]. En animales de laboratorio, esta terapia experimental generalmente se aplica una sola vez [83-87]; sin embargo, Telló y cols. [131, 132] reportan hasta 18 aplicaciones, para las cuales siempre obtiene la remisión completa del tumor de vulva en perras.

La determinación del punto donde la primera derivada del volumen tumoral cambia de signo y de pendiente, en la REG-IIa, se puede implementar mediante dos vías posibles: la primera, mediante la medición diaria del volumen tumoral (por clínica) y luego la primera derivada del volumen tumoral se calcula entre dos instantes de tiempo contiguos. En este caso, la CED se repite cuando la variación del volumen cambia de signo. En el orden experimental, esta vía tiene el inconveniente que este punto no sea exactamente el que prediga la EGM; no obstante, la terapia se repite en el momento que la primera derivada cambie de signo (punto que puede estar entre el estimado con la EGM y  $V_{\min}$ ). La segunda vía es factible si se conoce con anterioridad el tiempo de relajación del tumor en función de sus características histogénicas, tipo de hospedero y el esquema terapéutico que se emplea. Para esto, se puede extraer una pequeña muestra de la zona del tumor que se trata con CED y medir este tiempo mediante la técnica experimental de Resonancia Magnética Nuclear. La implementación de cualquiera de estas dos vías en los experimentos futuros conducirá a inducir una mayor efectividad antitumoral de la CED. Esto se puede justificar desde el punto de vista biofísico porque el tiempo de recuperación del tumor es menor que la duración del efecto citotóxico que se induce por la acción de la CED y como resultado, el tumor no se autorganiza.

En el GT2-3, REG-IIc (disminución del volumen tumoral y de su primera derivada desde  $V_0$  hasta cero) se puede explicar porque la CED induce diferentes alteraciones en el tumor y su periferia (intervalo de volumen entre  $V_0$  y  $V_i$ ), y la activación de otros mecanismos antitumorales que se relacionan con el sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, células K y NK [77, 94, 98-100, 157-159] y de posiblemente otros que no se han reportado hasta el momento en la literatura (intervalo de volumen entre  $V_i$  y cero).

En el GT2-3, en contraste con GT2-2, la primera derivada del volumen tumoral no cambia de signo (negativo) entre  $V_0$  y  $V_d$  aunque sí de pendiente, aspecto que puede estar relacionado con la existencia de al menos dos mecanismos antitumorales.

El hecho de que las cinéticas completas de crecimiento de los tumores de Ehrlich (GT1-3) y fibrosarcoma Sa-37 (GT2-3) sean un lazo cerrado sugiere que estos dos tipos de tumores son reversibles. Este lazo muestra que la REG-I y la REG-II de las cinéticas de crecimiento de estos dos tipos de tumores son asimétricas para todo valor de  $\Delta t$ , siendo la velocidad de disminución del volumen del tumor (REG-II) 1,37 veces mayor que la velocidad de crecimiento (REG-I). Este hecho demuestra que las velocidades de REG-I y REG-II son proporcionales, en concordancia con la hipótesis de Norton-Simon [166]. Esto puede tener importantes implicaciones en la terapéutica de tumores que se tratan con CED, sola o combinada con otras modalidades de tratamiento (convencionales o en experimentación). La verificación experimental de esta afirmación en otros tipos de tumores puede conducir al cambio de la concepción actual sobre el tratamiento de tumores con CED.

Las simulaciones de la EGM y el uso de la misma sobre los datos de diferentes tumores experimentales (Ehrlich, fibrosarcoma Sa-37, sarcoma Sa-1 y melanoma B16) evidencian que los diferentes tipos de respuestas de un tumor que se observan después de la aplicación de la CED dependen esencialmente de la razón  $i/i_0$ , para todos valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  ( $\beta < \alpha$ ),  $\gamma$ ,  $i_0$ , y  $V_0$ , siendo más evidente para  $\alpha$  e  $i_0$  (Tablas 6, 7, 12, 13, A3, A5 y A7).

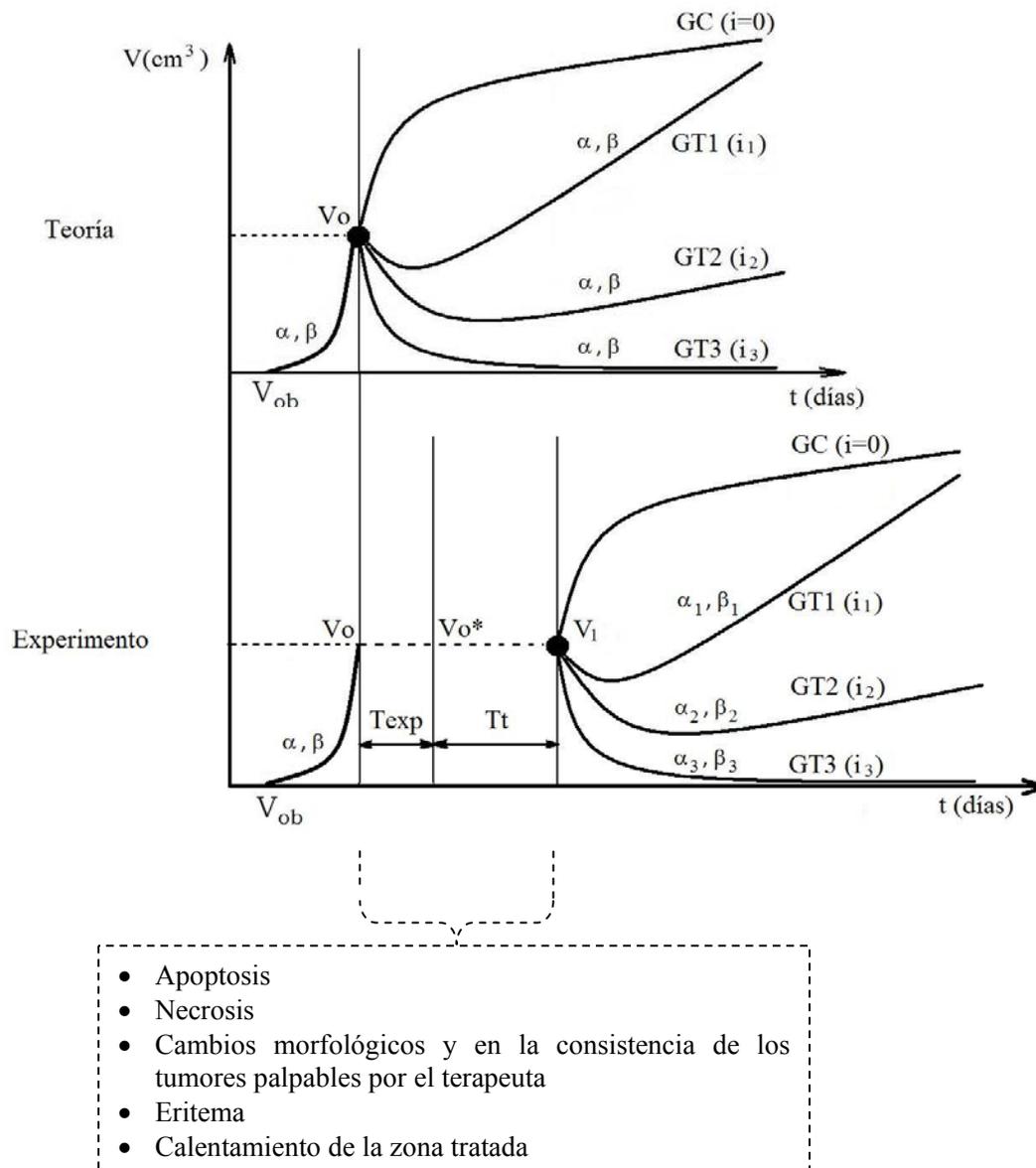
La dependencia de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  en función de  $i$  (Tablas 6, 7, 12, 13, A3, A5 y A7) se puede explicar porque la EGM no tiene en cuenta los cambios que acontecen en el tumor durante los tiempos de exposición de la terapia ( $T_{\text{exp}} = 45$  minutos) y el que transcurre desde el fin de la terapia hasta el primer volumen post-tratamiento que se mide ( $V_1$ ), que se denomina  $T_t$  ( $T_t = 24$  horas), como se muestra de forma esquemática en la figura 31.

Los resultados experimentales que se reportan en la literatura demuestran que durante  $T_{\text{exp}}$  y  $T_t$ , en el tumor se inducen importantes alteraciones (apoptosis, necrosis, cambios estructurales y morfológicos palpables y visibles por el terapeuta, entre otros) que se hacen más evidentes en la medida que la intensidad de la CED aumenta [15, 18, 22, 25, 53, 77, 88, 94]. Algunas de estas alteraciones y los cambios estructurales y morfológicos también se observan en los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 durante y en las primeras 24 horas después de la

aplicación de la CED, hecho que se observa en el Estudio Piloto que se ejecuta en la actualidad y en estudios previos del grupo cubano de electroterapia [17].

Las alteraciones que se mencionan arriba pueden traer consigo cambios del parámetro  $\alpha$  en los tumores que se tratan con CED durante  $T_{exp}$  y  $T_t$ , en dependencia de la intensidad de la CED ya que en esta Tesis, la variedad histológica del tumor (Ehrlich o fibrosarcoma Sa-37), el tipo de organismo (BALB/c), tamaño inicial del tumor ( $V_0 \cong 0,5 \text{ cm}^3$ ), el tiempo de exposición de la CED (45 minutos) y el arreglo de electrodos (cuatro en la base del tumor) se mantienen constantes. Estos cambios del parámetro  $\alpha$  con la intensidad de la CED están de forma implícita en el volumen del tumor que se calcula a partir de la medición diaria de sus tres diámetros perpendiculares, después de las 24 horas de aplicación de la terapia. Esto puede sugerir que el valor de  $\alpha$  que se registra al finalizar la terapia (en  $V_0^*$ ) o después de un tiempo  $T_t$  ( $V_1$ ), en dependencia del valor de  $i$ , no tiene por qué coincidir con este parámetro antes de la aplicación de la CED (en  $V_0$ , REG-I), como se muestra de forma esquemática en la figura 31.

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión



**Figura 31.** Representación esquemática de la simulación de la EGM (esquema de la parte superior) y la aplicación de la misma a una data experimental, por grupo experimental (esquema de la parte inferior).

Si el parámetro  $\alpha$  cambia durante  $T_{exp}$  y  $T_t$ , entonces es de esperarse, de forma general, que los parámetros  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  también cambien, como se muestra en las tablas 6, 7, 12, 13, A3, A5 y A7. Las dependencias del volumen tumoral en el tiempo que se observa en los tumores de Ehrlich (GT1-1, GT1-2 y GT1-3) y fibrosarcoma Sa-37 (GT2-1, GT2-2, GT2-3 y las réplicas), así como en otros tipos de tumores (Anexo 2) se pueden reproducir con la EGM, aunque los resultados no se muestran en esta Tesis. Para esto, al tumor control se le asocia valores de  $\alpha$  y  $\beta$  diferentes a los de los tumores tratados, que dependen del valor de  $i$ . Se puede verificar que se observan comportamientos de la cinética tumoral similares a los que se muestran para el tumor de Ehrlich (Figura 5), fibrosarcoma Sa-37 y sus dos réplicas (Figuras 5 y 8), y sarcoma Sa-1 y melanoma B16 (Figura A1), en dependencia del rango de variación de la razón  $i/i_0$ , como más arriba se discute.

Estos resultados sugieren que la EGM necesita ser refinada por medio de la inclusión en esta de los comportamientos del volumen tumoral en  $T_{exp}$  y  $T_t$ . Esto se puede garantizar mediante dos vías posibles: 1) el análisis de la EGM por tramo y 2) la formulación de un problema que empalme las regiones de la cinética de crecimiento de los tumores tratados con CED antes ( $t \leq \tau$ ), durante ( $T_{exp}$  y  $T_t$ ) y después de la aplicación de la terapia ( $t > T_t$ ).

En el primer caso, la ecuación (34) tiene que ser re-escrita como:

$$V^*(t) = \begin{cases} 0 & \text{para } 0 \leq t \leq t_{ob} \\ V_o e^{\left(\frac{\alpha}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & \text{para } t_{ob} \leq t \leq \tau \\ i? & \text{para } \tau \leq t \leq T_{exp} + T_t \\ V_o e^{\left(\frac{\alpha^*}{\beta}\right)\left(1 - e^{-\beta(t-\tau)}\right)} & \text{para } T_{exp} + T_t \leq t \leq \tau + t' \end{cases}, \quad (35)$$

En el segundo caso, las condiciones de empalme que se encuentren deben garantizar la continuidad de la cinética de crecimiento de los tumores tratados con CED antes, durante y después de la aplicación de la terapia. Para esto, se resuelve el problema de empalme de la REG-I (intervalo de tiempo entre  $t_{ob}$  y  $\tau$ ) y la región de la cinética que comprende el período de tiempo entre  $\tau$  y  $T_{exp}$ , siendo  $V_0$  el punto común de estas dos regiones. Luego, se resuelve un problema similar pero entre  $T_{exp}$  y  $T_t$  con el punto común  $V_0^*$  para los dos regiones. Por último, se resuelve un problema de este tipo entre  $T_t$  y la región después de la misma hasta el

fin del experimento con  $V_1$  como punto común para dichas regiones, como se muestra en la figura 31.

Estas dos vías no se tienen en cuenta desde el momento inicial de la concepción de la EGM porque en la literatura no se conoce, teórica o experimentalmente, como el volumen tumoral cambia con  $i$  durante  $T_{exp}$  y  $T_t$ . Tampoco, se conocen las relaciones explícitas entre los parámetros de la EGM. Estos aspectos hacen que el problema de empalme sea muy complejo y el por qué al inicio de la formulación del problema se asume, en una primera aproximación, que los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  son independientes de  $i$ .

A partir de los resultados que se muestran para el tumor de Ehrlich (Tabla 6) y fibrosarcoma Sa-37 (Tablas 7; 12 y 13) se puede proponer una dependencia explícita preliminar de los parámetros  $\alpha$  e  $i_0$  con  $i$ ; sin embargo, se requiere de un experimento adicional donde se obtengan otros tipos de respuestas intermedias entre las que se observan para los grupos GT1-2(GT2-2) y GT1-3(GT2-3). También, este experimento adicional se encamina a demostrar de forma experimental la existencia de la respuesta parcial estacionaria, que se revela a partir de la simulación de la EGM después de la aplicación de la CED.

A pesar de lo que se discute en el anterior párrafo, los análisis que se hacen en esta Tesis para la REG-I y para después de la aplicación de la CED (24 horas después) son correctos ya que la EGM (7; 17; 34 o 35) es factible para describir, por tramo, los datos experimentales de estos dos tipos de tumores (Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37) y de otros (sarcoma Sa-1 y melanoma B16 [162]) si se tienen en cuenta los pequeños valores de SSE, SE, PRESS, MPRESS y de cada uno de los errores con que se estiman los parámetros de la EGM ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$ ).

El conocimiento de la REG-I de la cinética de crecimiento del tumor no perturbado es de importancia porque la futura evolución del tumor después de la aplicación de la CED (u otra terapia) depende de su evolución natural. Además, el análisis de esta región puede revelar la posible existencia de otros procesos en la cinética de estos tumores que no se pueden obtener directamente de los datos experimentales y si de la modelación matemática [116, 165]. En la actualidad, las cinéticas de crecimiento tumoral que se obtienen de forma experimental en tumores no perturbados y perturbados con CED proporcionan un entendimiento limitado. Sin embargo, las informaciones que se derivan de ellas (en esta Tesis) y otras que no se conocen hasta el momento, pueden revelar con la modelación matemática. Las mismas requieren de

nuevas aproximaciones físico-matemáticas y más estudios a niveles celular, molecular, atómico y cuántico para corroborar experimentalmente la existencia de tales procesos.

Los resultados obtenidos indican que la EGM debe ser modificada o una aproximación matemática debe ser propuesta con el fin de describir la cinética de crecimiento tumoral y explicar la presencia de al menos uno de estos fenómenos, en concordancia con Bellomo y cols. [116], quienes proponen que "... la investigación futura refinará y mejorará definitivamente los modelos existentes, mientras el análisis de los problemas matemáticos inherentes conducirá esperanzadoramente a la nueva matemática, permitiéndonos dentro de poco abordar los problemas más allá de nuestras habilidades técnicas ...". Para empezar a entender la complejidad del sistema propuesto, deben desarrollarse simulaciones novedosas, incorporando los conceptos desde muchas áreas científicas tales como la investigación de cáncer, mecánica estadística, matemática aplicada y los nuevos sistemas de dinámica no lineales.

### **3.2.3. Distribuciones del potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica generados por un arreglo elíptico de electrodos**

Los resultados experimentales y teóricos de esta Tesis evidencian que la intensidad de la CED juega un papel fundamental en la destrucción de los tumores sólidos y que estos pueden ser destruidos completamente para una dosis umbral de CED. Sin embargo, este parámetro solo no tiene un papel fundamental en la destrucción de tumores; sino que también su distribución por todo el tumor, incluyendo su periferia, a través de los electrodos resulta un aspecto de mucha importancia. Esta distribución de la densidad de corriente en el tumor es la máxima permisible, mientras la del organismo es la mínima. Para esto, se debe tener en cuenta la cantidad, polaridad, forma de inserción y disposición de los electrodos, así como si estos se insertan dentro o fuera del tumor; así como las diferencias de conductividades entre el tumor y el tejido sano circundante, como se evidencia en esta Tesis. La diversidad de estos parámetros y la complejidad de las expresiones analíticas conllevan a la necesidad de visualizar como estos parámetros influyen en las distribuciones de las densidades de corriente en el tumor y el tejido sano circundante. También, el modelo físico que se expone en esta Tesis permite proponer, en cierta aproximación, el arreglo elíptico de electrodos óptimo, mediante un

proceso de optimización que permite maximizar la destrucción del tumor con el mínimo daño al organismo.

El arreglo elíptico de electrodos óptimo, aunque no se hace en esta Tesis, se puede implementar mediante las siguientes vías:

- 1- Optimizar el tamaño del arreglo de electrodos respecto a las dimensiones del tumor.
- 2- Buscar la combinación más factible de los parámetros del arreglo de electrodos tal que la densidad de corriente sea la máxima permisible en el tumor y la que se induzca en el tejido sano sea menor o igual que  $10 \text{ mA/m}^2$ .

La primera vía es factible porque del experimento se miden los diámetros mayor y menor del tumor mediante un pie de rey. Además, los resultados de esta Tesis revelan que la Configuración 1 (electrodos que se insertan dentro del tumor) concentran más las líneas de densidad de corriente en el tumor y su periferia con la mínima cantidad de líneas de densidad de corriente en el tejido sano. Con estos dos elementos se pueden buscar las dimensiones del arreglo elíptico de electrodos  $b_1$  y  $b_2$  interior al tumor tal que la densidad de corriente eléctrica sea la máxima permisible en el tumor y que la del tejido sano sea menor o igual a  $10 \text{ mA/m}^2$  [160]. Esta vía tiene el inconveniente que no se tienen en cuenta los otros parámetros del arreglo de electrodos.

La segunda vía es más compleja y completa que la primera y también su implementación es factible pero sugiere un tiempo de cálculo elevado porque en el programa de computación ONCOMAPET<sup>®</sup> se requiere variar todos los parámetros del arreglo de electrodos tal que primero se desechen las configuraciones de electrodos que induzcan una densidad de corriente eléctrica en el tejido sano mayor que  $10 \text{ mA/m}^2$ . Esto garantiza la seguridad de la electroterapia y que los efectos adversos en el tejido sano sean mínimos. De las configuraciones seleccionadas de forma automática, el programa de computación debe proponer las posibles configuraciones de electrodos que induzcan las máximas densidades de corriente eléctrica permisible en el tumor. También, en el proceso de optimización se debe tener en cuenta el tamaño del tumor. Para esto, el programa de computación ONCOMAPET<sup>®</sup> tiene implementada la posibilidad de superponer arreglos elípticos de electrodos concéntricos con la finalidad de tratar tumores de gran tamaño. Estas posibilidades del ONCOMAPET<sup>®</sup> y otras que no se muestran en este trabajo son las razones por las que en esta Tesis no se explota la capacidad de modelar la densidad de corriente eléctrica que genera un arreglo elíptico de

electrodos en función de los diferentes parámetros del arreglo de electrodos. A pesar que en esta Tesis no se hace una discusión profunda de la optimización del arreglo elíptico de electrodos, la implementación del ONCOMAPET<sup>®</sup>, en gran medida, la realización de experimentos innecesarios que conduzcan al gasto excesivo de costos, tiempo y de recursos materiales y humanos.

En el orden práctico, las distribuciones de corriente eléctrica en el tumor y en el tejido sano circundante se pueden verificar de forma experimental mediante las técnicas de Bioimpedancia eléctrica [104], Imágenes de Densidad de Corriente Eléctrica [151] y Tomografía de Impedancia Eléctrica por Resonancia Magnética Nuclear [167]. Esta última técnica experimental también permite hacer una determinación de la conductividad promedio del tejido a partir de la determinación de los valores puntuales de la conductividad en el tejido. Estas técnicas experimentales reproducen con bastante exactitud las distribuciones de densidad de corriente eléctrica que se obtienen mediante simulaciones para los diferentes parámetros del arreglo de electrodos. Sin embargo, las mismas son costosas (más de 1 000 000 USD) y no están al alcance de todos los laboratorios de experimentación ni hospitales.

Este inconveniente hace que en nuestras condiciones experimentales se proponga una vía indirecta que relacione la propuesta del arreglo de electrodos óptimo con su eficacia y toxicidad. Para esto se propone la optimización del arreglo de electrodos y luego verificar su efectividad y toxicidad mediante la realización de un experimento. Esta optimización permite la selección de los parámetros del arreglo de electrodos óptimos (o más cercanos al óptimo) que maximicen la destrucción del tumor.

Es importante señalar que para la selección óptima de la dosis de CED y del arreglo de electrodos se requieren tener en cuenta 16 variables diferentes, tales como: dosis de la CED, tiempo de exposición de la terapia, número de veces que se repite la terapia, tipo de terapia (catódica, anódica, campo y anódico-catódica), forma de inserción de los electrodos (vertical, paralelo al diámetro mayor y radial), arreglo de electrodos (cantidad de electrodos, forma del arreglo, tamaño del arreglo), variedad histológica del tumor y tipo de hospedero. Es importante señalar que para un animal, la cantidad de posibilidades diferentes (teoría de combinatoria) aumenta cuando se combinan dos (120), tres (560) o más variables del total de

16 posibilidades. Si este problema de optimización se aborda desde el punto de vista experimental, el costo es muy grande y poco práctico.

Lo mencionado anteriormente justifica la importancia de este estudio en la planificación terapéutica de la electroterapia porque esta modelación numérica puede ser un instrumento eficiente para mejorar las distribuciones del campo eléctrico y la densidad de corriente eléctrica y su control dentro del cuerpo porque esta permite visualizar las distribuciones de densidad de corriente eléctrica en dos medios biológicos con conductividades diferentes (tumor y tejido sano circundante) y seleccionar adecuadamente a  $V_o$ , la configuración de electrodos, y la relación  $\sigma_1/\sigma_2$  para aumentar la efectividad antitumoral de CED con el daño mínimo al organismo. A pesar de las potencialidades de este estudio bidimensional, el mismo tiene las siguientes limitaciones: 1) ignora los efectos de las cargas y corrientes en la interfase tumor-tejido sano circundante, si se asume la existencia de un microcampo eléctrico alrededor del tumor [35, 77]. 2) Este estudio no considera el potencial bioeléctrico, la intensidad del campo eléctrico y la densidad de corriente eléctrica inherentes al tumor [77, 138]. 3) Este no brinda informaciones de cómo dependen las distribuciones de la densidad de corriente eléctrica en el tumor y el tejido sano circundante generada por un arreglo de electrodos tridimensional porque en general los tumores sólidos son volumétricos. 4) A partir de esta aproximación matemática no se puede obtener las visualizaciones de la densidad de corriente eléctrica generadas por arreglos de electrodos con otras formas (parábola, hipérbola, entre otras). La falta de optimización del arreglo de electrodos en función de sus parámetros y de otros puede explicar la diversidad de configuraciones de electrodos que se usan en los estudios *in vitro* e *in vivo* (animales y humanos) y por tanto la diversidad de resultados experimentales, constituyendo esto uno de los problemas principales que ha impedido el establecimiento de la ET en la Oncología Clínica.

La asunción de que las conductividades del tumor y el tejido sano circundante son constantes se justifica si se tiene en cuenta que las técnicas experimentales que emplean Serša y cols. [151], Seo y cols. [167], Halter y cols. [104], entre otros, reportan valores medios de este parámetro físico. Además, el cálculo del valor medio del tensor conductividad eléctrica siempre es posible si se asume que el tumor es anisótropo, como propone Sekino y cols. [166]. También, para los objetivos de esta Tesis es suficiente asumir que estas conductividades sean constantes.

A pesar que en esta Tesis no se hace un estudio del cambio de la conductividad eléctrica del tumor durante y después de la aplicación de la CED, es necesario señalar que esta y la permitividad cambian durante estos períodos de observación porque se inducen cambios en el tumor que se relacionan con las concentraciones de iones en los fluidos intracelular y extracelular [96], estructura y densidad celular [17, 22, 31], composición molecular [28, 31, 34], en la membrana celular [15, 22], entre otros. Este hecho es importante que se tenga en cuenta porque los cambios de conductividad eléctrica pueden ser uno de los indicadores de las condiciones de los tejidos y órganos como sugieren Seo y cols. [167].

La consideración de que los tumores son homogéneos en se puede asumir, en una primera aproximación, porque las evidencias en tumores humanos [1, 104, 167] muestran que estos son homogéneos si sus volúmenes son menores o iguales a  $3 \text{ cm}^3$ . También, en la Oncología Clínica se observan tumores homogéneos (adenomas, adenocarcinomas, carcinomas ductales de mama y en sarcomas) con volúmenes mayores a  $3 \text{ cm}^3$ , aunque no es la generalidad [1].

Para los fines de esta Tesis, no es crítico que los tumores sean homogéneos o no porque si siempre se garantiza que la densidad de corriente eléctrica media que se distribuye por toda el área tumoral esté por encima del valor permisible del tumor, se obtiene la destrucción completa de este. La densidad de corriente permisible se puede obtener a partir de la combinación de los parámetros del arreglo de electrodos tal que en el experimento se observe la remisión completa del tumor con el mínimo daño al organismo.

La densidad de corriente eléctrica media se puede calcular de forma numérica mediante la relación  $\iint J(x,y)ds/\iint ds$ , a partir de las expresiones  $[J_i^0(x,y) = \sigma_i E_{ni}^0(x,y)]$  para el tumor y  $[J_i^1(x,y) = \sigma_i E_{ni}^1(x,y)]$  para el tejido sano circundante. Estas expresiones indican que la densidad de corriente en cada punto es diferente, aspecto que se hace más evidente para los tumores heterogéneos. Si siempre se garantiza que la densidad de corriente eléctrica media en el tumor sea superior a la mayor de todas las densidades de corriente que aparecen en este, se asegura la destrucción tumoral completa. Esto es posible porque el porcentaje de necrosis del tumor incrementa con la densidad de corriente que se induce en este [15-48].

También, el proceder de inserción de los electrodos garantiza que se minimicen aún más los efectos tóxicos en el organismo debido a la acción de la densidad de corriente eléctrica en el tejido sano circundante ya que la cánula plástica aísla al electrodo del tejido sano circundante.

Este hecho explica por qué los efectos (eventos) adversos en animales de laboratorio [17, 22, 83-87] y en humanos [15, 22, 88-91, 94] son mínimos, aspectos que se mencionan en la discusión de los estudios toxicológicos.

Para saber si estos valores son significativos, se tiene en cuenta la relación que existe entre la densidad de corriente eléctrica que se induce en el tejido y su efecto biológico. Se conoce que si esta magnitud física está por debajo de  $1 \text{ mA/m}^2$  no existen efectos biológicos; entre  $1-10 \text{ mA/m}^2$  ocurren efectos biológicos mínimos, no significativos; entre  $10-100 \text{ mA/m}^2$  existen posibles efectos biológicos sin riesgo a la salud; entre  $100-1\ 000 \text{ mA/m}^2$  ocurren efectos biológicos sin el posible riesgo a la salud y por encima de  $1\ 000 \text{ mA/m}^2$  existen efectos biológicos con riesgos probado a la salud [18, 94]. Serša y cols. [151] reportan que en el promedio de densidad de corriente de  $2\ 500 \text{ A/m}^2$  se encuentra el mejor compromiso entre la sensibilidad a la CED y el daño del tejido producido por esta.

Las pequeñas diferencias que se encuentran en RMSE y  $D_{\text{máx}}$  demuestran la buena correspondencia entre las soluciones analítica y numérica para el potencial e intensidad del campo eléctrico. Este hecho sugiere que para el diseño de un arreglo de electrodos es suficiente tener en cuenta solo el potencial y el campo eléctrico de orden principal. En la práctica, estas pequeñas diferencias entre estas soluciones no influyen significativamente en la efectividad antitumoral de la electroterapia, y por tanto las mismas no se muestran en el gráfico de contorno del potencial y la intensidad del campo para la exactitud de primer orden ni valores de RMSE.

Para una malla más grande que  $1\ 000 \times 1\ 000$ , la solución numérica de este sistema tiende a coincidir con la solución analítica; sin embargo, el costo del cálculo computacional es superior porque el número de iteraciones aumenta. Esto justifica que para el análisis numérico es suficiente una malla de  $1\ 000 \times 1\ 000$ .

La discrepancia que existe entre las soluciones analítica y numérica, fuera del arreglo de electrodos, para todo valor de  $e$  (Figuras 19-21) es explicada por Dev y cols. [136]. La misma disminuye si  $R_{\text{exterior}}$  aumenta.

El hecho de que existe una pequeña perturbación en el campo eléctrico alrededor de los electrodos inactivos 1 y 4 se explica por la presencia de un campo eléctrico que generan los electrodos 2; 3; 5 y 6. Los electrodos 1 y 4 adquieren una carga neta que se distribuye rápidamente por sus superficies y como consecuencia estos dos electrodos se comportan como

objetos cargados y por consiguiente generan un campo eléctrico que altera el espacio alrededor de ellos. La intensidad y forma de estas pequeñas perturbaciones alrededor de los electrodos 1 y 4 dependen de la configuración del arreglo de electrodos, el potencial en los electrodos activos, y de la separación entre los electrodos.

La componente radial del campo eléctrico que se induce en la superficie de los electrodos 1 y 4 depende directamente de la fuerza del campo eléctrico que genera por el resto de los electrodos y la excentricidad del arreglo de estos. El campo eléctrico que generan los electrodos 2; 3; 5 y 6 no afecta a los electrodos 1 y 4 para los mayores valores  $e$ , hecho que justifica que no se observa ninguna perturbación alrededor de estos dos electrodos (Figura 18b).

Para las configuraciones de electrodos no simétricas y/o arreglos con más de 6 electrodos, el cálculo analítico de  $C_n$  y  $A_{n1}$ , es complejo. Por tal razón estos coeficientes se calculan simplemente resolviendo los sistemas de ecuaciones lineales (20) y (24). Esto es una generalización de la forma particular que usan Dev y cols. [136] y Čorović y cols. [63]. Es muy importante tener esto en cuenta para los tumores sólidos tratados con electroterapia porque los electrodos generalmente no se insertan simétricamente en el tumor y el número de electrodos depende del tamaño de este [18, 94].

Debido a la diversidad de dosis y arreglos de electrodos que se reportan en la literatura es de esperar que los bioefectos que se inducen en el tumor y en el organismo sean diferentes y como resultado en la literatura se proponen diversos mecanismos antitumorales [15, 22, 83-87, 94]. Esta afirmación sugiere que el (los) mecanismo(s) antitumoral(es) de la CED depende(n) esencialmente de la interacción de este agente físico con el tumor, y esta es la razón básica por la cual el grupo cubano de Bioelectricidad presta especial atención a la dosis y distribución de la CED, así como la influencia de estos parámetros en la cinética de crecimiento de los tumores, en correspondencia con otros autores que en los últimos años dirigen sus investigaciones en estas direcciones [15, 22, 83-97].

Este estudio sienta las bases para que las investigaciones futuras evalúen la influencia de la densidad de corriente eléctrica y su distribución, a través de los electrodos, en la EGM que describe el crecimiento de tumores tratados con CED y contribuye a proponer una estrategia terapéutica óptima para los tumores; principalmente aquellos que son menos sensibles a la

CED. Otro mérito de este trabajo es que otras geometrías de electrodos bidimensionales (parábola e hipérbola) se pueden establecer a partir de esta aproximación matemática.

Los estudios futuros se enfocarán en la solución de las recomendaciones de esta Tesis y de otras con el fin de sentar las bases para la estandarización de esta terapia experimental y que la misma se pueda convertir en una de las opciones terapéuticas principales para destruir el cáncer de forma eficaz con el daño mínimo al organismo, hecho no resuelto todavía en los órdenes teórico y experimental.

**CONCLUSIONES**

1. Existe un umbral de corriente eléctrica directa por cada tipo de tumor (Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37) a partir del cual ocurre su destrucción completa. También, el porcentaje de regresión de estos tumores y la sobrevivencia de los ratones BALB/c se incrementan con el aumento de la intensidad de corriente eléctrica directa.
2. La Ecuación de Gompertz modificada es factible para describir y revelar nuevas informaciones de las cinéticas de crecimiento de los tumores no tratados y tratados después de la aplicación de la corriente eléctrica directa.
3. La aproximación matemática predice en cierta aproximación cómo dependen las distribuciones de potencial, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica en función de la forma y tamaño del arreglo de electrodos, posicionamiento y polaridad de estos, y de las diferencias de conductividades entre el tumor y su tejido sano circundante, hecho que permite discernir acerca del lugar más conveniente para colocar los electrodos durante la terapia.

## RECOMENDACIONES

1. Incluir en la ecuación de Gompertz modificada la dependencia explícita de sus parámetros en función de la intensidad de la corriente eléctrica directa con el fin de describir la cinética de crecimiento completa de un tumor antes, durante y después de la aplicación de esta terapia experimental.
2. Aplicar la ecuación de Gompertz modificada a otras variedades histológicas de tumores experimentales, y establecer los rangos de variación de los parámetros de esta ecuación para cada uno de estos tipos de tumores.
3. Optimizar el arreglo elíptico de electrodos y luego evaluar de forma experimental su eficacia y toxicidad.
4. Generalizar el modelo que permite visualizar las distribuciones del potencial eléctrico, intensidad del campo eléctrico y densidad de corriente eléctrica en el tumor y el tejido sano circundante, a otras secciones cónicas (parábola e hipérbola) y modelar estas distribuciones en estos tejidos generadas por arreglos de electrodos tridimensionales.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Cotran RS, Robbins SL. Patología Estructural y Funcional. Séptima Edición. Ed. Elsevier, Saunders, Madrid. (2005).
2. Cohen SM, Arnold LL. Cell Proliferation and Carcinogenesis. *J Toxicol Pathol*, 21:1-7. (2008).
3. Koliopanos A, Avgerinos C, Paraskeva C, Touloumis Z, Kelgiorgi D, Dervenis C. Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 7:345-56 (2008).
4. Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*, 58:544-58 (2008).
5. Toyokuni S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life*, 60: 441-447 (2008).
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Última actualización: Julio de 2008
7. Unión Internacional contra el Cáncer (UICC). Disponible en:  
[http://www.uicc.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=13&Itemid=113](http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113).  
Última actualización: Septiembre de 2008.
8. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud de la Dirección Nacional de Estadística del Ministerio de Salud Pública (2009).
9. Hoshino I, Matsubara H, Komatsu A, Akutsu Y, Nishimori T, Yoneyama Y, Murakami K, Sakata H, Matsushita K, Miyazawa Y, Brooks R, Yoshida M, Ochiai T. Combined Effects of p53 Gene Therapy and Leptomycin B in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* ,75:113-119 (2008).
10. Rugg C, Mutter N. Anti-angiogenic therapies in cancer: achievements and open questions. *Bull Cancer*, 94:753-62 (2007).
11. Xiang SD, Scalzo-Inguanti K, Minigo G, Park A, Hardy CL, Plebanski M. Promising particle-based vaccines in cancer therapy. *Expert Rev Vaccines*, 7:1103-19 (2008).
12. Toohey JJ. Dehydroascorbic acid as an anti-cancer agent. *Cancer Lett*, 263:164-9 (2008).

13. Tanaka H, Kageyama K, Asada R, Yoshimura N, Miwa N. Promotive effects of hyperthermia on the cytostatic activity to Ehrlich ascites tumor cells by diverse delta-alkyllactones. *Exp Oncol*, 30:143-7 (2008).
14. Sadacharam M, Soden DM, O'sullivan GC. Electrochemotherapy: An emerging cancer treatment. *Int J Hyperthermia*, 24:263-73 (2008).
15. Yoon DS, Ra YM, Ko DG, Kim YM, Kim KW, Lee HY, Xin YL, Zhang W, Li ZH, Kwon HU. Introduction of Electrochemical Therapy (EChT) and Application of EChT to the breast Tumor. *Journal of Breast Cancer*, 10:162-168 (2007).
16. Schaefer N, Schafer H, Maintz D, Wagner M, Overhaus M, Hoelscher AH, Türler A. Efficacy of Direct Electrical Current Therapy and Laser-Induced Interstitial Thermotherapy in Local Treatment of Hepatic Colorectal Metastases: An Experimental Model in the Rat. *J Surg Res*, 146:230-40 (2008).
17. Bergues LC. La electroterapia una nueva alternativa para el tratamiento de tumores malignos. Estudios preclínicos. Tesis de doctorado (2003).
18. Xin Y. The development of Electrochemical Therapy in China. Proceeding of 8<sup>th</sup> Congress on tumors of International Association of Biological Closed Electric Circuits, Nanning, China, September 21-23, pp. 4-8 (2004).
19. Hiller H. Fundamentals of treatment with direct current. *Arch Phys Ther*, 17:67-68 (1965).
20. Schauble MK, Habal MB, Gullick HD. Inhibition of experimental tumor growth in hamsters by small direct currents. *Arch Path Lab Med*, 101:294-297 (1977).
21. Nordenström BEW, Preliminary clinical trials of electrophoretic ionization in the treatment of malignant tumors. *IRCS Med Sci*, 6:537-540 (1978).
22. Vijn AK. Phenomenology and Mechanisms of Electrochemical Treatment (ECT) of Tumors. *Modern aspects of electrochemistry*, 39:231-275 (2006).
23. Turjanski P, Olaiz N, Abou-Adal P, Suarez C, Risk M, Marshall G. pH front tracking in the electrochemical treatment (EChT) of tumors: Experiments and simulations *Electrochimica Acta*, 54:6199-6206 (2009).
24. Veiga VF, Nimrichter L, Teixeira CA, Morales MM, Alviano CS, Rodrigues ML, Holandino C. Exposure of Human Leukemic Cells to Direct Electric Current: Generation of Toxic Compounds Inducing Cell Death by Different Mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, 42:61-74 (2005).

25. Kurokawa M, Sakagami H, Kokubu F, Noda H, Takeda M, Adachi M. Induction of apoptotic cell death by direct-current treatment in human leukemic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123:370-376 (1997).
26. Veiga VF, Holandino C, Rodrigues ML, Capella MA, Menezes S, Alviano CS. Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an in vitro analysis. *Bioelectromagnetics*, 21:597-607 (2000).
27. Tang B, Li L, Jiang Z, Luan Y, Li D, Zhang W, Reed E, Li QQ. Characterization of the mechanisms of electrochemotherapy in an in vitro model for human cervical cancer. *Int J Oncol*, 26:703-711 (2005).
28. Wartenberg M, Wirtz N, Grob A, Niedermeier W, Hescheler J, Peters SC, Sauer H. Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*, 29:47-54 (2008).
29. Li KH, Xin YL, Gu YN, Xu BL, Fan DJ, Ni BF. Effects of Direct Current on Dog Liver: Possible Mechanisms for Tumor Electrochemical Treatment. *Bioelectromagnetics*, 18:2-7 (1997).
30. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Berry DP, Maddern GJ. Local ablation for unresectable liver tumors: is thermal best? *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 11:97-106 (2004).
31. Von Euler H, Olsson JM, Hultenby K, Thorne A, Lagerstedt AS. Animal models for treatment of unresectable liver tumours: a histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver. *Bioelectrochemistry*, 59:89-98 (2003).
32. Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. Electrochemical Treatment of Mouse and Rat Fibrosarcomas with Direct Current. *Bioelectromagnetics*, 18:18-24 (1997).
33. Wojcicki M, Kostyrka R, Kaczmarek B, Kordowski J, Romanowski M, Kaminski M, Klonek J, Zielinski S. Electrochemical therapy in palliative treatment of malignant dysphagia: a pilot study. *Hepatogastroenterology*, 46:278-84 (1999).
34. Von Euler H. Electrochemical treatment of tumours. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala (2002).
35. International Asociation for Biological Closed Circuits (IABC). Disponible en <http://www.iabc.readywebsites.com/> . Última actualización: Marzo de 2008.

36. Chou C. Thirty-five years in bioelectromagnetics research. *Bioelectromagnetics*, 28:3-15 (2007).
37. Ren RL, Vora N, Yang F, Longmate J, Wang W, Sun H, Li JR, Weiss L, Staud C, McDougall JA, Chou CK. Variations of dose and electrode spacing for rat breast cancer electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics*, 22:205-211 (2001).
38. Ando H, Ito K, Wang L, Hibi K, Hidemura K, Yamazaki T, Kasai Y, Akiyama S, Nakao A. Modification of adriamycin pharmacokinetics by direct electric current in rats. *Anticancer Drugs*, 13:321-326 (2002).
39. Serša G, Golouh R, Miklavčič D. Anti tumor effect of tumor necrosis factor combined with electrotherapy on mouse sarcoma. *Anti Cancer Drugs*, 5:69-74, (1994).
40. Samuelsson L, Joensson L, Lamm IL, Linden CJ, Ewers SB. Electrolysis with different electrode materials and combined with irradiation for treatment of experimental rat tumors. *Acta Radiol*, 32:178-181 (1991).
41. Xie L, Sun C. A new local ablation for solid malignant tumours: anti-tumour effect of hyperthermal and electrochemical therapy on transplantable mouse cancer. *Int J Hyperthermia*, 22:607-12 (2006).
42. Maintz D, Fischbach R, Schafer N, Turler A, Kugel H, Schafer H, Lackner K. Local therapy of liver metastases of colorectal carcinomas. Laser therapy vs. direct current treatment in the rat model. *Rofo Forstschr Geb Rontgonstr Neuen Bildgeb Verfah*, 173:471-477 (2001).
43. Larkin J, Soden D, Collins C, Tangney M, Preston JM, Russell LJ, McHale AP, Dunne C, O'Sullivan GC. Combined electric field and ultrasound therapy as a novel anti-tumour treatment. *Eur J Cancer*, 41:1339-1348 (2005).
44. Lin XZ, Jen CM, Chou CK, Chou CS, Sung MJ, Chou TC. Saturated saline enhances the effect of electrochemical therapy. *Dig Dis Sci*, 45:509-514 (2000).
45. Von Euler H, Strähle K, Thörne A, Yongqing G. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). *Bioelectrochemistry*, 62:57-65 (2004).
46. Dobbins C, Wemyss-Holden SA, Cockburn J, Maddern GJ. Bimodal electric tissue ablation-modified radiofrequency ablation with a le veen electrode in a pig model. *J Surg Res*, 144:111-116 (2008).

47. Humphrey CE, Seal EH. Biophysical approach toward tumor regression in mice. *Science*, 130:388-390 (1959).
48. Vijn A. Electrochemical treatment (ect) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogencavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:663-665 (2004).
49. Colombo L, González G, Marshall G, Molina FV, Soba A, Suarez C, Turjanski P. Ion transport in tumors under electrochemical treatment: In vivo, in vitro and in silico modeling. *Bioelectrochemistry*, 71:223-32 (2007).
50. Esser AT, Smith KC, Gowrishankar TR, Weaver JC. Towards solid tumor treatment by irreversible electroporation: intrinsic redistribution of fields and currents in tissue. *Technol Cancer Res Treat*, 6:261-74 (2007).
51. Vodovnik L, Miklavčič D, Serša G. Modified cell proliferation due to electrical currents. *Med & Biol Eng & Comput*, 30:CE21-CE28 (1992).
52. Zhu F, Tan S, Lin J. Effects of direct pulse on tissues of tumors in mice. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Annual International Conference. IEEE Engineering in Medicine and Biology*, Amsterdam 35-36 (1996).
53. Kim HB, Ahn S, Jang HJ, Sim SB, Kim KW. Evaluation of corrosion behaviors and surface profiles of platinum-coated electrodes by electrochemistry and complementary microscopy: biomedical implications for anticancer therapy. *Micron*, 38:747-753 (2007).
54. Serša G, Kotnik V, Cemazar M, Miklavčič D, Kotnik A. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor bearing mice-natural resistance and immune responsiveness. *Anti-Cancer Drugs*, 7:785-91 (1996).
55. Grecu D, Carstea AS, Grecu AT, Visinescu A. Mathematical modelling of tumor growth. *Romanian Reports in Physics* 59:447-455 (2007).
56. Behera A, O'Rourke C. The Effect of Correlated Noise in a Gompertz Tumor Growth Model. *Braz J Phys*, 38:272-278 (2008).
57. Byrne HM. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nature Reviews|Cancer*, 10:223-230 (2010).
58. Preziosi L. *Cancer Modelling and Simulation*. Chapman&Hall/CRC, New York (2003).
59. D'Onofrio A. Metamodeling tumor-immune system interaction, tumor evasion and immunotherapy. *Mathematical and Computer Modelling*, 47:614-637 (2008).

60. Turjanski P, Soba A, Suárez C, Colombo L, González G, Molina F, Marshall G. Anodic pH distribution analysis during electrochemical treatment of tumors: numerical simulations. *Mecánica Computacional*, 26:3458-3474 (2007).
61. Kotnik T, Miklavčič D. Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields. *Bioelectromagnetics*, 21:385-394 (2000).
62. Miklavčič D, Jarm T, Karba R, Serša G. mathematical modelling of tumor growth in mice following electrotherapy and bleomycin treatment. *Math Comp Simulation*, 39:597-602 (1995).
63. Čorović S, Pavlin M, Miklavčič D. Analytical and numerical quantification and comparison of the local electric field in the tissue for different electrode configurations. *Biomed Eng Online*, 6:37 (2007).
64. Mehrara E, Forssell-Aronsson E, Ahlman H and Bernhardt P. Specific Growth Rate versus Doubling Time for Quantitative Characterization of Tumor Growth Rate. *Cancer Research*, 67:3970-3975 (2007).
65. Patel BP, Rawal UM, Rawal RM, Shukla SN, Patel PS. Tobacco, antioxidant enzymes, oxidative stress, and genetic susceptibility in oral cancer. *Am J Clin Oncol*, 31:454-9 (2008).
66. Bayani J, Paderova J, Murphy J, Rosen B, Zielenska M, Squire JA. Distinct patterns of structural and numerical chromosomal instability characterize sporadic ovarian cancer. *Neoplasia*, 10:1057-65 (2008).
67. Toyokuni S. Novel Aspects of Oxidative Stress-Associated Carcinogenesis Antioxidants & Redox Signaling, 8:1373-1377 (2006).
68. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*, 401:1-11 (2007).
69. Leung EY, Crozier JE, Talwar D, O'Reilly DS, McKee RF, Horgan PG, McMillan DC. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*, 123:2460-4 (2008).
70. Steel GG. Basic clinical radiobiology. Second Edition. Oxford University Press, Inc. New York 1-30 (1997).
71. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*, 358:2039-2049 (2008)

72. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*, 39:212-20 (2007).
73. Schmidt K, Hoffend J, Altmann A, Strauss LG, Dimitrakopoulou-Strauss A, Engelhardt B, Koczan D, Peter J, Dengler TJ, Mier W, Eisenhut M, Haberkorn U, Kinscherf R. Angiostatin Overexpression in Morris Hepatoma Results in Decreased Tumor Growth but Increased Perfusion and Vascularization. *J Nucl Med*, 47:543-551 (2006).
74. Berndorff D, Borkowski S, Moosmayer D, Viti F, Müller-Tiemann B, Sieger S, Friebe M, Hilger Ch, Zardi L, Neri D and Dinkelborg L. Imaging of Tumor Angiogenesis Using <sup>99m</sup>Tc-Labeled Human Recombinant Anti-ED-B Fibronectin Antibody Fragments. *J Nucl Med*, 47:1707-1716 (2006).
75. Dolhem R. The history of electrostimulation in rehabilitation medicine. *Annales de réadaptation et de médecine physique*, 51:427-431 (2008).
76. Talebi G, Torkaman G, Firoozabadi M, Shariat S. Effect of anodal and cathodal microamperage direct current electrical stimulation on injury potential and wound size in guinea pigs. *J Rehabil Res Dev*, 45:153-60 (2008).
77. Haltiwanger S. The Electrical Properties of Cancer Cells. Disponible en: <http://www.royalrife.com/haltiwanger1.pdf>. Última actualización: Abril, 2008.
78. Reis A, Henninger T. Zerstörung maligner wachstumsenergie durch anodische oxidation. *Klin Wochenschr* I, 39-43 (1953).
79. Holandino C, Veiga VF, Capella MM, Menezes S, Alviano CS. Damage induction by direct electric current in tumoural target cells (P815). *Indian J Exp Biol*, 38:554-558 (2000).
80. Von Euler H, Söderstedt A, Thörne A, Olsson J, Yongqing G. Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line. An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*, 58:163-167 (2002).
81. Zhukavets A. The Impact of Direct Current on Walker 256 Carcinosarcoma (W256) Growth. Disponible en: <http://2006.confex.com/uicc/uicc/techprogram/P1885.HTM> (2006).

82. Ma L, Lani V, Moan J. Combination therapy: photochemotherapy, electric current, and ionizing radiation. Different combinations studied in a WiDR human colon adenocarcinoma cell line. *J Photochem Photobiol B*, 21:2-3 (1993).
83. Mikhailovskaya AA, Kaplan MA, Brodskij RA, Bandurko LN. Evaluation of Antitumor Efficiency of Electrochemical Lysis on the Model of M-1 Sarcoma. *B Exp Biol Med*, 147:99-101 (2009).
84. Matveev NL, Borsukov AV, Sergreeva ON, Veredchenko AV, Krasnoshchekov AN, Sviridova TE, Vargina LM, Panchenkov DN, Alikhanov BB, Shcherbakov NV. Electrochemical lysis in the experiment and in the comparative characteristics with radiofrequency ablation in the treatment of malignant liver tumors. *Endosk Hir*, 2:19 (2009).
85. Sazgarnia A, Bahreyni TS, Shirin SM, Bayani RS, Khouei AL, Esmaeili HE, Homaei F. Treatment of colon carcinoma tumors by electrolysis: effect of electrical dose and polarity. *Iranian Journal of Medical Physics*, 5:25-38 (2009).
86. Hinz S, Egberts JH, Pauser U, Schafmayer C, Fandrich F, Tepel J. Electrolytic Ablation is as Effective as Radiofrequency Ablation in the Treatment of Artificial Liver Metastases in a Pig Model. *J Surg Oncol*, 98:135-138 (2008).
87. Mikhailovskaya AA, Kaplan MA, Brodskij RA, Bandurko LN. Combined Exposure to Electrochemical Lysis and Photodynamic Therapy. *B Exp Biol Med*, 147:95-98 (2009).
88. Arsov C, Winter C, Albers P. Value of galvanotherapy for localised prostate cancer *Urologe*, 48:748-754 (2009).
89. Li J, Xin Y, Zhang W, Liu J, Quan K. Effect of electro-acupuncture in treating patients with lingual hemangioma. *Chin J Integr Med*, 12:146-149 (2006).
90. Vogl TJ, Mayer HP, Zangos S, Bayne J, Ackermann H, Mayer FB. Prostate Cancer: MR Imaging-guided Galvanotherapy-Technical Development and First Clinical Results. *Radiology*, 245:895-902 (2007).
91. Salzberg M, Kirson E, Palti Y, Rochlitz C. A Pilot Study with Very Low-Intensity, Intermediate-Frequency Electric Fields in Patients with Locally Advanced and/or Metastatic Solid Tumors. *Onkologie*, 31:362-365 (2008).

92. Gu Y, Kang KM, Hasegawa T, Tanabe H, Suzuki I, Choi BO, Choi IB. Electrochemical cancer therapy induces apoptosis in SCC-7 tumor of mice. *Journal of the IABC*, Vol. 1, January-December (2003).
93. Turler A, Schaefer H, Schaefer N, Wagner M, Maintz D, Qiao JC, Hoelscher AH. Experimental low-level direct current therapy in liver metastases: influence of polarity and current dose. *Bioelectromagnetics*, 21:395-401 (2000).
94. Xin Y, Zhao H, Zhang W, Liang C, Wang Z, Liu G. Electrochemical Therapy of Tumors. In *Bioelectromagnetic Medicine*. New York: Marcel Dekker Inc; 709-726 (2004).
95. Liu J, Wei Y, Luo F, Lu S, Peng Y, Lei S, Zhao X, Yan Y. Cell cycle analysis and pathological changes of malignant tumors treated with electrochemical therapy. *Bioelectromagnetics*, 31:104-106 (2000).
96. Griffin DT, Dodd NFJ, Moore JV, Pullan BR, Taylor TV. The effects of low level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumor regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer*, 69:875-878 (1994).
97. Wemyss-Holden SA, Robertson GSM, Dennison AR, de la M Hall P, Fothergill JC, Jones B and Maddern GJ. Electrochemical lesions in the rat liver support its potential for treatment of liver tumors, *J. Surg Res*, 93:55-62 (2000).
98. Jarm T, Wickramasinghe ABD, Deakin M, Čemažar M, Elder J, Rolfé P, Serša G, Miklavčič D. Blood perfusion of subcutaneous tumours in mice following the application of low-level direct electric current. *Adv Exp Med Biol*, 471:497-506 (2000).
99. Serša G, Miklavčič D, Batista U, Novakovič S, Bobanovič F, Vodovnik L. Antitumor effect of electrotherapy alone or in combination with interleukin-2 in mice with sarcoma and melanoma tumors. *Anti-Cancer Drugs*, 3:253-260 (1992).
100. Serša G, Miklavčič D. Inhibition of Sa-1 tumor growth in mice by human leucocyte interferon alpha combined with low-level direct current. *Mol Biother*, 2:165-168 (1990).
101. Morrison CP, Court FG, Teague BD, Metcalfe MS, Wemyss-Holden SA, Texler M, Dennison AR, Maddern GJ. Endoscopic Perductal Electrolytic Ablation of the Pancreas: Experimental Studies of Morbidity and Mortality. *Dig Dis*, 23:83-91 (2005).
102. Dobbins C, Brennan C, Wemyss-Holden SA, Cockburn J, Maddern GJ. Bimodal electric tissue ablation-long term studies of morbidity and pathological change. *J Surg Res*, 149:1-2 (2008).

103. Maintz D, Fischbach R, Schafer N, Schafer H, Gossmann A, Kugel H. Results of electrochemical therapy of colorectal liver metastases in rats followed up by MRI. *Invest Radiol*, 35:289-294 (2000).
104. Halter RJ, Hartov A, Heaney JA, Paulsen KD, Schned AR. Electrical impedance spectroscopy of the human prostate. *IEEE Trans Biomed Eng*, 54:1321-7 (2007).
105. Smith DG, Potter SR, Lee BR, Ko WW, Drummond WR, Telford JK, Partin AW. In vivo measurement of tumor conductiveness with the magnetic bioimpedance method. *IEEE Trans Biomed Eng*, 47:1403-1405 (2000).
106. MR-Poduschka. Biologische krebstherapie. Disponible en: <http://www.mr-poduschka.de>  
Última actualización: Noviembre de 2008.
107. Cockburn JF, Maddern GJ, Wemyss-Holden SA. Bimodal electric tissue ablation (BETA) - in-vivo evaluation of the effect of applying direct current before and during radiofrequency ablation of porcine liver. *Clin Radiol*, 62:213-20 (2007).
108. Parise O Jr, Telló M, Oliveira L, Zanella R, Oliveira RT, Carvalho C, Lemes A, Gioso MA, Barbuto JA, Buzaid AC. Efeito anti-tumoral do campo elétrico potencializando quimioterápicos: estudos no modelo animal. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*, 37:76-81 (2008).
109. Ohmine Y, Morimoto T, Kinouchi Y, Iritani T, Takeuchi M, Monden Y. Noninvasive measurement of the electrical bioimpedance of breast tumors. *Anticancer Res*, 20:1941-1946 (2000).
110. Gabriel C. Dielectric properties of biological tissue: Variation with age. *Bioelectromagnetics*, 26:12-18 (2005).
111. Vodovnik L, Miklavčič D, Serša G. Modified cell proliferation due to electrical currents. *Med & Biol Eng & Comput*, 30:CE21-CE28 (1992).
112. Zhu F, Chou CK. Effects of combined electrochemical treatment and hyperthermia of mouse tumors. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Annual International Conference IEEE Engineering in Medicine and Biology*, Amsterdam 17 (1996).
113. Miklavčič D, Fajgelj A, Serša G. Tumor treatment by electric current: electrode material deposition. *Bioelectroch & Bioenerg*, 35:93-97 (1994).
114. Zheng MH, Feng B, Li JW, Lu AG, Wang ML, Hu WG, Sun JY, Hu YY, Ma JJ, Yu BM. Effects and possible anti-tumor immunity of electrochemotherapy with

- bleomycin on human colon cancer xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol*, 28:2426-2430 (2005).
115. Welter M, Bartha K, Rieger H. Emergent vascular network inhomogeneities and resulting blood flow patterns in a growing tumor. *J Theo Biol*, 250:257-280 (2008).
116. Bellomo N, Li NK, Maini PK. On the foundations of cancer modeling: selected topics, speculations, and perspectives. *Math Mod Meth Appl Sci*, 18:593-646 (2008).
117. Jiang Y. A Multiscale Model for Avascular Tumor Growth. *Biophys J*, 89:3884-3894 (2009).
118. Amyot F, Small A, Boukari H, Camphausen K, Gandjbakhche A. Topology of the heterogeneous nature of the extracellular matrix on stochastic modeling of tumor-induced angiogenesis. *Microvascular Research*, 77:87-95 (2009).
119. Mohammadi B, Haghpanah V, Larijani B. A stochastic model of tumor angiogenesis. *Computers in Biology and Medicine*, 38:1007-1011 (2009).
120. Komarova NL. Mathematical modeling of tumorigenesis: mission possible. *Cancer biology. Current Opinion in Oncology*, 17:39-43 (2005).
121. Macklin P, Lowengrub J. Nonlinear simulation of the effect of microenvironment on tumor growth. *J Theor Biol*, 245:677-704 (2007).
122. Tabatabai M, Williams D and Bursac Z. Hyperbolic growth models: theory and application. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2:14 (2005).
123. Dattoli G, Guiot C, Delsanto P, Ottaviani P, Pagnutti S, Deisboeck TS. Cancer metabolism and the dynamics of metastasis. *J Theor Biol*, 256:305-310 (2009).
124. Lo CF. Stochastic Gompertz model of tumour cell growth. *J Theor Biol*, 248:317-21(2007).
125. Ferrante L, Bompadre S, Possati L, Leone L. Parameter Estimation in a Gompertzian stochastic model for tumor growth. *Biometrics*, 56:1076-1081 (2000).
126. Escudero C. Stochastic models for tumoral growth. *Phys Rev E*, 73:1-4 (2006).
127. Friedman A. Mathematical analysis and challenges arising from models of tumor growth. *Math Mod Meth Appl Sci*, 17:1751-1772 (2007).
128. Waliszewski P. A principle of fractal-stochastic dualism and Gompertzian dynamics of growth and self-organization. *Biosystems*, 82:61-73 (2005).

129. Nilsson E, Fontes E. Mathematical modelling of physicochemical reactions and transport processes occurring around a platinum cathode during the electrochemical treatment of tumors. *Bioelectrochemistry*, 53:213-224 (2001).
130. Nilsson E, Berendson J, Fontes E. Electrochemical treatment of tumours: a simplified mathematical model. *J Electroanal Chem*, 460:88-99 (1999).
131. Telló M, Oliveira L, Parise O, Buzaid AC, Oliveira RT, Zanella R, Cardona A. Electrochemical therapy to treat cancer (in vivo treatment). *Engineering in Medicine and Biology Society. EMBS 2007. 29th Annual International Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1:3524-3527 (2007).
132. Telló M, Raizer A, Buzaid AC, Domenge C, Dias GAD, Almager HD, Oliveira L, Farber P, Oliveira RT, Silva VD. *O Uso da Corrente Elétrica no Tratamento do Câncer. EDIPUCRS: Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Press; (2004).*
133. Miklavčič D, Serša G, Kryžanowski M, Novakovič S, Reberšek S. Tumor Bioelectric Potential and its possible exploitation for tumor growth retardation. *J Bioelectr*, 96:133-149 (1990).
134. Miklavčič D, Šemrov D, Valenčič V, Serša G, Vodovnik L. Tumor treatment by direct electric current: computation of electric current and power density distribution. *Electr Magnetobiol*, 16:119-128 (1997).
135. Olaiza N, Maglietta F, Suárez C, Molina FV, Miklavčič D, Mir L, Marshall G. Electrochemical treatment of tumors using a one-probe two-electrode device, *Electrochimica Acta*, 55:6010-6014 (2010).
136. Dev SB, Dhar D, Krassowska W. Electric Field of a Six-Needle Array Electrode Used in Drug and DNA Delivery In Vivo: Analytical Versus Numerical Solution. *IEEE Trans Biom Eng*, 50:1296-1330 (2003).
137. Foster KR, Schwan HP. Dielectric permittivity and electrical conductivity of biological materials, in: *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, CRC Press, Boca Raton, 27-96. (1986).
138. Miklavčič D, Pavšelj N, Hart, FX. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*. John Wiley & Sons, New York. *Electric Properties of Tissues* (2006).
139. Ng EY, Sree SV, Ng KH, Kaw G. The use of tissue electrical characteristics for breast cancer detection: a perspective review. *Technol Cancer Res Treat*, 7:295-308 (2008).

140. Jonscher AK. Dielectric Relaxation in Solids, Chelsea Dielectrics Press, London, 1983.
141. CCAC. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care: Ottawa, 1984. 208p.
142. Norma Española ISO 10993-2. Parte 2: Requisitos relativos a la protección de los animales. Septiembre (1998).
143. Dagli, ML. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. Tese de Doutorado em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (1989).
144. Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of Veterinary Internal Medicine. WB Saunders Company (1995).
145. CCEEM: Guía para la Realización de Investigaciones Preclínicas Biológicas con Equipos Médicos GT-6 1998-05-04.
146. Menchón S. Modelado de las diversas etapas del crecimiento del cáncer y de algunas terapias antitumorales. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba (2007).
147. Patiño J. Oncología, caos y sistemas adaptativos complejos. Revista Colombiana de Cancerología, 154:16-19 (2002).
148. Werndl C. What are the New Implications of Chaos for Unpredictability? The British Journal for the Philosophy of Science, 60:195–220 (2009).
149. Parise O, Oliveira LO, Telló M, Gioso MA, Buzaid AC. Electrolysis and Electrochemical Therapy in the Treatment of Spontaneous Head and Neck Tumors of Cats and Dogs. Annual Meeting & Research Workshop on the Biology, Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer (2006).
150. Senior K. Electrical killing fields for cancer cells. Lancet Oncol, 8:578 (2007).
151. Serša I, Beravs K, Dodd NJF, Zhao S, Miklavčič D, Demsar F. Electric current density imaging of mice tumors, Magn Reson Med, 37:404-409 (1997).
152. Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP. Modeling of data, in numerical recipes in C, in: The Art of Scientific Computing, 2nd ed., Cambridge University Press, 1992.
153. J.D. Jackson. Classical Electrodynamics. Third Edition. John Wiley & Sons, Inc. (1999).
154. Landau LD, Lifshitz EM. Statistical Physics Part 1, vol. 5 of Course of Theoretical Physics. Pergamon, 3rd Ed. 1994.

155. Von Euler H, Nilsson E, Olsson JM, Lagersted AS. Electrochemical treatment (EchT) effects in rat mammary and liver tissue. In vivo optimizing of a dose-planning model for EChT of tumours. *Bioelectrochemistry*, 54:117-124 (2001).
156. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11:173-186 (2001).
157. Miklavčič D, An D, Belehradec J.Jr., Mir LM. Host's immune response in electrotherapy of murine tumors by direct current. *Eur Cytokine Netw*, 8:275-279 (1997).
158. Simčič S, Bobanovič F, Kotnik V, Vodovnik L. Local changes in membrane potentials intensify neutrophil oxidative burst. *Physiol Chem Phys & Med NMR*, 29:39-50 (1997).
159. Bobanovič F, Klampfer L, Miklavčič D. The effect of direct current on NK cell activity. *Trans BRAGS*, 11-20 (1991).
160. ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields up to 300 GHz. International commission on non-ionizing radiation protection. *Health Phys*, 74:494-522 (1998).
161. Geddes LA, Roeder RA. Direct-current injury: Electrochemical aspects. *J Clin Monit*, 18:157-161 (2004).
162. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectrochem Bioenerg*, 35:23-27 (1994).
163. Camazine S, Deneubourg JL, Franks NR, Sneyd J, Theraulaz G, Bonabeau E. *Self-Organization in Biological Systems*, Princeton University Press: ISBN 0-691-11624-5 - ISBN 0-691-01211-3. 2003
164. Nesterets Y, Gureyev T, Stevenson A, Pogany A, Wilkins S, Kincaid R, Ye H, Vogelsang L, Lipson E, Coman I, Fourmaux S, Kieffer JC, Krol A. Soft tissue small avascular tumor imaging with x-ray phase-contrast micro-CT in-line holography. *Medical Imaging 2008: Physics of Medical Imaging*. Edited by Hsieh, Jiang; Samei, Ehsan. *Proceedings of the SPIE*; 6913: 69133Z-69133Z-7. 2008
165. Molski M, Konarski J. Coherent states of gompertzian growth. *Phys Rev E*, 68:021916-1-021916-7 (2003).

166. Norton L. Conceptual and practical implications of breast tissue geometry: toward a more effective, less toxic therapy. *Oncologist* 2005; 10: 370-381. Disponible en: <http://www.TheOncologist.com/cgi/content/full/10/6/370>, Última actualización: February 9, 2007.
167. Seo JK, Kwon O, Woo EJ. Magnetic resonance electrical impedance tomography (MREIT): conductivity and current density imaging. *J Phys Conference Series*, 12:140-155 (2005).
168. Sekino M, Ohsaki H, Yamaguchi-Sekino S, Iriguchi N, Ueno S. Low-frequency conductivity tensor of rat brain tissues inferred from diffusion MRI. *Bioelectromagnetics*, 30:489-499 (2009).

**BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR**

1. Bergues L, Godina J, Ramírez A, González J, **Camué H**, Morales M, Fariñas M, Verdecia M, Rubio T, O’Farrill M, Acosta S, Suárez F, Zamora L, Céspedes M, Edward S, Crombet V, Sierra G. Modified Gompertz equation for electrotherapy murine tumor growth kinetics: Predictions and new hypotheses. *BMC Cancer* 10: 589-599 (2010).
2. **Camué H**, Bergues L, Ramírez A, Godina J, González J, Peña R, Sierra G, Morales M, Fariñas M, Verdecia M, Rubio T, O’Farrill M, Acosta S, Suárez F, Zamora L, Céspedes M, Edward S, Mesa Y, Bergues I. Influence of electrode array parameters used in electrotherapy on tumor growth kinetics: A mathematical simulation. *Mathematics and Computers in Simulation* (en proceso de revisión, 2010).
3. Ramírez A, Bergues L, **Camué H**, Soler Y, Gilart F, Morales M, Ortiz L, Suárez F, Fariñas M, Real N, Sierra G, Bergues I. Electric current density distribution in planar solid tumor and its surrounding healthy tissue generated by an electrode elliptic array used in electrotherapy. *Mathematics and Computers in Simulation* 80:1886 – 1902 (2010).
4. Ramírez A, Bergues L, **Camué H**, Soler Y, Roca E, Acosta S, Rubio T. Distributions of the potential and electric field of an electrode elliptic array used in tumor electrotherapy: Analytical and numerical solutions. *Mathematics and Computers in Simulation* 79: 2091–2105 (2009).
5. Bergues L, Ramírez A, Placeres R, Verdecia M, **Camue H**, Bory J, O’Farril M, Suarez F, Gonzalez M. Mathematical modeling of tumor growth in mice following low-level direct electric current. *Mathematics and Computers in Simulation* 78: 112–120 (2008).
6. Verdecia M, O’Farrill M, Jing-hong L, Bergues L, Suárez F, **Camué H**, Acosta S, Fariña M. Primeras experiencias clínicas en Cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales. *Rev Electrónica MEDISAN*, 11(1) (2007).
7. **Camué H**, Quevedo MCS, Cabrales LEB, Bruzón RNP, Salas MF, Peña OG, González TR, López DS, Flores JLM. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer* 4:87 (2004).

**OTRAS BIBLIOGRAFÍAS DEL AUTOR RELACIONADAS CON LA TESIS**

1. M. Suárez, R. Pérez, L. Bergues, **H. Camué**, D. Segura. “Alteraciones inducidas en el fibrosarcoma Sa-37 por la acción citotóxica de la corriente eléctrica directa”. *Rev. Cub. Med.* 4:1-4 (2003).
2. L. Bergues, **H. Camué**, R. Pérez, M. Suárez, M. Céspedes and M. Fariñas. “ELF magnetic field effects on some hematological and biochemical parameters of peripheral blood in mice”. *Electro- and MagnetoBiology*, 20 (2):185 – 191, (2001).
3. L. Bergues, **H. Camué**, R. Pérez, MC. Suárez, R. Hinojosa, L. Montes de Oca, M. Fariñas and O. De la Guardia: “Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current: Possible role of reactive oxygen species and antitumoral defense mechanisms”. *Bioelectromagnetics*, 22: 316-322, (2001).
4. L. Bergues, **H. Camué**, O. de la Guardia, M. Verdecia y T. Rubio. “Efecto antitumoral de la corriente eléctrica directa: estudio en tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37”. *Rev Cub Oncol* 17(3):176-79, (2001).
5. **H. Camué**, L. Bergues, M. Suárez, D. Segura, M. Fariñas. “Efectos de la corriente eléctrica directa en el crecimiento del tumor de Ehrlich”. *Rev. Cubana Oncol* 17(3):167-170, (2001).
6. **H. Camué**, D. Segura. “La electroquimioterapia: una nueva alternativa terapéutica en la Oncología”. *Rev. Cub Oncol* 17(3):188-94, (2001)
7. **H. Camué**, M. Suárez, D. Segura M. Verdecia y T. Rodríguez. “Efectos de la corriente eléctrica directa y el tipo de terapia en el crecimiento del tumor de Ehrlich”. *Rev. Electrónica MEDISAN* 5 (4), (2001)
8. L. Bergues, **H. Camué**, R. Pérez, R. Hinojosa and L. Montes de Oca. “T lymphocytes-cancerous cells model under cytotoxic action of the direct electric current”. *Rev Bras Cancerol*, 46 (3):265-274, (2000).
9. L. Bergues, A. Lara, J.L. García, R. Pérez, J. Losada, **H. Camué**, R. Hinojosa, L. Montes de Oca, A. Fong, A. González. “Influencia del campo eléctrico pulsante en la cinética de polimerización de las hemoglobinas S. Parte II: aumento del tiempo de demora”. *Rev Mex Fís*, 46 (3):276-280, (2000).
10. L. Bergues, R. Pérez, R. Hinojosa, **H. Camué**, M. Fariñas. “Magnetoterapia: Elementos de una controversia”. *Revista Avances Médicos de Cuba*, 21:42-45, (2000).

11. L. Bergues, **H. Camué**, R. Pérez, MC. Suárez, R. Hinojosa, L. Montes de Oca, M. Fariñas, O. De la Guardia. “Efectos de la corriente eléctrica directa en el tratamiento de tumores”. *Rev Cub Oncol* 16 (1):30-34, (2000).
12. L. Bergues, A. Lara, J.L. García, R. Pérez, J. Losada, **H. Camué**, R. Hinojosa, L. Montes de Oca, A. Fong, A. González. “Influencia del campo eléctrico pulsante en la despolimerización de las moléculas de hemoglobina S desoxigenadas. Parte I”. *Rev Mex Fís*, 46 (3):269-275, (2000).
13. L. Bergues, R. Pérez, R. Hinojosa, W. González, J. Leyva, J.L. García, C. Suárez, **H. Camué**, L. Montes de Oca, R. Roper, A. Fong. “Influence of Static Magnetic Field on the Evolution of Ehrlich Ascitic Tumor”. *Rev Mex Ing Biom*, XXI (1):19-24, (2000).
14. L. Bergues, **H. Camué**, R. Pérez, R. Hinojosa, L. Montes de Oca, A. Fong, L. Brito. “Host-cancerous cells model under cytotoxic action of the direct electric current”. *Rev Mex Ing Biom*, 20 (4):97-103, (1999).
15. L. Bergues, R. Hinojosa, R. Pérez, L. Montes de Oca, **H. Camué**, A. Lara, C. Suárez, R. Roper, A. Fong. “Efectos de la Corriente Eléctrica Directa en el Tumor Murino Subcutáneo de Ehrlich. I: Estudios de Necrosis y Volumen del Tumor en Estadíos Avanzados”. *Rev Bras Cancerol*, 44 (3), (1998).

#### **REGISTRO DE SOFTWARE**

1. **Registro de Obra Literaria “ONCOMAPET. Versión 1.0”**, Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA), 399-2008.

#### **PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES**

1. L. Bergues, A. Ramírez, R. Placeres, M. Verdecia, **H. Camué**, J. Bory, M. O’Farril, F. Suárez and M. González Mathematical modeling of tumor growth in mice following low-level direct electric current. IV Seminario Bienal Internacional acerca de las implicaciones filosóficas, epistemológicas y metodológicas de la teoría de la complejidad. Ciudad de La Habana, Cuba, Enero, 15-18, 2008.
2. Ramírez, L. Bergues, **H. Camué**. Modification of the Gompertz equation to describe the temporal evolution of solid tumors treated with direct electric current. IX Latin American Symposium of Chronobiology. Ciudad de La Habana, Cuba, Diciembre 20-27, 2007.

3. L. Jing- Hong, M. Verdecia, M. O’Farrill, L. Bergues, **H. Camué**, S. Acosta, M. Rios, M. Fariñas, M. Suárez, S. González, T. Rubio, K. Caballero, F. Suárez, N. Real and C. Firley. First clinical experiences in Cuba on the application of the EChT in the treatment of tumors. 9th International Congress of the IABC, Sao Paulo, Brasil, 2006.
4. **H. Camué**, L. Bergues, M. Verdecia, V. Tamayo, S. Acosta, M. O’farrill and N. Real Effect of Electrochemical Therapy on Fibrosarcoma Sa-37 and Ehrlich Tumors. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Seúl’2006, Agosto 27 – Septiembre 1, 2006, Seúl, Korea.
5. L. Bergues, **H. Camué**, M. Suárez, S. González, T. Rubio, M. Verdecia, M. O’farrill, K. Caballero and V. Tamayo Antitumoral Effect of Electrochemical Therapy: Histopatological Study. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Seúl’2006, Agosto 27 – Septiembre 1, 2006, Seúl, Korea.
6. L. Bergues, R. Pérez, **H. Camué**, M. Suárez, M. Fariña, O. de la Guardia, and K. Caballero. Increment of the Survival Rate of the BalB/C Mice with the Increase of the Doses of Direct Electric Current. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Seúl’2006, Agosto 27 – Septiembre 1, 2006, Seúl, Korea.
7. **H. Camué**, M. Suárez, L. Bergues, M. Fariñas, T. Rubio, K. Caballero, Y. Mesa, D. Segura, S. González y M. Verdecia “La terapia electroquímica en el tratamiento de los tumores de Ehrlich y Fibrosarcoma Sa-37”. Proceeding de la I Conferencia Internacional de Electromagnetismo Aplicado CNEA’2005, Junio 22–23, 2005, Santiago de Cuba, Cuba.
8. **H. Camué**, M. Suárez, L. Bergues, S. González, T. Rubio, M. Verdecia, M. O’Farrill, M. Céspedes y Y. Mesa “Efecto antitumoral de la terapia electroquímica: estudio histopatológico”. Proceeding del VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería HABANA’2005. C. Habana, Julio 19 – 22. 2005
9. L. Bergues, R. Pérez, **H. Camué**, M. Suárez, D. Segura, M. Fariñas, O. de la Guardia y K. Caballero. “Incremento de la razón de sobrevivencia de los ratones balb/c con el aumento de la dosis de corriente eléctrica directa”. Proceeding del VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería HABANA’2005. C. Habana, Julio 19–22. 2005
10. **H. Camué**, R. Pérez, L. Bergues, M. Céspedes, D. Segura and S. Acosta “Difference of electrosensibility between Fibrosarcoma Sa-37 and Ehrlich tumors under the same DEC

- dose”. Proceeding del 8th International Congress of the IABC, Nanning, China, September 20 - 24th, 2004.
11. L. Bergues, R. Pérez, **H. Camué**, M. Fariñas, M. Suárez, T. Rubio, J. Marín, D. Segura and L. Gómez “Effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors”. Proceeding of 8th International Congress of the IABC, Nanning, China, September 20 - 24th, 2004.
  12. **H. Camué**, K. Caballero, Y. Mesa, M. Céspedes, V. Tamayo, S. González, M. O’Farrill y S. Acosta “Diferencia de sensibilidad entre los tumores de Ehrlich y Fibrosarcoma Sa-37 bajo la misma dosis de corriente eléctrica directa”. V Congreso de la Sociedad Oncológica Centroamericana y del Caribe. ONCO’2004.
  13. L. Bergues, R. Pérez, **H. Camué**, M. Fariñas, M. Suárez, T. Rubio, M. Verdecia, D. Segura y L. Gómez “Influencia en la cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y Fibrosarcoma Sa-37 bajo la acción de diferentes cantidades de carga eléctrica”. V Congreso de la Sociedad Oncológica Centroamericana y del Caribe. ONCO’2004.
  14. **H. Camué**, R. Pérez, L. Bergues, M. Céspedes, D. Segura and S. Acosta. Difference of electrosensitivity between Fibrosarcoma Sa-37 and Ehrlich tumors under the same DEC dose. Proceeding of 8th International Congress of the IABC, Nanning, China, September 20 - 24th, 2004.
  15. L. Bergues, R. Pérez, **H. Camué**, M. Fariñas, M. Suárez, T. Rubio, J. Marín, D. Segura and L. Gómez. Effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. Proceeding of 8th International Congress of the IABC, Nanning, China, September 20 - 24th, 2004.
  16. **H. Camué**, L. Bergues, F. Guerrero, Y. Mesa, K. Caballero, R. Bressler, T. González and D. Segura “Assessment of Bioelectrical Parameters in Healthy Subjects by Cole – Cole Model”, Proceeding del World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Sydney2003, Julio 23 – 28, 2003, Sydney, Australia.

### **PREMIOS RECIBIDOS**

1. **PREMIO ANUAL NACIONAL DE LA SALUD PÚBLICA AÑO 2005** en la CATEGORÍA INVESTIGACIÓN BÁSICA al trabajo: “Electroterapia: una alternativa para el tratamiento del cáncer”
2. **PREMIO** del trabajo Influencia en la cinética de crecimiento de los tumores de Ehrlich y fibrosarcoma Sa-37 bajo la acción de diferentes cantidades de carga eléctrica, en el V Congreso de la Sociedad Oncológica Centroamericana y del Caribe (SOCECAR) y I Congreso SISCC. ONCO 2004, C. Habana, Cuba, (2004).
3. **PREMIO** del trabajo Evaluación histológica de los efectos de la corriente eléctrica directa en el tumor de Ehrlich en el V Congreso de la Sociedad Oncológica Centroamericana y del Caribe (SOCECAR) y I Congreso SISCC. ONCO 2004, C. Habana, Cuba, (2004).

### **TESIS DE DIPLOMA DIRIGIDAS**

1. Respuesta del tumor tratado en función de la razón entre el campo eléctrico aplicado y el campo eléctrico inducido en este. Simulación matemática. Autor: Ramón Raudel Peña García. Tesis de Diploma. Universidad de Oriente. (2009). Evaluación del comportamiento de los parámetros bioeléctricos medidos por bioimpedancia en individuos sanos y pacientes con cáncer. Autor: Yarelis Matos Delgado. Universidad de Oriente. (2009).
3. Mapas de potencial eléctrico y campo eléctrico generado por configuraciones de electrodos en tumores esféricos y elipsoidales. Autor: Yudelmis Soler Pérez. Universidad de Oriente. (2007).

## ANEXO 1

**Tabla A1: Estudios sobre la aplicación de la Electroterapia en carcinomas**

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electrodos</b>	<b>Dosis y tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
Wójcicki et al. (2000) [Polonia] Med Sci Monit	C3H N=20	Carcinoma mamario 16/C	9–10 mm diámetro	1 ánodo y 1 cátodo insertados en la base del tumor. [Pt]	5–21 mA (80 C) 1.5–2.5 hrs	26.86 días necrosis coagulativa
Bergues et al. (2001) [Cuba] Bioelectromagnetics	BALB/c N=27	Tumor de Ehrlich	850 mm <sup>3</sup>	1 ánodo en centro del tumor y 3 cátodos dentro pero cerca de la periferia. [Pt]	4 mA/21 min [27]	54.5 (24 hrs) 60.6 (48 hrs) 79.3 (72hrs) [% de necros]
Bergues et al. (2001) [Cuba] Rev Cubana Oncol	C57BL/6 N=10	Tumor de Ehrlich	100 mm <sup>3</sup>	1 ánodo en centro del tumor y 1 cátodo a 8-10 mm del borde del tumor, subcutánea. [Pt]	5 mA/30 min [10]	9.23 (TD)
Camué et al. (2001) [Cuba] Rev Cubana Oncol	BALB/c N=45	Tumor de Ehrlich	38 mm <sup>3</sup>	1. 2 ánodos en el tumor y 1 cátodo a 8-10 mm del borde del tumor, subcutaneo 2. 2 ánodos y 1 cátodo en el tumor [Pt]	1.8 mA/60 min (1) [15] 5 mA/30 min (1) [15] 5 mA/30 min (2) [15]	5.30 [TD] 5.27 [TD] 12.55 [TD]
Ciria et al. (2004) [Cuba] BMC Cancer	BALB/c N=30	Tumor de Ehrlich	500 mm <sup>3</sup>	2 ánodos y 2 cátodos colocados de forma alterna en la base del tumor, perpendicular a su eje mayor [Pt]	6.7 mA/45 min [10] 11.7 mA/45 min [10] 17mA/45 min [10]	CR (25 días)
Ren et al. (2001) [USA] Bioelectromagnetics	344 ratas Fisher N=130 (sobrevida) N=129 (patología)	MTF-7	20 mm diámetro 5.2 cm <sup>3</sup>	En dependencia del tamaño del tumor, en la base del tumor, perpendicular a su eje mayor [Pt]	40, 60, 80, 100 C (sobrevida) 10, 20, 40 y 80 C (patología)	8.2; 19.7; 46.3; 67.4; 70.4 días (respect) 39.7; 52.3; 62; 77 % respectiv.

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electrodos</b>	<b>Dosis/tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
Turler et al. (2000) [Alemania] Scand J Gastroenterol	ratas BD IX	Colon cancer cell DHD-K12/TRb (metástasis hígado)	4.8 mm	1 ánodo en el centro y 4 cátodos en la periferia, entre el tumor y el tejido sano.	80 C/cm <sup>3</sup> (10 mA) [17]	21% RC 78% RP
Turler et al. (2000) [Alemania] Bioelectromagnetics	ratas BD IX	Colon cancer cell DHD-K12/TRb (metástasis hígado)	3.6±1.4mm 25.2±9.7mm <sup>3</sup>	1. 1 ánodo en el centro y 2 ánodos y 2 cátodos en la periferia, entre el tumor y el tejido sano. 2. 1 cátodo en el centro y 2 ánodos y 2 cátodos en la periferia, entre el tumor y el tejido sano.	60 C/cm <sup>3</sup> (1) [10] 80 C/cm <sup>3</sup> (1) [11]  60 C/cm <sup>3</sup> (2) [10] 80 C/cm <sup>3</sup> (2) [7]  (10 mA)	30% RC 70% RP 55% RC 45% RP  20% RC 80% RP 43% RC 57% RP
Xie et al. (2006) [China] J Zhejiang Univ	Sprague- Dawley	Tumor primario de hígado		1 ánodo y 3 cátodos insertados en el lóbulo medio izquierdo del hígado	10 mA/5 min	29.32±1.627 necrosis coagulativa en ambos electrodos

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electrodos</b>	<b>Dosis/tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
David et al. (1985) [Canadá] Cancer Research	Hamster n=36	melanoma (T1-4)	0.26 mm <sup>3</sup>	1. 1 Electrodo activo dentro del tumor y 1 tierra fuera  2. positivo y negativo en el tumor [Pt/Ir (70/30)]	0.1 mA/1h (1) [5] 0.3 mA/1h (1) [5] 0.7 mA/1h (1) [5] 1 mA/1h (1) [6] 1.7 mA/1h (1) [4] 2.4 mA/1h (1) [6] 1 mA/1h (2) [5]	11% (red. tum) 43 % (red. tum) 44 % (red. tum) 66 % (red. tum) 83 % (red. tum) 98 % (red. tum) 67 % (red. tum)
Marino et al. (1994) [USA] J Surgical Res	C57BL/6 n=26* n=25** Control=26	Lewis (pulmón)		1 ánodo y 1 cátodo, perpendiculares al eje mayor del tumor [Pt]	2 mA/1h N=5 (1 aplicac.) N=21 (2 aplicac.)	20 % (red. tum) 43 % (red. tum)
Gu et al. (2004) [Korea] Journal of the IABC	C3H N=120	SCC-7	1 cm diámetro	1 an y 1 cat insertados a través del eje longitudinal del tumor [Pt]	10 mA/100 seg [40] 10 mA/500 seg [40] 10 mA/1000 seg [40]	222.0±17.8 240.3±8.5 (No. de células apoptóticas)

**Tabla A2: Estudios sobre la aplicación de la Electroterapia en sarcomas**

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electr.</b>	<b>Dosis y tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
Suarez et al. (2003) [Cuba] Rev Cubana Med	C57BL/6 NC=25	Fibrosarcoma Sa-37	40 mm <sup>3</sup>	2 ánodos y 2 cátodos insertados en el tumor. [Pt]	5 mA/30 min	80 (24 hrs) [3] 87 (48 hrs) [3] 90 (72 hrs) [3] 93 (96 hrs) [3] 96 (120 hrs) [3] [% de necros] TD = 13 días [10]
Jarm et al. (1997) [Eslovenia] Radiol Oncol	C57BL/6 N=16  Swiss nude N=22	Fibrosarcoma LPB	7 mm	Paralelos al tumor con cátodo en la parte caudal del tumor [Pt/Ir] (90/100)	0.6 mA/ 1 hr 1 mA/ 1 hr  0.6 mA/ 1 hr 1 mA/ 1 hr	6.3 TD (n=8) 11.7 TD (n=8)  3.4 TD (n=7) 4.5 TD (n=7)
Mikhailovskaya et al. (2009) [Rusia] Bulletin of Experimental Biology and Medicine	Ratas N= 154	Sarcoma M-1		Verticalmente dentro del tumor  horizontalmente bajo la base del tumor [Pt]	50 mA/15 min	6.3 TD (n=8) 11.7 TD (n=8)  3.4 TD (n=7) 4.5 TD (n=7)
Mikhailovskaya et al. (2009) [Rusia] Bulletin of Experimental Biology and Medicine	Ratas N= 154	Sarcoma M-1		Horizontalmente bajo la base del tumor [Pt]	20 mA/10 min	6.3 TD (n=8) 11.7 TD (n=8)  3.4 TD (n=7) 4.5 TD (n=7)
Miklavcic et al. (1997) [Eslovenia] Physiol. Meas.	A/J N= 7  C57Bl/6 N= 7	Fibrosarcoma Sa-1  Fibrosarcoma LPB	100 mm <sup>3</sup>	1 cátodo y 1 ánodo paralelos, colocados fuera del tumor, a 5-8mm del borde [Pt/Ir (90/10)]	0.6 mA/60 min	2.42 ± 1.54 (DT) 1.32 ± 0.60 (GD) [N=7]  7.25 ± 1.86 (DT) 3.66 ± 0.94 (GD) [N=7]

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electrodos</b>	<b>Dosis/tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
Xie and Sun (2006) [China] Int J Hyperthermia	ICR N=10	Sarcoma 180	1 – 2 cm de largo	1 ánodo y 1 cátodo en el tumor, longitudinal al borde.	30 – 35 mA/15 min (27 – 31.5 C)	Necrosis coagulativa y coligativa
Chou al. (1997) [USA] Bioelectromagnetics	C3H/HeJ N=157	Fibrosarcoma RIF-1	10 mm  20 mm	1 ánodo y 1 cátodo en la base del tumor, perpendicular al cuerpo  1 ánodo ó cátodo en el centro y 4 electr. de polaridad opuesta en el borde. [Pt]  1 cátodo insertado en la base y 1 ánodo a través del centro del tumor. Paralelos al eje del cuerpo  2 cátodos insertados en la base y 2 ánodos a través del centro del tumor. Paralelos al eje del cuerpo	5, 8, 10, 15 y 20 C 1 hr [79]  10 ó 15 C 1 hr [42]  10 ó 15 C 1 hr [6]  4.1–15 C 1 hr [6]	

<b>Autor</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tumor experimental</b>	<b>Volumen inicial</b>	<b>Colocación de electrodos</b>	<b>Dosis/tiempo</b>	<b>Respuestas obtenidas</b>
Chou al. (1997) [USA] Bioelectromagnetics	Fisher 344 N=34	Fibrosarcoma MCA-R	25 mm  20 mm	2 ó 3 cátodos en la base y 2 ó 3 ánodos a través del centro del tumor. Paralelos al eje del mayor del tumor.  6 ó 7 electrodos en la base, de forma alterna, perpendicular al eje del mayor del tumor.	4.1–15 C 1 hr [10]  5, 8, 10, 15 y 20 C 1 hr [79]  10 ó 15 C 1 hr [42]  10 ó 15 C 1 hr [6]	
Wójcicki et al. (2000) [Polonia] Med Sci Monit	BALB/c N=10	Fibrosarcoma F69 – 3	9–10 mm diámetro	1 ánodo y 1 cátodo insertados en la base del tumor. [Pt]	5–21 mA (80 C) 1.5–2.5 hrs	21.37 días

## Anexo 2

La figura A1 muestra la aplicación de la EGM a los datos experimentales de diferentes tipos de tumores (sarcoma Sa-1 (a), melanoma B16 (b) y Ehrlich (c)) que reportan Serša y cols. [162]. Esta figura revela que la EGM ajusta bien las cinéticas de crecimiento de los tumores controles (Sa-1 0 (Figura A1a), B16 0 (Figura A1b) y Ehrlich 0 (Figura A1c)) y de los tumores tratados sólo con CED (Sa-1 1 (Figura A1a), B16 1 (Figura A1b) y Ehrlich 1 (Figura A1c)); sin embargo, no así para los tumores tratados con bleomicina, como se muestra en las figuras A1a y A1b para los tumores sarcoma Sa-1 (Sa-1 2) y melanoma B16 (B16 2), respectivamente.

En las tablas A3, A5 y A7 se muestran los valores medios de los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $i_0$  para los tumores sarcoma Sa-1, melanoma B16 y Ehrlich, respectivamente. En las tablas A4, A6 y A8 se muestran los valores medios de los parámetros SSE, SE,  $r_a^2$ , PRESS y MPRESS para estos respectivos tumores.

**Tabla A3.** Promedio de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de la cinética de crecimiento del tumor sarcoma Sa-1

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
Sa1 0	0,584	0,218	-	-
Sa1 1	0,587	0,008	0,079	1,15
Sa1 2	0,362	0,060	0,066	1,45

Sa1 0: grupo control; Sa1 1: grupo tratado con  $i = 1,8$  mA por 60 min. Sa1 2: grupo tratado con  $i = 1,8$  mA por 60 min combinado con bleomicina. Cada grupo experimental está formado por 8 ratones [162].

**Tabla A4.** Promedio de los criterios estadísticos para la valoración de la ecuación de Gompertz modificada a partir del ajuste de los datos experimentales del tumor sarcoma Sa-1

Grupos	Parámetros estadísticos				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
Sa1 0	0,00027	0,012	0,9883	0,00009	0,00009
Sa1 1	0,0025	0,011	0,9789	0,0001	0,00004
Sa1 2	0,0043	0,015	0,3727	0,0002	0,0002

**Tabla A5.** Promedio de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de la cinética de crecimiento del tumor melanoma B16

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_o$ (mA)
B16 0	0,499	0,156	0	0
B16 1	0,879	0,039	0,056	1,223
B16 2	0,008	1,578	0,529	0,163

B16 0: grupo control; B16 1: grupo tratado con  $i = 1,8$  mA por 60 min. B16 2: grupo tratado con  $i = 1,8$  mA por 60 min combinado con bleomicina. Cada grupo experimental está formado por 8 ratones [162].

**Tabla A6.** Promedio de los criterios estadísticos para la valoración de la ecuación de Gompertz modificada a partir del ajuste de los datos experimentales del tumor melanoma B16

Grupos	Parámetros estadísticos				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
B16 0	0,00003	0,0038	0,999	0,000009	0,000009
B16 1	0,0056	0,0226	0,948	0,00036	0,00084
B16 2	0,0111	0,0347	- 0,334	0,00053	0,0025

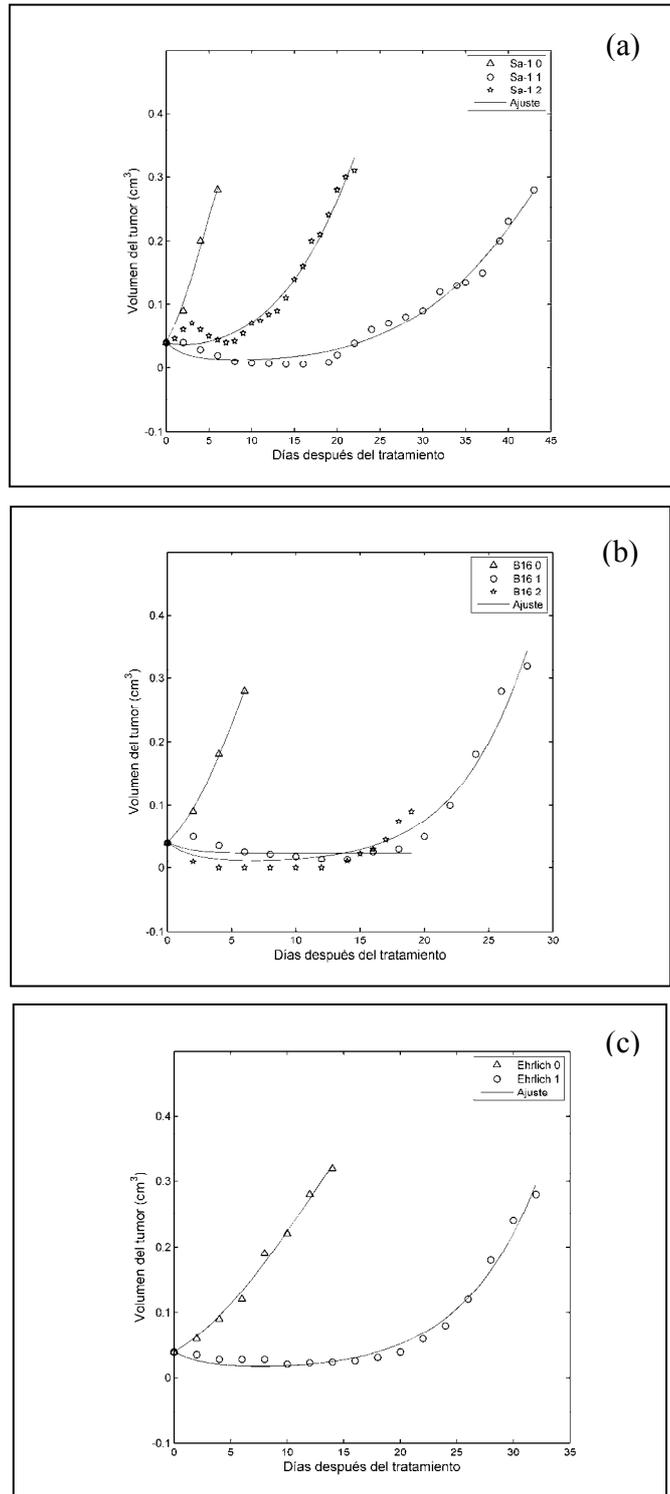
**Tabla A7.** Promedio de los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada que se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento del tumor Ehrlich

Grupos	Parámetros			
	$\alpha$ (días <sup>-1</sup> )	$\beta$ (días <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (días <sup>-1</sup> )	$i_0$ (mA)
Ehrlich 0	0,255	0,084	-	-
Ehrlich 1	0,5386	0,026	0,041	1,263

Ehrlich 0: grupo control; Ehrlich 1: grupo tratado con  $i = 1,8$  mA por 60 min. Cada grupo experimental está formado por 8 ratones [162].

**Tabla A8.** Promedio de los criterios estadísticos para la valoración de la ecuación de Gompertz modificada a partir del ajuste de los datos experimentales del tumor Ehrlich

Grupos	Parámetros estadísticos				
	SSE	SE	$r_a^2$	PRESS	MPRESS (m = 4)
Ehrlich 0	0,00047	0,0088	0,9927	0,000064	0,000025
Ehrlich 1	0,0017	0,011	0,9806	0,000089	0,00029



**Figura A1.** EGM en tres tipos de tumores: (a) sarcoma Sa-1, (b) melanoma B16 y (c) Ehrlich [162].