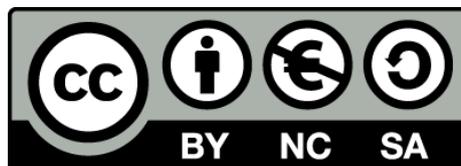




# Estudio de los procesos celulares inducidos por campos eléctricos en sistemas Lab-on-a-Chip

Ana María Oliva Brañas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.**

ESTUDIO DE LOS PROCESOS  
CELULARES INDUCIDOS  
POR CAMPOS ELÉCTRICOS  
EN DISPOSITIVOS DE  
LAB-ON-A-CHIP



ANA MARÍA OLIVA BRAÑAS

Prof. Josep Samitier i Martí  
Universitat de Barcelona  
Institut de Bioenginyeria de Catalunya

Dr. Antoni Homs Corbera  
Institut de Bioenginyeria de Catalunya

ESTUDIO DE LOS PROCESOS  
CELULARES INDUCIDOS  
POR CAMPOS ELÉCTRICOS  
EN DISPOSITIVOS DE  
LAB-ON-A-CHIP

ANA MARÍA OLIVA BRAÑAS

Prof. Josep Samitier i Martí  
Universitat de Barcelona  
Institut de Bioenginyeria de Catalunya

Dr. Antoni Homs Corbera  
Institut de Bioenginyeria de Catalunya



Programa de Doctorado en Biomedicina

## **Estudio de los procesos celulares inducidos por campos eléctricos en sistemas Lab-on-a-Chip**

Tesis presentada por Ana María Oliva Brañas  
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Directores de la Tesis:

**Prof. Josep Samitier i Martí**

Catedrático, Universitat de Barcelona  
Institut de Bioenginyeria de Catalunya

**Dr. Antoni Homs Corbera**

Institut de Bioenginyeria de Catalunya

**Tutor: Prof. Josep Samitier i Martí**

**REALIZADA EN**

**Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) - Laboratorio de  
Nanobioingeniería**

**Departamento de Electrónica - Universidad de Barcelona**





*En lugar de luchar contra la naturaleza, aprendamos de ella.  
El amor, el trabajo y el conocimiento, son las fuentes de nuestra vida,  
y por tanto, deberían de gobernarla.*

Wilhelm Reich.

*Cuando al final del camino me pregunten  
¿has amado? ¿has querido?  
yo enseñaré mi corazón lleno de nombres*

P. Casaldàliga



## Agradecimientos

Me gusta que la primera página que escribo después de este intenso tiempo de investigación y vida sean los agradecimientos.

Ciertamente, nada de todo esto hubiera sido posible sin la intervención de muchas personas y situaciones. Tantas, que no sé si es posible citar a algunas sin cometer la injusticia de no citar a otras. Por si acaso, valga el aviso previo de que nadie se ofenda si no ve su nombre escrito a continuación, es tan solo el efecto de muchas noches sin dormir que me afecta a la memoria...

La primera persona a la que quiero expresar mi agradecimiento en estas líneas es a mi director de tesis, el Profesor Josep Samitier, por tener la generosidad de ofrecerme esta oportunidad, maravillosa y deseada, de convertirme en Doctora en Biomedicina. Sin su ayuda, su inteligencia y su humanidad, nada de todo esto habría sido posible.

También quiero agradecer a Dr. Antoni Homs su supervisión durante todo este tiempo. No he conocido a otra persona que tenga tanta curiosidad por entender la realidad, una mente tan ágil, y que además esté siempre dispuesto a interrumpir su trabajo para atenderte, sin perder la sonrisa. Porque en 5 años trabajando codo con codo, nunca le he visto perder la sonrisa ni la ilusión por su trabajo. Gracias por las aportaciones técnicas y por el ejemplo como ser humano.

En los laboratorios en los que he estado trabajando ha habido mucha gente que me ha ayudado a que mi tesis dejara de ser una hipótesis. El profesor Antonio Juárez acogió a esta humilde ingeniera industrial en su laboratorio de microbiología, y con la colaboración de Dr. Eduard Torrents, no escatimaron tiempo en enseñarme los procedimientos biológicos que desconocía y necesitaba aplicar. M<sup>a</sup> Carmen Jaramillo ha sido mi gran apoyo en todo momento en este laboratorio, siempre dispuesta a solucionar cualquier inconveniente que pueda tener. También mis entonces compañeros de doctorado, como Mar Cendra, Aitor Sánchez, Nuria López, han sido muy importantes en esta etapa. Una pipeta, un problema con un gel, un “vigíleme el timer que voy al baño”, un café para desahogarse, todo eso forma parte también de este proceso de transformación personal que llamamos doctorado. En los laboratorios de nanobioingeniería es donde más tiempo he pasado. Gracias, Miriam Funes por tu paciencia en enseñarme los protocolos, David Izquierdo por ayudarme con las técnicas de fabricación, JuanMa Álvarez por toda la colaboración técnica (y por tu optimismo y sencillez vital), César Parra, Luis Rigat, Bea del Moral, Tommy Tong, Roberto Paoli...

¡¡hacemos un buen equipo!! Ha sido un placer compartir con vosotros este espacio y este tiempo.

Fuera de los laboratorios también hay vida, y María Martínez ha sido un gran elemento de apoyo para mí, con su gran sentido común y sus ganas siempre de ayudar. ¡Gracias, amiga!

No quiero que parezca que pongo a todo el resto de personas en el mismo saco, tal vez podría escribir un libro sobre cada amistad que me rodea. Precisamente ellos saben que lo importante no es cuánto, ni cómo ni dónde, sino simplemente estar, y simplemente ser. Javier Jordán, Anita Guamán, Andrés Arcentales, Virginia Paredes, Piedad González, Mario Llanos, Margarita Salazar, Sonia Vázquez, Miriam Sánchez... vuestros nombres están guardados en mi corazón.

Y por supuesto quiero agradecer a mi familia. A la de origen, mi madre que siempre me hace sentir orgullosa de mí misma, a mi padre que en su ausencia nos acompaña, a mis hermanas Lali, Marian, Pilar y a sus hijas, por ser la fuente de amor de la que bebo cada día. A la que elegí, Carlos, por ser el amor de mi vida. Y a los que me eligieron, Matías y Rubén, por ser mis mejores maestros. Gracias por estar en mi vida. Sois una bendición para mí.

La vida está llena de ocasiones para agradecer, ésta tan solo ha sido una excusa más...

# CONTENIDO

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. OBJETIVOS DE LA TESIS .....	12
A. Objetivo general.....	12
B. Objetivos específicos .....	12
3. ESTRUCTURA DE LA TESIS .....	13
Capítulo 2 BASES DE CONOCIMIENTO.....	17
1. LAS BACTERIAS COMO MODELO.....	18
A. Clasificación de los organismos: eubacterias, arqueas y eucariotas	20
B. Por qué las bacterias se utilizan como modelos para experimentación	23
C. <i>Escherichia coli</i> .....	27
2. INTERACCIÓN ENTRE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS Y LAS CÉLULAS .....	32
A. Efectos térmicos vs efectos no térmicos .....	34
B. Efecto sobre la membrana: el valor umbral del potencial transmembrana .....	35
C. Efectos sobre los canales iónicos .....	37
D. Electroporación .....	40
E. Efectos más allá de la membrana .....	43
F. Campos endógenos – la radiación que emiten las propias células..	44
G. La comunicación em de las células .....	48
3. CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE LAS CÉLULAS - MODELOS SIMULADOS.....	49
A. Introducción .....	49
B. Modelo de célula como elipsoide .....	52
4. USOS BIOTECNOLÓGICOS DE LOS CAMPOS ELÉCTRICOS.....	55
A. Electroforesis .....	55
B. Dielectroforesis .....	56

Capítulo 3 DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL <i>SET-UP</i> PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL CAMPO ELÉCTRICO .....	63
1. INTRODUCCIÓN .....	64
A. Polímeros.....	67
B. Fotolitografía .....	69
2. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL DISEÑO DE LOS CHIPS .....	73
A. Diseño de la geometría del chip.....	73
B. Fabricación de chips de oro .....	75
C. Fabricación de chips de ito .....	78
D. Caracterización y validación de los chips.....	79
3. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS .....	82
A. Modelización de la distribución del campo eléctrico aplicado en un medio conductor en presencia de células bacterianas.....	82
4. CONTROL DEL SISTEMA .....	102
A. Control de la fluidica .....	102
B. Control de las magnitudes eléctricas .....	103
C. Control de la temperatura .....	104
D. Control de la conductividad.....	105
E. Control de la variabilidad interna de los experimentos.....	105
Capítulo 4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS MAGNITUDES ELÉCTRICAS SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	107
1. INTRODUCCIÓN .....	108
A. Efectos sobre la membrana y pared celular.....	109
B. Efectos en el citoesqueleto - fases de crecimiento .....	112
C. Daños subletales .....	113
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	115
A. Preparación de las bacterias.....	115
B. Tratamiento eléctrico .....	116
C. Evaluación de los resultados .....	117
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	120
A. Efecto de la intensidad de campo ELÉCTRICO.....	120
B. Efecto de la frecuencia.....	129
C. Efecto de la corriente eléctrica.....	134
4. CONCLUSIONES.....	137

Capítulo 5 ESTUDIO DE LAS MAGNITUDES NO ELÉCTRICAS y LA SINERGÍA CON LOS EFECTOS ELÉCTRICOS EN <i>E. COLI</i> .....	139
1. INTRODUCCIÓN .....	140
A. Efecto de la temperatura.....	140
B. Efecto de la concentración.....	141
C. Efecto del tiempo de exposición .....	142
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	142
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	143
A. Efecto de la temperatura.....	143
B. Efecto del tiempo .....	146
C. Efecto de la concentración inicial.....	148
4. CONCLUSIONES.....	149
 Capítulo 6 APLICACIÓN AL ESTUDIO DE EFECTOS SUBLETALES EN DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS ESPECÍFICOS .....	 151
1. INTRODUCCIÓN .....	152
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	154
A. Diseño y fabricación del chip .....	154
B. cultivo bacteriano .....	155
C. dispositivo experimental.....	155
D. protocolo de análisis .....	156
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	157
A. Análisis del proteograma.....	157
B. Otras observaciones .....	164
4. CONCLUSIONES.....	167
 Capítulo 7 PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE APLICACIÓN DE CAMPO ELÉCTRICO EN LA LINEA CELULAR C2C12 PARA POSIBLES ESTUDIOS SOBRE EFECTOS EN LA DIFERENCIACIÓN .....	 169
1. INTRODUCCIÓN .....	170
A. C2C12.....	170
B. diferenciación celular mediada por campos eléctricos.....	173
C. Objetivo.....	176

2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	177
A.	Diseño del dispositivo .....	177
B.	Pruebas a realizar .....	177
C.	Diseño del experimento .....	179
3.	PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA.....	181
A.	Comprobación de la viabilidad de las células en el chip .....	181
B.	Establecimiento de un patrón de referencia.....	182
C.	Prueba de concepto de aplicación de campo .....	187
4.	CONCLUSIONES.....	190
Capítulo 8 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO.....		193
1.	CONCLUSIONES.....	194
2.	LÍNEAS DE TRABAJO FUTURO .....	198
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS RELACIONADAS CON LA TESIS .....		201
ANEXO 1 ELECTROPORACIÓN .....		203
1.	INTRODUCCIÓN .....	203
2.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	204
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	206
4.	CONCLUSIONES.....	207
ANEXO 2 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA C2C12...		209
1.	PROTOCOLO DE MANIPULACIÓN .....	209
2.	PROTOCOLOS DE ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	212
REFERENCIAS.....		219

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



# 1. INTRODUCCIÓN

¿Qué es la vida? Esta pregunta viene acompañando a la raza humana desde muy antiguo. Desde las ciencias biológicas podemos describir los procesos vitales de génesis, crecimiento, metabolismo, muerte, evolución. Pero que se pueda describir no significa siempre que se conozca el “por qué”, ni siquiera el “qué”. En los últimos años la esperanza de vida de los seres humanos en los países llamados desarrollados ha ido aumentando de forma constante. En gran parte, ello ha sido debido al desarrollo de la higiene y de la medicina y la biología, que ha permitido erradicar enfermedades que hasta el momento eran letales. No obstante, también han ido en aumento el número de enfermedades “nuevas” de etiología desconocida, que siguen siendo mortales. Nuevas plagas como las enfermedades cardiovasculares y pulmonares, cáncer, diabetes, incluso los accidentes de tránsito, sustituyen a las antiguas plagas de infecciones que diezaban la población hace unas décadas, y las que todavía azotan los países en vías de desarrollo [1].

En el intento de explicar las causas de estas enfermedades, nuevas y antiguas, y de encontrar soluciones a ellas, las ciencias se unen para desarrollar nuevas estrategias. Especialidades tan distintas como ingenieros y médicos, biólogos y matemáticos, informáticos y farmacéuticos, se unen cada vez más en equipos interdisciplinarios aunando esfuerzos para encontrar nuevas respuestas a estos desafíos. Entre estas iniciativas está la Ingeniería Biomédica, que trabaja en la frontera entre las ciencias biomédicas y las tecnologías ingenieriles aplicando tecnologías y métodos de la ingeniería al campo de la medicina. La riqueza de los equipos interdisciplinarios radica no solo en los diferentes conocimientos que poseen, sino también en la diferencia de organización mental de las personas que los integran. Diferentes formaciones nos otorgan diferentes modos de pensar, nos permiten utilizar herramientas propias de un ámbito en otro y ahí asoman nuevas posibilidades de enfoque de los problemas a resolver. Cuando se empezaron a aplicar técnicas propias de análisis de

señales (como las transformadas de Fourier) a señales biomédicas como el ECG <sup>1</sup>, asomaron nuevos conceptos como el de “coherencia” que han enriquecido mucho el conocimiento teórico y la práctica clínica de los cardiólogos.

Entre las investigaciones científicas hay una que se considera una constante a lo largo del tiempo. No genera patentes ni tiene fines prácticos inmediatos, pero sí permite conocer un poco más sobre algún proceso de ese misterio que llamamos vida. Es la ciencia básica, la investigación fundamental que pretende aportar un granito de arena al conocimiento de la realidad en sí misma. La posibilidad de colaborar en un proyecto de este tipo es algo realmente fascinante para cualquier mente curiosa, como la mía.

Esta tesis es el resultado de la investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Nanobioingeniería del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) en el Parque Científico de Barcelona, en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Microbiana e Interacción Huésped-Patógeno. El objetivo de esta colaboración es llegar a un entendimiento más profundo de cómo los campos eléctricos afectan a las células en general y las bacterias en particular, dentro de los dispositivos denominados Lab-On-a-Chip. Este tipo de dispositivos permite la manipulación y análisis automatizado de muestras con volúmenes muy reducidos, en un breve tiempo, bajo coste, portable y sencillo de usar. Todas estas ventajas han hecho que en los últimos treinta años haya habido un gran desarrollo de estos dispositivos, muchos de los cuales utilizan energía eléctrica para realizar parte de sus funciones.

---

<sup>1</sup> ECG – siglas de *Electrocardiograma*

## 2. OBJETIVOS DE LA TESIS

---

### A. OBJETIVO GENERAL

---

El objetivo principal de esta investigación es estudiar la relación entre los campos eléctricos y las células, cómo estos campos afectan a las células a diferentes niveles (forma, viabilidad, metabolismo, expresión proteica y genética), mediante dispositivos de tipo Lab-On-a-Chip. El objetivo es aportar información útil y contrastada que permita conocer un poco más los efectos que se pueden llegar a inducir a través de los campos eléctricos y la aportación de cada uno de los parámetros eléctricos a estos cambios. Por otro lado, este estudio permitirá realizar diseños más apropiados de los dispositivos analíticos miniaturizados basados en la manipulación por campo eléctrico de células.

---

### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

Al tratarse de un estudio interdisciplinar, es necesario trabajar sobre varios puntos simultáneamente: tanto en los aspectos técnicos de electrónica, microfluídica y fabricación de chips, como en la parte biológica de manipulación de bacterias y células, tipos de estudios y análisis de los resultados obtenidos.

Para ello, establecimos de entrada 2 bloques de objetivos:

- Objetivos relacionados con el diseño experimental y la puesta en marcha del mismo.
- Objetivos relacionados con la valoración de los resultados biológicos.

Entre los objetivos relacionados con el **diseño y la implementación experimental** están los siguientes:

1. Diseñar, fabricar y probar un chip que permita la aplicación de campos eléctricos controlados a células así como la evaluación posterior, y en algunos casos también *in situ*, de parámetros objetivos.
2. Diseñar unos protocolos y condiciones de experimentación que nos permitan evaluar, de forma independiente y controlada, los diferentes

parámetros físicos y su efecto: intensidad de campo eléctrico, corriente, tiempo, frecuencia, conductividad, temperatura y concentración, así como las sinergias entre ellos.

3. Establecer qué parámetros de diseño y físicos deberían aplicarse en un dispositivo microfluídico actuado por campos eléctricos para obtener un resultado analítico deseado sobre las células (mortalidad, reparación, diferenciación, mutación, electroporación...)

Respecto a la **valoración de los resultados**, se trata de estudiar cambios concretos a nivel biológico relacionados con las condiciones experimentales previamente fijadas. Los principales son los siguientes:

1. Analizar cómo las diferentes magnitudes afectan a la viabilidad celular
2. Determinar el valor umbral en el que determinada magnitud (o combinación de ellas) se vuelve letal
3. Analizar los posibles cambios en la dinámica de crecimiento debidos a la aplicación de campos eléctricos
4. Estudiar las posibles alteraciones morfológicas
5. Cambios en la expresión proteica y/o genética
6. Valorar la posibilidad de realizar electroporación en condiciones de campos eléctricos mucho más débiles de los actualmente utilizados
7. Estudiar la relación coste-beneficio entre las condiciones y magnitudes físicas necesarias para el funcionamiento de microdispositivos de manipulación celular basados en campo eléctrico y sus efectos biológicos colaterales para su optimización. Ejemplo de aplicación real.

### 3. ESTRUCTURA DE LA TESIS

De acuerdo con los objetivos establecidos, la tesis se desarrolla a lo largo de 8 capítulos, tal y como se describe a continuación.

En el capítulo 2 se describen los conceptos básicos necesarios para contextualizar y entender mejor este trabajo intrínsecamente multidisciplinar y se resume el estado del arte actual referente al estudio de la interacción entre campos eléctricos y células. Este capítulo nos dará las bases teóricas y

aclarará algunas decisiones tomadas. Se discuten tanto la elección de las bacterias como modelo, las interacciones conocidas de los campos eléctricos en las células, y el estado del arte de la caracterización eléctrica y los usos biotecnológicos de la interacción entre campos eléctricos y células. Es decir, toda aquella información que considero necesaria conocer para el buen entender de lo que se describe en los siguientes capítulos.

El primer paso para el estudio es el diseño y fabricación de los chips adecuados para la experimentación. Este es el contenido fundamental del capítulo 3, en el que se describe el diseño escogido, la técnica utilizada para su fabricación, el control del sistema y la puesta en marcha de todo el dispositivo experimental. También se incluyen en este capítulo los cálculos teóricos realizados por modelado y simulación que me permitieron caracterizar el comportamiento del sistema, elegir el rango de las magnitudes a estudiar e interpretar y discutir de forma más completa los resultados al final de la tesis.

Los capítulos 4, 5 y 6 corresponden a los análisis realizados con la cepa bacteriana *Escherichia coli* Wild Type MG1655. El capítulo 4 estudia en profundidad el efecto que las magnitudes eléctricas tienen sobre las bacterias, valorando los umbrales de letalidad y los efectos subletales, es decir, todos aquellos efectos que, sin alterar grandemente la viabilidad celular, sí que están modificando el metabolismo, la dinámica de crecimiento o la morfología de las células.

El capítulo 5 analiza el efecto de las magnitudes no eléctricas que también intervienen en los estudios y que son intrínsecas a la experimentación: la temperatura, el tiempo y la concentración de la muestra son parámetros que no podemos dejar de valorar a la hora de estudiar los efectos de la aplicación de campos eléctricos, ya que intervienen inevitablemente en el protocolo de experimentación.

Una vez caracterizadas todas las magnitudes en cuanto al efecto que producen en las células, en el capítulo 6 se muestra una aplicación práctica en un dispositivo concentrador basado en dielectroforesis. En este capítulo se analizan los efectos subletales producidos por la aplicación de diferentes condiciones de campo a las bacterias.

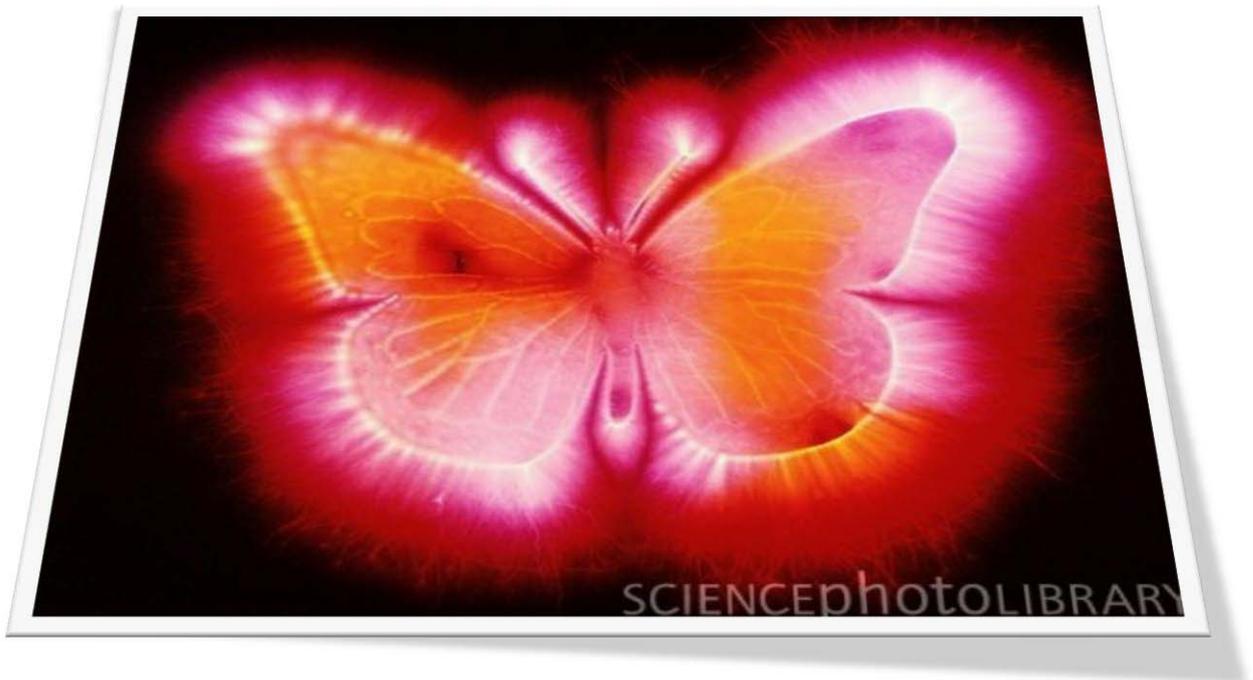
El capítulo 7 describe la puesta a punto de un sistema de aplicación de campo eléctrico en la línea celular C2C12 para estudios de posibles efectos en la diferenciación celular. Se trata de adaptar el sistema para poder cultivar exitosamente células eucariotas de modo que puedan ser observadas en todo momento, contadas, analizadas en su forma y a las que se les pueda aplicar el estímulo eléctrico deseado para conseguir el efecto de la diferenciación celular inducida sin aporte de sustancia química.

Finalmente, en el capítulo 8 se recogen las conclusiones globales, el grado de consecución de los objetivos planteados, y las posibles líneas de trabajo futuro.



# Capítulo 2

## BASES DE CONOCIMIENTO



# 1. LAS BACTERIAS COMO MODELO

Las bacterias son organismos considerablemente simples y relativamente fáciles de manipular en laboratorio. Por eso se han desarrollado muchos métodos en biología molecular alrededor de las bacterias, y estos organismos a menudo sirven como un modelo para entender funciones celulares y procesos de desarrollo de organismos más complejos. Mucho de lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares básicos en las células, como la translación o la replicación, se ha originado con estudios de bacterias [2]. Esto es así porque las funciones centrales celulares han permanecido sin cambios a través de la evolución. Los ribosomas tienen una estructura similar en todos los organismos, y muchos de los factores de translación se han conservado ampliamente [3].

El aparato de replicación de ADN de todos los organismos contiene características comunes, que se describieron por primera vez en bacterias y fagos. Las chaperonas<sup>2</sup> que ayudan a otras proteínas a plegarse y las topoisomerasas<sup>3</sup> que cambian la topología del ADN se descubrieron primero en bacterias y en sus virus, llamados fagos [4]. Los estudios de la reparación del daño del ADN y la mutagénesis en bacterias también han llevado al camino del entendimiento de estas rutas en células eucariotas. También los sistemas de reparación, polimerasas mutagénicas son similares en todos los organismos y han sido recientemente implicados en algunos tipos de cáncer humanos [5].

Evidencias recientes indican que la biología celular de las bacterias puede ser mucho más compleja y más parecida a las eucariotas de lo que previamente se pensó [2]. Durante un largo tiempo se ha podido observar el citoesqueleto de las eucariotas y su propósito aparentemente motor. Sin embargo las bacterias, siendo mucho más pequeñas, se suponía que eran “sacos de enzimas” que solo se podían mover en difusión pasiva. Las bacterias incluso tienen muchas de las estructuras proteicas relacionadas con las proteínas del citoesqueleto,

---

<sup>2</sup> Las chaperonas son proteínas presentes en todas las células cuya función es la ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas.

<sup>3</sup> Las topoisomerasas son enzimas capaces de actuar sobre la topografía del ADN, enredándolo o desenredándolo.

que antes se pensaba que estaba limitado a eucariotas. Ahora las bacterias ya no son solo sacos de enzimas con una pequeña estructura interna. Ahora se ven como estructuras celulares con una dinámica compleja que tiene mucho que ver con organismos superiores [6]. De nuevo, el estudio de las aparentemente simples bacterias puede aportar principios básicos de biología celular que son comunes a todos los organismos y que ahora podemos vislumbrar.

Sin embargo, las bacterias no son solo importantes como herramientas de laboratorio para entender organismos superiores. Son importantes e interesantes por derecho propio. Juegan un papel esencial en la ecología de la Tierra. Son los únicos organismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, es decir, convertir  $N_2$  en amoníaco, que forma parte de aminoácidos y ácidos nucleicos. Sin las bacterias, el ciclo natural del nitrógeno se vería roto [2]. También son esenciales en el ciclo del carbón debido a su capacidad de degradar los polímeros recalcitrantes naturales como la celulosa o la lignina [7].

Las bacterias y algunos tipos de hongos previenen la tierra de quedar sepultada de restos vegetales y otros materiales que contienen carbono. Los compuestos tóxicos incluyendo petróleo, muchos de los hidrocarburos clorados y otros productos de la industria química también son degradados por bacterias. Por este motivo, estos organismos son esenciales para la purificación del agua y la limpieza de las aguas residuales [8]. Además, las bacterias producen la mayoría de los llamados gases de efecto invernadero, como el metano y el dióxido de carbono, que a su vez son usados por otros tipos de bacterias [9]. Este ciclo ayuda a mantener el equilibrio climático [2]. Las bacterias incluso han tenido un profundo efecto en la geología de la Tierra, siendo responsables de la mayoría de los depósitos de hierro y de otros minerales en la corteza terrestre [4].

Otra característica inusual de las bacterias y arqueas es su habilidad para vivir en entornos extremadamente inhóspitos, muchos de los cuales no tienen ninguna otra fuente de vida [2]. Estos organismos son los únicos que viven en el mar muerto. O en fuentes de agua caliente cerca de la temperatura de ebullición, en atmósferas sin oxígeno...

Las bacterias que viven en entornos inhóspitos a veces permiten que otros organismos puedan sobrevivir también a través de relaciones simbióticas (gusanos tubulares en las fuentes hidrotermales del lecho marino, cianobacterias en la tundra del ártico, bacterias quimioluminescentes que generan luz para animales marinos), etc [4].

También vale la pena estudiarlas por su papel en las enfermedades. El conocimiento obtenido con las bacterias y su genética molecular, ayuda en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas para antiguas enfermedades y para nuevas [3].

Algunas bacterias nos benefician directamente. Solo el 10% de nuestras células son humanas [10]. También se usan para hacer compuestos químicos útiles como antibióticos, benceno o ácido cítrico [4]. Las bacterias son los organismos más diversos fisiológicamente en la tierra, y la importancia de las bacterias en la vida en la tierra y el potencial uso de ellas es enorme. Se ha estimado que sólo se ha podido aislar menos del 1% de los tipos de bacteria que viven en la tierra [10]. Claramente, los estudios sobre bacterias continuarán siendo esenciales para nuestros esfuerzos futuros de entender, controlar y beneficiarnos del mundo biológico que nos rodea.

---

## A. CLASIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS: EUBACTERIAS, ARQUEAS Y EUCARIOTAS

---

De acuerdo con el actual punto de vista [11], todos los organismos en la tierra pertenecen a alguna de las tres divisiones mayores: eubacterias, arqueas o eucariotas.

---

### EUBACTERIAS

---

Las bacterias tienen una genética totalmente diferente unas de otras. Muchas de las bacterias como la *Escherichia coli* son eubacterias (o simplemente bacterias) [12]. Estos organismos pueden diferenciarse grandemente en su apariencia física. Aunque muchos son unicelulares, con forma de bastón o

esféricas, algunos son multicelulares y tienen ciclos de desarrollo muy complejos [2]. Las cianobacterias, (también llamadas algas azul-verde) son eubacterias pero tienen clorofila y pueden ser filamentosas, por eso originariamente se las confundió con algas [4]. Los actinobacterias productores de antibióticos parecen hongos por sus esporas y porque forman filamentos. Quizás las más extrañas son las Myxococcus, que pueden sobrevivir como unicelulares o formando cuerpos agregados. Por eso las eubacterias no se pueden distinguir por su apariencia física sino solo por criterios bioquímicos como la secuencia de ARN ribosómico y la ausencia de orgánulos[10].

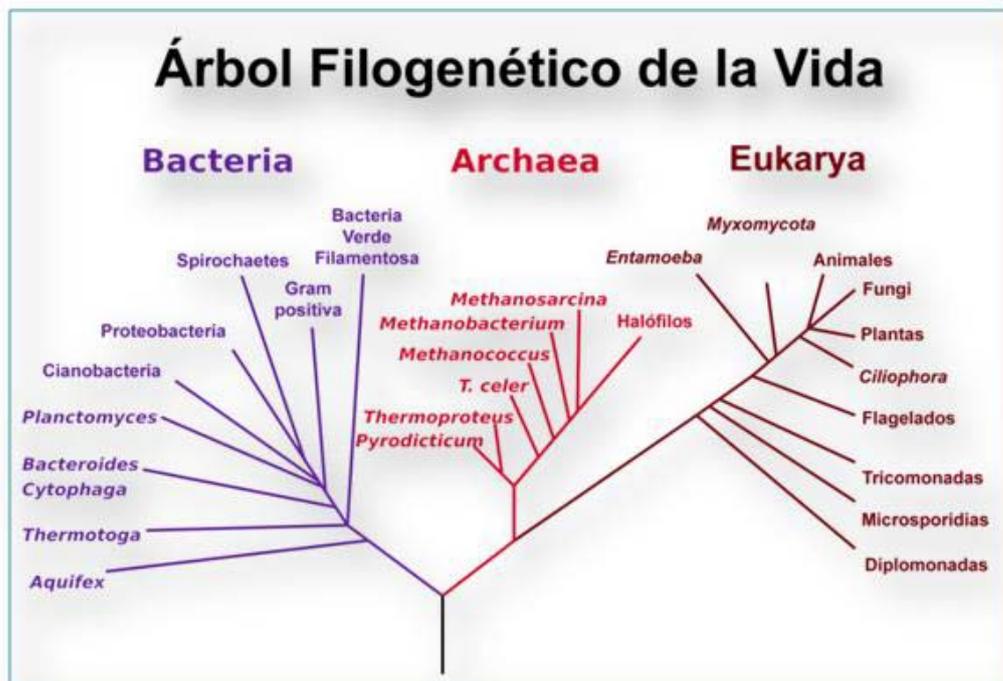


Figura 2.1: Situación de las arqueas en el árbol filogenético de Carl Woese basado en datos de secuencias genéticas de [ARNr](#) [12].

Según el árbol filogenético de Carl Woese [13], las eubacterias se pueden dividir en dos subgrupos principales, las *gram* negativa y las *gram* positiva. Esta división se basa en la respuesta a los test de tinción *Gram*. Las *gram* negativa retienen una pequeña parte de la tinción y son rosas después de ello, mientras que las *gram* positiva retienen más y se vuelven azules. La diferencia

reside en que las *gram* negativas están rodeadas de una estructura fina compuesta de una membrana interna y externa mientras que la estructura alrededor de las *gram* positiva es mucho más gruesa, con una membrana y un muro ancho. Sin embargo la diferencia entre ambos grupos parece ir más allá de la posesión de una membrana exterior. En general, los tipos individuales de *gram* negativa están más relacionados con otras *gram* negativa que con las *gram* positiva, sugiriendo que la separación entre estos dos tipos es más antigua que la aparición de nuevas especies.

---

## ARQUEAS

---

Son organismos unicelulares que se parecen a las bacterias pero que son muy diferentes bioquímicamente. Son básicamente organismos “extremófilos”, es decir, que viven bajo condiciones que otros tipos de organismos no pueden sobrevivir, como en manantiales sulfurosos a muy alta temperatura, en el lecho oceánico, o en el Mar Muerto. Algunas de las arqueas también realizan funciones bioquímicas relativamente inusuales como fabricar metano[14].

La clasificación de las arqueas diferente de las eubacterias o bacterias verdaderas es relativamente reciente y se basa mayormente en la secuencia de los RNA ribosómicos y las estructuras de los lípidos y polimerasas [10]. Algunas evidencias señalan que las arqueas están más relacionadas con las eucariotas que con las eubacterias. Las arqueas en sí mismas forman un grupo muy diverso de organismos. Sobre ellas se conoce mucho menos que sobre las eubacterias.

---

## EUCARIOTAS

---

Son los miembros del tercer reino de organismos en la Tierra. Incluyen organismos aparentemente tan diferentes como plantas, animales y hongos. El nombre “eucariota” deriva de su membrana nuclear. Normalmente tienen un núcleo. Pueden ser unicelulares como las levaduras y protozoos y algunos tipos de alga, o pueden ser multicelulares como plantas y animales. A pesar de su apariencia y forma de vida tan diferente, y de su relativa complejidad, las

eucariotas son similares a nivel biomolecular, particularmente en las rutas de síntesis macromolecular [10].

La presencia o ausencia de membrana nuclear afecta mucho los mecanismos disponibles para fabricar proteínas en la célula. La síntesis del RNA mensajero (mRNA) y su traslación puede ocurrir simultáneamente en las células que no tienen núcleo, puesto que no hay membrana que separe los ribosomas (que sintetizan proteínas) del ADN. Pero en la mayoría de las eucariotas, el ADN está físicamente separado de los ribosomas. Por ello, el mRNA que se fabrica en el núcleo se debe transportar a través de la membrana nuclear antes de que pueda ser traducida a proteínas en el citoplasma, y la transcripción y la traducción no pueden ocurrir simultáneamente [11].

Además, las bacterias (y las arqueas) tampoco tienen otros constituyentes celulares típicos de las eucariotas, incluyendo las mitocondrias y los cloroplastos, cosa que no es de sorprender puesto que ellas son el origen de las mitocondrias y los cloroplastos [10]. Tampoco tiene orgánulos visibles como el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático. Ello les confiere un aspecto mucho más simple bajo el microscopio.

---

## B. POR QUÉ LAS BACTERIAS SE UTILIZAN COMO MODELOS PARA EXPERIMENTACIÓN

---

En la genética bacteriana, las técnicas genéticas se utilizan para estudiar las bacterias [6]. Aplicar las técnicas genéticas a las bacterias no es diferente, en principio, de aplicarlas a cualquier otro organismo. Sin embargo, los métodos disponibles sí que son muy diferentes. Algunos tipos de bacterias son relativamente fáciles de manipular genéticamente. Por ello, se conoce más sobre las bacterias que sobre ningún otro tipo de organismo [7]. Algunas de las propiedades de las bacterias que facilitan los experimentos son las siguientes [10]:

---

## LAS BACTERIAS SON HAPLOIDES

---

Eso significa que solo tienen una copia o alelo de cada gen. Esto hace mucho más fácil identificar las células con un tipo particular de mutación. En organismos diploides, muchas mutaciones no tienen efecto a no ser que ambas copias del gen en dos cromosomas homólogos tengan la mutación. En organismos haploides como las bacterias, la mayoría de las mutaciones tienen un efecto inmediato

---

## TIENEN TIEMPOS DE GENERACIÓN CORTOS.

---

El tiempo de generación es la duración del tiempo que el organismo tarda en alcanzar la madurez y dividirse. Si el tiempo de generación es muy largo, eso limita el número de experimentos posibles. Algunas cepas de *E. coli* (como la utilizada) se reproducen cada 20 minutos en condiciones idóneas. A esta velocidad de multiplicación, los cultivos de bacterias permiten realizar experimentos en un solo día.

---

## SE REPRODUCEN ASEXUALMENTE

---

El hecho de que se multipliquen por división celular es otra ventaja. La reproducción sexual complica los experimentos genéticos porque la progenie nunca es idéntica a los progenitores. Pero si los organismos se multiplican asexualmente por división celular, toda la progenie es genéticamente idéntica a los padres y entre ellos mismos. Los organismos genéticamente idénticos se llaman clones. Las bacterias generan clones de sí mismos cada vez que se dividen.

---

## LAS COLONIAS CRECEN EN PLACAS DE AGAR

---

Los experimentos a menudo requieren que muchos individuos se analicen para una propiedad particular. Por eso, es importante tener muchos individuos en un reducido espacio. En algunas bacterias es posible tener miles, millones e incluso billones de individuos en una sola placa de Petri. Una vez en la placa, las bacterias se dividen una y otra vez, y toda la progenie se hace visible una

vez la colonia se ha formado. Cada colonia está formada por millones de bacterias, todas clones de la bacteria original.

---

## LAS COLONIAS SE PUEDEN PURIFICAR

---

Si en una mezcla de bacterias hay diferentes cepas o mutantes y se siembran en una placa agar, cada una de ellas se multiplicará y formará su colonia. Las colonias pueden estar demasiado cerca para poderlas separar, o pueden tener una mezcla de diferentes tipos. Si las colonias se cogen y se diluyen antes de volverlas a plaquear, se puede recuperar siempre la cepa original, ya sea en un único paso o en varios.

---

## SE PUEDEN CONTAR FÁCILMENTE GRACIAS A LAS DILUCIONES SERIADAS

---

Para contar el número de bacterias en un cultivo o para aislar un cultivo puro, a menudo es necesario obtener colonias discretas. Sin embargo, como las bacterias son pequeñas, cada cultivo tiene miles de millones de bacterias por mililitro. Si eso se plaquea directamente, las bacterias crecerán todas juntas y no se podrán obtener colonias discretas. Las diluciones seriadas ofrecen un sistema práctico para obtener un número contable de colonias discretas. El principio es que si se van haciendo diluciones repetidamente, se puede conseguir diluir lo suficiente para poderlas contar. Las diluciones es mejor hacerlas por pasos, de modo que entre una dilución y la siguiente no haya más de una proporción 1:100. Es mejor hacer 2 diluciones 1:100 que hacer una única dilución 1:10000

---

## PERMITE AISLAR CEPAS ESCASAS

---

Tal vez la mayor ventaja de utilizar bacterias en los experimentos es la posibilidad de hacer selecciones, en las que cepas mutantes muy raras o escasas se pueden aislar. Para seleccionar una entre un cultivo mezclado de bacterias, se siembran todas en una placa en la que haya unas condiciones en las que solo la mutante deseada pueda crecer. Por ejemplo, en un experimento de electroporación en el que la célula incorpora un material genético que la

hace resistente a un antibiótico concreto, si sembramos todas las células en placas con este antibiótico, sólo podrán crecer aquellas que hayan sido correctamente electroporadas y hayan incorporado con éxito este material. Otro ejemplo sería cultivarlos a una temperatura que no es apta para la multiplicación de una cepa pero sí de otra. Después de haber seleccionado la cepa que ha crecido correctamente, ésta se puede purificar de nuevo por si quedaran restos de otras bacterias contaminantes. Las posibilidades de selección son asombrosas. Si se usan los medios adecuados, una bacteria se puede aislar de entre miles de millones de otras que estén sembradas en la misma placa de Petri.

---

### SE PUEDEN ALMACENAR SIN DETERIORO

---

Muchos tipos de organismos se deben propagar continuamente, de otra manera envejecen y mueren. La propagación de los organismos requiere transformaciones continuas y alimentación continuada, lo que significa costos en tiempo y recursos. Pero muchos tipos de bacterias se pueden almacenar en un estado de reposo de forma que no estén propagándose continuamente. Las condiciones dependen del tipo de bacteria. Algunas generan esporas y se pueden almacenar como esporas inactivas. Otras se pueden almacenar congelándolas en glicerol o secándolas. Almacenar los organismos en estado inactivo es algo especialmente útil en experimentos genéticos, que a menudo requieren la acumulación de grandes números de mutantes o de cepas. Se mantienen intactas hasta que se necesitan, y entonces se reviven.

---

### PERMITEN INTERCAMBIO GENÉTICO

---

Muchos tipos de organismos en la tierra intercambian material genético de algún tipo, lo que presumiblemente acelera la evolución e incrementa la adaptabilidad de las especies. El intercambio de ADN de una bacteria a otra puede ocurrir en una de las 3 formas siguientes:

- Transformación: el ADN liberado por una célula entra en otra de la misma especie

- Conjugación: los plásmidos, que son pequeñas moléculas de ADN auto replicantes en bacterias, transfieren ADN de una célula a otra.
- Transducción: un virus bacteriano accidentalmente toma ADN de una célula que se ha infectado e inyecta este ADN en otra célula.

---

## SU RELACIÓN CON LOS FAGOS

---

Uno de los descubrimientos más importantes en genética procede de los estudios con virus que infectan bacterias [15]. Estos virus se llaman bacteriófagos, o simplemente fagos. Los fagos no están vivos, son solo genes envueltos en una capa protectora de proteínas y/o membrana, como todos los virus. Como no están vivos, no se pueden multiplicar fuera de las células. Sin embargo, si un fago encuentra un tipo de bacteria que es sensible a él, el fago (o su ADN o RNA) entra en la célula y se dirige a fabricar más fagos. Los fagos se suelen identificar por los agujeros que hacen en las capas de bacterias sensibles. Si sembramos en una placa Petri una capa de bacterias mezcladas con fagos, a medida que las bacterias se multiplican una puede ser infectada por los fagos, que se multiplican y finalmente lisan la bacteria, liberando más fagos. Como las bacterias de alrededor se contaminan también, los fagos se expanden, y se forma una capa opaca que se llama *biofilm* bacteriano. En el momento en que el fago infecta la primera bacteria, el *biofilm* se rompe y se forma un punto en el agar. Tiene el aspecto de estar vacío, pero está lleno de fagos. Los fagos también son haploides, y permiten seleccionar cepas específicas de bacterias.

Después de lo anterior, queda claro por qué las bacterias son tan utilizadas en laboratorio. Y de entre todas las bacterias, una tiene especial relevancia: se trata de la *Escherichia coli*:

---

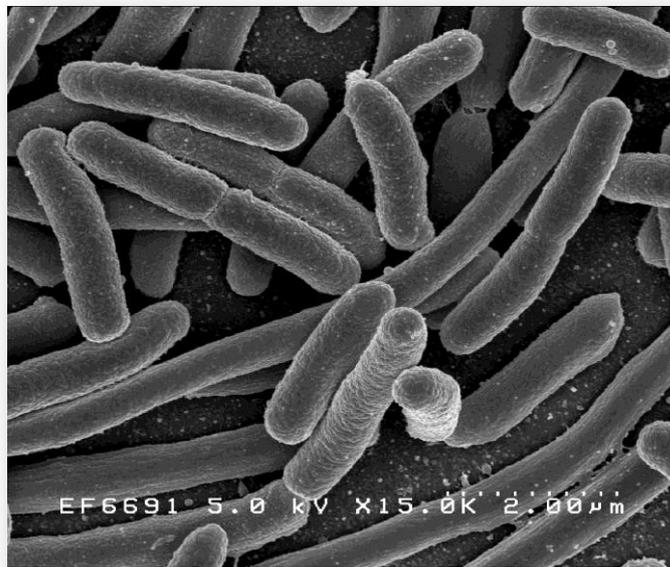
## C. ESCHERICHIA COLI

---

La *Escherichia coli* (abreviada *E. coli*), es quizás la bacteria más estudiada por el ser humano [7]. Habitualmente se encuentra en los intestinos

(enterobacteria) de los animales de sangre caliente, aunque es bastante ubicua. La mayoría de las cepas no son nocivas, pero algunas causan grandes enfermedades a los humanos a causa de la contaminación alimentaria. Las inocuas forman parte de la flora normal del intestino (0,1%), y benefician a sus huéspedes produciendo vitamina B y K y previniendo el establecimiento de otras bacterias patógenas. No forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

Fuera de los organismos que colonizan pueden sobrevivir por largos tiempos. Su presencia en el agua es un indicador de la no-pureza de la misma.



*Fig 2.2: Imagen de la bacteria Escherichia coli vista al microscopio electrónico [16]*

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor [17].

Puede crecer muy fácilmente en cualquier laboratorio, lo que ha hecho que sea la más investigada por más de 60 años, y que sea utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular [3].

---

## ESTRUCTURA GENÓMICA

---

Tiene solo un cromosoma, un plásmido circular. Este cromosoma ha sido totalmente secuenciado por los investigadores, aunque no todas las secuencias han podido ser descodificadas en sus funciones.

Hay muchas cepas diferentes de *E. coli*, cada una de ellas se diferencia de la cepa silvestre en el genotipo. Eso puede manifestarse en cambios en el fenotipo. Es por ello que diferentes cepas de *E. coli* pueden vivir en diferentes tipos de animales. El proceso biológico natural de la mutación en los genomas es la mayor causa de las diferentes cepas de bacteria. Además, pueden transferir su material genético con otras bacterias, aumentando todavía más las mutaciones y por tanto, las cepas.[17].

---

## ESTRUCTURA CELULAR

---

Es una bacteria *gram* negativa con forma de bastón. El análisis por microscopía electrónica muestra que la célula está recubierta de una membrana extra, la membrana exterior o pared celular, situada fuera de la capa de peptidoglicanos. Esta capa externa contiene dos tipos de lípidos, lipopolisacáridos y fosfolípidos, así como una serie de proteínas características que se pueden ver en la tabla siguiente:

<b>Componente</b>	<b>Moléculas</b>
<b>LPS</b>	34.6 e5
<b>Porinas y OmpA</b>	2
<b>Lipoproteínas</b>	7
<b>Fosfolípidos</b>	87

*Tabla 1: composición de la pared celular.*

Entre la capa externa y la membrana citoplasmática existe un espacio periplásmico. Muchos de los espacios vitales para el crecimiento y la viabilidad celular ocurren en este compartimento. La arquitectura del periplasma facilita el crecimiento de la pared celular y de la membrana exterior y coordina estos

procesos con el de la división celular. Las proteínas existentes en este espacio cumplen importantes funciones en la detección y el procesamiento de los nutrientes y el transporte hacia la célula. El microambiente generado por este espacio periplásmico es capaz de regularse para adaptarse a los cambios que ocurren tanto fuera como dentro de la célula.

Algunas cepas tienen vellosidades y pueden aceptar y transferir plásmidos de y a otras bacterias.

---

## APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

---

El modelo bacteriano de *E. coli* tiene un rol importante en la ingeniería biológica por su larga historia de laboratorio y su facilidad de manipulación. Se ha utilizado extensamente para sintetizar ADN y proteínas [7]. Muchos resultados de las investigaciones en *E. coli* se pueden aplicar a animales y humanos. Una de las aplicaciones más útiles es la producción de insulina para pacientes diabéticos [10], puesto que la bacteria *E. coli* puede producir enzimas humanas a través del ADN recombinante.

Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido y de todas las investigaciones realizadas, aún no se tiene un conocimiento completo de esta bacteria. Además de las dificultades técnicas inherentes a los procedimientos analíticos, hay algunos problemas que son exclusivos de la naturaleza de la bacteria. En concreto, las variaciones en tamaño y en composición y la heterogeneidad del crecimiento en las poblaciones son algunos de los factores críticos que pueden afectar a los estudios [18].

A la hora de analizar los resultados de las investigaciones sobre bacterias, es importante tener en cuenta que el comportamiento in vitro no siempre refleja la situación in vivo [6].

---

### *E. COLI* K-12 MG1655

---

La cepa utilizada en los experimentos es la K-12 MG1655. Es una cepa que se considera que emula una cepa silvestre (*wild type*), y que se ha mantenido como cepa de laboratorio con una manipulación genética mínima. Las

mutaciones del genotipo presentes en muchas cepas K-12 probablemente se han adquirido en su historia en el laboratorio [19], [20].

La cepa MG 1655 fue derivada y nombrada por Mark Guyer a partir de la cepa W1485, que a su vez procede de una K-12 original [16].

Uno de los puntos importantes a conocer sobre la *E. coli* es su dinámica de crecimiento, que se suele representar en las siguientes fases.

---

## FASES DE CRECIMIENTO

---

La *E.coli*, como todas las bacterias, siguen un crecimiento exponencial con varias fases, como se representa en la figura 2.3:

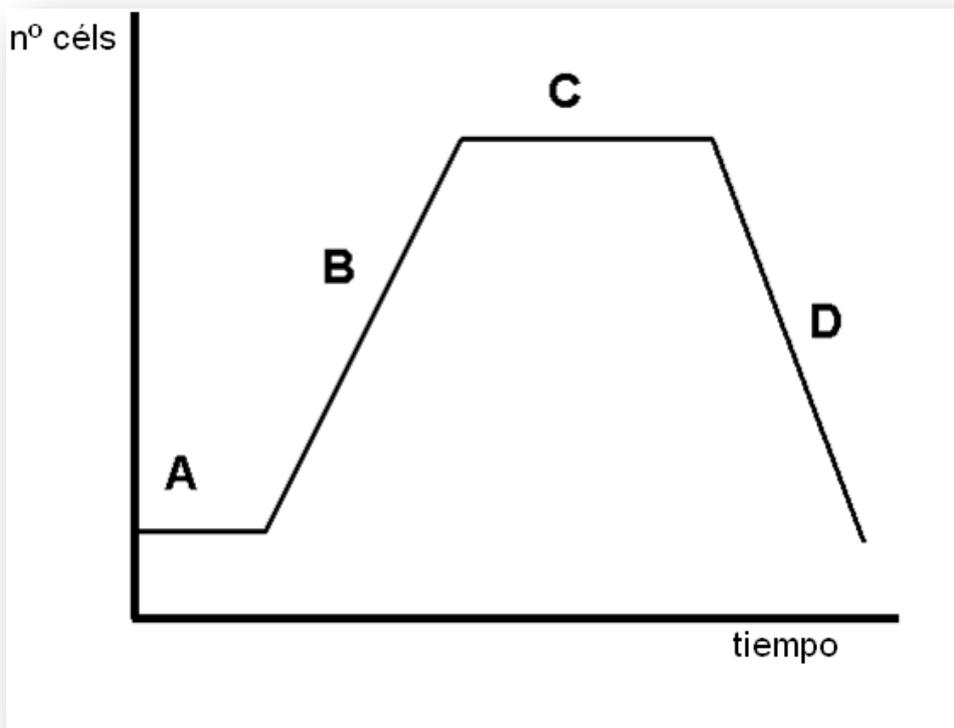


Fig. 2.3: Fases del crecimiento bacteriano

La fase A se llama fase de **adaptación**: las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. No es una fase de latencia, sino de adaptación del ciclo de crecimiento, y en esta fase se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas.

La fase B es la fase **exponencial** (a veces también llamada fase logarítmica) es un período caracterizado por la duplicación celular. Cada periodo (aproximadamente 20 minutos en el caso de la *E. coli* MG 1655) de tiempo la población se duplica. La pendiente de esta línea es la tasa de crecimiento específica del organismo, que es una medida del número de divisiones por célula y por unidad de tiempo. Depende de las condiciones de crecimiento, que afecta a la frecuencia de los eventos de división celular y a la probabilidad de que ambas células hijas sobrevivan.

Durante la fase C o fase **estacionaria**, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas. Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de muerte bacteriana.

Finalmente, en la fase D, llamada de declive o **muerte**. En ella las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren.

Una vez conocidas las características básicas de los modelos de experimentación, pasamos a estudiar los efectos conocidos en la interacción entre las células y los campos eléctricos.

## 2. INTERACCIÓN ENTRE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS Y LAS CÉLULAS

El estudio de la interacción entre campos electromagnéticos (EM) y la materia biológica a menudo se llama bioelectromagnetismo. La comprensión de estas interacciones es una materia compleja debido a la naturaleza también compleja de los objetos biológicos [21].

El uso extensivo de tecnologías EM no solo ha llevado a preocupación por sus efectos sino también a un considerable interés por sus posibilidades de aplicación médica y tecnológica [22]. Se han realizado muchas investigaciones para determinar los efectos biológicos causados por exposición a campos EM.

Sin embargo, la interpretación de la respuesta a las células a estos campos está llena de vacíos por la falta de un protocolo estandarizado y por la dificultad para tener técnicas adecuadas, tanto en lo referente a la obtención de datos, como a la incertidumbre sobre la magnitud real de los campos aplicados a nivel local, incluso a veces la contaminación de los cultivos por subproductos procedentes de los electrodos, así como por la propia complejidad de los sistemas biológicos en estudio [23].

Uno de los mayores desafíos a la hora de entender los cambios observados en sistemas biológicos resultantes de las exposiciones a campos eléctricos es ser capaz de relacionar los cambios biológicos con los mecanismos físicos. Eso a su vez nos lleva a la dificultad de obtener resultados reproducibles y a menudo no está claro cómo los cambios en las condiciones de exposición se relacionan con los cambios en la biología [24]. Esta dificultad a menudo es el resultado de la complejidad de un entendimiento completo y preciso del sistema biológico bajo experimentación y también de las diferencias desconocidas en la biología entre diferentes experimentos. Este problema se solapa a la dificultad de no conocer con precisión los mecanismos que están produciendo los cambios biológicos. Por ello es tan importante continuar haciendo investigación que aporte algo de luz a la interacción entre los campos electromagnéticos y la materia viva.

A la hora de evaluar la interacción entre campos EM con estructuras biológicas, los estudios se pueden clasificar en categorías diferentes.

- Por un lado, si las clasificamos en función de si las muestras celulares están en su entorno natural, obtendremos una división de experimentos in vivo o in vitro.
- Por otro lado, atendiendo a la categorización de las radiaciones electromagnéticas, hablaremos de radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes.
- Si atendemos a las radiaciones no ionizantes, aún podemos seguir clasificando en función de los efectos observables podemos, por ejemplo, separar entre térmicos o no térmicos.

En los siguientes apartados se clasifican y analizan los diferentes efectos observados en dicha interacción. En primer lugar, la distinción entre los efectos térmicos y no térmicos, y posteriormente, los diferentes efectos no térmicos en la membrana (desde 3 puntos de vista, el potencial de membrana, la reestructuración de los canales iónicos y la electroporación) y más allá de la membrana (interacciones con funciones celulares y con los propios campos endógenos, así como la comunicación entre diferentes células)

---

## A. EFECTOS TÉRMICOS VS EFECTOS NO TÉRMICOS

---

Los **efectos térmicos** se refieren a los efectos producidos por un incremento de temperatura debido a la absorción de energía electromagnética por un determinado material biológico. En principio, la temperatura aumentará hasta que la entrada de calor se equilibre con la capacidad del sistema de evacuarlo mediante conducción o convección. En el caso de sistemas biológicos, que son altamente dinámicos, puede llevar varios minutos llegar a la temperatura de equilibrio [25]. El equilibrio de temperatura resultante de la exposición a campos externos está esencialmente determinado por el promedio de la potencia absorbida. Por ello se utiliza el parámetro SAR (*Specific Absorption Rate*) que da idea de la proporción de la potencia absorbida como criterio para medir la respuesta térmica biológica.

Hay que tener en cuenta que los sistemas celulares son extraordinariamente sensibles a la temperatura. Además es necesario recordar que normalmente las medidas que se obtienen experimentalmente corresponden a variaciones globales de temperatura, pero en la realidad pueden estar ocurriendo también variaciones locales. Una de las respuestas más conocidas de las células en cuanto aumenta la temperatura es la inducción de las “*heat-shock proteins*”. Estas proteínas son chaperonas moleculares uno de cuyos roles es prevenir que otras proteínas se desnaturalicen bajo estrés ambiental [3]. Por ello, la aparición o modificación de la expresión de estas proteínas es uno de los indicadores que habitualmente se buscan para valorar la afectación por causa térmica.

Debido a esta alta sensibilidad a la temperatura, siempre que se estudia el efecto de campos EM es importante poderlo desacoplar de un posible efecto térmico [26]. No se conoce cuál es la excursión térmica mínima necesaria para producir respuestas en las células, aunque se considera que 4°C por encima de la temperatura fisiológica ya es una temperatura muy alta para células mamíferas [27] [28]. Las bacterias no son tan sensibles a la temperatura como otros tipos de células, de modo que una variación de incluso 10°C alrededor de la temperatura óptima de crecimiento no produce un efecto letal sobre ellas. Una regla común es trabajar en condiciones que aseguren mantener variaciones de temperatura en la muestra biológica inferiores a 1°C [29].

Según el estándar C95.4-2005 de IEEE, **los efectos no térmicos** se definen como “todo efecto de absorción de energía EM que no esté asociado o dependa de la producción de calor o un incremento de temperatura medible” [30].

Cuando se trata de estudiar este tipo de efectos no térmicos, el espectro se abre enormemente, pudiéndose enfocar el estudio a las variaciones que se pueden producir a nivel morfológico (cambios de forma o de dimensión), de funcionamiento celular (activación de procesos celulares, mutaciones genéticas, alteración en la síntesis de proteínas), movimientos a escala celular (dielectroforesis, electroforesis) o intra-celular (polarización, alineamiento de dipolos eléctricos existentes, y movimiento de cargas libres) e incluso variaciones en las propiedades de membrana (electroporación, modificaciones en las configuraciones de los canales iónicos).

---

## B. EFECTO SOBRE LA MEMBRANA: EL VALOR UMBRAL DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANA

---

La literatura es prolija en estudios sobre los efectos no térmicos de los campos EM [21], [31], [32]. Sin embargo, los estudios sistemáticos son complejos y a menudo, no comparables entre ellos debido a la no homogeneización en los procedimientos utilizados. Encontramos una gran diversidad de tipos de campo (intensidad, frecuencia, tiempo...) aplicados a una gran diversidad de objetos biológicos (bacterias, células eucariotas, tejidos, organismos) en

condiciones muy diferentes (in vitro, single cell, in vivo,...). Por ello, no siempre es fácil obtener conclusiones de los estudios realizados. En cualquier caso, una de las premisas mayoritariamente aceptada es que la mayor parte de la interacción entre campos electromagnéticos se produce en la membrana, puesto que sus características eléctricas hacen que “apantalle” los campos, es decir, que actúa como una jaula de Faraday impidiendo que los campos penetren en el interior de la célula, siempre que nos mantengamos dentro de un rango de frecuencias relativamente bajo (menor o igual a MHz) [21]. Y como la membrana celular tiene un determinado potencial transmembrana, el campo externo tiene que ser mayor que este potencial transmembrana si queremos ver algún tipo de efecto.

El potencial transmembrana se establece, de forma genérica (sin especificar en tipo de célula o condiciones de obtención de ese valor) en aproximadamente 1000 V/cm [33]–[35]. Este valor se establece a partir de la composición y estructura de la célula. Las células están delimitadas por una membrana bilipídica que separa el medio interno del medio externo que es drásticamente diferente. Aunque la concentración global de iones es similar en ambas partes de la bicapa, la concentración de cada ion es diferente. La electrodifusión de los iones a través de gradientes electroquímicos genera una separación de cargas a través de la membrana que da lugar a un potencial transmembrana que es del orden de -70mV, según se puede calcular a partir del modelo clásico de Hodgking y Huxley [36]. Los gradientes iónicos desaparecerían rápidamente si no fuera por las bombas iónicas activas de ATP que los mantiene. A pesar de ello, en la mayoría de los casos, estas bombas no tienen un papel significativo en la generación del potencial de membrana [34].

La parte hidrofóbica de la membrana lipídica separa la diferencia de cargas y genera el potencial de membrana. Como esta región es extremadamente fina (2nm), el potencial de membrana se convierte en un intenso campo eléctrico del orden de 1000V/cm.

También de modo genérico se establece que por debajo de este umbral, los efectos a nivel de viabilidad son negligibles [33]. La explicación a esto es que aunque se sabe que la exposición de la célula a un campo eléctrico también induce voltajes en el interior de la célula, se considera esos voltajes son varios

órdenes de magnitud menor que el inducido en la membrana celular. Como son demasiado débiles para electroporación, se considera habitualmente que el interior de la célula permanece no afectado [37].

Sin embargo cada vez más estudios muestran que tal premisa no es estrictamente cierta, o al menos no de forma tan generalizada como se ha considerado. Las corrientes inducidas en la membrana debido al propio potencial de membrana son del orden de pA, lo cual nos da idea de la “sutileza” de los campos eléctricos que las células son capaces de percibir.

---

## C. EFECTOS SOBRE LOS CANALES IÓNICOS

---

En fisiología es conocido que las propiedades y comportamientos de los canales iónicos situados en las membranas celulares juegan un rol crítico en la regulación de los procesos vitales de las células [38]. Los mecanismos por los que las proteínas perciben el voltaje son diversos: los canales iónicos tiene una región con carga positiva que se mueve en respuesta a los cambios en el potencial de la membrana, algunos receptores acoplados a proteínas G tienen un patrón capaz de percibir el voltaje y algunas de las bombas y transportadores de membrana usan los iones que transportan a través de la membrana para sentir el voltaje de la membrana [34]. Por ejemplo, las proteínas G tienen un papel fundamental en el funcionamiento de los canales iónicos controlados por ligando, y permiten que un evento molecular único en la superficie de la membrana acelere, inhiba o provoque una cascada de reacciones biológicas en un proceso llamado amplificación [3].

De una manera similar, campos eléctricos muy débiles, que no son capaces de producir ningún efecto a nivel de actividad celular, pueden activar mecanismos a nivel de regulación, dando lugar a respuestas fisiológicas que se manifiestan utilizando la energía del metabolismo celular [39]. Es conocido que varios componentes de la cascada de regulación, incluyendo receptores, canales de calcio y procesos enzimáticos en la célula, son sensibles a los campos eléctricos y magnéticos. Las fuerzas electromagnéticas en la superficie exterior de las membranas pueden modificar las interacciones ligando-receptor, que a su vez alterarían el estado de las moléculas de membrana que están

relacionadas con el control de los procesos celulares internos [40][41]. De hecho, hay estudios que muestran cómo los radicales libres, incluido el óxido nítrico, están involucrados en el acoplamiento de los campos EM a eventos químicos en la cascada de señalización. Este hecho tiene una importancia médica tan grande que se reconoció con el Premio Nobel en 1998, otorgado a los doctores. Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad [38].

No se sabe a ciencia cierta cómo las células perciben y responden a diferencias de voltaje tan pequeñas como 0,1mV, pero se sabe que responden [23]. Los efectos de los campos eléctricos parecen ser atribuibles a una serie de mecanismos principales:

- Polarización de las cargas. A su vez genera un campo nuevo como resultado del movimiento de las cargas. Algunos dipolos permanentes que existen sin necesidad de campo externo, se reorientan [42], [43]
- La orientación significativa de los dipolos permanentes resulta en cambios topográficos de las moléculas [21].
- Difusión y movimiento de cargas. Ello genera un nuevo campo que no existía antes de la aplicación del campo externo [44].
- Los iones pueden unirse o separarse de las proteínas [45]
- Se puede producir agrupaciones de canales iónicos o de receptores en la membrana celular, como si fuera un tipo especial de iontoforesis (movimiento de iones) [46]. Se ha estimado que la caída de voltaje por célula requerida para producir una asimetría está entre 0,1 y 1mV [47]
- Enzimas sensibles a voltaje. Son un caso especial de acoplamiento electroconformacional de los canales proteicos [21]

En concreto, respecto a los cambios conformacionales en la membrana, algunos estudios especifican que los cambios se producen especialmente en los canales iónicos y las enzimas asociadas a las membranas, produciéndose entrada de sustancias externas, a la vez que electroporación y electrofusión. A menudo estos efectos ocurren simultáneamente, aunque habitualmente uno es predominante. [48]

Muchas proteínas de membrana utilizan el campo eléctrico para regular la función de la célula, así que de alguna manera tienen que notarlo. La

explicación de que las células son capaces de sentir el voltaje, la podemos encontrar en varios autores. Por ejemplo, Vajrala *et al* [49] explica por qué un potencial de membrana modulado externamente puede afectar la actividad enzimática, transporte y comportamiento conformacional. Las proteínas son moléculas dipolares. Al estar sometidas al campo EM tienen tendencia a modificar su orientación. Pero por la propia configuración de las proteínas transmembrana, éstas no pueden girar en el interior de la membrana y disipar energía en una relajación de Debye [34]. En el caso de cargas móviles, se produce una translocación y una corriente transitoria que se puede medir experimentalmente. La combinación de cambios conformacionales y de translocación iónica crea una respuesta no lineal manifestada por la generación de armónicos [50]. Ya anteriormente, Robinson [23] había explicado que el grado de redistribución de las componentes móviles en la membrana plasmática depende del ratio de coeficiente de difusión y la motilidad electroforética.

Los cambios conformacionales en la membrana tienen una influencia no sólo en el aumento del intercambio de iones con el medio extracelular, sino que afecta también a la reorganización de los elementos del citoesqueleto, y tiene influencia en el proceso de apoptosis, e incluso no se puede excluir una alteración del patrón de la expresión génica [41].

Desde otro punto de vista, Kalinina [51] propone un modelo basado en gradiente cortical de pH, basándose en que al poner una célula en el interior de un campo externo, el potencial transmembrana deja de ser homogéneo, de modo que la parte de la membrana que mira al ánodo está hiperpolarizada mientras que la mira al cátodo está despolarizada. Consecuentemente, el influjo de protones aumenta en la región hiperpolarizada y disminuye en la despolarizada. Como resultado, reporta cambios en la dirección del crecimiento y migración, aunque afirma que los mecanismos moleculares detrás de los direccionamientos de crecimiento aún no se comprenden del todo.

En cualquier caso, los procesos cíclicos como el transporte de iones, consumo de ATP y los procesos respiratorios (que además tienen electrones involucrados) son de particular interés porque son sensibles a la sincronización con campos oscilantes [49].

---

## D. ELECTROPORACIÓN

---

Tal vez uno de los efectos más clásicos de los campos EM sobre las células es la electroporación. Es un fenómeno en el cual una célula expuesta a un campo eléctrico (generalmente pulsante y de muy alta intensidad) se permeabiliza de modo que se forman poros acuosos en su membrana. Si el campo es suficientemente fuerte, la exposición puede causar un aumento significativo de la conductividad y permeabilidad de la membrana plasmática [37]. Si el campo es muy intenso el proceso puede ser irreversible y producirse la lisis de la célula, pero si el estímulo es adecuado, la membrana se recupera de su estado poroso, después de permitir un canal instantáneo para iones y moléculas en ambos lados de la membrana. Por eso la electroporación se utiliza como herramienta para alterar artificialmente el contenido celular [3].

Cuando la célula se expone a un campo externo, se induce un voltaje en la membrana plasmática. Este voltaje es proporcional a la intensidad del campo y se superpone al potencial de membrana de condiciones fisiológicas, alrededor de  $-70\text{mV}$  [6]. De acuerdo a esta teoría de electroporación, el voltaje de la membrana reduce la energía necesaria para los recolocamientos de los lípidos de la membrana que resulta en la formación de pasillos acuosos (poros hidrofílicos) y la consecuente aumento de la conductividad y permeabilidad de la membrana [37].

El fenómeno de la electroporación se lleva estudiando décadas, primero como una rotura reversible de membranas de células electro-excitable y posteriormente, en el resto de células [52].

La electroporación, como una respuesta biofísica a un campo externo aplicado, se puede describir a través de varios pasos [53][54]

- 1- la aplicación de un pulso eléctrico produce un incremento transitorio del potencial transmembrana lo que produce campos a través de la membrana de  $10^6$  V/m (para una membrana típica de 10 nm de grosor).
- 2- se produce una reorganización rápida de la estructura molecular de la membrana

- 3- se induce la formación de poros, que perforan la membrana y se rellenan de moléculas de agua.
- 4- ello provoca un incremento de varios órdenes de magnitud del transporte molecular e iónico a través de la membrana celular
- 5- en algunas circunstancias, la membrana se vuelve a su estado original.

Habitualmente se utilizan campos pulsantes de alta intensidad para electroporar células. Los parámetros más importantes para una electroporación efectiva son la intensidad del campo aplicado y la duración del pulso [55]. Aunque hay muchos más parámetros que pueden influenciar la eficiencia de la electroporación, como la forma del pulso, la polaridad, el número de intervalos entre pulsos, el tamaño de las células y las condiciones térmicas. La capacidad de incorporar moléculas también depende de su tamaño molecular, carga y otras propiedades físicas y químicas.

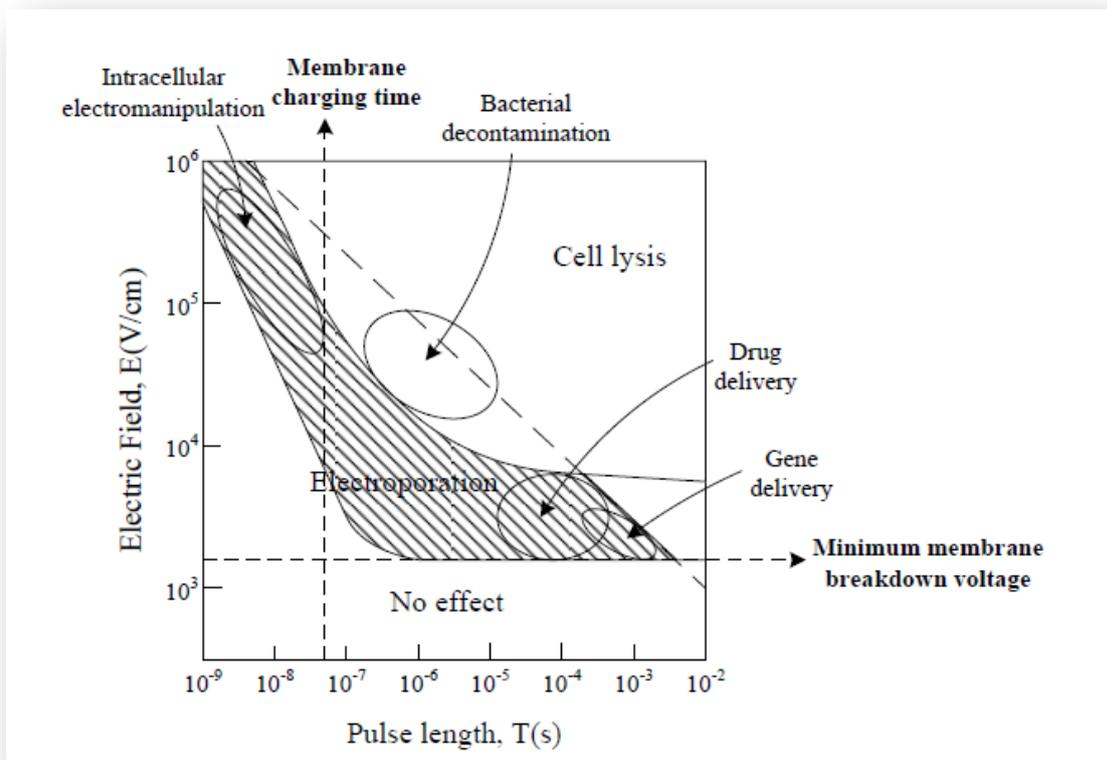


Fig 2.4: Rango de aplicaciones bioeléctricas relacionadas con la electroporación [54]

En esta figura [54] se resumen las diferentes aplicaciones en los distintos grados de electroporación. Se puede distinguir un valor umbral de campo

eléctrico por debajo del cual no ocurre la poración, y que el autor establece en unos 2000 V/cm. A medida que aumenta la intensidad de campo o el tiempo de exposición (duración del pulso), se puede observar el rango donde se esperan los mayores efectos. Si continúa aumentando el campo eléctrico, las células mueren (región de lisis)

Diferentes aplicaciones requieren diferentes puntos de trabajo. Para aplicaciones médicas, la zona preferida es el rango de pulsos largos y campos eléctricos bajos. Particularmente, la transfección genética ocurre cuando los pulsos son del orden de ms (en lugar de microsegundos) y las amplitudes del orden de 100 V/cm. La electro quimioterapia requiere campos eléctricos más elevados (KV/cm) y pulsos más cortos (10  $\mu$ s). La descontaminación de bacterias requiere pulsos del orden de 1 ms, operando en campos de 10 a más de 100 KV/cm [52].

Cuando en la gráfica nos desplazamos hacia la izquierda, con valores mucho mayores (miles de V/cm) pero pulsos más cortos, la situación se invierte, la membrana celular se mantiene intacta pero se afectan las estructuras internas [37], produciéndose la electroporación no de la membrana plasmática sino de las membranas interiores de las células.

A pesar de que esta es la teoría más extendida, algunos autores también aseguran conseguir electroporación aplicando campos de mucha menor intensidad. El ejemplo más claro está descrito en el artículo "*Study of mechanisms of electric field-induced ADN transfection*" [56]. En él se comentan los resultados previamente publicados, así como los obtenidos por la propia experimentación, utilizando amplitudes de campo entre 50 y 200 V/cm, a frecuencias de entre 0,1 Hz y 1 MHz. El autor reporta resultados de transfección con el 100% de supervivencia de las bacterias (*E.Coli*). Teóricamente, los campos aplicados no son suficientes para producir una electroporación, pero posteriormente, otros autores citan resultados similares en otros tipos de líneas celulares [57]. En el anexo referente a la electroporación se comenta en profundidad este tema.

---

## E. EFECTOS MÁS ALLÁ DE LA MEMBRANA

---

Con los métodos actuales se hace complicado explicar el efecto de los campos externos en muchos componentes intracelulares en las células vivas. La medida de campos en biología celular, se ha limitado a métodos dependientes de membrana, mediante tinciones sensibles a voltaje, “*patchclamp*”, métodos de fluorescencia o técnicas de transferencia de energía resonante [49]. Incluso las simulaciones realizadas y que nos acercan al comportamiento de la membrana como componente electrónica, tan solo son aproximaciones de los valores reales y la distribución del campo eléctrico en el interior de la célula.

Los efectos de los campos EM van más allá de la membrana, aunque no se conoce mucho sobre las distancias hasta las que llega o el rango de su influencia. En un estudio de los campos en el interior de las células, [58] utiliza electro PEBBLEs (*Photonic Explorers for Biomedical use with Biologically Localized Embedding*) que les permite medir analitos como Ca, K, NO, O en el interior de la células, así como propiedades físicas como la viscosidad. Sus medidas muestran que los campos se pueden transmitir mucho más allá de los 10 nm establecidos, incluso micras en el citoplasma, y que por tanto, las fuerzas que se producen en la superficie de la membrana pueden generar señalizaciones de largo alcance.

Se ha mostrado [31] que los campos EM de baja frecuencia pueden actuar a nivel celular y afectar funciones celulares, incluyendo proliferación y diferenciación [59]–[62][63][64], apoptosis [65], [66], transcripción de ADN [67], expresiones de proteínas [68] 88), fosforilación de proteínas [69], actividad metabólica [70] o inhibición de la adherencia [71] y cambios en la morfología [63]

La interacción entre los campos electromagnéticos y los sistemas biológicos es aún una cuestión abierta. Actualmente también se barajan hipótesis de que pueda haber interacciones resonantes entre los campos electromagnéticos externos y las vibraciones endógenas de los sistemas biológicos, como se explica en el próximo apartado.

---

## F. CAMPOS ENDÓGENOS – LA RADIACIÓN QUE EMITEN LAS PROPIAS CÉLULAS

---

Cuando hablamos de campos electromagnéticos, habitualmente nos referimos a campos externos aplicados a entidades biológicas. Pero pocas veces tenemos en cuenta que las propias células tienen sus campos electromagnéticos. Esto significa que no podemos obviar que hay una interacción entre ambos campos. A pesar de que habitualmente no se publica sobre los efectos como interacción entre dos campos electromagnéticos, hay un largo recorrido histórico de investigaciones sobre este tema. Un excelente trabajo en la recopilación de datos sobre ello se puede leer en el *review* publicado por Michal Cifra [31].

La historia del descubrimiento de la electricidad en los seres vivos comienza con los experimentos de Galvani y Volta, en una época en la que la teoría electromagnética actual estaba muy lejos de ser conocida. La detección de los campos endógenos fue descrita por primera vez por Scheminzký en 1916 [31]. Detectó “emanaciones” de luz de procesos bioquímicos de levaduras usando platos fotográficos. Actualmente hay una abundante literatura publicada sobre las emisiones espontáneas de luz procedentes de las células. Habitualmente se denomina emisiones de fotones ultra débiles o biofotones. Generalmente, las células incrementan las emisiones cuando están produciendo cambios fisiológicos [72].

Desde otro enfoque, basado en la medida directa, Burr fue probablemente el primero en publicar en los 1930s una serie de documentos con considerable cantidad de observaciones sobre gradientes de voltaje bastante estables en varios y diferentes sistemas biológicos, incluyendo vertebrados, invertebrados y plantas [73]. Observó que los gradientes de voltaje solo cambiaban por alteraciones en la biología fundamental de los organismos como el desarrollo, crecimiento, heridas locales, ciclos menstruales en hembras y cáncer. En 1935 en su *Teoría Electrodinámica de la Vida* dijo que “*el patrón de organización de cualquier sistema biológico está establecido por un campo electrodinámico complejo, que en parte está determinado por sus componentes fisicoquímicas atómicas y que en parte determina el comportamiento y la orientación de esas*

*componentes.*” El término electrodinámico hace referencia obviamente al hecho de que los campos medidos cambiaban en el tiempo. Sin embargo, cambios en el tiempo eran del orden de minutos, horas y días, lo que desde el punto de vista de las ecuaciones de Maxwell se puede considerar como campos cuasiestáticos.

Las corrientes endógenas y los campos eléctricos cuasiestáticos en células y tejidos son de gran importancia fisiológica. Las corrientes directas (DC) que surgen de los flujos de canales iónicos de la membrana son importantes en la señalización [74], no solo en las células electroexcitables de los organismos superiores. En el artículo “*Electrical Dimensions in Cell Science*” [32], se da una visión general de esta actividad eléctrica endógena y su papel en la fisiología celular, así como del comportamiento no lineal de los fenómenos oscilatorios en los seres vivos. Algunos de los posibles roles de estos campos endógenos se relacionan con interacciones proteicas a “larga distancia” [75], cinética de las reacciones químicas [76], disrupción de la organización celular [77][78] e interacciones intercelulares [79][80].

Estos campos endógenos no solo han sido definidos, sino que también han sido medidos a través de diferentes técnicas.

---

## MEDIDAS DIRECTAS

---

La primera posibilidad para cuantificar y analizar los campos generados por los sistemas biológicos se basa en la detección electrónica directa de los campos EM procedentes de una célula o una suspensión de células. Usando un analizador de espectro, diferentes equipos de investigación detectaron las señales emitidas por diferentes organismos. En la tabla 2 se resumen algunos de los resultados obtenidos:

ORGANISMO	FRECUENCIA / LONGITUD DE ONDA	AUTORES Y AÑO
<b>Alga <i>Netrium Difitus</i></b>	7 KHz, 33 KHz 0.4 . 1.6 KHz 1, 7, 50 (60)- 80 MHz  8-9, 8.2 MHz  1.5, 2.6, 5.7, 18 52 MHz  42 GHz	Pohl y Pollock (1986) Jelinek et al (2009), Cifra (2009) Jafary-Asl and Smith (1983), Del Giudice et al. (1989) Jelinek et al (1999, 1996), Pokorný et al (2001)  Hölzel (1990), Hölzel and Lamprecht (1995,1994), Hölzel (2001)  Jelínek et al (2002, 2005, 2007), Kucera (2006)
<b>Levadura <i>Schizosaccharo myces pombe</i></b>	3.1 , 4.8 MHz	Hölzel (1990), Hölzel and Lamprecht (1995, 1994), Hölzel (2001)
<b>Musculo gastrocnemio de rana (estimulado eléctricamente)</b>	0.2 – 2 mm	Gebbie and Miller (1997)
<b>Nervio de cangrejo (estimulado eléctricamente)</b>	3-10 $\mu$ m	Frase and Frey (1968)
<b>Varios tipos de bacterias, plantas, hongos, células mamíferas</b>	Visible, UV	Gran abundancia de datos y libros

*Tabla 2: Resumen de detección electrónica directa de campos electromagnéticos celulares. Las medidas indirectas, por ejemplo por efecto dielectroforético, no están incluidas [73].*

La medida directa tiene la dificultad de que las señales emitidas son muy débiles, y por norma general, en entorno de medición es bastante ruidoso electromagnéticamente. Es de destacar el trabajo realizado en la medición de la actividad electromagnética de células en la región de GHz [74][80] especialmente alrededor de 42 GHz. Su trabajo se basa en los campos generados por las vibraciones de los microtúbulos del citoesqueleto, y su relación con la respiración celular en las mitocondrias. Es el resultado de una línea de investigación muy consistente en el tiempo que recoge los postulados de Fröhlich de las oscilaciones polares coherentes eléctricamente [75][77], y que posteriormente fue trabajado y aplicado por Pokorný, el cual encontró una clara correlación de las funciones celulares y de la actividad electromagnética de la célula [76], [78]. Por ejemplo, se han hallado variaciones en las emisiones al someter las células a toxinas, o durante la mitosis [81].

Otra banda del espectro donde se han hecho multitud de medidas directas corresponde a la banda de la luz visible, en la que se pueden captar las emisiones de biofotones. Como esta banda se aleja del alcance de este trabajo, simplemente dejo constancia de la existencia de estas radiaciones y de su medida.

---

## MEDIDAS INDIRECTAS

---

Los campos endógenos también se pueden detectar indirectamente por técnicas como la dielectroforesis. Uno de los pioneros en medir los campos EM mediante DEP fue Pohl. Utilizando esta técnica, Pohl estimó que las frecuencias de las oscilaciones eléctricas celulares están en el rango de la radiofrecuencia, entre 5KHz y 9 MHz [82] Encontraron además que las oscilaciones eléctricas eran dependientes de la actividad metabólica, y que las células muertas o metabólicamente bloqueadas no mostraban efecto dielectroforético. Estos experimentos incluyeron test de muchos tipos de células, incluyendo bacterias, hongos, algas, nematodos y células de mamíferos. Pohl observó variaciones en los campos EM emitidos por las levaduras cuando se exponían a toxinas químicas o mitosis celular [83].

También investigó la variación de la actividad eléctrica celular a lo largo del ciclo de la vida de la célula. Se encontró que durante la mitosis es cuando hay una mayor actividad eléctrica de las células.

Los resultados de numerosas investigaciones [84][73][21][38] mostraron la evidencia de la existencia de campos eléctricos celulares.

Todas las células testadas [74] incluyendo líneas celulares de bacterias, algas, hongos, aves, mamíferos, mostraron efectos dieléctricos causados por campos EM celulares. La gran variedad de células que muestran efectos este tipo de efectos indica que los campos EM al menos en el rango de MHz es un fenómeno generalizado [82][85][75].

Pero los campos EM no solo son una característica propia de las células, sino que también son un modo de comunicación entre ellas.

---

## G. LA COMUNICACIÓN EM DE LAS CÉLULAS

---

Los sistemas biológicos se pueden comunicar con otros e interactuar con el entorno inanimado por mecanismos diferentes y a diferentes niveles, dependiendo del tipo y la complejidad del sistema biológico y de la naturaleza de la información que quieren comunicar. Muchos mecanismos conocidos de la comunicación célula a célula incluyen señalizaciones químicas o eléctricas. Nuestro conocimiento de las formas de comunicación no químicas y no eléctricas es aún algo rudimentario [31]. Sin embargo, una comunicación electromagnética podría explicar fenómenos que son difíciles de atribuir a otras formas de señalización, por ejemplo, fenómenos que requieren sincronización entre unidades biológicas físicamente separadas [73][86].

La ventaja de la comunicación vía campos EM frente a la comunicación química o eléctrica es evidente: no dependen de vibraciones para ser transmitidas, por tanto no dependen de un medio, y decaen muy lentamente [87]. Además, necesitan una inversión energética mínima porque operan a baja intensidad y utilizan energía liberada de procesos celulares naturales [88]. A bajas intensidades, las señales electromagnéticas se convierten en un mecanismo de precisión para que las células puedan comunicar su estado energético y disipar energía coordinadamente para maximizar el uso de los recursos disponibles. En determinadas circunstancias, cuando la célula está bajo condiciones de estrés o de muy alta densidad celular, estas señales pueden llevar demasiada energía y ser demasiado fuerte. Estas señales fuertes pueden actuar como sistemas de alarma celular, induciendo la dispersión o reprogramando la apoptosis [89].

Otra ventaja es que se propagan más rápido que las señales químicas, porque no están limitadas por difusión. Eso proporciona un mecanismo superior para la señalización celular cuando se requiere una respuesta rápida. Además, la célula puede afectar directamente la actividad enzimática o la expresión génica, ya que puede atravesar las membranas celulares.

De hecho, se han realizados numerosas observaciones de interacciones celulares a distancias, mecanismo que en muchos casos se confirma que son de naturaleza electromagnética [74]. Por tanto, los campos electromagnéticos

son una vía de comunicación intra e intercelular. Campos externos interfieren con esta comunicación, aunque no conozcamos con precisión de qué manera.

### 3. CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE LAS CÉLULAS - MODELOS SIMULADOS

---

#### A. INTRODUCCIÓN

---

A la hora de evaluar y cuantificar los efectos que los campos electromagnéticos tienen sobre la célula, es habitual realizar un modelado de las mismas [90]. De una forma general podemos decir que las células contienen electrolitos altamente conductivos en medios acuosos separados por membranas delgadas de baja conductividad, llenas de macromoléculas eléctricamente activos. Además dispone de múltiples mecanismos de interacción, tanto pasivos como activos (bombas iónicas, canales controlados por voltaje, regiones de membrana electroporables, proteínas transmembrana altamente polarizables, etc.) Por ello, una de las grandes dificultades es que los sistemas biológicos son extremadamente heterogéneos, lo cual crea una complicación básica: un campo aplicado da lugar a un campo respuesta que difiere espacialmente y temporalmente del campo aplicado en el interior del sistema biológico [48].

Como ya hemos comentado anteriormente, se considera que el lugar donde ocurren la mayoría de interacciones entre campos electromagnéticos y células es la membrana. La membrana tiene una conductividad mucho menor que el citoplasma y que el medio extracelular, incluso algunos autores la consideran no conductora [33].

Las membranas biológicas son sistemas muy complejos por lo cual se emplean modelos de su comportamiento eléctrico para comprender su funcionamiento. Un modelo biológico es una representación simplificada de un sistema por lo general complejo. La simplificación consiste en incluir en el modelo solamente los componentes necesarios para explicar una o más variables que se desean

estudiar. Un modelo tiene la desventaja de representar imperfectamente la realidad, pero tiene la ventaja de permitir la descripción del sistema estudiado y la predicción de su comportamiento frente a cambios en las variables. Los modelos más útiles son aquellos suficientemente simples para ser analizados pero suficientemente complejos para representar con buena aproximación el sistema en estudio. Los modelos eléctricos de la membrana son un buen ejemplo de este equilibrio.

El estudio de la respuesta de la membrana al paso de corriente indica que se comporta como una asociación de elementos eléctricos de tipo resistivo y capacitivo [91].

Una resistencia es un elemento eléctrico de tipo disipativo, pues las cargas que circulan por ella pierden energía potencial. En el caso de la membrana, las corrientes son llevadas por iones disueltos como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$ . Las diferencias entre resistividades de membrana de diferentes células se deben fundamentalmente al número de canales iónicos presentes por unidad de superficie de membrana. Como la corriente que atraviesa la membrana también circula por el medio intra y extracelular, en principio debe considerarse la contribución de ambos al comportamiento eléctrico. La resistencia eléctrica del citoplasma depende principalmente de las clases y concentraciones de iones que contiene, de la movilidad de estos iones y de la temperatura. La resistividad del medio extracelular se supone despreciable comparada con la resistencia del citoplasma y de la membrana. Esto se cumple muy aproximadamente in vitro cuando se coloca una célula en un recipiente con un gran volumen de líquido extracelular.

Las membranas celulares carecen esencialmente de comportamiento inductivo, pero poseen un claro comportamiento capacitivo. Los líquidos intra y extracelular actúan como las placas y la matriz lipídica de la membrana es el dieléctrico. Las membranas biológicas tienen una capacidad específica de membrana próxima a  $1 \mu F/cm^2$ . Como las concentraciones iónicas intracelulares son mucho mayores que la carga equivalente de esta capacidad, el potencial transmembrana se puede modificar con una transferencia de iones que virtualmente no modifica la concentración en el citoplasma. En la membrana en reposo, la intensidad circulante es cero [91].

Desde los primeros estudios de Fricke, las células se han modelado clásicamente como una esfera rodeada de una membrana que contiene citoplasma [92]. El citoplasma se modela como un medio uniforme con una determinada permitividad y conductividad, mientras que la membrana se describe como un recubrimiento con propiedades eléctricas superficiales. Determinando los campos que existen en la célula a medida que la frecuencia

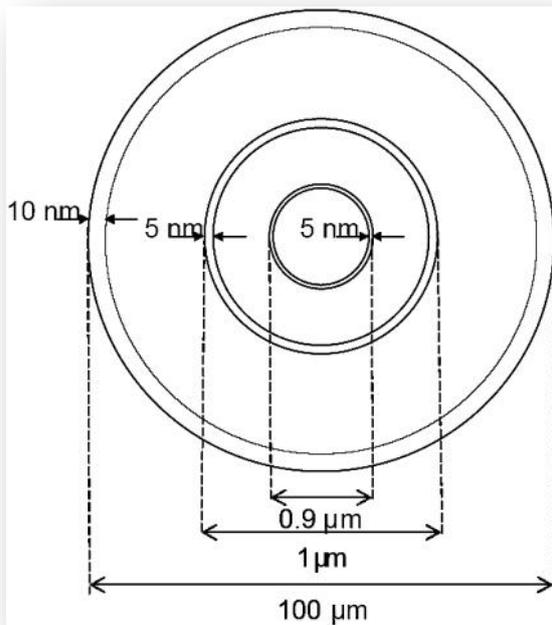


Fig 2.5: Modelo de célula como esfera con tres membranas [49]

varía, se intenta determinar las rutas por las que los campos pueden impactar la fisiología [93]. A pesar de que el modelo más habitual es de 2 capas, en algunas ocasiones este modelo se ha ampliado hasta contener 4 capas, lo cual aporta un mayor detalle al mismo.

Modelos un poco más realistas utilizan elipsoides confocales que dan soluciones relativamente simples de las ecuaciones de Laplace. Se han utilizado exitosamente para interpretar información en las propiedades

dieléctricas de las partículas en un ancho rango de circunstancias experimentales. Sin embargo, cuanto más realista es un modelo, más complicado es de resolver analíticamente y se requiere la utilización de métodos numéricos [94]. Una de las dificultades que plantea el modelado es que las dimensiones son muy diferentes, variando entre micras (diámetros o longitudes celulares) y nanómetros (grosos de las paredes o membranas). Ello ocasiona problemas en el procesado informático por elementos finitos.

En cualquier caso, es importante mantener siempre presente que las interacciones dependen de los campos locales, no de los promedios reportados en los estudios experimentales, por eso el modelado puede ser un

complemento interesante a la hora de plantear los experimentos y de analizar los resultados.

## B. MODELO DE CÉLULA COMO ELIPSOIDE

Al ser la *E.coli* una bacteria de morfología similar a un bastón (“rod-like”), el modelo de célula esférica no parece el más adecuado. Varios autores [33], [90], [95], [96] proponen un modelo basado en elipses confocales que, sin ser la forma exacta de la bacteria, sí se acerca más a la realidad geométrica de lo que lo hace una esfera.

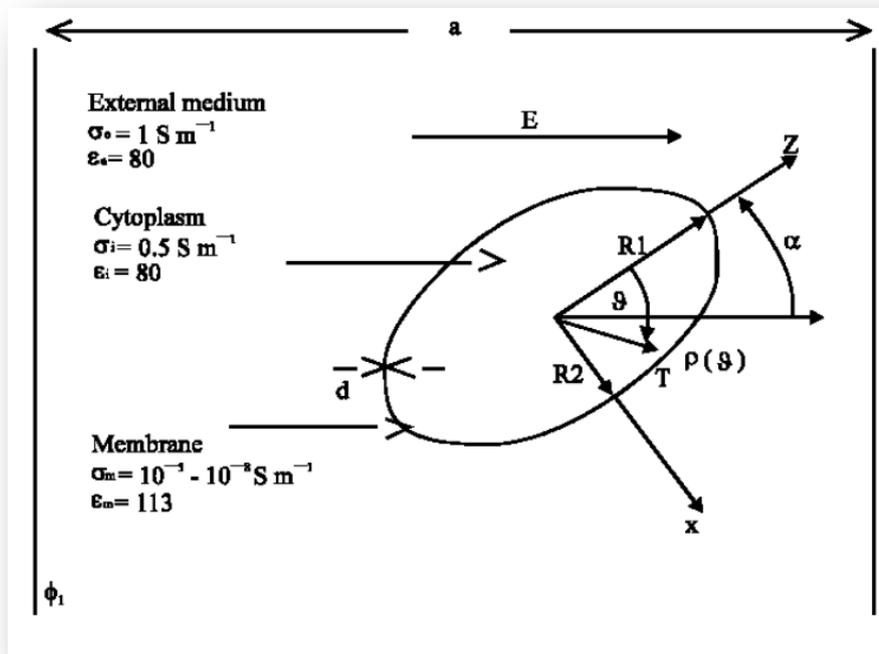


Fig 2.6 Modelo de *E.coli* como elipse propuesto por [33]

Para realizar un modelo necesitamos dos tipos de parámetros que están parcialmente relacionados: los geométricos y los eléctricos.

### PARÁMETROS GEOMÉTRICOS

Los parámetros geométricos se suelen establecer a partir de imágenes de microscopio (habitualmente SEM). No todos los autores coinciden en los valores exactos, pero sí en el orden de magnitud.

A modo de comparativa, la siguiente tabla muestra valores de geometría por diferentes autores:

Autor	Radio mayor ( $\mu\text{m}$ )	Radio menor ( $\mu\text{m}$ )	Grosor membrana (nm)	Grosor pared (nm)
ASAMI [95]	1.395	0.34	5	20
GOWISREE [33]	2	0.8	-	20
SANCHÍS [97]	1.68	0.41	8	15
SRIVASAN	1.5	0.5	-	-
CASTELLARNAU[98]	1.5	0.75	8	50

Tabla 3: Resumen de los valores de geometría y sus correspondientes autores

A la hora de modelizar la bacteria, también hay que tener en cuenta que tanto la orientación de la bacteria respecto a los electrodos como la concentración de bacterias producirán cambios en la impedancia del sistema [99]

---

## PARÁMETROS DIELECTRICOS

---

Los parámetros dieléctricos se obtienen por medidas dieléctricas que nos permiten obtener las propiedades eléctricas pasivas como capacitancias y membranas celulares, constantes dieléctricas y conductividades en el interior de la célula, así como en la membrana y pared celular. El análisis de los datos obtenidos del comportamiento dieléctrico de suspensiones de *E. coli* depende de la geometría establecida, por ello es importante tomar los valores de geometría y de parámetros dieléctricos del mismo modelo.

La mayoría de los modelos celulares de doble capa, las propiedades dieléctricas de las 3 regiones resultantes se aproximan empíricamente por la teoría de la relajación de Debye. El citoplasma es difícil de modelar con su composición exacta, por lo que se aproxima a una solución salina con propiedades específicas dependientes de la frecuencia [100].

Hay 3 términos macroscópicos que se definen a la hora de tener en cuenta las interacciones entre la materia y los campos EM:

- la **permitividad**  $\epsilon$  describe la magnitud de la polarización inducida y el alineamiento parcial de los dipolos eléctricos permanentes.
- la **conductividad**  $\sigma$  describe la cantidad de densidad de corriente conducida.
- la **permeabilidad magnética**  $\mu$  tiene en cuenta el alineamiento de los dipolos magnéticos permanentes.

Estos parámetros, especialmente la permitividad y conductividad del citoplasma y la membrana, están relacionados con características fisiológicas importantes y pueden deducirse del espectro dielectroforético de polarizabilidad [97]

La membrana es una bicapa lipídica que tiene una permitividad relativa independiente de la frecuencia y una conductividad muy baja [101]

En la tabla siguiente se representa la comparación de los parámetros obtenidos para *E. coli* por diferentes autores:

Autor	$\epsilon_{rc}$	$\sigma_c$	$\epsilon_{rm}$	$\sigma_m$	$\epsilon_{rw}$	$\sigma_w$
<b>ASAMI[95]</b>	49.8	0.19	9.5	5e-8	74	0.68
<b>MIETCHEN[102]</b>	50	0.5	8	1e-6	77	7e-3
<b>SUEHIRO[103]</b>	60	0.19	10	5e-8	60	0.5
<b>SANCHÍS[97]</b>	70	0.07	10	<1.5e-7	60	0.5
<b>CASTELLARNAU[98]</b>	49.8	0.48	9.8	259e-6	78	58e-3

Tabla 4: comparación de los valores de los parámetros dieléctricos obtenidos por diferentes autores para el modelo de elipsoide alargado con 2 paredes, ajustado para *E.coli* Unidades:  $\sigma_c$  (S/m),  $\sigma_m$  (1e-6 S/m),  $\sigma_w$  (1e-3S/m)

En el Capítulo 3 se muestra la modelización realizada y los resultados obtenidos a través de ella, que han permitido diseñar los experimentos para analizar los efectos de los campos eléctricos en las bacterias.

## 4. USOS BIOTECNOLÓGICOS DE LOS CAMPOS ELÉCTRICOS

Los campos electromagnéticos se han utilizado desde hace décadas para interactuar con las células. Una de las aplicaciones en las que se hace un uso más extensivo es en los dispositivos conocidos como Lab-On-a-Chip. Estos dispositivos utilizan campos que van desde DC hasta GHz, y con intensidades de campo desde 0,1 V/cm a 1 K/cm y se utilizan para actuar sobre las cargas celulares (electroforesis), polarización (dielectroforesis) o sobre el fluido circundante (electroósmosis) [29]

---

### A. ELECTROFORESIS

---

La electroforesis es el movimiento de una partícula cargada en un campo eléctrico. En el ámbito tecnológico, se define como una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

La electroforesis se usa en una gran mayoría en la materia del ADN recombinante ya que nos permite saber la carga que poseen los polipéptidos, y separar los diferentes polipéptidos resultantes de las variaciones del experimento del ADN recombinante. La variante de uso más común para el análisis de mezclas de proteínas o de ácidos nucleicos utiliza como soporte un gel, habitualmente de agarosa o de poliacrilamida. Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan al unirse con sustancias como el SDS (detergente) que incorpora cargas negativas de una manera dependiente de la masa molecular de la proteína. Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando

por la malla del gel (una red tridimensional de fibras cruzadas), por lo que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

## B. DIELECTROFORESIS

La dielectroforesis (DEP) es una herramienta muy valiosa para manipular y caracterizar suspensiones de células y células individuales en dispositivos microfluídicos.

La DEP se basa en las fuerzas de polarización que actúan en partículas dieléctricas, que se producen por la aplicación de campos eléctricos alternos. Estos campos inducen una distribución de cargas en las intercaras de las células biológicas. Las contribuciones dominantes se producen típicamente en la membrana celular. Como resultado, la célula experimenta una fuerza en un campo no homogéneo, cuya dirección está determinada por el signo del contraste dieléctrico entre el medio y la célula. Si la polarizabilidad del medio es mayor que la de las células, las partículas experimentan una fuerza que las atrae a los mínimos de campo (DEP negativa o n-DEP). Por el contrario, las partículas pueden ser empujadas a los máximos de campo, hacia los electrodos, hablamos entonces de DEP positiva o p-DEP.

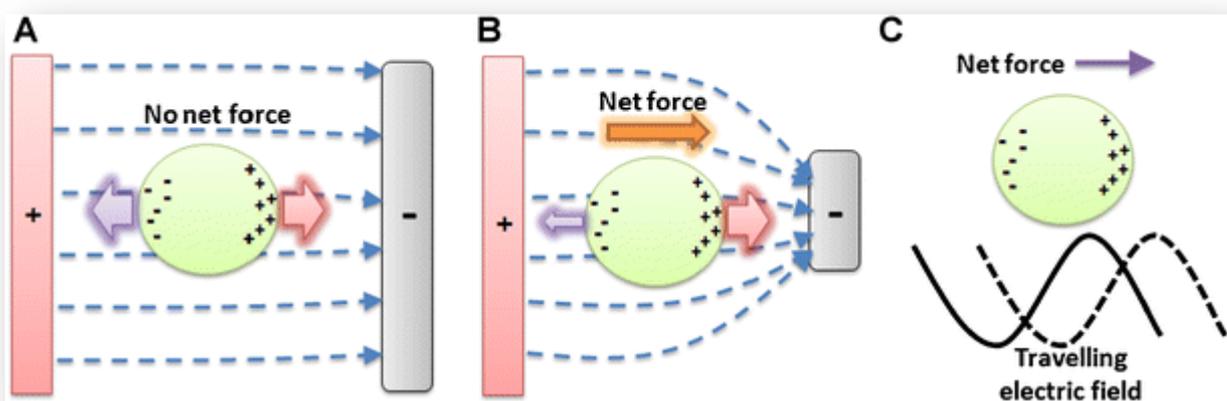
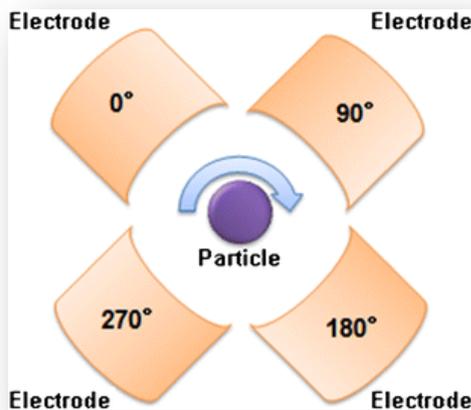


Fig 2.7. – Esquema de la definición de Dielectroforesis según [104]. En A), la partícula experimenta una fuerza neta nula mientras está suspendida en un campo eléctrico uniforme. En B), la partícula experimenta una fuerza dielectroforética neta debido a la magnitud del gradiente del campo eléctrico. En C), la partícula experimenta una fuerza dielectroforética debido al gradiente de fase del campo eléctrico.

De lejos, el mayor esfuerzo de aplicación de la DEP ha estado directamente enfocado a las ciencias biomédicas y biotecnológicas [35]. Los primeros estudios estaban dirigidos a entender cómo las células responden a las fuerzas dielectroforéticas, y cómo ello podía llevar a un mayor entendimiento de sus propiedades fisicoquímicas. Actualmente, el esfuerzo está dirigido a aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, especialmente en temas como la separación y clasificación, atrapamiento, purificación y caracterización [104]. A modo de ejemplo, y sin pretender hacer un examen exhaustivo, se comentan a continuación alguna de las aplicaciones principales de la DEP en biotecnología.

## ATRAPAMIENTO

Muchos de los dispositivos desarrollados para este efecto trabajan con condiciones de n-DEP y se han diseñado para estudios sobre células únicas.



*Fig 2.8: Una partícula suspendida entre 4 electrodos que forman un campo eléctrico rotante creado por 4 señales eléctricas con 90° de diferencia.*

Tienen la ventaja sobre otros sistemas de que no producen contacto con las células. El enfoque clásico es el de 4 electrodos planares que definen un espacio entre ellos, una estructura cuatripolar con polarización a 90°C de desfase entre un electrodo y su inmediato vecino [105].

La evolución de este diseño permite hacerlo en estructuras tridimensionales mediante el uso de planos de electrodos, o el uso de postes cuatripolares [106][107]. La principal dificultad de esta configuración es que a bajas frecuencias se produce electrolisis y formación de burbujas en la superficie del electrodo. La i-DEP (insulator-based DEP) de Cummings and Singh [108] usa postes aislantes para generar campos no uniformes en una cámara con electrodos externos. Los postes crean regiones con intensidades de campo altas y otras con intensidades de campo bajas. Entre otras aplicaciones, Lapisco-Encinas lo usó

para desarrollar un concentrador y separador de bacterias patógenas en agua [109].

## CLASIFICACIÓN Y SEPARACIÓN

También se puede usar DEP para separar entre células y objetos similares basándose en las propiedades dieléctricas propias de cada objeto. Como la magnitud y la dirección de la fuerza dielectroforética depende de las propiedades de las partículas, DEP es ideal para separar partículas entre poblaciones homogéneas. La forma más sencilla es la separación por flujo. Una mezcla de partículas se introduce en la cámara de separación, en la que hay un *array* de electrodos en la base de la cámara. Los electrodos están polarizados de manera que produzcan p-DEP sobre una de las partículas y n-DEP sobre la otra. De este modo, al pasar una suspensión sobre ellos, unas partículas serán atraídas y atrapadas sobre los electrodos, mientras que las otras serán repelidas hacia el centro de la cámara y empujadas por el flujo hacia la salida, donde estas partículas serán recogidas. Cuando ya se han recogido todas estas partículas, se quita el campo eléctrico y las partículas que habían sido atrapadas son liberadas. El flujo las empujará hacia la salida, donde serán recogidas en un segundo recipiente. Estos separadores de flujo se han demostrado efectivos en la separación de células de cáncer [110], cultivos celulares [111] y levaduras [112].

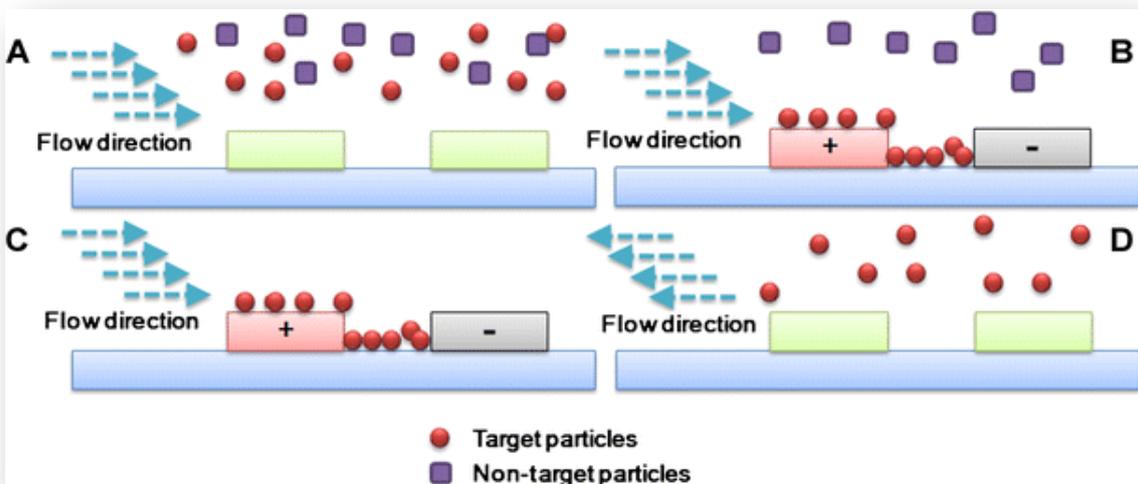


Fig. 2.9: Separación de partículas a través de atrapamiento y liberación de partículas basada en DEP [104].

Un paso más hacia la complejidad es el Fraccionamiento *en Flujo con Campo* (FFF). Al aplicar n-DEP contra gravedad, las partículas son levitadas a diferentes alturas sobre la superficie según sus propiedades físicas y dieléctricas, y pueden viajar a diferentes velocidades dependiendo de la interacción entre estas propiedades y las condiciones impuestas por la gravedad y la fuerza dielectroforética. Una población heterogénea de partículas se podrá fraccionar en diferentes subpoblaciones que aparecerán a diferentes tiempos [113], [114].

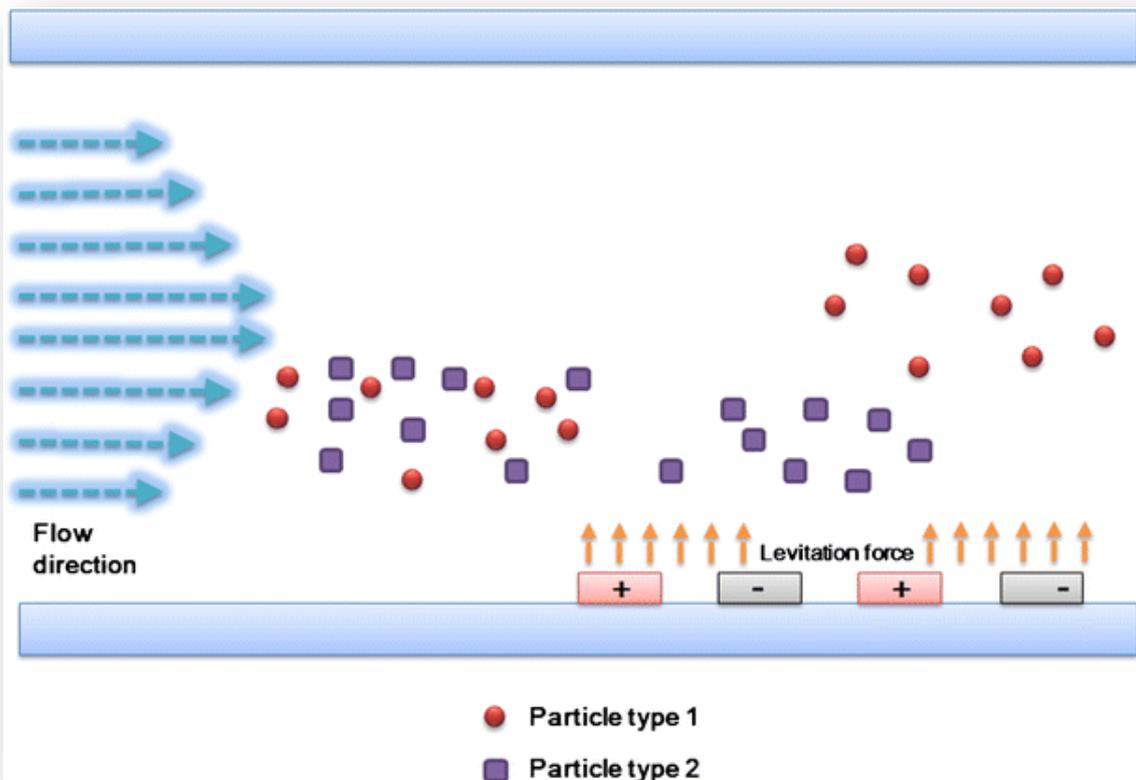


Fig 2.10: Separación de partículas por FFF [104]

También se pueden dirigir las partículas utilizando estructuras biplanares que definen un espacio 3D.

Aprovechando que los fenómenos producidos por DEP y electro-rotación son altamente dependientes de las características dieléctricas de las células, nos permite separar unas células de otras de manera sencilla.

## CARACTERIZACIÓN

Además de para manipular, los sistemas de dielectroforesis se pueden utilizar para caracterizar las células. En realidad, como se ha comentado anteriormente, en sus orígenes Pohl utilizaba la DEP para medir los campos eléctricos endógenos de las células. Muchos otros autores han publicado aplicaciones de la DEP para la caracterización y la manipulación de partículas biológicas. En la tabla 5 se muestra un resumen [35]

BIOPARTÍCULA	AUTORES
<b>Células sanguíneas</b>	Pohl, Burt, Gascoyne, Becker, Huang, Chan, Yang, Minerick, Menachery, Pethig, Nascimento, Hashimoto, Cheng
<b>Células Madre</b>	Talary, Stephens, Vykoukal, Flanagan, Marx
<b>Neuronas</b>	Heida, Prasad, Jaber, Flanagan
<b>Células beta pancreáticas</b>	Pethig
<b>Bacterias y levaduras</b>	Phol, Price, Inoue, Aswncor, Urano, Marx, Kiljstra y Wal, Li y Bashir, Suehiro, Bessete, Lapizco-Encinas, Castellarnau, Cheng, Park y Beskok
<b>Apoptosis</b>	Wang, Labeed, Pethig, Talary
<b>Virus</b>	Schnelle, Müller, Gimsa, Morgan y Green, Hughes, Morgan, Kentsch, Akin, Lapizco-Encinas, Grom
<b>ADN</b>	Asbury y Engh, Washizu y Kurosawa, Yamamoto, Kawabata y Washizu, Asbury, Chou, Hölzel, Ying, Zhen, Bakewell y Morgan, Sung y Burns, Hoeb, Gagnon, Dalir, Swami, Lei, Cheng
<b>Cromosomas</b>	Prinz
<b>Proteínas</b>	Washizu, Zheng, Clarke

*Tabla 5: resumen de caracterización y manipulación de partículas biológicas mediante DEP [35].*

## MANIPULACIÓN DE PARTÍCULAS ORGÁNICAS

La DEP es de gran utilidad a la hora de manipular partículas orgánicas como células, fragmentos de ADN, proteínas y virus. La manipulación de células es especialmente importante en el caso del estudio de enfermedades de la sangre, porque las células sanguíneas se pueden manipular en sistemas

microfluídicos para simular su comportamiento real en situaciones particulares, como la agregación [114].

Las técnicas de DEP ofrecen características únicas para aplicaciones médicas. Por ejemplo, la separación de células de cáncer de células sanas permite una técnica no invasiva *label-free*<sup>4</sup> para diagnosticar cáncer [110]. Incluso hay estudios en los que se utiliza DEP para determinar el grupo sanguíneo [104].

Un estudio detallado de las diferentes técnicas utilizadas para manipular ADN, proteínas y partículas virales se puede encontrar en el review de Lapizco-Encinas [109].

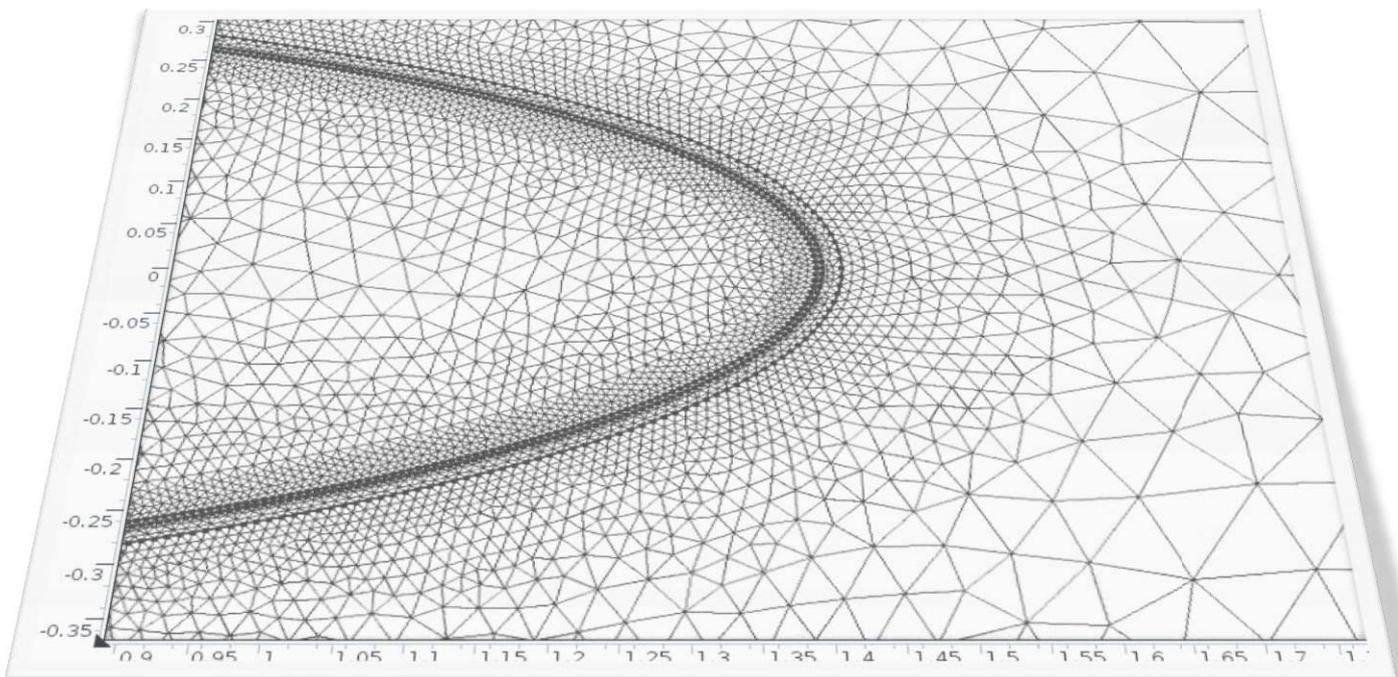
---

<sup>4</sup>Label-free, literalmente “sin etiqueta”, es un sistema que permite cuantificar sustancias biológicas sin necesidad de añadir moléculas que se unan de forma unívoca a una determinada proteína.



# Capítulo 3

## DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL *SET-UP* PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL CAMPO ELÉCTRICO



# 1. INTRODUCCIÓN

La primera cosa que hay que tener a la hora de estudiar el efecto de los campos eléctricos sobre las células es un dispositivo que permita dicho estudio. Es decir, necesitamos disponer de un sistema que nos permita introducir las células en una cámara con el medio adecuado para la experimentación y que disponga de las conexiones eléctricas para aplicar el campo eléctrico deseado. O lo que es lo mismo, necesitamos un dispositivo fluidoico con electrodos integrados y un control de todo el sistema. A todo este equipamiento es a lo que llamamos *set up*.

La fabricación de este tipo de dispositivos no resulta algo complicado teniendo en cuenta el estado del arte de la fabricación actual, especialmente a partir del desarrollo de la microtecnología basada en la litografía, que fabrica dispositivos con características funcionales de laboratorio en un único chip con apenas unos centímetros de tamaño con milímetros de grosor. Es el concepto del *Lab-On-a-Chip* (LOC), también llamados *Micro Total Analysis Systems* o microsistemas de análisis total. Al ser un campo especialmente dedicado a la miniaturización de sistemas de bombeo y manipulación fluidica, la microfluidica ofrece la posibilidad de aplicarse a los campos de la biología y la química. A medida que la escala de tamaño disminuye, los fundamentos de la física de fluidos cambian rápidamente. Por ejemplo, la gravedad pasa a ser habitualmente negligible mientras que la tensión superficial cobra un importante papel. La viscosidad y la inercia también suelen resultar negligible, pero aparece el efecto denominado de “doble capa”, relacionado con la variación del potencial eléctrico próximo a una superficie. En concreto, todos los procesos dominados por superficies (como la transferencia de calor) son especialmente susceptibles de utilizarse en este tipo de dispositivos, como las PCR<sup>5</sup>, que

---

<sup>5</sup> PolymeraseChainReaction, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987 por KaryMullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de

utilizan varios ciclos de temperaturas altas y bajas, y que ven en este tipo de sistemas la forma ideal de “huir” de la inercia térmica.

Las primeras aplicaciones de los dispositivos microfluídicos fueron la separación de partículas y de células con pequeñas diferencias de tamaño, lo cual atrajo un gran interés por parte de la química analítica. La principal ventaja es su pequeño tamaño. Para aplicaciones clínicas, reducir el tiempo es otra de las grandes ventajas. Menor tamaño significa menor volumen de muestras y de agentes químicos, y por tanto, reducción de costes y la posibilidad de aumentar el número de análisis a realizar dada una cantidad fija de reactivos químicos disponibles.

Al integrar los dispositivos microfluídicos con componentes electrónicas como circuitos, se pueden amplificar señales eléctricas de bajo nivel, como las emitidas por las neuronas, de forma que se detectan más fácilmente. El control de la geometría que permiten los sistemas de fabricación permite estructuras que producen la difusión de los componentes o el control de las interacciones célula a célula.

Examinando los datos de la bibliografía respecto a las aplicaciones de los microsistemas, se puede ver claramente que el mayor interés ha estado focalizado en la biología molecular y en la bioquímica. Hay muchas razones para ello. En primer lugar, el Proyecto Genoma Humano dio como resultado una gran necesidad de desarrollar tecnologías para secuenciar el ADN y analizar las transcripciones de ARN en las células. Ello llevó al desarrollo de la electroforesis capilar y su consiguiente miniaturización, y la fabricación de chips de ADN: Además, la biología molecular y la bioquímica no requiere trabajar con células vivas, que añade una gran complejidad. Por eso el trabajo a nivel celular con células vivas integradas en microsistemas hace menos tiempo que se está desarrollando en comparación con la investigación a nivel molecular y de aplicaciones microfluídicas. A medida que la nanotecnología progresa, la investigación a través de sistemas LOC se extiende también hacia nuevos

---

ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

ámbitos de aplicación, como la manipulación de nanopartículas como los nanotubos de carbón, proteínas, ADN y virus [54].

Los LOC se basan habitualmente en un sistema fluídico a base de canales y cámaras (habitualmente hecho con un polímero) y un circuito electrónico depositado sobre vidrio. Los métodos actuales de fabricación incluyen técnicas de prototipado (*hot embossing*, moldeo por inyección y litografía ligera), y técnicas de fabricación como la foto-ablación por laser, fotolitografía y litografía de rayos x.

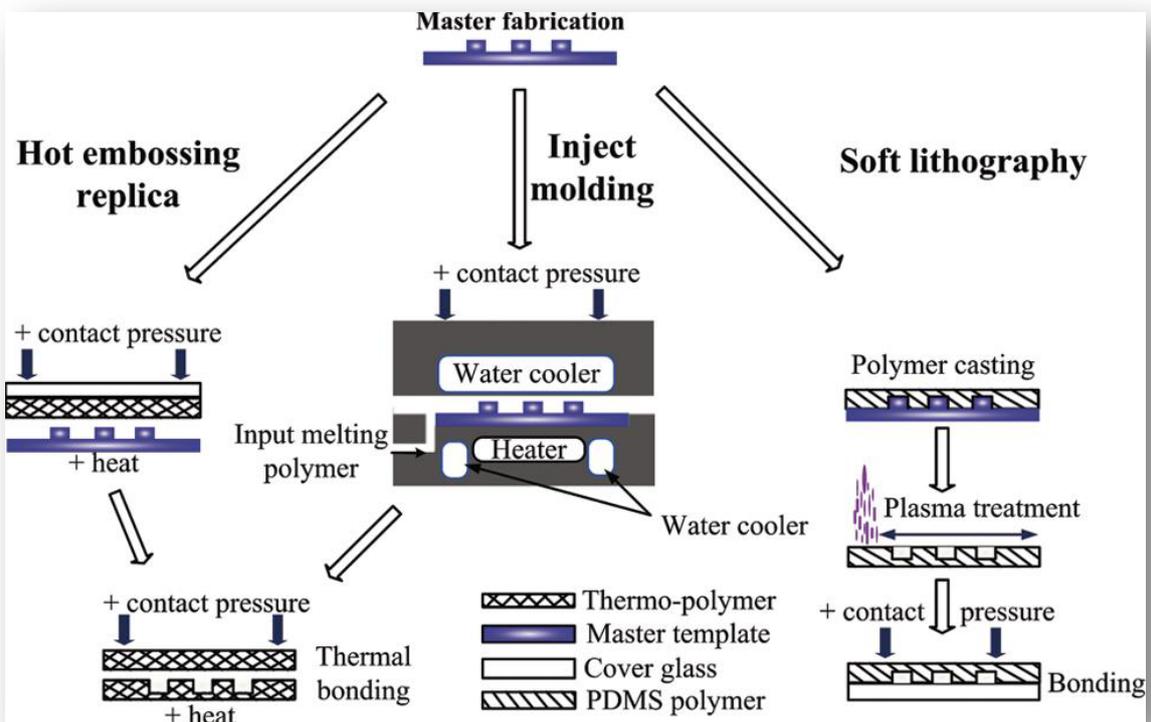


Fig. 3.1: Ilustración de los procedimientos de fabricación típicos por técnicas de prototipado (*hot embossing*, moldeo por inyección y litografía ligera [115]).

Las ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas están resumidas en esta tabla [115] :

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Hot Embossing</b>	Rentable, preciso, replicación rápida de microestructuras, producción masiva	Restringido a termoplásticos, dificultad para fabricar estructuras complejas 3D
<b>Moldeo por inyección</b>	Fácil de fabricar geometría compleja, características finas y geometría 3D, ciclo de tiempo corto, producción masiva, altamente automatizado	Restringido a termoplásticos, alto coste del molde, dificultad para hacer geometrías socavadas grandes
<b>Litografía ligera</b>	Rentable, útil para fabricar geometrías 3 D, alta resolución (pocos nm)	Patrón de deformación, vulnerable a defectos
<b>Fotoablación por laser</b>	Rápido, producción de gran formato	Sesiones con múltiples tratamientos, materiales limitados
<b>Fotolitografía convencional / óptica</b>	Alto rendimiento de obleas, ideal para características a microescala	Generalmente requiere una superficie plana para comenzar, y se necesita tratamiento químico posterior
<b>Litografía por Rayos X</b>	Alta resolución para fabricar nano-patrones, absorción sin dispersión espúrea, capaz de fabricar paredes grandes y de acabado fino	Dificultad para fabricar el master, requiere mucho tiempo, alto coste

*Tabla 6: resumen de las ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de fabricación microfluídica según [115].*

La fabricación comienza por la elección del polímero adecuado para el uso que se le va a dar.

---

## A. POLÍMEROS

---

Las técnicas de microfabricación se iniciaron con las tecnologías de la industria electrónica de semiconductores, basado en silicio o vidrio. Pero el desarrollo de las técnicas de fabricación basadas en polímeros ha cambiado el panorama, por la ventaja de la facilidad de fabricación, versatilidad de los materiales y buena biocompatibilidad. Además tienen la ventaja de ser más económicos y de existir un amplio rango de materiales a elegir en función de las características de cada aplicación, como puedan ser las propiedades ópticas, biocompatibilidad y propiedades mecánicas y ópticas. Otra razón importante por la que elegir los dispositivos basados en polímeros es la posibilidad de

realizar chips de un solo uso para aplicaciones clínicas y biomédicas, para lo cual se requiere un bajo coste de fabricación, alto volumen de producción, buena reproducibilidad y versatilidad en el diseño para un amplio rango de aplicaciones.

Los principales polímeros usados para realizar los sistemas fluidicos son:

- 1- **PDMS (Polidimetilsiloxano)**. Forma parte de los compuestos organosilíceos que habitualmente se denominan siliconas. Es el polímero orgánico más usado, y particularmente conocido por sus propiedades reológicas inusuales. Es un polímero ópticamente transparente, en general inerte, no tóxico y no inflamable. Tiene multitud de usos, desde lentes de contacto a champús, y es especialmente útil en los dispositivos LOC por su biocompatibilidad. Presenta hidrofobicidad superficial, aunque se puede alterar la superficie químicamente mediante la oxidación por plasma, y de esta forma se convierte en hidrofílico (lo que habitualmente es necesario para los dispositivos microfluidicos basados en flujos de soluciones acuosas). De esta manera se evita la adsorción de contaminantes superficiales. Las estructuras hechas con PDMS se pueden utilizar en combinación con agua o alcohol sin que haya deformaciones. Otros solventes de tipo orgánico pueden difundirse en el material, pero en el caso de dispositivos microfluidicos se considera que la deformación es negligible. Es muy habitual su uso también como “estampa” en la técnica conocida como *soft lithography*.
- 2- **PMMA (Polimetilmetacrilato)**. Es conocido como el “cristal acrílico” por su gran transparencia óptica. Tiene propiedades moderadas, es fácil de manipular y de procesar y relativamente económico. Su temperatura de transición es aproximadamente de 100°C (depende de la composición exacta). Permite procesos de moldeado por inyección, compresión y extrusión. Tiene una gran resistencia al impacto y unas propiedades ópticas similares a las del cristal. Es altamente biocompatible.
- 3- **COP (Cicle Olefin Polymer)**. Se ha hecho popular por sus propiedades, como la alta resistencia química, baja absorción de agua, excepcional transparencia óptica (incluido el ultravioleta cercano) y facilidad de fabricación. También es compatible con esterilización y por ello se ha

convertido en una excelente alternativa al vidrio en muchos productos médicos. Tiene una superficie inerte y permite una alta resolución en la replicación de detalles a escala nanométrica.

La técnica utilizada para fabricar dispositivos LOC suele constar de dos fases: En la primera se utiliza la fotolitografía para obtener los modelos geométricos deseados para el chip, tanto para los electrodos como para las cámaras fluidicas. En la segunda se fabrican las cámaras propiamente dichas a partir de un modelo maestro o molde.

---

## B. FOTOLITOGRAFÍA

---

La fotolitografía es un proceso empleado en la fabricación de dispositivos electrónicos. Consiste en transferir un patrón desde una fotomáscara a otra superficie, habitualmente silicio en forma cristalina, aunque también se puede utilizar otros materiales como el vidrio o los metales.

La técnica conocida como *soft lithography* (traducida a menudo como fotolitografía ligera) es una familia de técnicas de fabricación de estructuras que consiste en crear una estampa elástica que permita la transferencia de patrones geométricos de tamaño nano o micrométrico a otra superficie, habitualmente cristal, silicio o superficie poliméricas. Se llama "ligera" porque utiliza habitualmente materiales elastoméricos, casi siempre el PDMS [116].

La mayor parte de los procesos de litografía ligera se basan en las técnicas de fotolitografía. La resolución final depende en gran medida de la calidad de las máscaras utilizadas, así como del método que se haya utilizado para

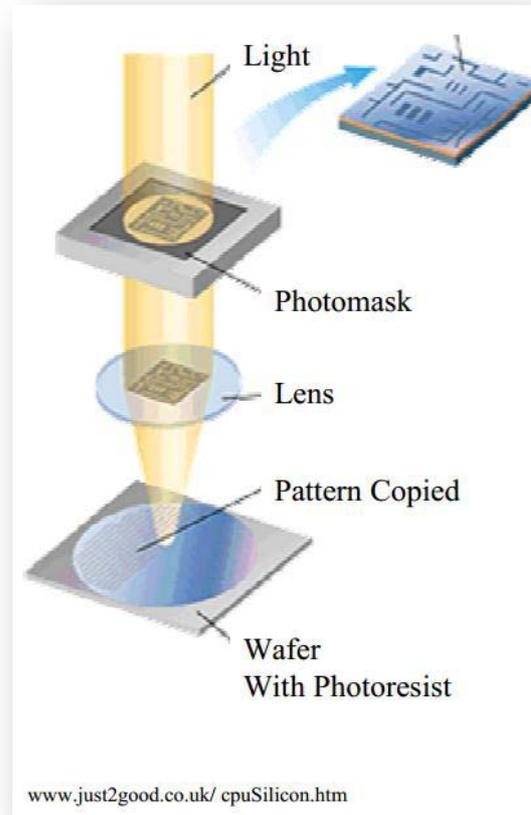


Fig 3.2: Esquema del funcionamiento de la fotolitografía.

implementarlo. Por debajo de los 100 nm se puede fabricar mediante capas de composite, y se puede llegar al orden de los 5 nm utilizando nanotubos de carbón como *masters*. El límite de resolución reportado es de unos 20 nm [115]

La base de funcionamiento es siempre la misma: la transferencia de un motivo geométrico a una superficie polimérica: Para ello, primero se prepara el sustrato, habitualmente una oblea de silicio o un vidrio portaobjetos. Después de limpiarlo adecuadamente se deposita una capa de polímero (PDMS, PMMA, etc). Se somete entonces a la exposición con luz UV a través de una fotomáscara, de modo que el patrón queda impreso en el polímero. La figura X ilustra este proceso. Dependiendo de si la resina es positiva o negativa, el proceso de revelado dejará sobre la superficie la estructura en positivo o en negativo. Posteriormente esta estructura se utilizará para hacer moldes para obtener cámaras microfluídicas o para fabricar los electrodos.

La diferencia entre fotorresinas negativas y positivas se puede ver claramente en el siguiente esquema:

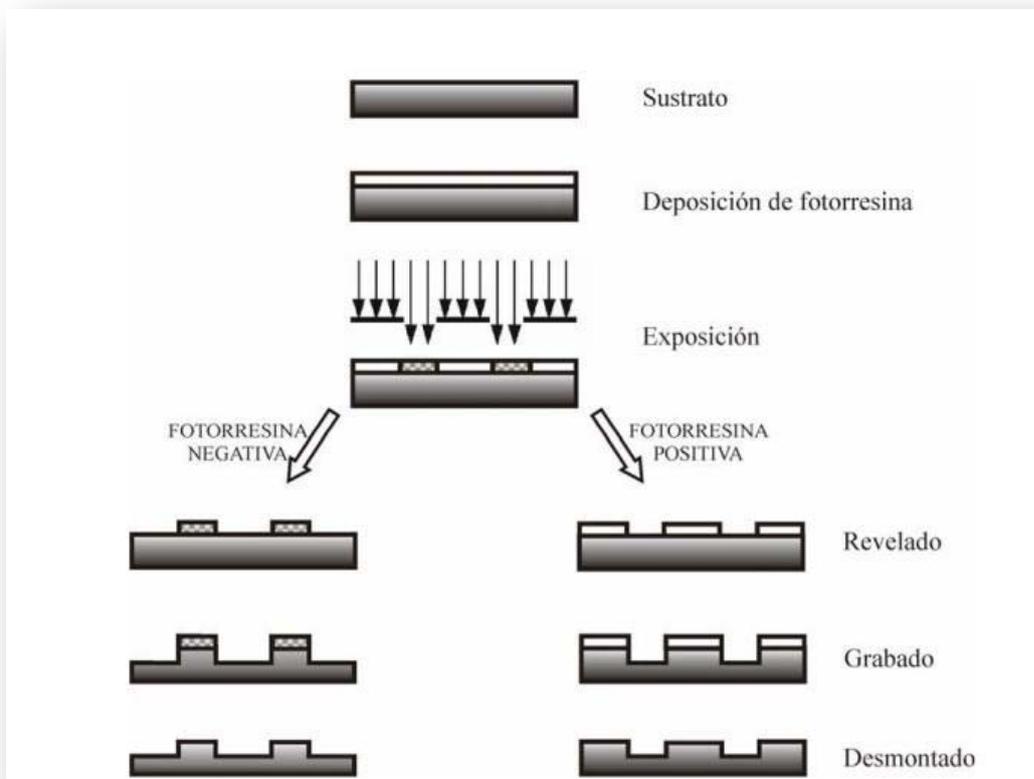


Fig. 3.3: Ilustración de la diferencia entre una fotorresina negativa y una positiva [117].

Tal y como se puede apreciar, en las fotoresinas positivas, las áreas expuestas son eliminadas durante el revelado. En las fotoresinas negativas, las áreas no expuestas son las eliminadas en el proceso de revelado.

---

## FABRICACIÓN DE ELECTRODOS

---

En el caso de los electrodos, se utilizan fotoresinas negativas. Una vez depositada la fotoresina y sometida a la fotolitografía, el revelado nos permitirá tener una superficie totalmente recubierta de resina excepto en las partes donde se debe depositar el metal. Posteriormente esta superficie es metalizada. El último paso (*lift-off*) consiste en eliminar la resina, que se llevará con ella la parte de metal que no sirve para los electrodos, dejando el motivo de los electrodos perfectamente impreso sobre la superficie original. Este proceso se representa en el gráfico siguiente:

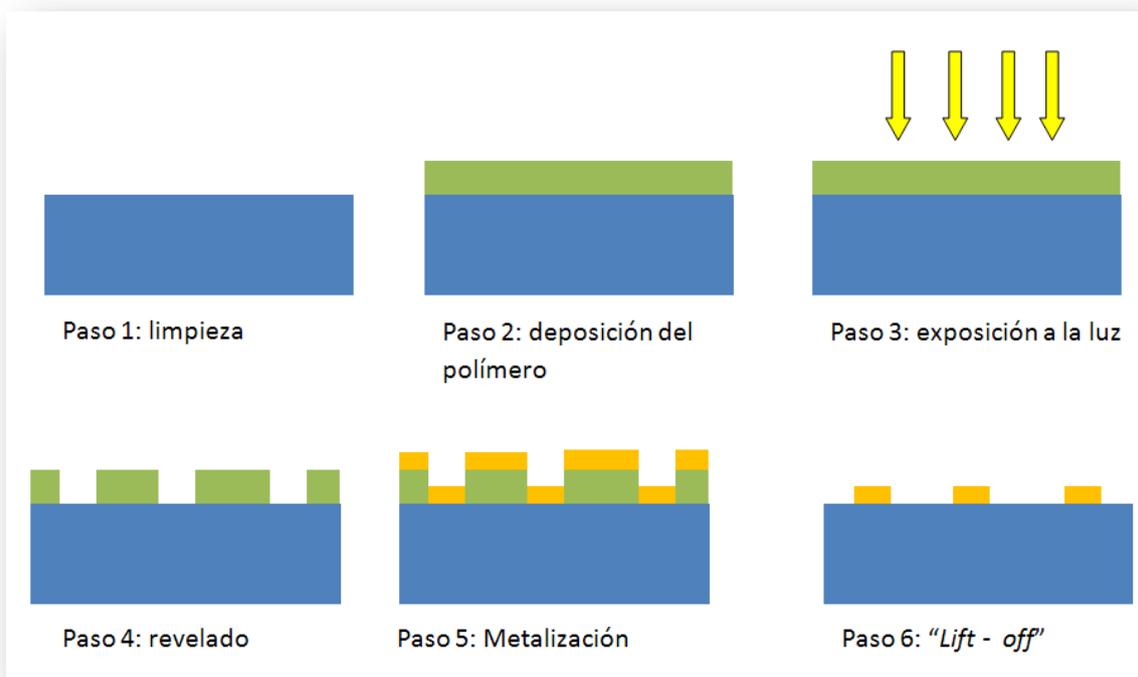


Fig 3.4: Representación esquemática del proceso de fabricación de electrodos.

---

## MASTER Y RÉPLICAS DE LAS CÁMARAS

---

La obtención de las cámaras con canales microfluídicas se realiza a menudo por el procedimiento de máster-réplica. Consiste en obtener un molde negativo

de la estructura que deseamos obtener y posteriormente utilizar este molde para obtener las cámaras o las estampas deseadas, tal y como se esquematiza en el dibujo siguiente [115]:

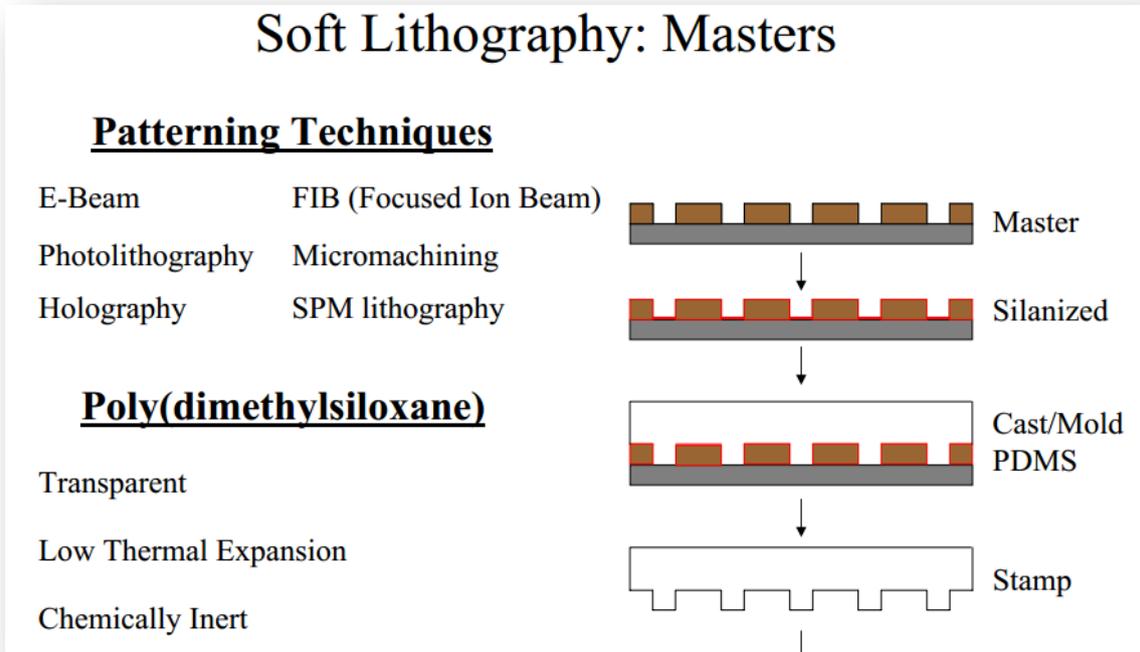


Fig 3.5: Representación esquemática de la obtención de máster de cámara microfluídica. Imagen modificada de [118]

Esta técnica permite utilizar los moldes varias veces para obtener diferentes cámaras o estampas que puedan ser utilizadas.

En determinadas circunstancias, las réplicas pueden ser producidas por *Hot Embossing*. Se trata de una tecnología que permite fabricar microestructuras con alta precisión y gran calidad. Para ello utiliza una herramienta de moldeo en la cual el molde se presiona en vacío en un polímero a una temperatura por encima de su temperatura de transición vítrea. De este modo, al enfriarse, el polímero queda con la estructura geométrica deseada.

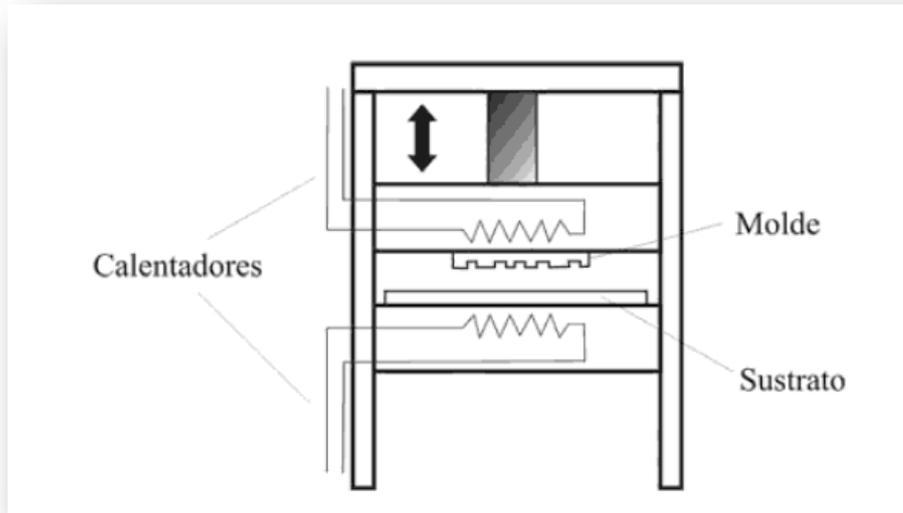


Fig 3.6: Esquema del dispositivo experimental para el estampado del patrón del molde mediante la técnica denominada hot embossing [117]

## 2. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL DISEÑO DE LOS CHIPS

A lo largo de la experimentación se han realizado principalmente dos modelos de chip, que difieren en el sistema de fabricación y los materiales utilizados, aunque no en la geometría.

---

### A. DISEÑO DE LA GEOMETRÍA DEL CHIP

---

El estudio a realizar requiere disponer de un chip con las siguientes características:

- 1- Suficiente distancia entre los electrodos para permitir una intensidad de campo adecuada para ver efectos en las bacterias.
- 2- Suficiente volumen para poder realizar muestras de expresión proteómica y, llegado el caso, expresión genómica.
- 3- Fabricable de manera repetible y flexible.

Las condiciones 1 y 2 son aparentemente excluyentes, puesto que para conseguir una intensidad de campo suficientemente elevada es necesario disminuir la distancia entre electrodos, lo cual disminuye también el volumen disponible. Por ello, se opta por hacer una cámara relativamente grande de modo que se pueda optimizar el espacio disponible en superficie.

El chip tiene un diseño tipo “sándwich” con una cámara fluidica entre dos electrodos. Las entradas y salidas disponen de un conector tipo *up-church* con un tubo de FEP de conectado a una bomba microfluidica, tal y como se ve en el esquema siguiente:

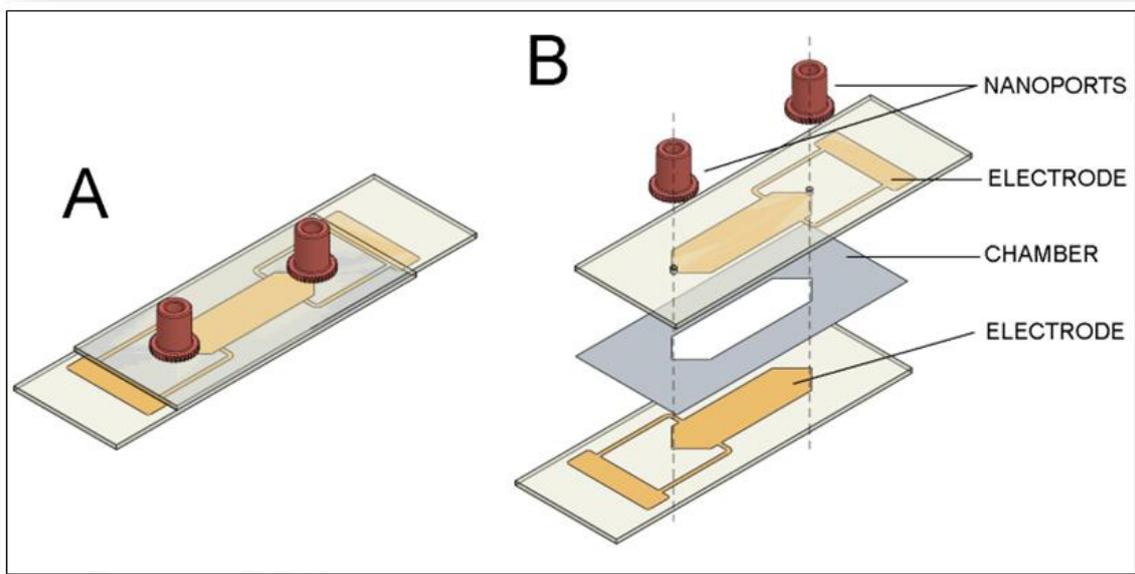


Fig 3.7: Diseño de los chips de oro. A) chip ya montado. B) Despiece.

El diseño se ha realizado en AutoCAD, con la siguiente geometría:

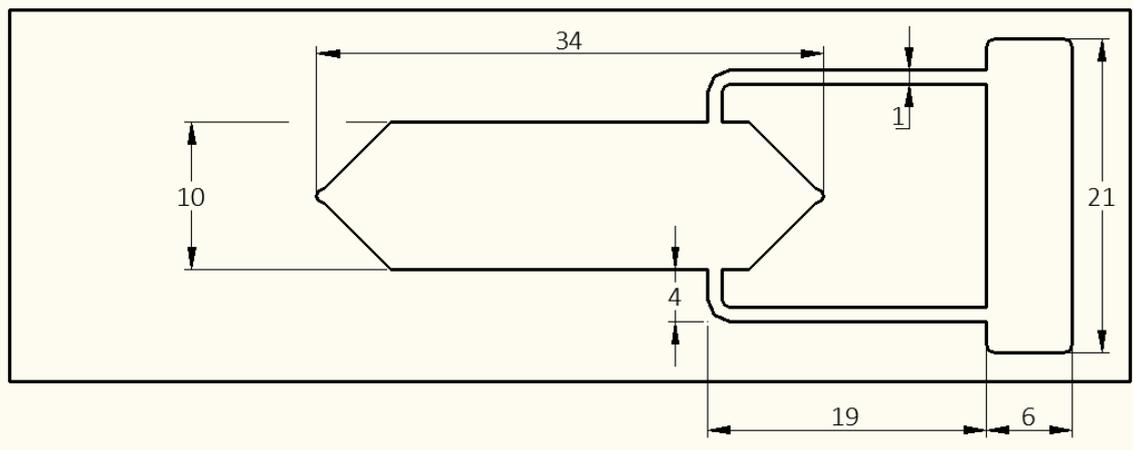


Fig 3.8: Detalle de la geometría y dimensiones de los electrodos.

El espacio correspondiente a la cámara fluidica es de aproximadamente 2.5 cm<sup>2</sup>, con el siguiente diseño:

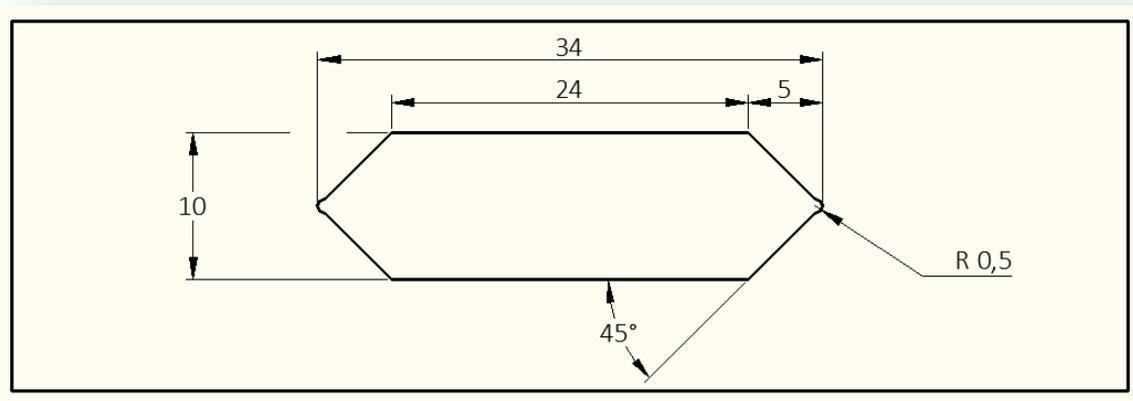


Fig. 3.9: Detalle de la geometría y las dimensiones de la cámara fluidica diseñada.

Este diseño permite una dinámica fluidica adecuada para la aplicación.

## B. FABRICACIÓN DE CHIPS DE ORO

Las máscaras para los electrodos se han impreso en láminas de poliestireno con resolución de 20.000 dpi.

Para fabricar los electrodos se utiliza el sistema de fotolitografía. Para ello se toman portaobjetos de cristal de laboratorio (Deltalab™) y se limpian por un

proceso de baños químicos, en el que primero se sonica durante 5 minutos con acetona, posteriormente con isopropanol y finalmente con etanol. Se seca con nitrógeno y se someten al Plasma Cleaning (PDC-002, Harrick Scientific Corporation - Ithaca) durante 15 minutos a media potencia. Una vez limpio, cada portaobjetos se cubre con una capa de fotoresina negativa AZ1512. Para darle el grosor adecuado y distribuir homogéneamente la fotoresina, hace rotar el vidrio horizontalmente en un proceso de centrifugado en dos fases: una fase “lenta” a 500 rpm durante 5 segundos y posteriormente una “rápida” a 4000 rpm durante 30 segundos. Una vez terminado, se coloca encima de una placa caliente a 95°C durante 1 minuto. Para transferir el patrón de los electrodos a esta superficie se utiliza la exposición a fotolitografía con luz ultravioleta a través de la máscara de poliestireno que contiene el diseño. Se somete durante 5 segundos a la luz ultravioleta a 200 W y 21,7 mW/ cm<sup>2</sup>. El paso siguiente es el revelado: se somete el vidrio durante 10 segundos al revelador AZ 726 MF Developer. De esta manera, conseguimos que el cristal contenga la información del electrodo de la siguiente manera: el dibujo que debe quedar cubierto de oro está completamente limpio sobre el cristal. El resto de portaobjetos, lo que no debe ser cubierto de oro, está recubierto de la fotoresina.

A continuación, se depositan 20nm de Titanio y 80 nm de oro por la técnica de *e-beam* (este paso está subcontratado a una empresa externa). Posteriormente se quita la fotoresina con el oro para dejar el patrón de los electrodos totalmente limpio sobre el portaobjetos. Este proceso se denomina habitualmente *lift-off* y consiste en sumergir el electrodo en una placa de Petri y cubrirlo con el AZ100 Remover, sonicando durante 5 minutos aproximadamente. Se confirma mediante inspección visual con el microscopio que la superficie está totalmente limpia de resina. Todos los productos AZ se adquieren en MicroChemicals.

El segundo elemento de los chips es la cámara. En un principio se comenzó diseñando una cámara de PDMS, centrifugando el polímero sobre un portaobjetos de vidrio en dos fases para conseguir el grosor deseado de 40 µm. La cámara se cortaba con un bisturí al tamaño deseado y se procedía al *bonding* o unión de los 3 elementos (la cámara entre los dos electrodos). Se

utilizaron diferentes estrategias para conseguir la unión: activación por plasma con diferentes valores de exposición, centrifugar sobre COP en lugar de sobre vidrio, diferentes curados del polímero, incluso la utilización del Hot Embossing para aplicar una fuerza homogénea y controlada sobre las tres superficies a adherir. Sin embargo, ninguno de los sistemas probados fue capaz de proporcionar resultados repetibles en los que hubiera fiabilidad del sellado de la cámara del chip. Además, muchos de los electrodos acababan rompiéndose por la fuerza aplicada y el corte de la cámara mediante bisturí era poco preciso. De los que se conseguían, el análisis de impedancia arrojaba valores muy poco constantes. Por tanto, se buscó otra alternativa.

La solución definitiva es el uso de un adhesivo de doble capa. Se consiguió un adhesivo de alta fiabilidad de nombre comercial SCAPA 43023 a través de la empresa TTSL. Es un adhesivo que habitualmente se utiliza en imprenta, de alta adhesión transcurridas 24h de su aplicación. Hay disponibilidad de grosores de 40 $\mu$ m, 70 $\mu$ m, 100 $\mu$ m y 200 $\mu$ m, lo cual permitió además hacer diferentes versiones del mismo chip, de modo que experimentalmente podríamos jugar con los diferentes parámetros eléctricos con mayor facilidad. Con estos grosores se pueden conseguir volúmenes de 60  $\mu$ L para la cámara de 200  $\mu$ m, y volúmenes proporcionalmente inferiores para los otros grosores. Esta cámara se corta automáticamente con un plotter-cortador (cutting plotter Graphtec – Craft ROBO-Pro), que permite máxima precisión en la obtención de la misma y, por tanto, máxima repetitibilidad en los volúmenes de trabajo.

La cámara va adherida entre dos electrodos. A uno de ellos hay que realizarle previamente dos agujeros mediante un taladro DREMEL 398 con punta de diamante de 0,9 mm. A estos agujeros se adhieren mediante resina epoxi los conectores tipo *up church* que se utilizarán como elementos de entrada y salida del fluido.

Los cables son soldados con pintura de plata y sellada la soldadura con resina epoxi para proteger de los esfuerzos mecánicos y del agua, así como para aislarlos eléctricamente.

---

## C. FABRICACIÓN DE CHIPS DE ITO

---

Se ha realizado otra versión del mismo chip utilizando electrodos de ITO (Indium Tin Oxide). La razón es que el ITO es un material totalmente transparente que permite la observación directa de lo que está ocurriendo en el interior de la cámara. El ITO se puede comprar ya depositado sobre vidrios de laboratorio (Aldrich 576352). Originalmente se realizaron los electrodos en ITO mediante el proceso de *wet-etching*, a través del cual se dibujaban los electrodos y se eliminaba del vidrio la parte de ITO que no correspondía al diseño de los mismos. Posteriormente se vio que tal proceso no era necesario, puesto que al colocar la cámara adhesiva, ésta ya permitía delimitar la superficie conductora con la geometría deseada.

Por tanto, los electrodos consisten en un vidrio de laboratorio recubierto de ITO. La cámara se fabrica de la misma manera que en el chip anterior, cortándola con precisión con el plotter.

A la mitad de los electrodos se les realiza un agujero con el taladro DREMEL de 0,9mm y se le acopla con resina epoxi el conector *up church* que permite acoplar la fluídica. No se requiere presión especial para conseguir la máxima adherencia en el chip. Los cables se sueldan con pintura de plata y se recubren con resina epoxi. En este caso es especialmente importante asegurarse de que no queda ningún rincón del cristal con el ITO depositado al aire, puesto que eso generaría artefactos.

El resultado final de los chips se puede ver en la siguiente foto:

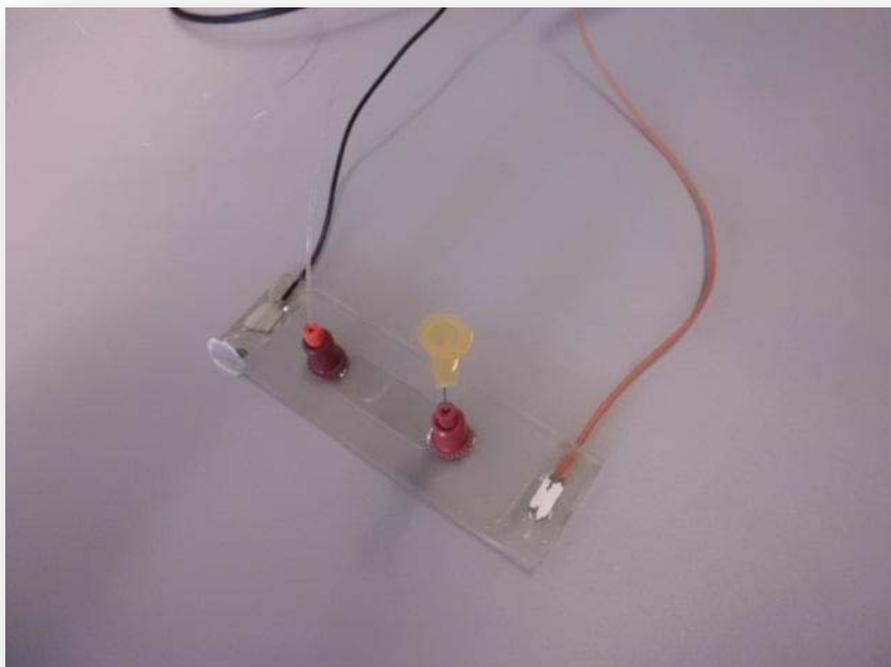


Fig 3.10: Fotografía del aspecto final del chip de ITO

---

## D. CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS CHIPS

---

Una vez terminados los chips son sometidos a pruebas fluídicas y eléctricas:

---

### PRUEBAS FLUÍDICAS

---

Para las pruebas fluídicas se utiliza básicamente fluoresceína para comprobar los siguientes puntos:

- **estanqueidad:** mediante el uso de fluoresceína, se observa si hay algún tipo de pérdidas en el chip, a causa de un mal sellado del mismo.
- **fluídica:** se procede al llenado y vaciado del chip, observando (cuando es posible) si se produce de forma adecuada, sin la formación de burbujas. Se miden los volúmenes recuperados y se comparan con el volumen teórico para establecer el error procedimental. Se utiliza una microbomba (Harvard Apparatus PHD2000) y se compara con el llenado manual. Se define la mejor velocidad de llenado en 120  $\mu\text{l}/\text{min}$  y se establece el mejor protocolo de llenado (empujar con el fluido por un orificio) y vaciado (absorberlo por el

otro). Se observa que el llenado y vaciado manual no supone una pérdida de eficacia ni precisión fluidica.

- **Escalado de los volúmenes.** Al disponer de diferentes grosores de adhesivo de doble cara, es posible realizar chips con diferentes volúmenes. Se confirma que el volumen recuperado en cada chip es el que corresponde según el grosor de la cámara utilizada.

---

## PRUEBAS ELÉCTRICAS

---

Se utiliza un analizador de impedancia para caracterizar y validar los chips.

Para ello, se estudia la impedancia de cada chip en vacío, para confirmar que la estructura es correcta. La imagen que debe obtenerse es la de un condensador, como muestra la figura, en la que se representan superpuestos los resultados del análisis de 7 chips diferentes, todos ellos en vacío:

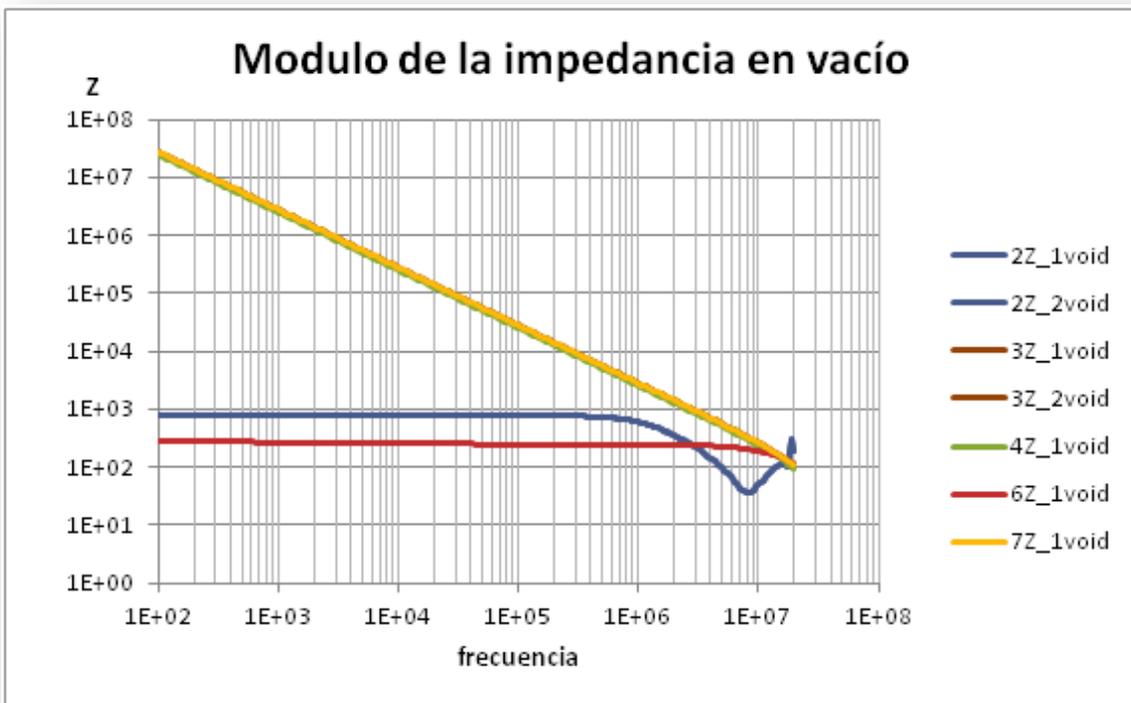


Fig 3.11: Gráfica obtenida del análisis de la impedancia de diferentes chips vacíos.

En este ejemplo, los chips 1 y 6 son descartados por que no cumplen las especificaciones.

Posteriormente, los chips son llenados con una solución de agua miliQ con la conductividad ajustada a  $20 \mu\text{S}/\text{cm}$  mediante la adición de microlitros de NaCl. De esta manera se establece el valor nominal de la impedancia y se estudia su variación a través de la frecuencia. Una gráfica ejemplo para los chips de oro es la siguiente:

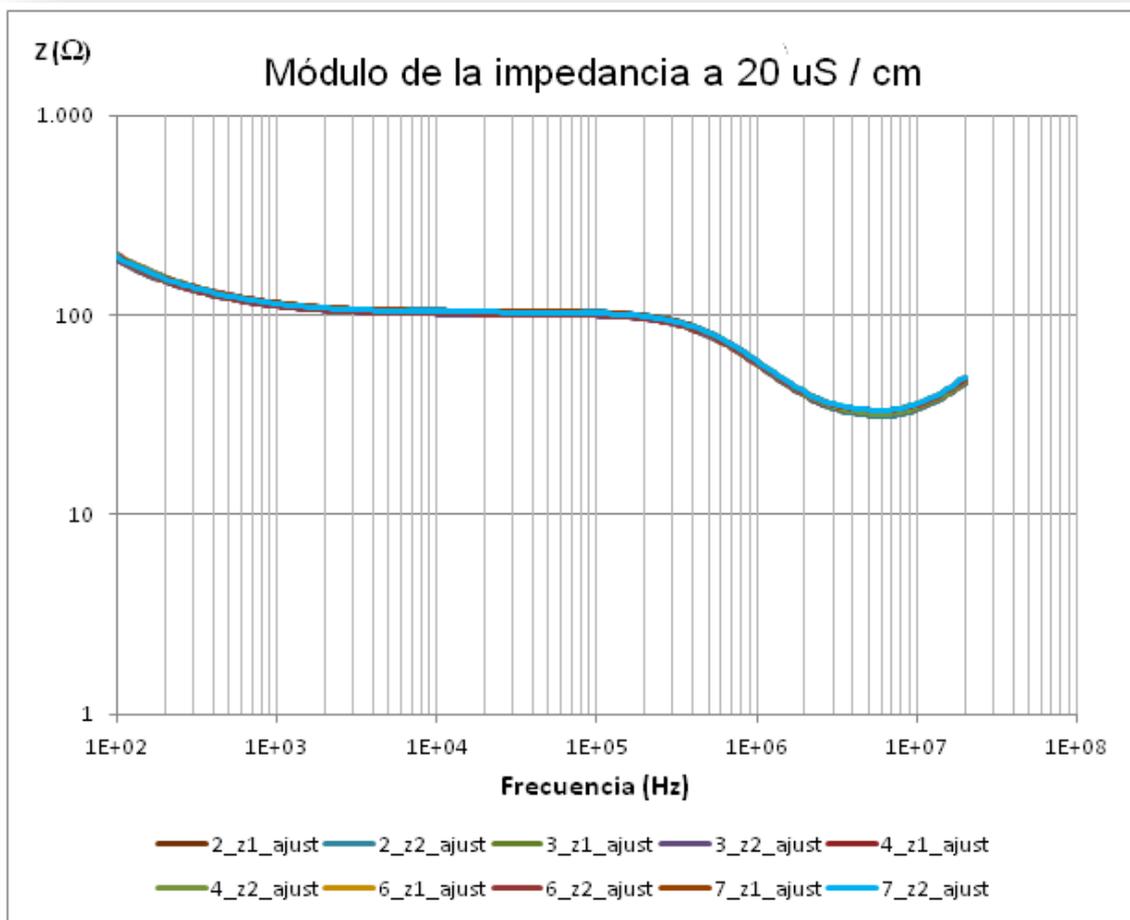


Fig 3.12: Gráfica obtenida por análisis de la impedancia de 10 chips llenos de una solución ajustada a  $20 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Nótese que todas las curvas están solapadas, indicando idéntico comportamiento.

La validación fluidica se realiza únicamente después de la fabricación, pero la validación eléctrica se va controlando periódicamente para asegurarnos de que los chips utilizados tienen siempre las mismas características eléctricas.

### 3. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS

El estudio sobre las bacterias consiste en aplicar un campo eléctrico a una población en un chip y valorar la contribución (en la medida de lo posible) de los diferentes parámetros a la viabilidad. Para ello, es crucial la elección de los parámetros a aplicar, que son básicamente:

- 1- Intensidad de campo eléctrico(E)
- 2- Intensidad de corriente eléctrica (I)
- 3- Frecuencia (F)
- 4- Tiempo (t)
- 5- Concentración (C)
- 6- Temperatura (T)

Como se puede observar, se eligen tres magnitudes eléctricas (E, I, F) y tres magnitudes no eléctricas (t, C, T) de las que, como hemos visto, hay evidencia de que afectan a la hora de aplicar los campos eléctricos. Como estudiar todas las posibles combinaciones entre ellos es prácticamente imposible, la elección de los parámetros que se consideran más interesantes se ha realizado a través de un estudio de modelización y de la confirmación experimental de su validez.

---

#### A. MODELIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CAMPO ELÉCTRICO APLICADO EN UN MEDIO CONDUCTOR EN PRESENCIA DE CÉLULAS BACTERIANAS

---

Como se ha comentado en la introducción, el modelado de células y los campos aplicados es algo habitual en el entorno biotecnológico, puesto que proporciona una información valiosa que, aun siendo teórica, se suele acercar bastante a la realidad.

El modelo escogido para realizar una simulación es el de Asami [95], por ser el más citado en la bibliografía y estar extensamente explicado y justificado [119]. Es un modelo realista, en el que se tiene en cuenta la heterogeneidad de los valores de tamaño de las células en suspensión y que permite predecir la dependencia en frecuencia de la constante dieléctrica y la conductividad.

El autor explica en su trabajo que ha determinado el tamaño de la célula a partir de 250 células usando un microscopio de contraste de fase. Las células parecen bastones o elipsoides alargadas (como un balón de rugby) que miden entre 1,2 y 5,2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,6-0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Muestran una distribución de longitud de forma normal, cuya media equivale a una longitud de 2,79  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 0,68  $\mu\text{m}$ . Las células utilizadas son *E. coli* (K38) pero la diferencia entre ambas cepas no es importante en cuanto a las características dimensionales de las células.

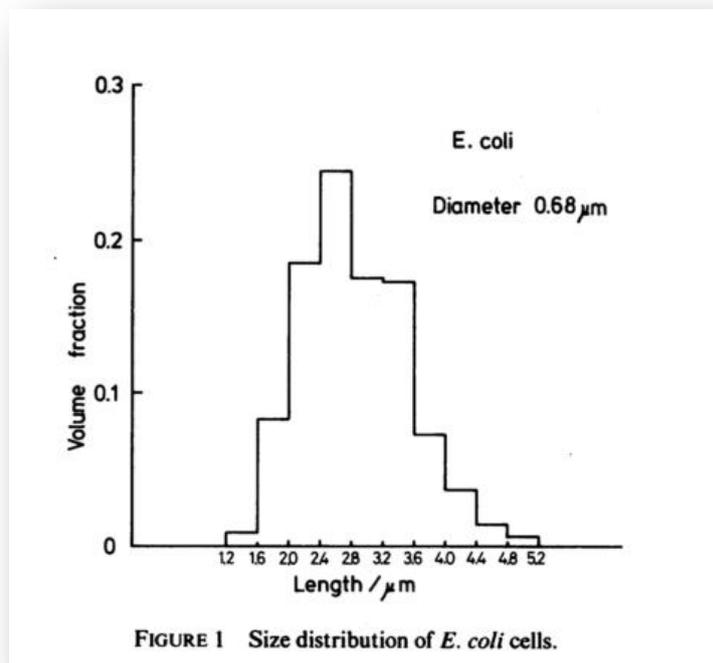


Fig 3.13: Distribución de tamaños de las células *E. coli* según [95]

El coste computacional de un modelo tridimensional es muy alto, y más cuando las dimensiones varían en 3 órdenes de magnitud, como es el caso. Por ello, se ha optado por hacer un modelo bidimensional. En la figura 3.14 se muestra el modelo geométrico utilizado.

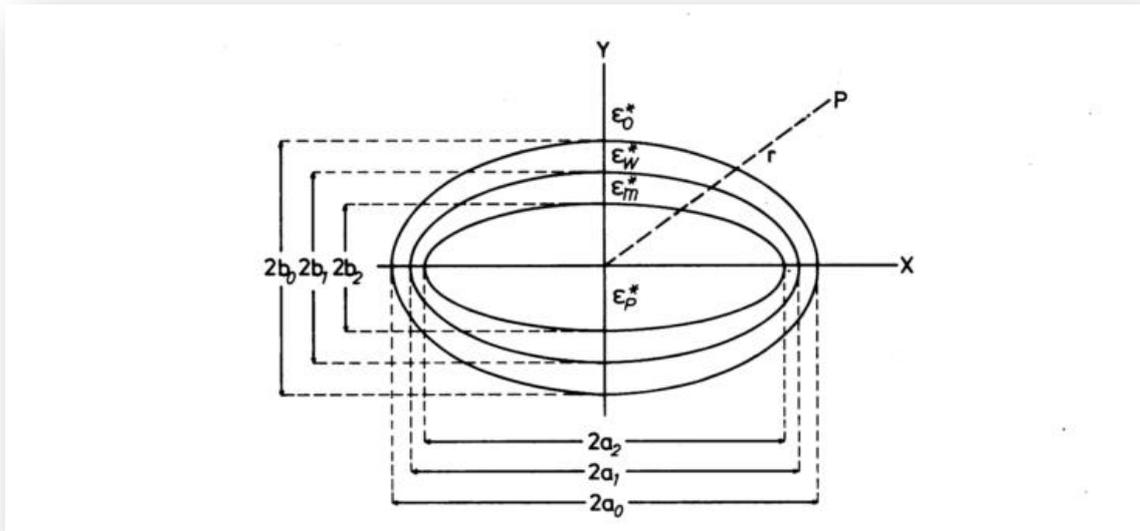


Fig 3.14: modelo de elipses confocales utilizado [95]

Se trata de un modelo con simetría axial. Para obtener el máximo de información posible sobre la distribución de los campos eléctricos en el interior de la bacteria, se han realizado dos cortes, uno longitudinal y otro transversal. De este modo se puede aproximar mejor el comportamiento tridimensional.

Los pasos a seguir para realizar la simulación son los siguientes:

- 1- Definir la geometría
- 2- Seleccionar los materiales
- 3- Elegir el modelo físico
- 4- Establecer las condiciones de contorno y condiciones iniciales
- 5- Definir el mallado de elementos finitos
- 6- Seleccionar el estudio a realizar
- 7- Visualizar los resultados.

A continuación se especifican las características utilizadas en el modelo

---

## PASOS DE LA MODELIZACIÓN

---

**1 - La geometría** se ha realizado con AUTO-CAD. Considerando el citoplasma, la membrana externa y la pared celular, el modelo equivalente tiene las siguientes dimensiones:

Radio mayor ( $\mu\text{m}$ )	Radio menor( $\mu\text{m}$ )	Grosor membrana(nm)	Grosor pared (nm)
1.395	0.34	5	20

Tabla 7: medidas de la geometría utilizada en el modelo.

Se ha considerado una bacteria rodeada de medio definiendo una “unidad de análisis”.

Una vez incorporado al simulador COMSOL Multiphysics 4.2a, el resultado es el siguiente:

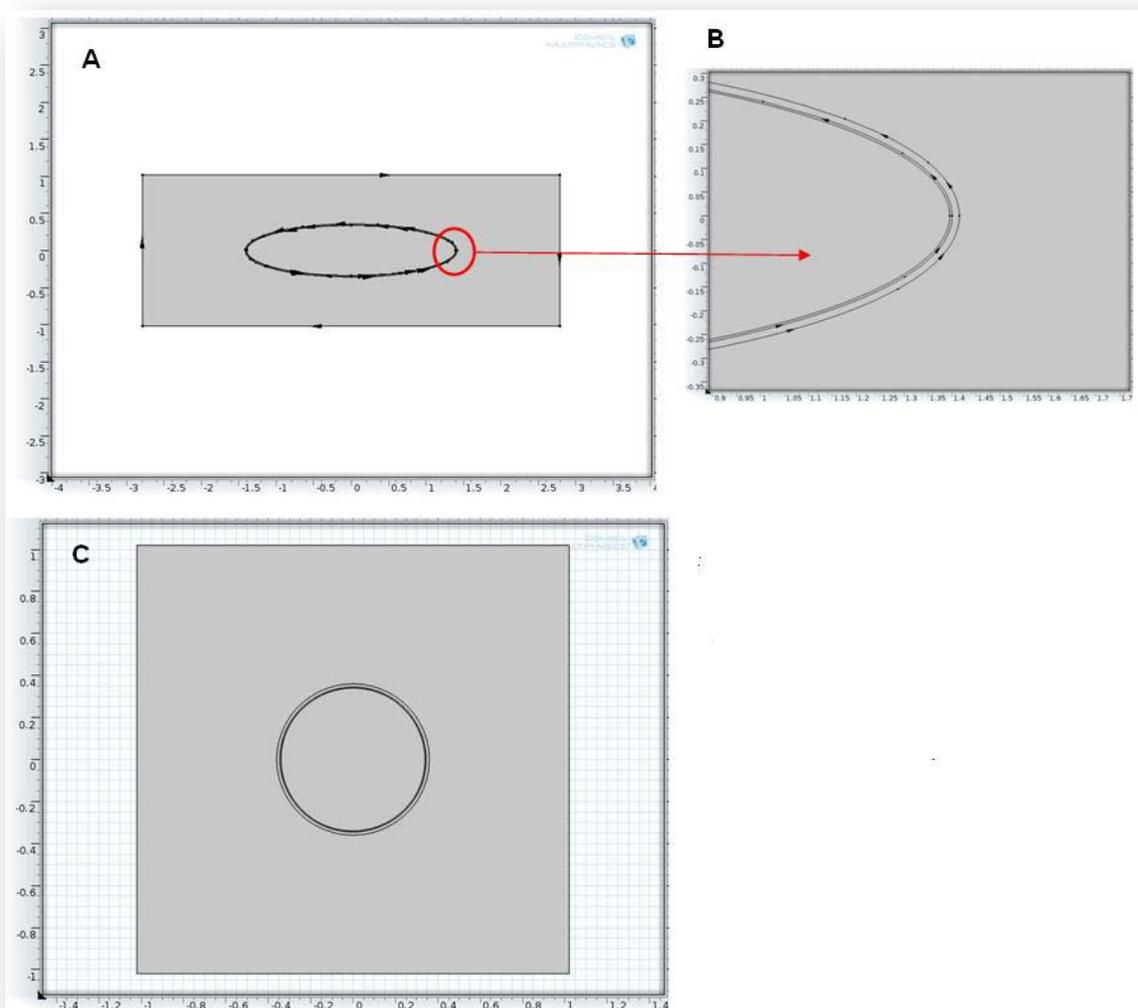


Fig 3.15: Imagen del modelo utilizado en la simulación. A) corte longitudinal de la bacteria. B) detalle de las membranas. C) corte transversal de la bacteria.

2 - Una vez importada y construido el modelo, se procede a incorporar las propiedades físicas de cada uno de **los materiales** asignados a cada elemento (citoplasma, membrana celular, pared celular y medio exterior). Los parámetros eléctricos utilizados son los siguientes:

$\epsilon_{rc}$	$\sigma_c$ (S/m)	$\epsilon_{rm}$	$\sigma_m$ (S/m)	$\epsilon_{rw}$	$\sigma_w$ (S/m)
<b>49.8</b>	0.19	9.5	5e-8	74	0.68

Tabla 8: valores de las propiedades físicas de los materiales del modelo.

3 - El paso siguiente es la elección del **modelo físico**, que corresponde al modelo “*electric currents*”. Este módulo permite entender y predecir los campos eléctricos y magnéticos en aplicaciones de estática y baja frecuencia. A través de este modelo se puede predecir la distribución del campo electromagnético, las fuerzas electromagnéticas, la disipación de potencia y la distribución de la densidad de corriente eléctrica.

Este módulo permite trabajar en 2D y en 3D, con elementos pasivos y activos. Todas las formulaciones están basadas en las ecuaciones de Maxwell y tienen en cuenta las leyes de los materiales, como la ley de Ohm para el transporte de carga. Se puede acceder a diferentes opciones de modelado a través de la interfaz AC/DC, lo que nos permite elegir si vamos a trabajar con electrostática, corriente continua, corriente alterna, etc.

También permite elegir las condiciones de contorno. Las ecuaciones se resuelven por método de elementos finitos a través de una discretización numérica de los elementos, en combinación con los algoritmos de resolución de los sistemas de ecuaciones. Los resultados se presentan en una ventana gráfica, pudiéndose escoger la magnitud a representar, tanto campos eléctricos, corrientes o voltajes o expresiones de estas cantidades físicas que se pueden definir previamente.

Eligiendo la opción de Conservación de Corriente se añade la ecuación para el potencial eléctrico y se puede definir la conductividad eléctrica y la permeabilidad relativa de cada material. La variable dependiente en este modelo es el Potencial Eléctrico.

**4 - Las condiciones de contorno** para la interfaz de Corriente Eléctrica permite escoger periodicidad de modo que se pueda simular que este elemento-bacteria se repite indefinidamente en una dirección. Se define también la superficie (electrodo) de potencial de referencia y la de potencial aplicado.

Como las bacterias pueden adoptar diferentes posiciones dentro del chip, se han hecho 3 modelizaciones:

- bacterias en posición longitudinal con los electrodos arriba y abajo (posición ALFA)
- bacterias en posición vertical con los electrodos arriba y abajo (posición BETA)
- bacterias en posición transversal (no se han hecho cambios en la posición de los electrodos porque la figura es simétrica) (posición GAMMA)

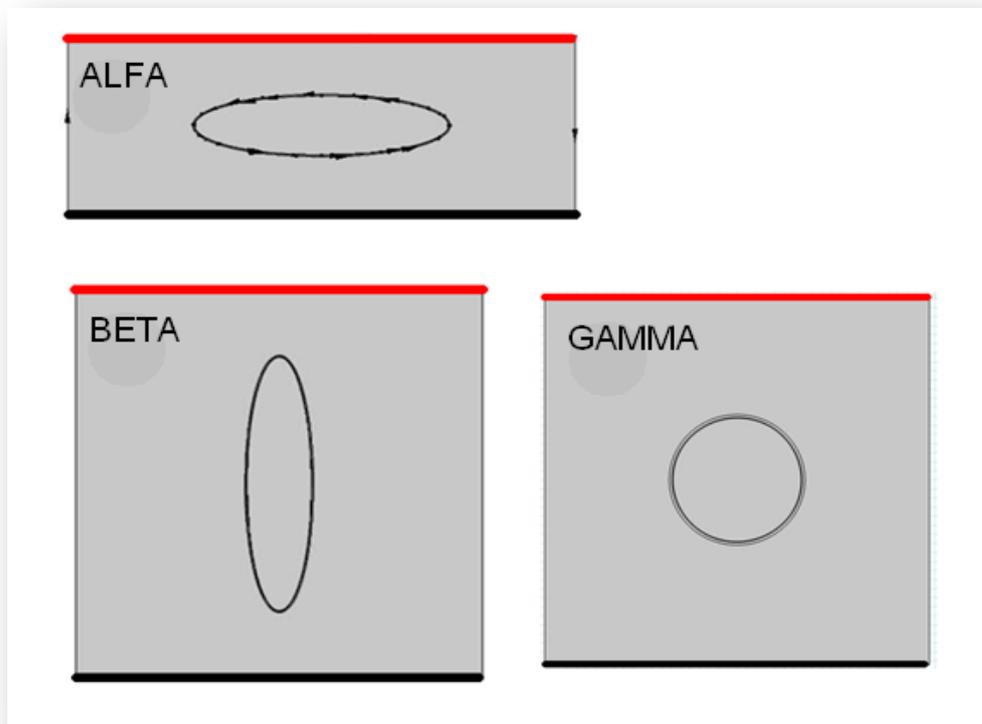


Fig 3.16: Detalle de las posiciones relativas entre bacteria y modelo.

El campo aplicado al elemento bacteria + medio se ha definido en 0,12 V para los modelos ALFA y GAMMA, y de 0,3 V en el modelo BETA. Todos

ellos corresponden a un potencial aplicado en un chip como el fabricado en oro de 600 V/cm. La aplicación de un campo mayor o menor afecta a la magnitud de los parámetros calculados, pero no a la variación en la frecuencia, que viene determinado por la impedancia. Por ello se muestra un único valor de intensidad de campo eléctrico.

**5- Mallado:** Los distintos elementos geométricos tienen dimensiones muy diferentes, por eso se ha optado por un mallado extra fino adaptativo, que se puede observar en la figura siguiente:

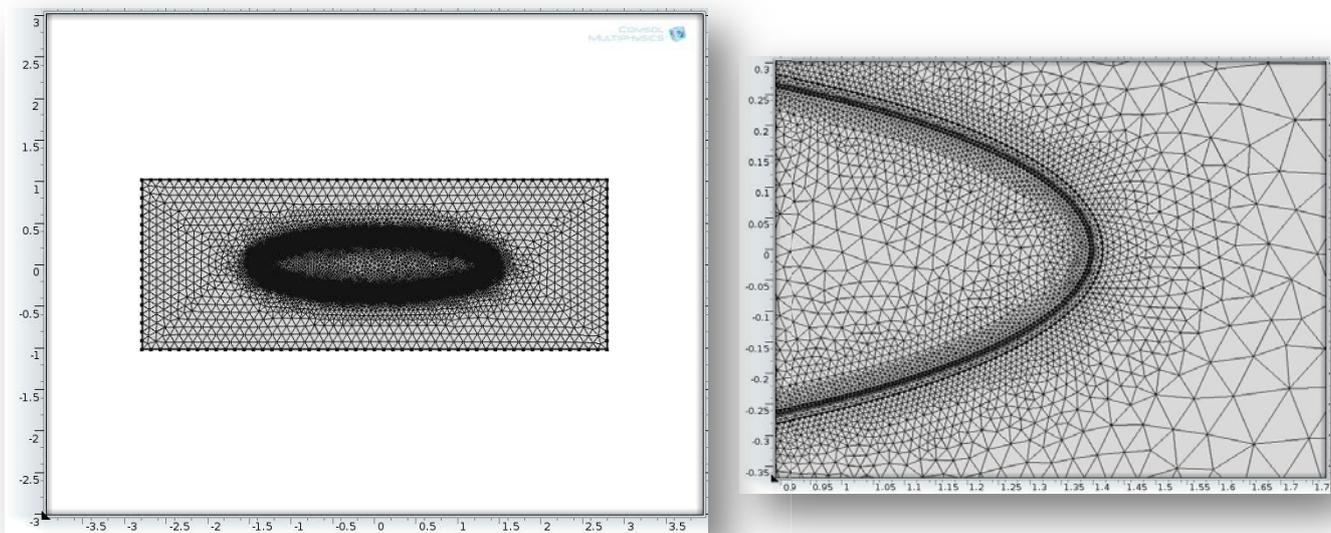


Fig 3.17: Detalle del mallado utilizado en la simulación.

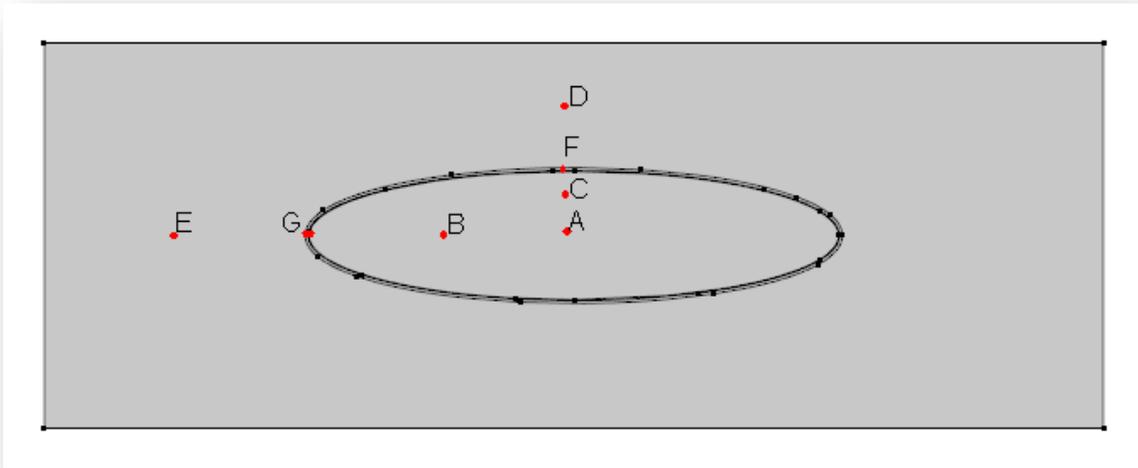
**6- En el estudio realizado,** se analiza el potencial eléctrico, la intensidad de campo eléctrico, la disipación de potencia y la densidad de corriente en la bacteria a frecuencias de entre 10 Hz y 10 GHz, en saltos de un orden de magnitud.

---

## RESULTADOS DE LA MODELIZACIÓN

---

Los valores de los diferentes parámetros estudiados varían con la posición de la bacteria respecto a los electrodos. Para representar los resultados, se han elegido puntos que puedan ser significativos del comportamiento general del sistema, tal y como indica la figura siguiente:



*Fig 3.18: Detalle de los puntos de estudio elegido. Nótese que los puntos F y G corresponden tanto a la membrana celular como a la pared celular.*

En ella se puede observar que los puntos A, B y C corresponden al citoplasma. Los puntos D y E al buffer. El punto F corresponde a la zona central tanto de la membrana como de la pared celular de la bacteria y el punto G al polo de la misma, también diferenciándose entre membrana y pared celular.

Para las simulaciones realizadas con la bacteria en diferente posición, la nomenclatura se mantiene, siendo los puntos B, G, E correspondientes al eje mayor y los puntos C, F, D al eje menor.

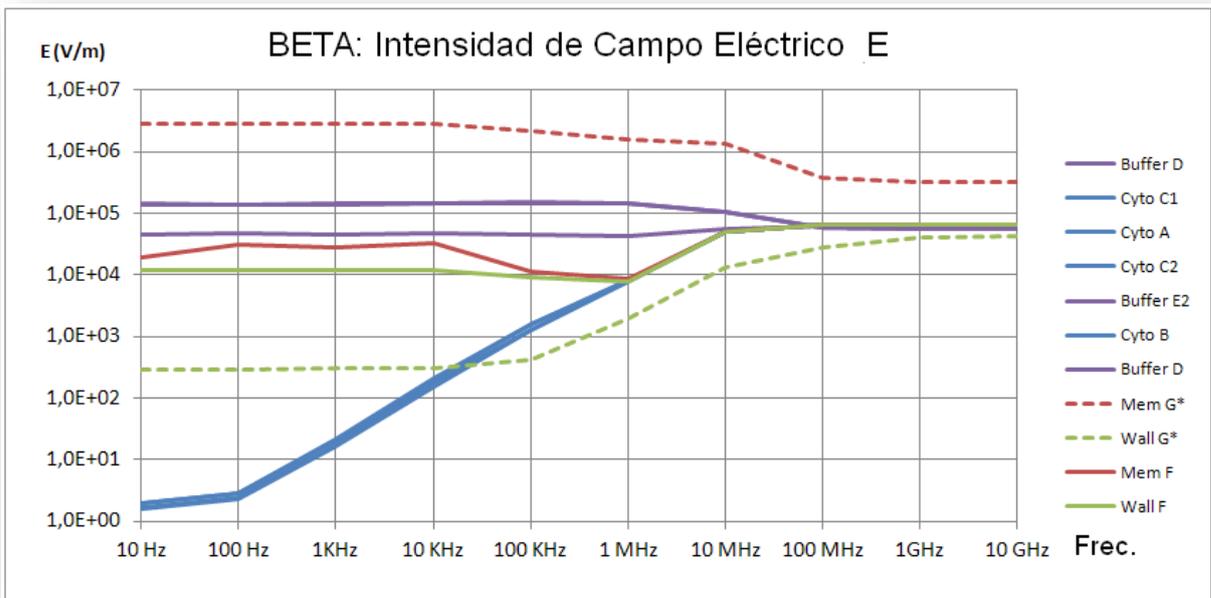
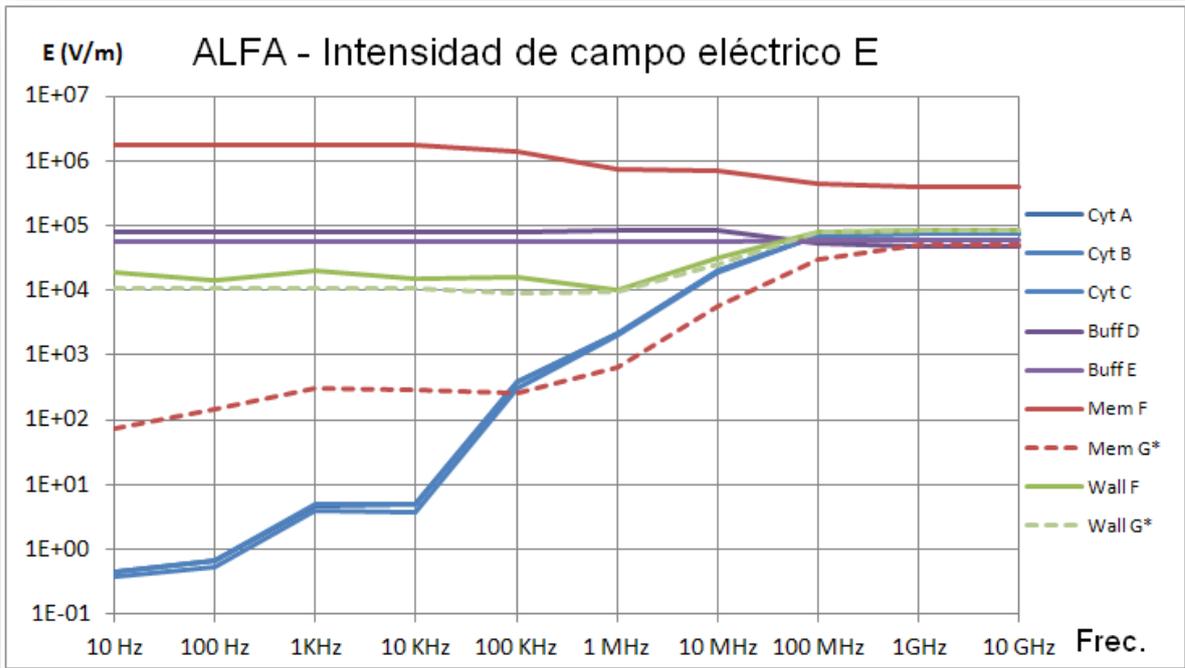
Hay que remarcar que cuando la bacteria está en posición horizontal y los electrodos también, los polos de la bacteria están a la máxima distancia de los electrodos, mientras que cuando la bacteria está en posición vertical respecto a los electrodos, los polos están a la mínima distancia de los electrodos.

En las gráficas se ven representados estos valores. Los valores correspondientes al buffer se representan en violeta, el citoplasma en azul, la membrana en rojo y la pared celular en verde. Para mayor claridad, los polos se han representado con líneas discontinuas.

A continuación se muestran los resultados de las diferentes magnitudes estudiadas.

## INTENSIDAD DE CAMPO ELÉCTRICO

A continuación se muestran los resultados de las potencias estudiadas en los diferentes puntos para las tres posiciones relativas entre bacteria y electrodo:



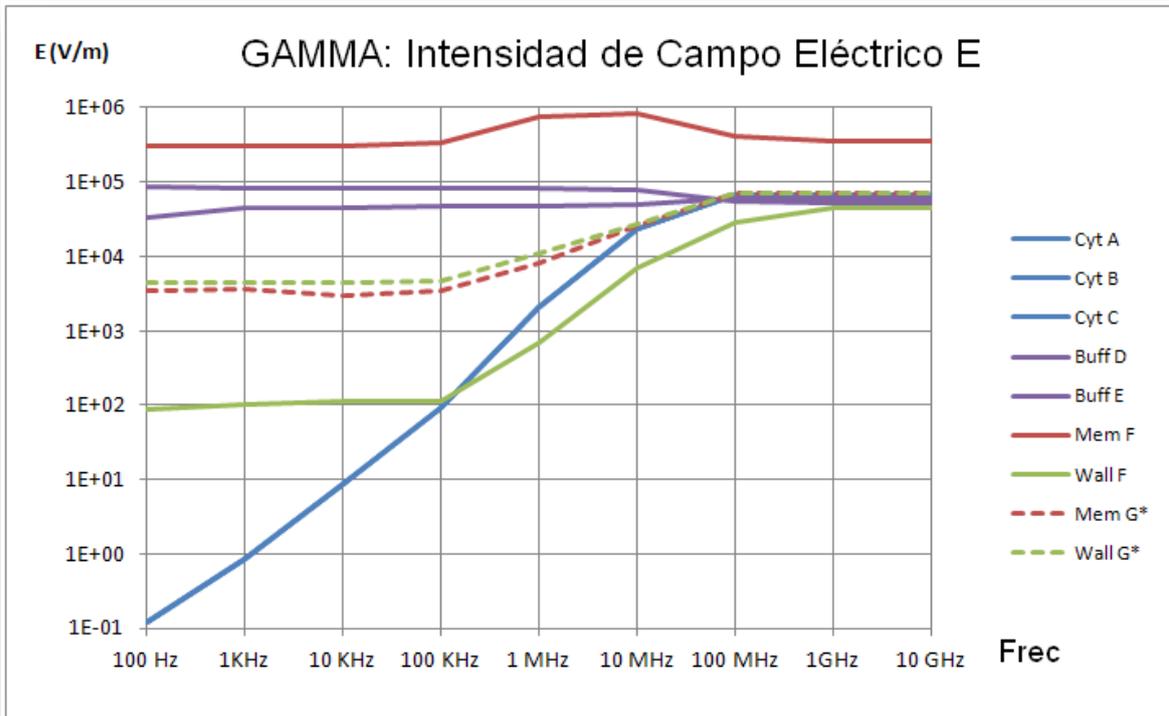


Fig 3.19: Resultados de los valores de la intensidad de campo eléctrico en los diferentes puntos de estudio para las 3 posiciones alfa, beta y gamma.

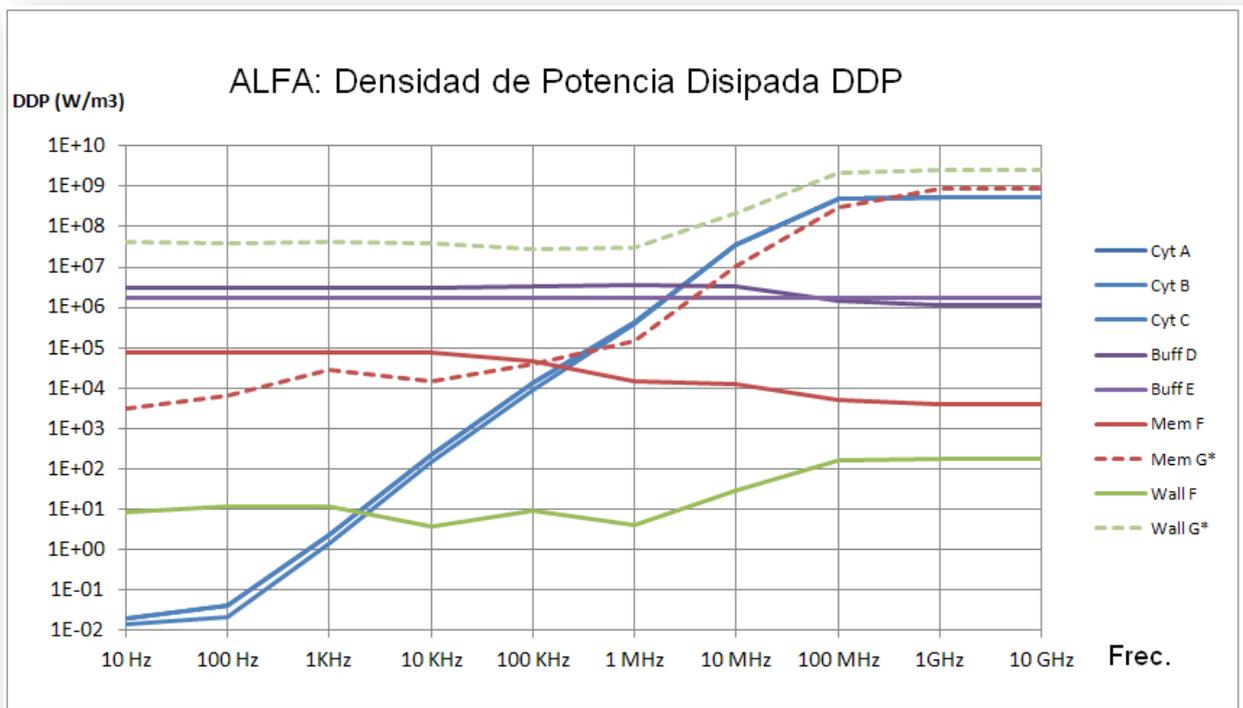
Respecto a la intensidad de campo se puede observar que:

- El valor de la membrana a baja frecuencia es dos o más órdenes de magnitud mayor que el valor en la pared celular, y de más de 5 órdenes de magnitud mayor que en el citoplasma.
- A medida que aumenta la frecuencia, en general la intensidad de campo de la membrana tiende a disminuir, mientras que la del citoplasma tiende a aumentar.
- El primer punto en el que la intensidad de campo del citoplasma se equipara al de las membranas celulares, indicando de algún modo que el campo empieza a penetrar en la bacteria (en la zona de los polos) se produce a valores cercanos a los 100 KHz.
- A altas frecuencias, la distribución del campo se hace cada vez más uniforme, el material se hace más transparente al campo y la conductividad de todas las estructuras tiende a igualarse.
- Desde el primer momento, existe un campo eléctrico en el interior del citoplasma, a pesar de ser muchos órdenes de magnitud inferior al de las membranas. Su valor crece con la frecuencia de manera exponencial

alcanzando el valor del potencial del resto de estructuras celulares en un valor de frecuencia que oscila entre 1MHz y 100MHz, dependiendo de la posición de la bacteria respecto a los electrodos.

### POTENCIA DISIPADA

A continuación se muestran los resultados de las potencias estudiadas en los diferentes puntos para las tres posiciones relativas entre bacteria y electrodo:



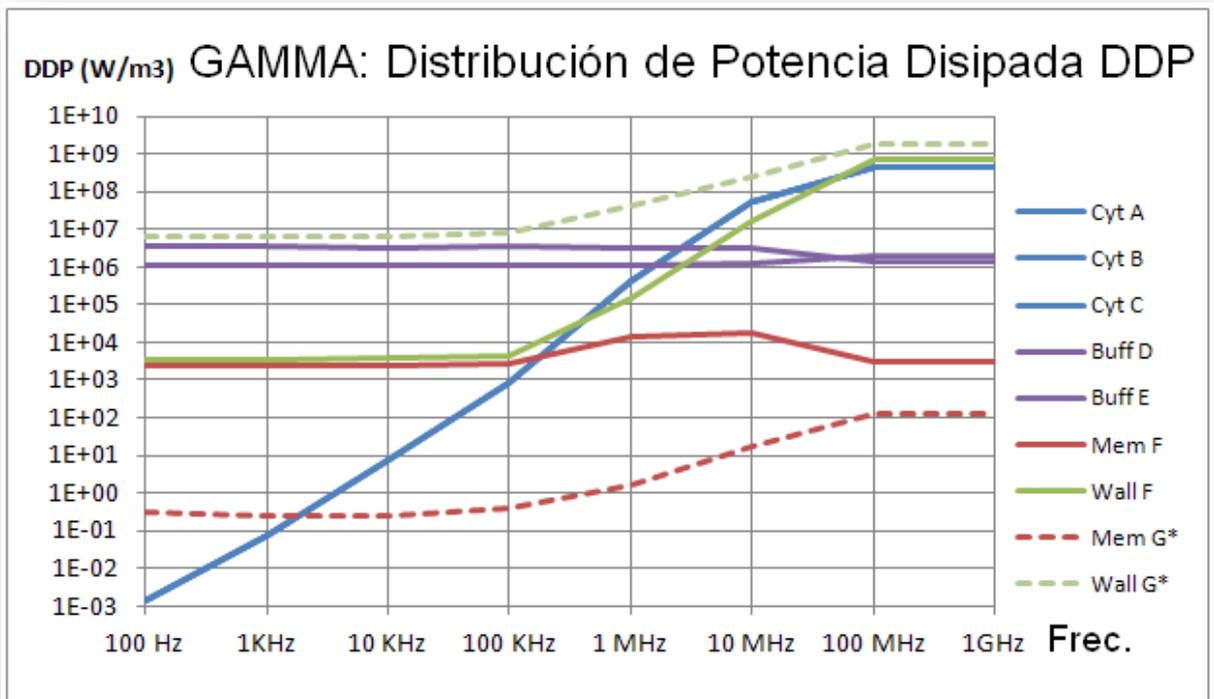
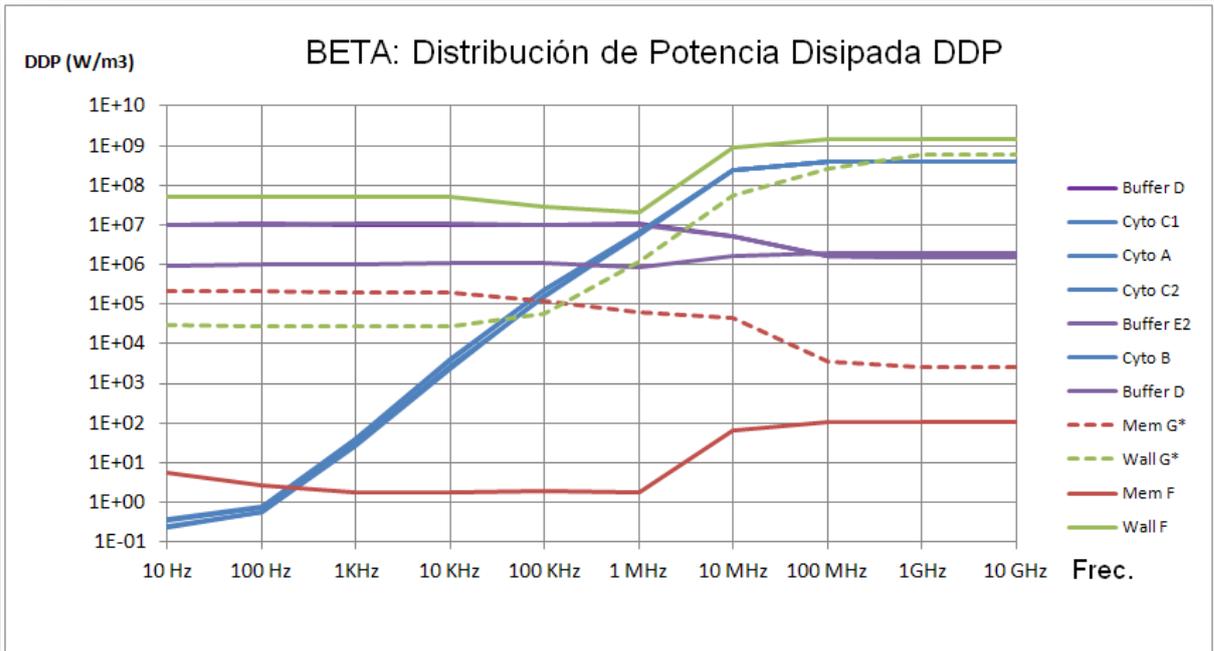


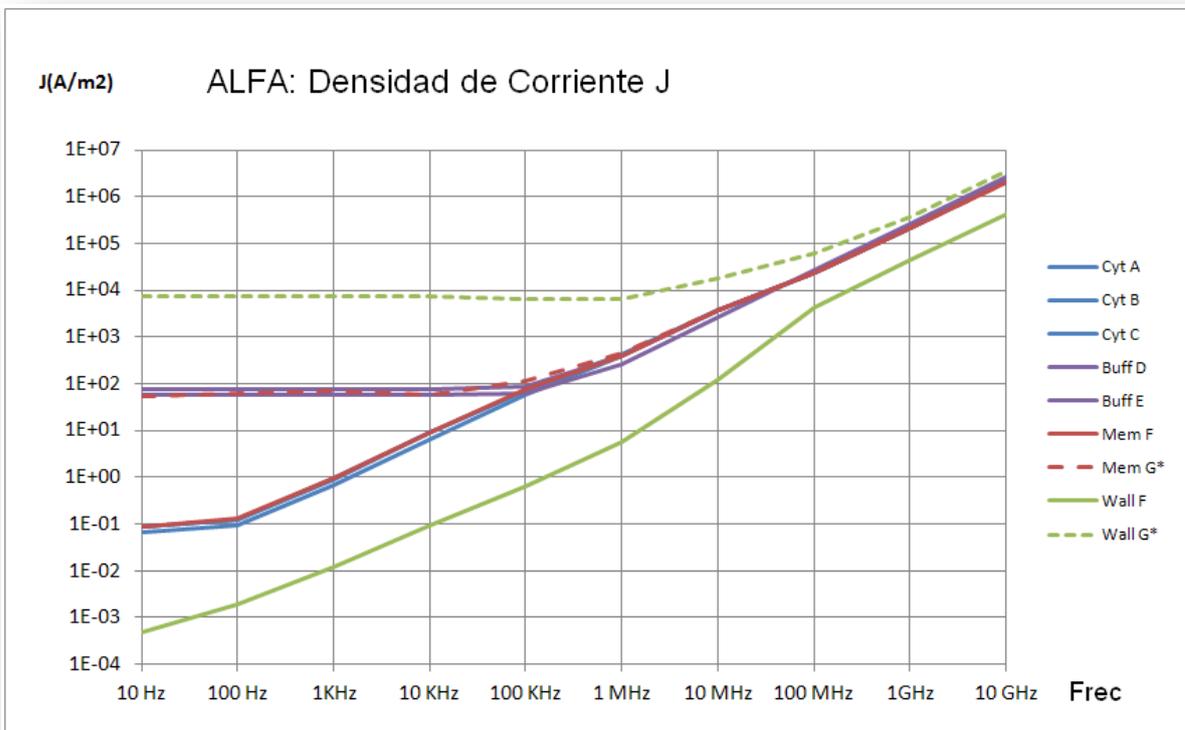
Fig 3.20:: Resultados de los valores de la densidad de potencia disipada (DDP) en los diferentes puntos de estudio para las 3 posiciones.

Respecto a la densidad de disipación de potencia total se observa que:

- En todos los casos, los valores más altos se producen en la pared celular. La membrana le sigue con un valor menor que depende de la posición de la célula respecto a los electrodos. La disipación en el citoplasma es unos 6 órdenes de magnitud menor que la de las membranas.
- A valores entre 100 KHz y 1 MHz, la potencia disipada en el citoplasma empieza a superar la de la membrana.
- Por encima de 1 MHz la potencia disipada en el citoplasma supera a la del medio.

## DENSIDAD DE CORRIENTE

A continuación se presentan los resultados obtenidos respecto a los valores de la densidad de corriente para cada una de las 3 posiciones, en cada uno de los puntos evaluados:



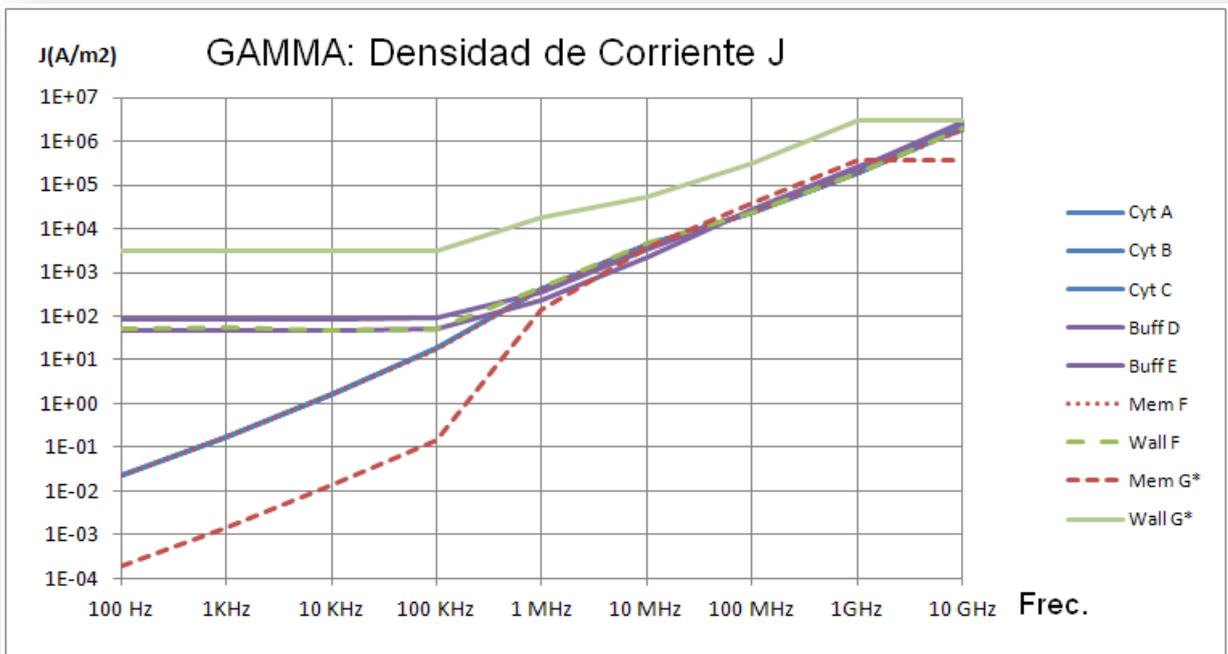
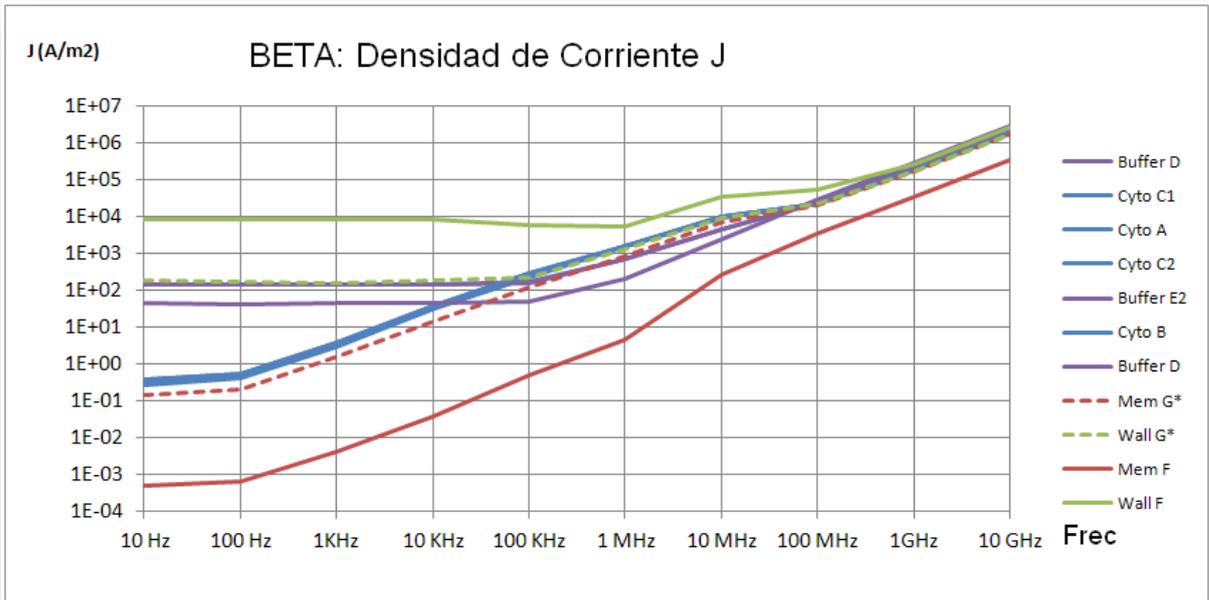


Fig 3.21: Valores de la densidad de corriente ( $J$ ) en los diferentes puntos evaluados para cada una de las tres posiciones.

Respecto a la densidad de corriente:

- El valor máximo de la densidad de corriente está en la pared celular. Este valor se mantiene constante a bajas frecuencias mientras el valor de la membrana y el citoplasma va creciendo exponencialmente con la

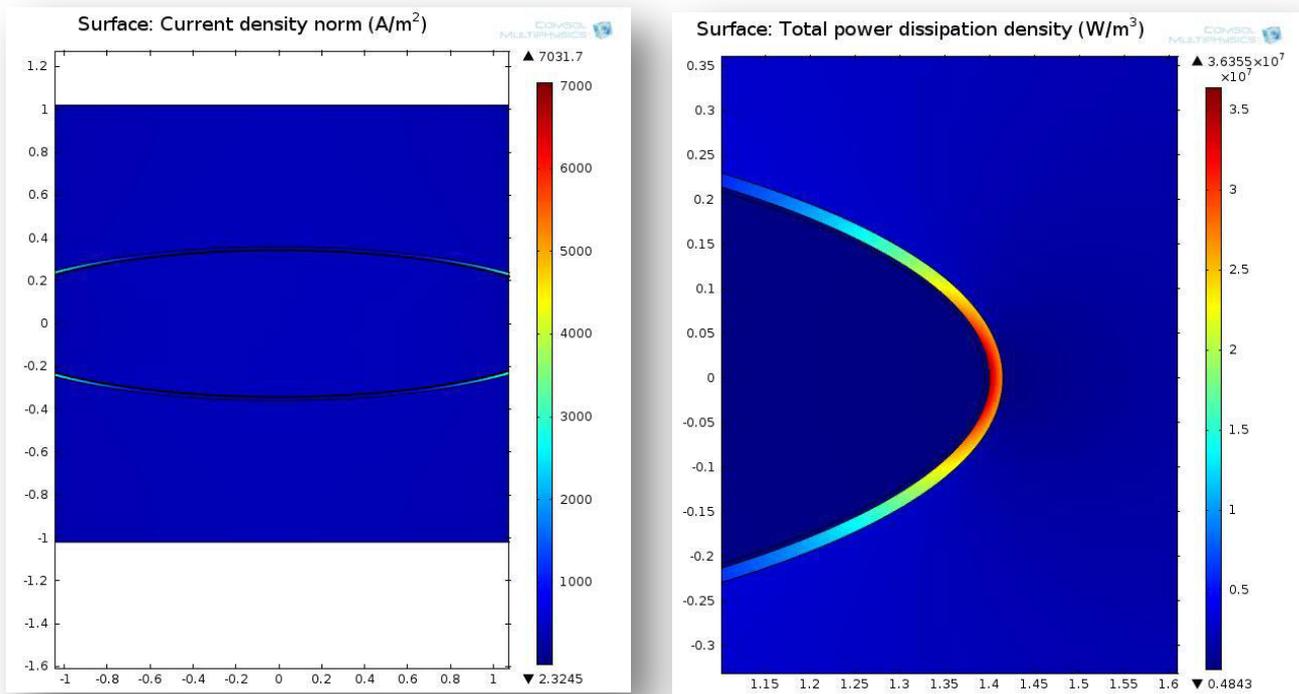
frecuencia. Es decir, hasta un valor de entre 100 KHz y 1 MHz se comporta de manera constante, dejando pasar siempre la misma corriente. A partir de ese punto, empieza a cambiar la intensidad empieza a aumentar de forma exponencial.

- Hasta 100 KHz la corriente pasa por el medio exterior, la impedancia del medio es la que predomina. Sin embargo, se observa que a un valor cercano a los 100 KHz, el valor de la densidad de corriente en el interior de la célula y el valor en el exterior se equiparan, indicando que la corriente está entrando. La intensidad empieza a cambiar de camino y las impedancias se igualan. A 1 MHz toda la corriente está cruzando la célula en cualquier posición.

Los valores máximos de la disipación de la potencia y de la densidad de corriente se alcanzan en los polos de la bacteria, tal y como se muestra en la figura, y que por tanto será la zona más débil del a misma, tal y como se ha reportado previamente [120].

- A frecuencias superiores a 1 GHz la intensidad es la misma en todos los sistemas, indicando que la célula se ha vuelto totalmente transparente y que las líneas de corriente atraviesan la célula en línea recta. En este punto, la distribución del campo eléctrico también se vuelve homogénea para todas las estructuras. A partir de este valor también se produce un incremento muy importante del valor de la corriente eléctrica.

Las imágenes de la simulación (fig 3.22) nos muestran claramente cómo los polos de la bacteria son los puntos de máxima disipación de potencia:



*Fig 3.22: Detalle de la distribución de la densidad de disipación de potencia en la bacteria.*

A través de la secuencia de imágenes correspondiente a la variación de la distribución de la densidad de corriente podemos ver gráficamente el momento en que la intensidad empieza a atravesar la bacteria. Se ha representado la densidad de corriente en escala logarítmica normalizada para una mejor visualización de las variaciones.

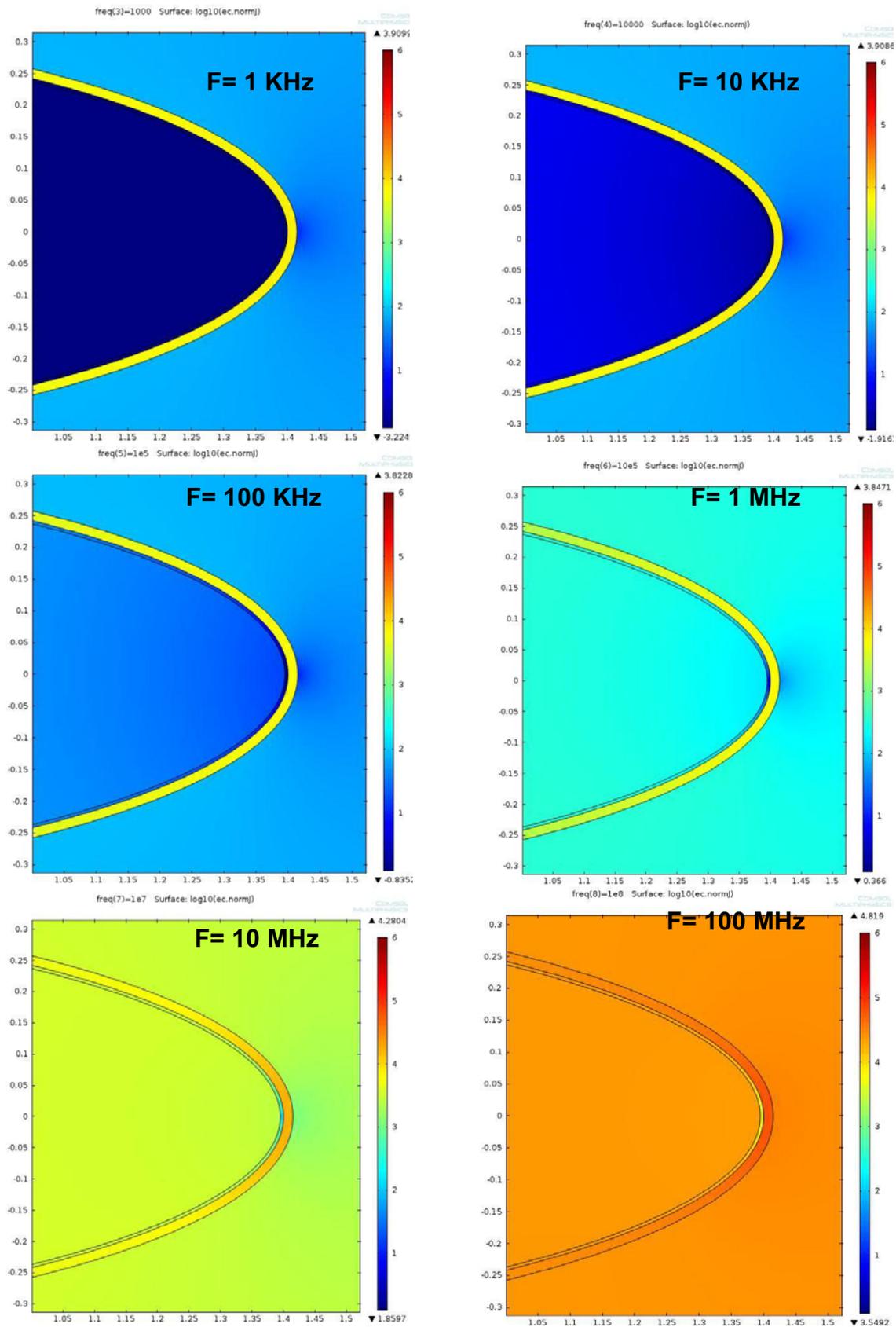


Fig 3.23: Evolución de la distribución de la densidad de corriente en función de la frecuencia.

En conclusión, todos estos resultados nos muestran los siguientes datos:

- Las frecuencias a las que se producen cambios en el comportamiento de la bacteria en el interior de un campo eléctrico están en el rango entre los 10 KHz y 1 MHz
- Para valores inferiores a MHz, la membrana es la parte con mayor valor de campo eléctrico, mientras que la pared celular es la principal diana de la densidad de corriente y la disipación de potencia.
- Los valores dependen de la posición relativa de la bacteria y el electrodo, pero en general, a frecuencias entre 100 KHz y 1 MHz el comportamiento de la pared celular cambia y la corriente comienza a atravesar la célula.
- A medida que aumenta la frecuencia, se produce un aumento en la disipación de potencia y en la densidad de corriente, indicando cambios en la impedancia del sistema (a igualdad de campo eléctrico aplicado). Por ello se considera importante hacer un análisis adicional sobre la variación de la impedancia del sistema.

## ANÁLISIS DE LA IMPEDANCIA DEL SISTEMA

Para poder entender más profundamente los resultados, se ha procedido a simular también el comportamiento en impedancia del sistema. Para ello se ha modelado en MATLAB R2010a (ver Anexo 2) el circuito equivalente de la bacteria y el medio en condiciones de concentración y de conductividad reales, utilizando los mismos valores de la simulación. El circuito es el siguiente:

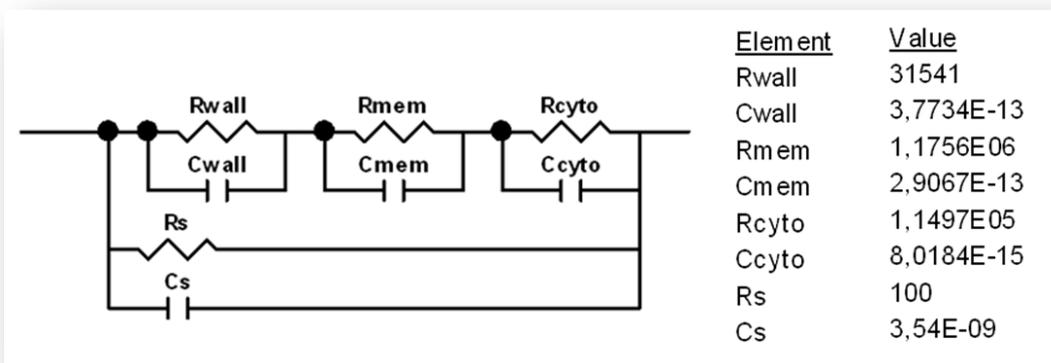


Fig 3.24: Modelo utilizado para la modelización de la impedancia del sistema bacteria-medio

El resultado se muestra a continuación:

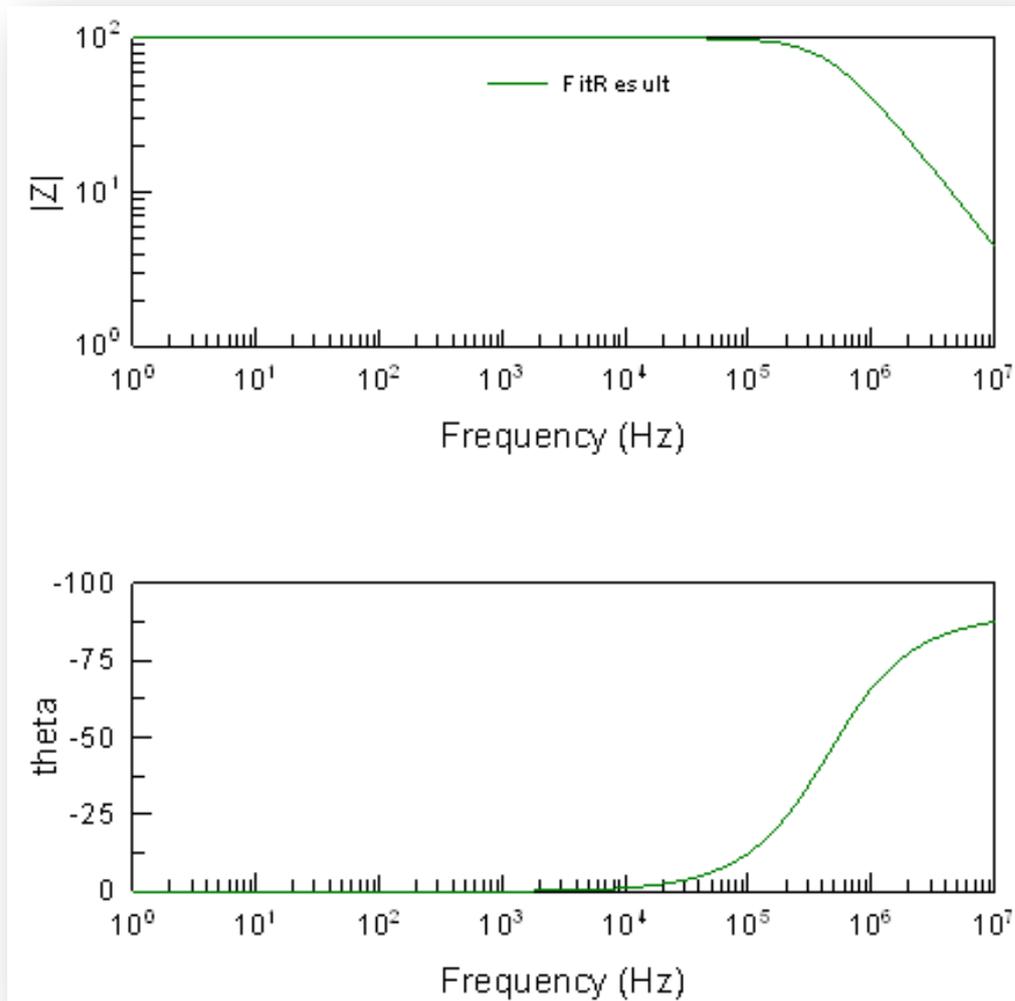


Fig 3.25: Resultado de la modelización de la respuesta en impedancia del sistema.

Se puede observar que el modelo realizado coincide con gran exactitud con los resultados experimentales obtenidos en la validación por análisis de impedancia de los chips reales.

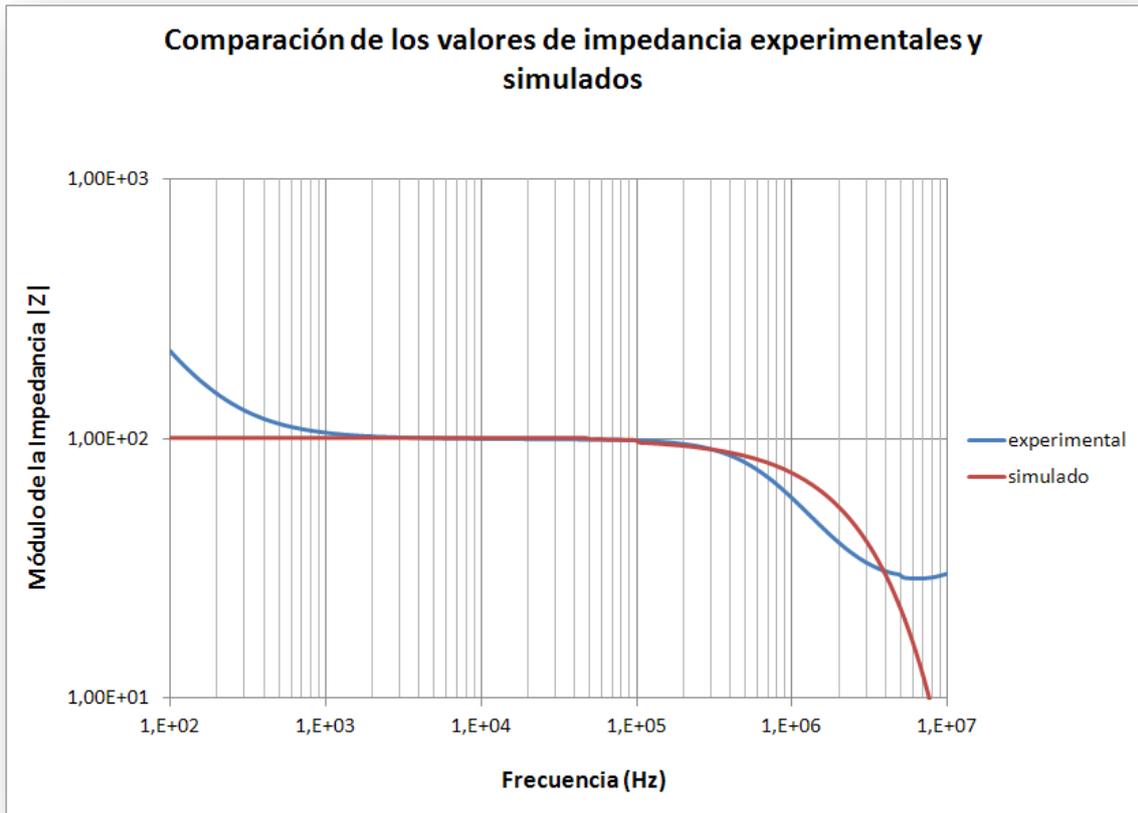


Fig 3.26: superposición de los valores de impedancia experimentales y simulados. Nótese la gran similitud entre ambos.

El comportamiento eléctrico de la célula se puede explicar de forma cualitativa según las modelizaciones realizadas. Es posible ver un comportamiento resistivo hasta 100KHz, y una importante caída de la impedancia a partir de este valor, así como un cambio de fase de modo que el comportamiento se convierte en capacitivo.

---

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

---

Tomando en consideración los diferentes resultados y analizando en profundidad los datos obtenidos (tanto los valores numéricos de E y DDP como la distribución en la superficie), se puede observar que los cambios más relevantes para el estudio de las posibles variaciones en el comportamiento se producen, en líneas generales, entre 100 KHz y 1 MHz.

La combinación de ambas informaciones nos permite ver cómo los puntos más importantes a estudiar son las frecuencias comprendidas entre 100 KHz y

1 MHz, que es donde los cambios de comportamiento debido a las características dieléctricas de la membrana son más visibles.

La disminución de la impedancia en el rango de frecuencias indicado produce, a igualdad de campo aplicado, un aumento de la intensidad de corriente que circula,

Es necesario puntualizar que la impedancia de este segundo modelo es la impedancia global, que se mantiene constante. Esto parece contradecir los resultados obtenidos en la simulación con COMSOL, en los que se ve un aumento continuo de la intensidad que solo puede asociarse a una variación en la impedancia. Ello es debido a que las impedancias locales de cada parte considerada de la bacteria sí tienen una variación, a pesar de que la impedancia global se considere resistiva y por tanto, constante.

## 4. CONTROL DEL SISTEMA

---

### A. CONTROL DE LA FLUIDICA

---

Se utilizan tanto un llenado y vaciado manual como por microbomba (Harvard Apparatus PHD2000), comprobándose que con ambos métodos se consigue el mismo resultado, como se puede observar en la siguiente figura (el valor teórico es de 60  $\mu\text{l}$ ):

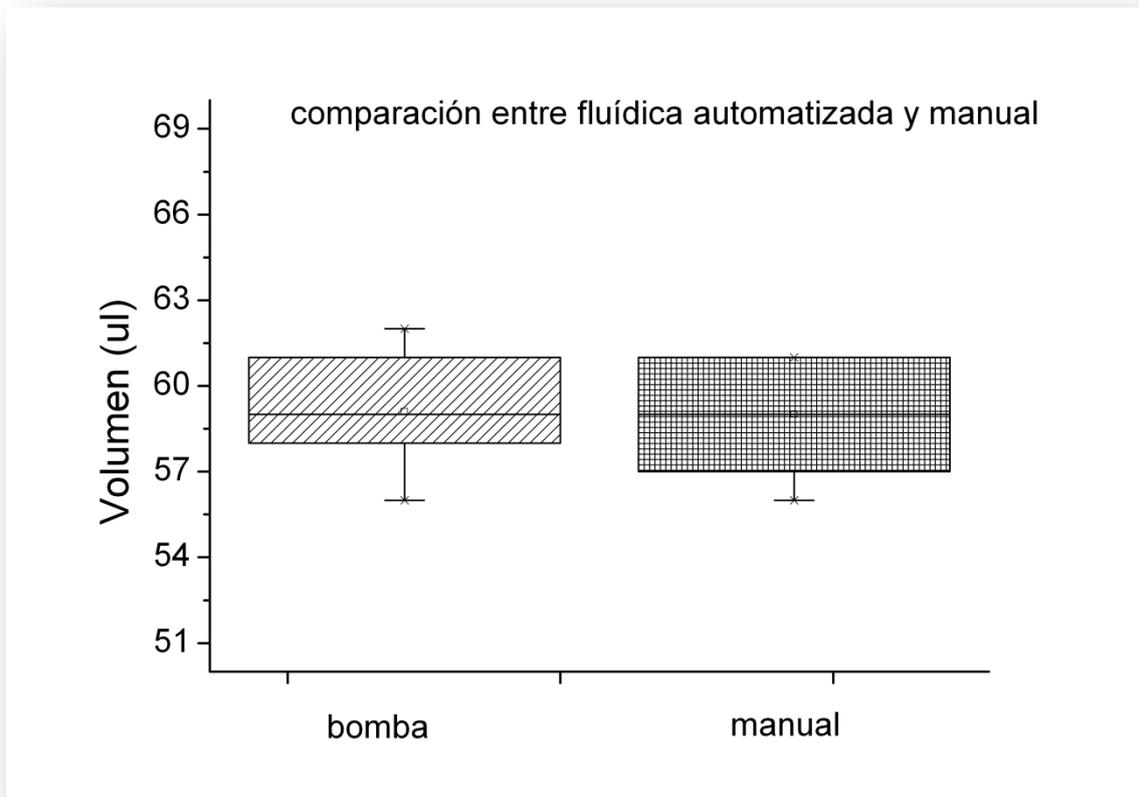


Fig 3.27: Resultados de la comparación del volumen recuperado en el chip realizado por métodos manuales o por bomba microfluídica.

En ella se puede observar cómo los resultados de los distintos métodos de recuperación no se pueden considerar significativamente diferentes.

---

## B. CONTROL DE LAS MAGNITUDES ELÉCTRICAS

---

Se dispone de un osciloscopio (TDS210 Tektronix) con el que medir el voltaje aplicado y la intensidad que circula por el circuito.

Los chips son analizados en su impedancia cada 5 días de uso durante 3 meses para confirmar que el estado es correcto y que los valores de impedancia no han variado.

### C. CONTROL DE LA TEMPERATURA

La temperatura es uno de los factores críticos a la hora de diseñar correctamente el experimento. Si queremos valorar los efectos no térmicos de los campos eléctricos, debemos estar seguros de que los efectos térmicos (al menos globales) sean descartados lo máximo posible. Para ello se ha realizado un estudio a través de la cámara infrarroja (FLIR Systems A40 M). Esta cámara mide la temperatura superficial. Por ello, se ha estimado la temperatura en el interior de los chips teniendo en cuenta los materiales, grosores y conductividad térmica de cada material.

Se aplicaron diferentes voltajes a medios celulares con conductividades distintas. Los resultados mostraron que para voltajes aplicados del orden de 17 V<sub>p</sub>, la conductividad debe ser inferior a 20 μS/cm para asegurar que la temperatura sea inferior a 37 °C tras una exposición de 5 minutos, como se puede observar en la figura siguiente:

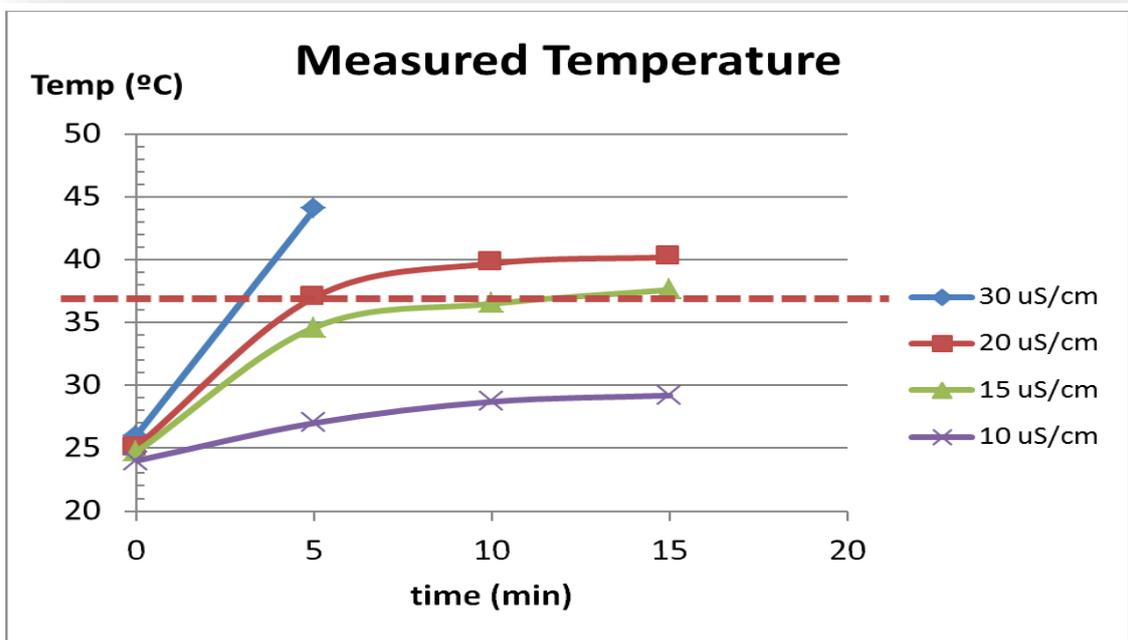


Fig 3.28: Resultados obtenidos mediante cámara de infrarrojos mostrando la temperatura alcanzada para diferentes conductividades a lo largo del tiempo, en una exposición a 17 V<sub>p</sub>

Cuando se usa un baño térmico a 25 °C se pueden utilizar conductividades más elevadas sin que haya fluctuaciones indeseadas de temperatura.

La temperatura se mide en el interior del chip con una sonda térmica (Thermoworks THS-307-159) en los experimentos.

---

## D. CONTROL DE LA CONDUCTIVIDAD

---

La conductividad del medio se obtiene mediante los procesos de lavado que se explican en los apartados correspondientes de protocolos. A través de estos procesos se obtiene una conductividad suficientemente baja como para que la intensidad eléctrica produzca, por efecto Joule, un calentamiento mínimo que permita cumplir las especificaciones anteriormente citadas en cuanto al control de la temperatura. El valor de la conductividad es medido en cada experimento y ajustado a 10  $\mu\text{S/cm}$  cuando es necesario mediante la adición de microlitros de NaCl. Sin embargo, la conductividad de la muestra no es constante a lo largo del tiempo, sino que va aumentando.

La cuantificación empírica de esta variación se puede expresar mediante la ecuación:

$$\sigma_f = \sigma_i + 0.1706t$$

Donde  $\sigma_f$  es la conductividad final,  $\sigma_i$  es la conductividad inicial (ajustada a 10  $\mu\text{S/cm}$ ) y  $t$  es el tiempo en minutos. Esta ecuación se ha obtenido por regresión lineal de los datos experimentales de los cambios de conductividad durante 2 horas. La desviación estándar de esta expresión está calculada en 0,0366

Según esta ecuación, para asegurarnos permanecer por debajo de los 20  $\mu\text{S/cm}$  las bacterias deben ser utilizadas para la experimentación antes de 1 hora a contar desde que han sido preparadas.

---

## E. CONTROL DE LA VARIABILIDAD INTERNA DE LOS EXPERIMENTOS

---

Al trabajar en biología, es imprescindible saber que los experimentos no van a arrojar siempre los mismos resultados, pues la variabilidad interna de los

mismos es mucho mayor de la variabilidad intrínseca en experimentos puramente ingenieriles. Por ello, es necesario hacer una estimación del valor promedio de la variabilidad interna de los experimentos.

Para ello, se realiza el siguiente procedimiento:

- Se llenan los chips con la suspensión de bacterias tal y como se utiliza en un experimento normal
- Se recupera la muestra tras 5 minutos de permanencia en el chip (como si fuera una muestra control)
- Se realiza el procedimiento habitual (descrito más adelante) para contar el número de bacterias recuperadas
- Se grafica y calcula el resultado

Los resultados realizados permiten calcular una variabilidad intrínseca del 20%, eso significa que ninguna variación por debajo de este nivel puede considerarse significativa. La significatividad por encima de este nivel se evalúa estadísticamente mediante la prueba U de Mann Whitney realizada con el programa Origin Pro 8, como se explica en el apartado correspondiente a la evaluación de los resultados.

Una vez tenemos todo el *set up* preparado, podemos comenzar con la experimentación. En el próximo capítulo se analiza la contribución de las magnitudes eléctricas a los efectos letales y subletales en *E. coli*.

# Capítulo 4

## ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS MAGNITUDES ELÉCTRICAS SOBRE *ESCHERICHIA COLI*



# 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo nos centramos en los efectos de las magnitudes eléctricas (intensidad de campo, corriente y frecuencia) sobre la viabilidad y el metabolismo de nuestro modelo bacteriano. *Escherichia coli* es, como hemos comentado anteriormente, el microorganismo más utilizado en experimentación, y sus parámetros eléctricos son bien conocidas. Se puede encontrar numerosa bibliografía respecto a las pruebas más diversas a las que las distintas cepas han sido sometidas.

Los estudios de la industria alimentaria tratan de esterilizar los alimentos mediante campos eléctricos pulsantes (PEF) como una alternativa a la pasteurización [121][122]. La inactivación de microorganismos y enzimas contenidas en los productos alimentarios con técnicas eléctricas comenzó en los años 1920s con su aplicación para la esterilización de la leche [123]. Las dos técnicas principales son el uso de campos eléctricos pulsantes (PEF) de alta intensidad y el llamado “*Ohmic Heating*” o calentamiento por efecto Joule. La primera se basa principalmente en la inactivación de los patógenos por electroporación. La segunda, en el calor producido por la corriente eléctrica, con la ventaja de que el calentamiento se produce de forma más rápida y homogénea [124]. Ambos métodos permite una mejora en la retención de nutrientes y las características organolépticas respecto a los métodos convencionales de esterilización.

Así como los efectos térmicos han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria, también la cuestión de la contribución no térmica del campo eléctrico a la letalidad microbiana ha sido motivo de muchos estudios en la literatura. A pesar de los estudios realizados, los mecanismos subyacentes en la inactivación de microorganismos mediante campos eléctricos no se conocen plenamente [123]–[126] y es todavía un tema controvertido. La mayoría de los estudios se enfocan en pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF), mientras que los campos más débiles, inferiores a 1000 V/cm han recibido poca atención [127]

A la hora de evaluar los efectos que los campos eléctricos tienen sobre las bacterias, hay varios puntos a tener en cuenta:

- 1) Las bacterias han desarrollado estrategias adaptativas para encarar los desafíos de los ambientes cambiantes y sobrevivir bajo condiciones de estrés. Estas respuestas adaptativas involucran cambios genéticos que controlan los cambios metabólicos [128].
- 2) En el propio proceso de aplicación del campo eléctrico, pueden producirse radicales libres, modificación del pH o generación de especies tóxicas que generen daño a las células [64][120].
- 3) La estructura de la membrana: Al poseer moléculas polares en su superficie, es una de las dianas que se espera que se vea afectada por los campos EM, ya que los posibles movimientos de estas moléculas en la matriz de la membrana influenciarían a los canales iónicos [120].
- 4) Pueden producirse también cambios a nivel de cascada de señalizaciones, alterando las funciones celulares.

También hay que señalar que la resistencia bacteriana está afectada por muchos factores ambientales, cuya relevancia puede ser mucho mayor que la debida al genotipo [122].

La exposición de células biológicas a campos eléctricos puede producir una gran variedad de respuestas bioquímicas y fisiológicas profundas en *E. coli* [124]. A pesar de que es difícil separar un efecto de otro, puesto que todos están interrelacionados, a continuación se muestra una recopilación de los efectos de los campos EM sobre la bacteria.

---

## A. EFECTOS SOBRE LA MEMBRANA Y PARED CELULAR

---

La interacción de los campos eléctricos con la membrana es, al igual que en el caso de células en general, la más estudiada y citada en la bibliografía. Su influencia se puede clasificar en dos grupos principales: estímulos capaces de romper la membrana (electroporación) y estímulos que producen cambios en la distribución de los elementos en la superficie de la misma.

En general, el campo eléctrico se considera uno de los principales modos de inactivación microbiana [129]. La inactivación aumenta a medida que aumenta el campo eléctrico, por encima del potencial transmembrana. Este valor del potencial transmembrana no es fijo, sino que se puede ver modificado por la superposición de un campo externo. Los valores a los cuales la membrana de la *E. coli* se empieza a electroporar varían según la fuente consultada, pero en general, se considera que si el campo total excede un valor umbral entre 0,2 y 1 V se producirá la formación de poros en la membrana [124][126]. Estos poros pueden ser reversibles o irreversibles. Suelen ser reversibles si el potencial transmembrana es inferior a 1V [124][130]. La reorientación de la *E. coli* durante la exposición eléctrica facilita la electropermeabilización [126]. Para potenciales transmembrana superiores, o aplicaciones de campo eléctrico mayores, la electroporación suele ser irreversible.

A diferencia de las células eucariotas, la bacteria posee además de la membrana una pared celular externa a ella. Esta pared celular es permeable a pequeñas moléculas e iones. En realidad, muchas de las moléculas estructurales de la pared celular están ionizadas, de modo que cuando la conductividad ambiental es baja, la región llamada pared celular puede ser altamente conductora en virtud de la presencia de contra-iones móviles [131][95]. Algunos autores han observado rotura de la pared celular si se excede una caída de 0,4 – 2 V [123].

Si se produce un proceso reversible, el restablecimiento de la membrana puede ocurrir en segundos o en minutos. El hecho de que las células se recuperen o no depende no solo del campo aplicado, sino que también depende en gran medida de lo que ocurra en los instantes posteriores a la aplicación del campo. Las células se recuperan rápido si se cultivan en un medio favorable [130]. En comparación con las bacterias *Gram* – positivas, las bacterias *Gram*-negativas como la *E. coli* muestran una capacidad de supervivencia muy inferior a las *Gram*-positivas a pesar de haber sellado de nuevo los poros producidos por la electropermeabilización. También muestran un grado de electropermeabilización muy bajo en relación con las *Gram*-positiva, para igualdad de estímulo eléctrico [132], a pesar de que el valor crítico de campo es inferior que para las bacterias *Gram*-positivas [125].

La observación por SEM de la membrana bacteriana tras la exposición a los campos EM muestra cambios, indicando la posible causa de la muerte de la célula [56], [70], [122], [133]. A través de un análisis por microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se ha podido observar los cambios en la capa de peptidoglicanos [133]. También los análisis por fluorescencia permiten ver los daños en la membrana [125], [132]. La rotura se produce especialmente en los dos extremos de las células [120], lo cual parece ser debido a que en los extremos el potencial transmembrana es menor, y por tanto son las zonas más débiles [123].

La electroporación no sólo es la causa directa de la lisis de la célula por rotura de la membrana. También se produce un gran estrés químico asociado al transporte molecular. Un fenómeno interesante que se ha observado es que el número de *E. coli* inactivadas tras un estímulo eléctrico es mucho mayor que las que ha sido electroporadas de forma irreversible. Eso sugiere que son capaces de resellar sus membranas, y que el daño producido en otras estructuras o funciones puede ser la causa de la inactivación de las células [125]. En comparación con las células eucariotas, la *E. coli* tiene una pequeña área superficial y una alta relación superficie. La composición de la bacteria es también menos robusta: la difusión amplificada por el campo eléctrico hace que un canal iónico con una corriente de 2 pA pueda agotar la concentración de iones en el interior en solo 1 segundo [134].

Otro de los mecanismos de interacción más aceptado tiene que ver con los cambios en la estructura de la membrana [63][123] lo cual afecta especialmente a la orientación de los lípidos de la membrana y, por tanto, a la viabilidad celular. También las proteínas pueden activarse por estímulo eléctrico, lo cual produce cambios en la regulación de las actividades internas y en la comunicación con otras células [135]. El hecho de que el potencial transmembrana sea la mayor componente de la fuerza para la fosforilación oxidativa, el transporte de membrana y el movimiento flagelar da la pista de que la maquinaria bacteriana puede estar regulada eléctricamente [134]. Incluso puede llegar a producirse una transferencia directa de electrones que afecte a la respiración celular [136]. Una corriente eléctrica, incluso de baja intensidad, puede aumentar la concentración de protones en el citoplasma y

perturbar la funcionalidad de la membrana causando una alteración del metabolismo celular.

La dependencia en frecuencia de la inhibición del crecimiento bacteriano sugiere que los campos eléctricos afectan al equilibrio de las reacciones enzima-substrato. Como los campos EM afectan la distribución de carga molecular, pueden interferir en algunas reacciones enzimáticas. El efecto se espera que sea mayor en las enzimas de la membrana, puesto que la membrana evita que puedan rotar y que se escapen del efecto del campo, y porque el campo es amplificado por la membrana. La exposición de estas enzimas a una frecuencia adecuadamente sintonizada puede inhibir el crecimiento bacteriano al agotar los productos enzimáticos en la célula. [137]

---

## B. EFECTOS EN EL CITOESQUELETO - FASES DE CRECIMIENTO

---

A nivel intracelular, la estructura más afectada por el campo EM sería la más polarizada. En el caso de las células eucariotas, esta estructura es el citoesqueleto. Durante mucho tiempo se ha considerado que las bacterias carecían de citoesqueleto. En realidad, no lo necesitaban puesto que la estructura viene sostenida por el exoesqueleto de la pared celular. Sin embargo, se ha descubierto que hay 3 proteínas que son homólogas a las del citoesqueleto: FtsZ es la homóloga de la tubulina, MreB y ParM son homólogas de la actina, y CreS parece ser un filamento intermedio [137]. Tanto la tubulina como la FtsZ tienen un momento dipolar grande, lo cual lo hace diana de los campos EM, que interfieren en la orientación y en el proceso de polimerización y despolimerización que está involucrado la estructura celular y el proceso de división. Por supuesto, otras moléculas orientadas estructuralmente y polares también son susceptibles de ser influenciadas por los campos EM, a través de la disrupción de procesos celulares en la célula.

Es generalmente aceptado que las fases de crecimiento exponencial son más sensibles al estrés que las de adaptación y las estacionarias [122][129].

Incluso se ha cuantificado el valor crítico de voltaje de rotura de la membrana en la fase estacionaria como un 30% mayor [127].

La explicación parece ser lógica. El crecimiento bacteriano en fase exponencial está caracterizada por una alta proporción de células en división, durante las cuales la membrana es más sensible a los campos aplicados [122]. Además, durante la división se generan campos eléctricos no homogéneos cerca de los puentes que separan las células hijas. Estos campos no homogéneos ejercen fuerzas dielectroforéticas unidireccionales en las partículas y moléculas cargadas y polares, lo cual resulta en un movimiento hacia el puente [64]. Estas fuerzas producen una distorsión de macromoléculas que afectarían la integridad estructural de las células o interferirían con procesos en las que las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante.

Bajo condiciones ambientales de estrés, las células responden adaptándose a través de cambios en los perfiles de proteínas. El estudio de las proteínas que se expresan de manera diferente tras un estímulo eléctrico sugiere que tienen un papel en la adaptación de la bacteria al estrés eléctrico [138]. El estrés es una respuesta adaptativa protectora para sobrevivir, con la ayuda de proteínas de estrés que están asociadas a captar y reparar el daño del ADN, ayudar a las proteínas dañadas a volverse a plegar y recuperar su estado conformacional y también actuando como chaperonas para el transporte celular de proteínas a sus destinos.

A pesar de que normalmente se supone que los cambios de expresión se producen mientras la célula está metabólicamente activa, se ha descubierto que, al menos en *E.coli*, los cambios pueden (y de hecho suelen) producirse en la fase estacionaria. En este estado aparentemente no diferenciado, se producen cambios fisiológicos significativos que permiten a las células sobrevivir a una gran variedad de estresores ambientales [128].

---

## C. DAÑOS SUBLETALES

---

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, sigue abierto el debate sobre si el daño en la membrana y la inactivación de los microorganismos debido a los

campos eléctricos es un suceso todo-o-nada, o pueden existir células dañadas a nivel sub-letal. No es un tema sencillo, porque para evaluar el efecto bactericida de los campos eléctricos, el método más utilizado es el del conteo de la siembra en placa, el cual es insuficiente para revelar los daños inducidos. La detección real de las células con daños subletales bajo el estrés de los campos eléctricos es muy difícil de estimar, puesto que muchas bacterias son capaces de autorepararse [121]. El uso de tinciones como la de vida / muerte o la GFP<sup>6</sup> permite discriminar células según su estado de la membrana, pero no da indicación de la viabilidad y la actividad en términos de metabolismo [139].

Algunos autores han afirmado categóricamente que no hay un daño subletal [132]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que sí hay daños bajo el estrés de los campos eléctricos [121]. Entre otros, parece ser que *E. coli* pierde la capacidad de multiplicarse, a pesar de no morir directamente bajo el efecto del campo eléctrico [125]. En principio, el daño subletal es de esperar que alargue la fase de recuperación [130]. Según otros estudios, las células dañadas subletalmente son especialmente sensibles a factores estresantes post tratamiento [122]. Uno de los factores más determinantes para la posibilidad de que haya efectos subletales es la temperatura. Por encima de 38 °C, el proceso se convierte en todo o nada, con ausencia de daños subletales y sin electroporación. Sin embargo, por debajo de esa temperatura, sí que existen daños que pueden afectar al metabolismo sin alterar la viabilidad [122].

Con toda esta información ya sabemos qué podemos esperar de la aplicación de los campos eléctricos. Es por ello que se decide aplicar campos que estén en el umbral de producir una alta letalidad, considerado como una supervivencia de aproximadamente un 10 % de las células iniciales. Los campos de intensidad inferior es probable que nos permitan valorar algunos de los efectos subletales.

---

<sup>6</sup> GFP: Green Fluorescent Protein

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se exponen los diferentes protocolos utilizados en la experimentación.

---

### A. PREPARACIÓN DE LAS BACTERIAS

---

Las bacterias utilizadas son *E. coli* cepa silvestre MG 1655. Estos organismos se encuentran disponibles en el laboratorio del grupo de investigación de “Biotecnología bacteriana e interacción huésped patógeno” liderado por el Profesor Antonio Juárez.

Estos microorganismos son raspados de la placa de petri con agar en la que se mantienen en fase latente con un asa de Kolle y puestos en un tubo con 5 ml de LB (Luria – Bertani) estéril. Se mantiene durante toda la noche (ON- *over night*) en incubación con agitación orbital a 150 rpm y 37 °C.

Posteriormente se reinocula 1 ml de muestra un una concentración 1:100 de medio LB fresco, y se deja crecer a 37 °C y 150 rpm hasta que se alcance una concentración de  $1 \times 10^9$  células /ml. Tarda aproximadamente 2 horas, y se comprueba mediante espectroscopia el valor de la concentración. Es una medida de turbidez en la cual el valor de Densidad Óptica a 550 nm debe ser igual a 0,5 (Standard McFarland)

En este momento se para la incubación y la muestra se traspara a tubos falcon estériles que serán centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet resultante en 20 ml de agua desionizada y estéril a temperatura ambiente. De esta manera se va eliminando de las bacterias los restos de medio LB, de forma que podamos controlar la fase de crecimiento (que se supone que en este momento es exponencial) y la conductividad de la suspensión. Este proceso se repite 3 veces, y finalmente las bacterias se resuspenden en un volumen final de 2,5 ml.

Tras confirmar y ajustar el valor de la conductividad, las bacterias quedan preparadas para ser utilizadas en la experimentación. Tras evaluarlo experimentalmente, se detecta que tras los primeros 20 minutos hay una

mortalidad celular de aproximadamente el 40 %, no atribuible a ningún procedimiento posterior. Es decir, cuando se siembra la preparación bacteriana inmediatamente después de ser resuspendida, el número de bacterias es superior a si se siembra a los 20 minutos. Pasado este tiempo, el número de bacterias se mantiene estable. La hipótesis es que el protocolo seguido para prepararlas, que incluye cambios de temperatura y esfuerzos mecánicos, puede dañarlas. Aquellas que son inmediatamente puestas en un medio favorable (las que son sembradas) tienen la posibilidad de recuperarse con más facilidad, pero las que se mantienen en un medio no favorable (el agua no es tóxica pero tampoco es isoosmótica ni nutritiva), probablemente mueren. El protocolo incluye por tanto, un tiempo de espera de 20 minutos, pasados los cuales se empieza a aplicar el tratamiento eléctrico.

---

## B. TRATAMIENTO ELÉCTRICO

---

El campo se aplica a través de un generador de funciones conectado al chip, utilizando las magnitudes eléctricas de acuerdo con el diseño del experimento.

El protocolo de irradiación es el siguiente: una vez se ha puesto en marcha todo el procedimiento experimental, la solución bacteriana se mezcla durante 3 segundos en un vórtex. Las células son entonces introducidas en el chip. Se obtienen dos muestras de cada experimento. En la muestra control las células son mantenidas en el chip el tiempo previsto pero sin aplicar voltaje alguno. En las muestras irradiadas se aplica un voltaje durante el mismo tiempo.

Ambas muestras son recuperadas y resuspendidas en LB (1:10), e incubadas a 37 °C – 150 rpm el tiempo determinado en cada experimento, dependiendo del estudio que se quiera realizar. En cada serie de experimentos hay siempre al menos un control al inicio y otro al final del experimento, para estar seguros que las células están todavía vivas al final del experimento y que los efectos observados en cuanto a cambio en la supervivencia no son debidos al tiempo transcurrido durante la experimentación.

Los diferentes estudios que se han realizado han sido los siguientes:

1 - INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DEL CAMPO ELÉCTRICO: Se han aplicado diferentes intensidades de campo eléctrico en un rango entre 100 V/cm y 1400 V/cm, analizando la supervivencia de las células..

2 - INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA: Se ha analizado el efecto de tres valores de frecuencia: 10 KHz, 100 KHz y 1 MHz, a diferentes valores de intensidad de campo eléctrico para ver la relación entre ambos parámetros y la mortalidad. En algunos casos se ha utilizado también la frecuencia de 10 MHz.

3 - INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE ELÉCTRICA: Se han analizado el efecto de diferentes valores de intensidad, desde 25 mA hasta 280 mA.

También se han realizado pruebas combinadas entre voltaje y frecuencia y entre intensidad y frecuencia, de modo que los resultados fueran lo más precisos y esclarecedores posible.

Todos los experimentos se realizan con un baño térmico de 25°C para descartar al máximo posible los efectos térmicos a nivel global. No es posible asegurar que no haya incrementos locales de temperatura.

---

## C. EVALUACION DE LOS RESULTADOS

---

La valoración de los resultados se ha realizado los siguientes métodos.

---

### ESTIMACIÓN DE CAMBIOS EN LA SUPERVIVENCIA (LETALIDAD)

---

Para estudiar si las bacterias permanecen viables tras una actuación sobre ellas, el método clásico es el de conteo por placa. Este método permite cuantificar el número de células (o mejor dicho, colonias) que permanecen viables (a largo plazo). Para realizarlo, se siembra una alícuota de 100 µl de cada muestra en una placa con LB Agar después de ser incubada durante 5 minutos a 37 °C con movimiento orbital de agitación a 150 rpm. Cada muestra se siembra a 2 diferentes diluciones en al menos 4 diferentes placas de Petri para tener medidas estadísticas. El número de colonias se cuenta tras 24 horas de incubación a 37°C sin movimiento. Si la placa está bien sembrada, el

número de colonias estará entre un mínimo de 30 y un máximo de 300. Por encima o por debajo de estos valores, la dilución no es la adecuada y los resultados no se pueden considerar fiables. Se siembran y se cuentan tanto la muestra control como la muestra tratada (irradiada). A los valores obtenidos hay que aplicarles los factores correspondientes en función de la dilución sembrada. Por ejemplo, si hemos contado 40 bacterias en una dilución  $-7$ , el resultado final sería  $40 \times 10^{-8}$ , puesto que al haber sembrado 100  $\mu\text{l}$ , actúa como una dilución más respecto al valor por mililitro.

A la hora de graficar los resultados, se puede realizar de dos maneras: o bien representando directamente los valores del conteo o bien normalizando los valores mediante la división respecto de los valores de la muestra control. Normalizar nos permite comparar entre diferentes experimentos que puedan tener valores iniciales de control ligeramente diferentes, puesto que el protocolo de preparación de las bacterias puede generar dichas diferencias en la concentración.

Para normalizar los valores, cada medida de células viable o *colony forming unit* por mililitro (cfu / ml) de la muestra irradiada se calcula como el promedio de las placas sembradas y se compara con el número de células de la muestra control, de modo que se calcula el porcentaje de supervivencia:

$$\% \text{ Supervivencia} = (N / N_0) \times 100$$

Donde N es el número de células promedio de la muestra irradiada y  $N_0$  es el número de células promedio de la muestra control.

Los datos son analizados y representados a través del programa OriginPro8. La mayoría de las gráficas se representan en formato *box chart* en el que se grafican los cuartiles 25% y 75%, así como los valores del 1% y 99% y la mediana. De este modo, la observación de las figuras ya permite ver si los cambios son significativos. De todos modos, también en la mayoría de los casos se procede a analizar estadísticamente la significatividad de los cambios observados, a través del test no paramétrico para muestras independientes U-*Mann Whitney*. Tanto los gráficos como los análisis estadísticos se realizan con el programa OriginPro8.

---

## ESTIMACIÓN DE EFECTOS SUBLETALES

---

Para intentar valorar los efectos que se pueden observar a nivel subletal, se realizan diferentes estrategias.

En primer lugar, el estudio de la **evolución de las curvas de crecimiento**. Si las células pierden (aunque sea temporalmente) la capacidad de dividirse, o entran en un estado de reparación en el que la división celular cambia su velocidad, eso se debería poder observar a través del análisis de las curvas de crecimiento. Para obtener estas curvas el procedimiento es el siguiente:

Se siembra una alícuota de 100  $\mu$ l de cada muestra para realizar el conteo en placa, igual que en el caso anterior. El resto de la muestra continúa incubándose en las mismas condiciones (37 °C, 150 rpm). Este procedimiento se repite cada 30 minutos. Cada muestra se siembra a 2 diferentes diluciones en al menos 4 diferentes placas de Petri, y se comparan los valores del número de cfu/ml en cada caso. Las placas se cuentan tras una incubación ON a 37 °C sin agitación. Al graficar los valores obtenemos una curva con la **evolución del número de células viables**. En este tipo de curva se puede observar si hay retraso o no en el crecimiento.

Otro método es el que permite observar la **tasa de crecimiento**. Para ello, se incuban las células en LB a 37 °C – 150 rpm y se mide la densidad óptica (OD) con el espectrofotómetro a 550 nm cada 30 minutos. Al representar gráficamente estos valores, se puede observar la curva y evaluar posibles cambios en ella (como por ejemplo la pendiente). Este método también permite calcular el tiempo de generación (tiempo necesario para duplicar el número de células) y la máxima OD obtenida después de un cultivo de toda la noche.

Una célula crece progresivamente y se divide en dos células iguales. El tiempo requerido para que la célula se divida (o para que la población de un organismo se duplique en número) se conoce como tiempo de generación o duplicación.

Numéricamente se puede calcular aplicando la expresión:

$$g = \frac{0.3 \times t}{\log N - \log N_0}$$

Donde  $g$  es el tiempo de generación (minutos)

$t$  es el intervalo de tiempo transcurrido entre las dos muestras analizadas (minutos)

$N$  es el número de bacterias inicial

$N_0$  es el número de bacterias final

Este valor del tiempo de generación es también una estimación de la velocidad específica de crecimiento, que se puede obtener a partir de la pendiente de una gráfica en escala lineal de ordenadas vs tiempo.

En el análisis de estos valores, se realiza el test no paramétrico U de Mann-Whitney con el software OriginPro8.

Hay que remarcar que los resultados obtenidos a través de la siembra en placa y los obtenidos por densidad óptica no siempre tienen por qué ser coincidentes. Ambos métodos aportan información complementaria, puesto que el comportamiento de las células al ser cultivadas en una placa con agar no es el mismo que si se incuban en un medio líquido LB. Además, la medida por densidad óptica no discrimina si las células que están aportando turbidez al medio están vivas o muertas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

#### A. EFECTO DE LA INTENSIDAD DE CAMPO ELÉCTRICO

---

Para valorar los efectos de esta magnitud se ha procedido a irradiar en diferentes condiciones durante 5 minutos a una frecuencia fija de 1 MHz. Puesto que las muestras parten de un estado inicial muy similar, se considera que los experimentos son comparables.

## VARIACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA

El primer análisis es establecer las condiciones de letalidad, es decir, qué intensidad de campo aplicada necesitamos para tener una mortalidad de aproximadamente 1 orden de magnitud, lo que es lo mismo, una supervivencia cercana al 10%. La figura representa la variación del porcentaje de supervivencia (frente a la muestra control, valores normalizados) correspondientes a 4 valores de campo.

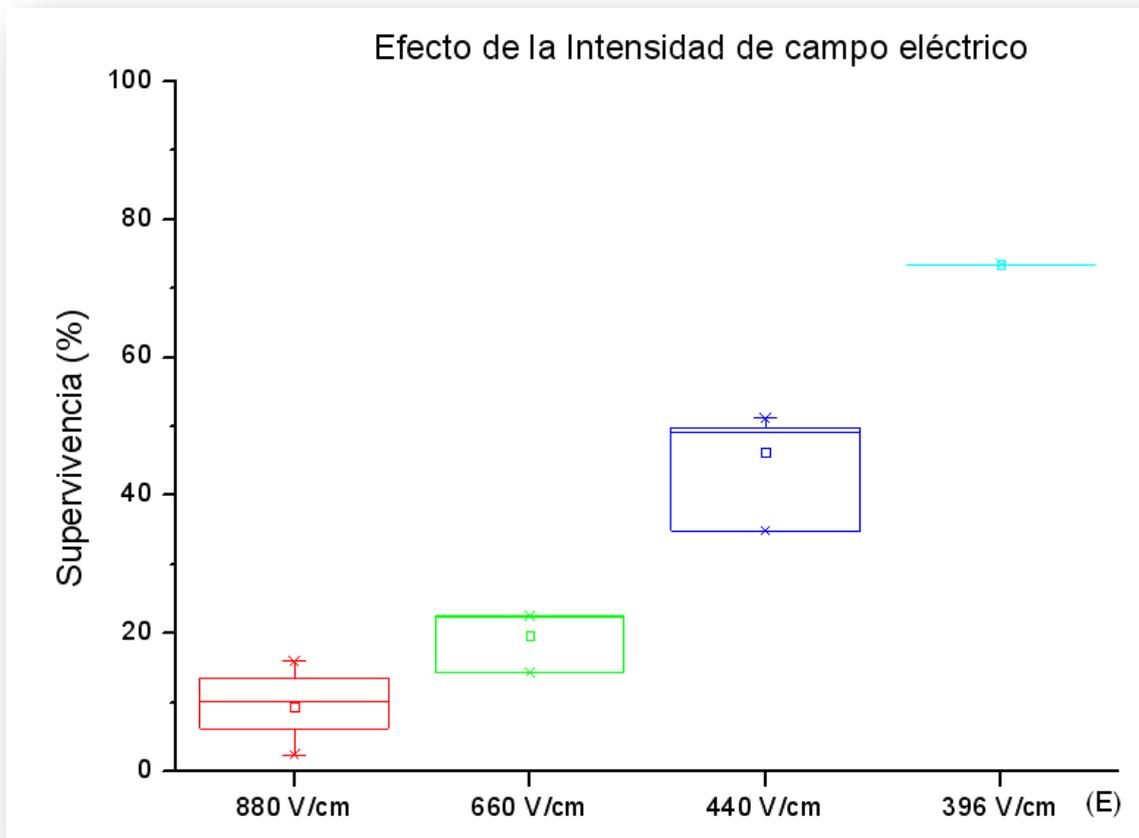


Fig 4.1: Resultados de la variación de la supervivencia en función de la intensidad de campo eléctrico.

En esta gráfica se puede observar cómo a mayor es la intensidad del campo eléctrico aplicada, menor es la supervivencia. A 880 V/cm ya tenemos un nivel de letalidad considerado alto (un orden de magnitud). Este resultado es bastante coherente con lo esperado a través del estudio de la literatura correspondiente. Otros autores cifran las intensidades de campo necesario en un valor umbral de 1000 V/cm. La dificultad radica en saber si se refiere al

campo medido en el medio o al campo efectivo sobre la pared celular o sobre la membrana. Tal y como hemos calculado en la simulación, al aplicar entre los electrodos un campo de 600 V/cm, éste no se distribuye de manera regular a lo largo de toda la bacteria. La geometría de la célula y su posición determinan el lugar donde el campo se hace más intenso, llegando a valores de casi 5 veces la intensidad aplicada. Esto significa que los valores promediados pueden ocultar la información de los valores puntuales, mucho más altos. Esta es una valoración que nos va a ocurrir en todos los casos y hace que establecer 880 V/cm como un umbral de letalidad del 90% sea arriesgado sin hacer la puntualización de que el campo es el correspondiente al medio, y no a las membranas celulares.

La literatura afirma, como hemos dicho, que valores superiores a 1 V en la membrana [124], [126] o 0,4 V a 2 V en la pared [123] producen electroporación irreversible o lo que es lo mismo, muerte celular. Estos valores de voltaje corresponden a un campo eléctrico transmembrana de 200.000 V/cm, muy superior al que obtenemos en nuestra simulación, que incluso en el peor caso (correspondiente a los polos de la bacteria en posición vertical) está un orden de magnitud por debajo. Por tanto, aparentemente la muerte debe producirse por algún otro proceso. De hecho, el conteo en placa solo permite ver qué células han sido capaces de repararse y dividirse adecuadamente tras 24h de cultivo en un medio apropiado. No permite hacer más valoraciones sobre lo que le ha ocurrido a esas células durante ese tiempo. Para poderlo valorar, tenemos que analizar los resultados correspondientes a los cambios en la dinámica de crecimiento.

---

## VARIACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

---

Para evaluar los posibles efectos subletales que pueda tener el campo eléctrico, representamos la evolución del número de células que son viables tras la exposición, después de ser incubadas y sembradas.

Cuando representamos todos los valores obtenidos en experimentación, la gráfica es la siguiente:

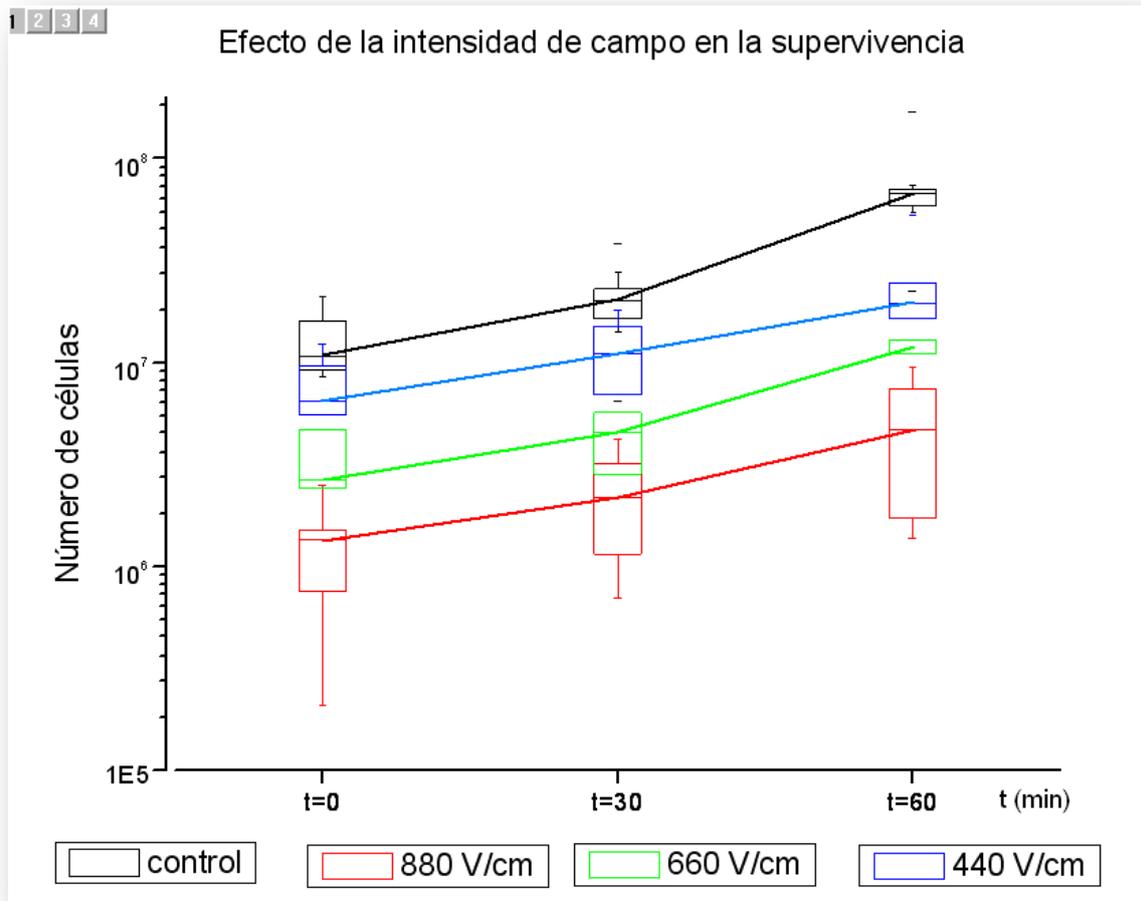


Fig 4.2: Resumen de los resultados del efecto de la intensidad de campo eléctrica en la supervivencia celular bacteriana.

En ella vemos el número de células contadas tras haberlas cultivado en placa durante toda la noche. La muestra t=0 indica que esas bacterias se sembraron recién realizado el experimento. t=30 y t=60 indica bacterias que han sido cultivadas durante 30 y 60 minutos respectivamente en LB a 37°C y posteriormente se ha sembrado una alícuota y se ha contado al día siguiente. En esta gráfica se han unido los puntos correspondientes a la mediana para mejorar la visualización de la misma. La información correspondiente al minuto t=0 es la misma de la gráfica del conteo de número de viables, solo que en este caso están representados los valores numéricos de todas las muestras, y no el porcentaje normalizado de supervivencia. La información de la siembra para t=30 y para t=60 muestra que las proporciones se mantienen. Todas las rectas tienen la misma pendiente. Como se ha comentado en la introducción, cuando el medio es favorable, las células se recuperan de manera rápida [130]. Pasado

este tiempo, las bacterias recuperan su ritmo normal. Estos datos son coherentes con estudios publicados previamente [120] en los que se afirma que después de una mortalidad inicial, las células se adaptan y continúan su crecimiento habitual. Sería de esperar que a partir de este momento el ritmo (al menos para la muestra control) se mantuviera constante.

Para profundizar en estos resultados y analizar con más detalle el ritmo de crecimiento, analizamos los datos sobre la evolución de los cultivos “en líquido”, es decir, sin sembrar, y ver cómo varía la densidad óptica, que nos permite cuantificar la cantidad de células que hay. La información se encuentra en la figura siguiente:

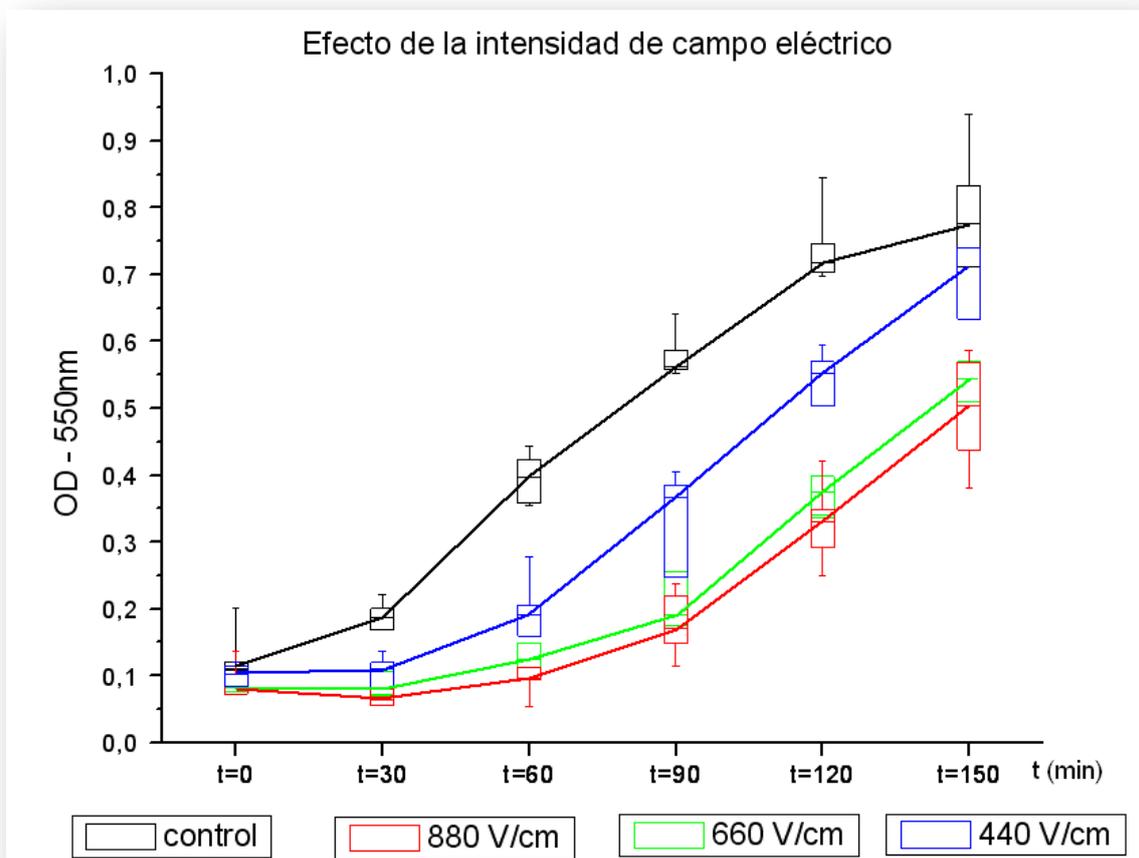


Fig 4.3: Resumen del efecto de la intensidad de campo eléctrico en la curva de crecimiento

En esta figura se representa la densidad óptica a 550 nm como método de estimación del número de células. Se deja la muestra incubando en LB y se van extrayendo alícuotas para medir la turbidez. Se observa que en el primer

momento, todas las muestras convergen en un valor muy bajo. Esto es parte del protocolo de experimentación. Si la muestra está diluida, el valor de la turbidez es muy pequeño, eso hace que este valor no sea más significativo que como punto de partida del cultivo.

A partir del momento  $t=30$  minutos, se puede empezar a diferenciar el comportamiento de las distintas muestras. De nuevo, el patrón indica que cuanto mayor es el campo eléctrico aplicado, mayor es la distancia a la muestra control. También se repite el valor obtenido en el gráfico anterior, en el cual entre el minuto 0 y el 30 se observa un ritmo de crecimiento más lento que el que ocurre posteriormente. Esto nos indica la fase de adaptación de las bacterias, y el inicio de la duplicación.

La información de esta gráfica es bastante similar a la de la gráfica anterior, es decir, el comportamiento de las células es el mismo en placa que en líquido, y probablemente la contribución de las células muertas a la DO no se pueda considerar importante, puesto que no distorsiona los resultados. La principal diferencia entre esta gráfica y la anterior está en el intervalo de  $t=0$  a  $t=30$ , en el cual se puede observar que, mientras que la muestra control se duplica a un ritmo , las muestras irradiadas no se duplican, incluso en el caso de la muestra con intensidad más alta, el valor de la turbidez disminuye. Teniendo en cuenta que la turbidez valora por igual las células vivas y las muertas, solo podemos atribuir esta leve disminución del valor a errores de medida por el método experimental. En cualquier caso, la información de este intervalo indica que durante este periodo, las células no se han dividido con normalidad. No es fácil saber por qué en cultivo líquido se aprecia este efecto mientras que en el plaqueo en siembra no se observa. Probablemente la explicación esté en la información del resto de la gráfica. A partir del minuto 30 y, especialmente, del minuto 60, las células se duplican a un ritmo similar al de la muestra control, indicando que los procesos de reparación ya se deben haber realizado completamente. Esto explicaría por qué las muestras sembradas (entre las que hay algunas dañadas y otras que no), tienen tiempo para autorepararse y tras 24 horas, mostrar un nivel de crecimiento "normal". En el intervalo de 30 a 60 minutos las células empiezan a duplicarse a un ritmo más rápido, que en el caso de la muestra control se mantiene a un ritmo más o menos constante

hasta el minuto 120. A partir de este momento el ritmo empieza a disminuir, posiblemente debido a un agotamiento de nutrientes en el medio por la alta densidad bacteriana. A partir del minuto 90, la distancia entre todas las muestras no parece espaciarse más, a pesar de que la dispersión de los datos es grande. No se puede diferenciar estadísticamente entre la muestra irradiada a 660 V/cm y a 880 V/cm.

Para analizar con más detalle la dinámica de crecimiento, se han calculado los tiempos de generación correspondientes a la gráfica anterior.

---

### VARIACIÓN DE LOS TIEMPOS DE GENERACIÓN

---

Los resultados están representados en la gráfica siguiente:

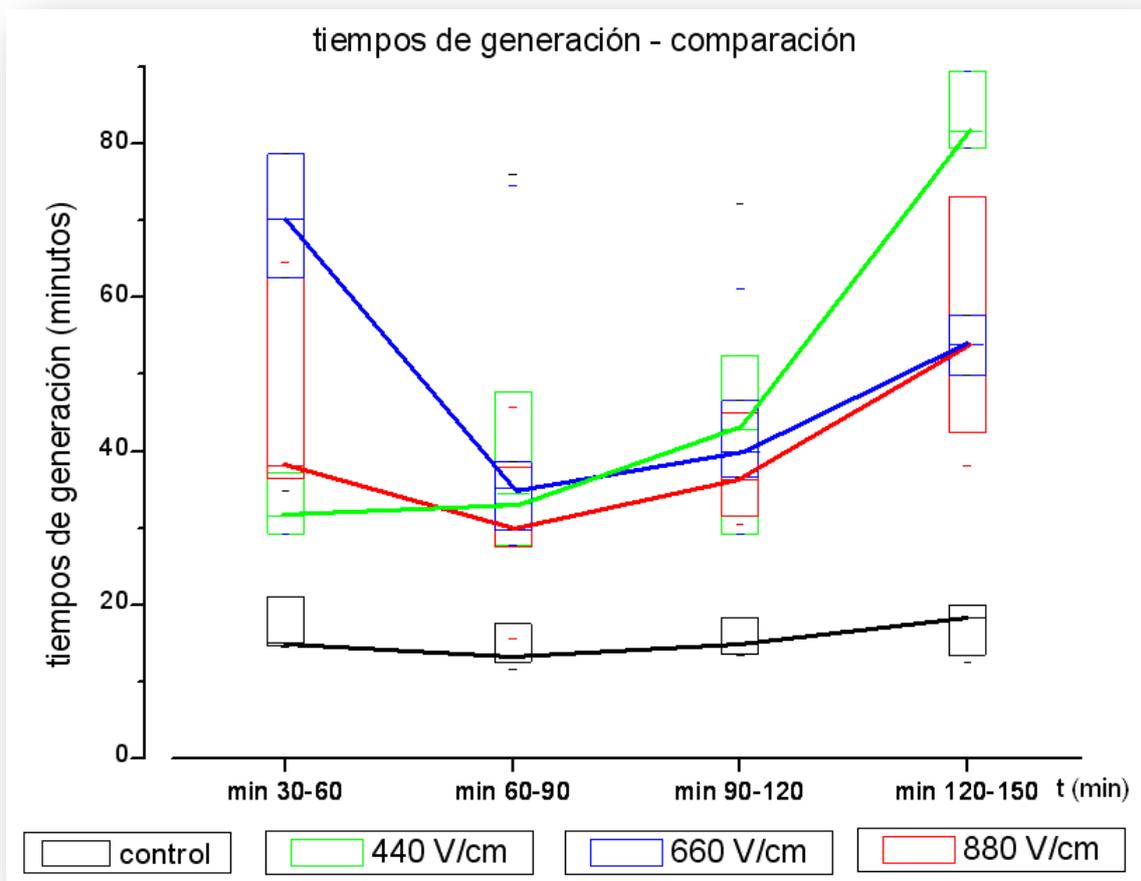


Fig 4.4: Resumen de los cambios en los tiempos de generación debidos a la exposición a diferentes valores de campo eléctrico.

En esta gráfica no se disponen de datos suficientemente fiables para calcular los tiempos de generación del primer intervalo ( $t=0$  a  $t=30$ ). Por ser valores muy pequeños, los cálculos dan promedios sin sentido. Los intervalos siguientes, a pesar de tener una dispersión grande también, sí pueden aportar algo de luz. Se puede observar que los tiempos de las muestras irradiadas son, en todos los casos, significativamente más altos que los de las muestras control. Los tiempos de la muestra control se mantienen constantes con un promedio de 20 minutos, cosa que es de esperar, puesto que las bacterias tienen un tiempo de duplicación bastante estable mientras no se cambien las condiciones ambientales.

La variabilidad observada puede ser atribuida a la variabilidad interna de experimentación. Las muestras irradiadas muestran todas ellas un tiempo de generación superior, aunque no es posible distinguir estadísticamente entre los diferentes niveles de irradiación. Eso significa que las muestras irradiadas, más allá del minuto 30 también empiezan a duplicarse a una velocidad más elevada, aunque lejana de la velocidad de las muestras control. Esta información es coherente con la publicada [130] en la que se explica que el daño subletal es de esperar que alargue la fase de recuperación y de adaptación, y por tanto, que haga que los tiempos de generación sean más largos. Esta velocidad se hace de nuevo un poco más lenta en los intervalos siguientes, especialmente a partir del minuto 120, en este caso probablemente debido a un cambio en el medio.

Es de especial mención el comportamiento de la muestra irradiada a menor intensidad. Esta muestra tiene tiempos de generación cada vez más lentos, como si no hubiera podido recuperarse del todo de los daños producidos, incluso a partir del minuto 120 tiene tiempos significativamente mayores que todas las demás muestras. Una posible interpretación de ello puede ser que a valores inferiores de campo predominan los daños subletales, de los cuales las bacterias no siempre consiguen recuperarse, mientras que a valores superiores predomina la mortalidad, y las bacterias que consiguen sobrevivir parecen recuperarse con más facilidad de los daños.

## VARIACIÓN DEL NIVEL MÁXIMO DE OD ALCANZADO

Una vez obtenidas todas las muestras, se dejan incubar toda la noche y se observan los valores máximos obtenidos en cada uno. En la gráfica siguiente se observa que los valores finales alcanzados por las muestras irradiadas sí pueden considerarse estadísticamente diferentes ( $p=0.027$ ), mientras que no es posible diferenciar entre las muestras irradiadas entre sí. Este resultado también puede indicar que algo ha ocurrido en las células irradiadas que no han sido capaces de alcanzar el mismo nivel que la muestra control. Si la reparación hubiera sido total, habrían llegado al mismo nivel pasado suficiente tiempo. Es posible que un alto número de células muertas modifique el medio de forma que las células supervivientes no se encuentren con el mismo medio que la muestra control y tal vez estén en condiciones diferentes de crecimiento.

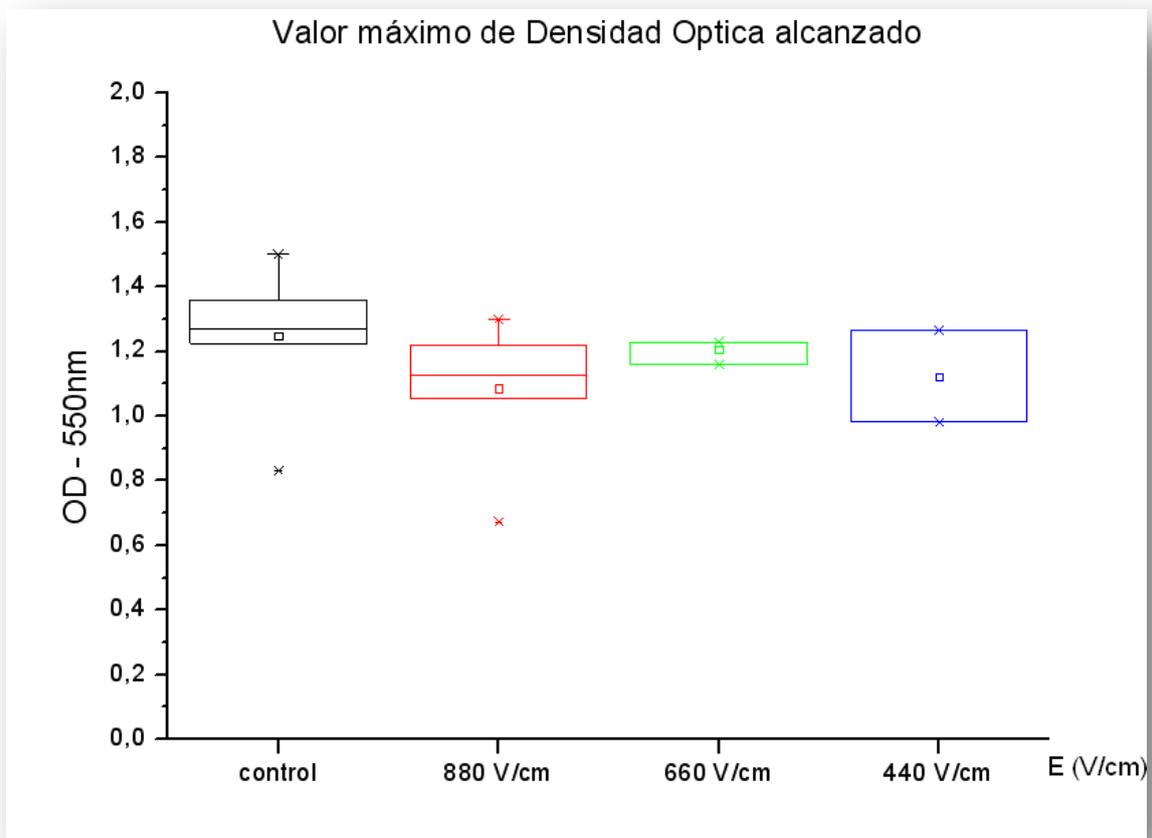


Fig 4.5: Valores máximos de Densidad Óptica alcanzados tras un cultivo ON a diferentes valores de intensidad de campo eléctrico.

Tal vez este resultado tenga relación con lo comentado sobre que las bacterias inactivadas pueden haber resellado su membrana, pero haber perdido algunas de sus funciones vitales, entre ellas la capacidad de multiplicarse [125].

## B. EFECTO DE LA FRECUENCIA

Se ha trabajado con 3 frecuencias para estudiar el efecto sobre la viabilidad. En todos los casos se ha aplicado el campo eléctrico durante 5 minutos, con una intensidad de 600 V/cm. El análisis de la densidad óptica de las alícuotas obtenidas cada 30 minutos como estimación del número de bacterias, ha arrojado los siguientes resultados:

### 100 KHZ

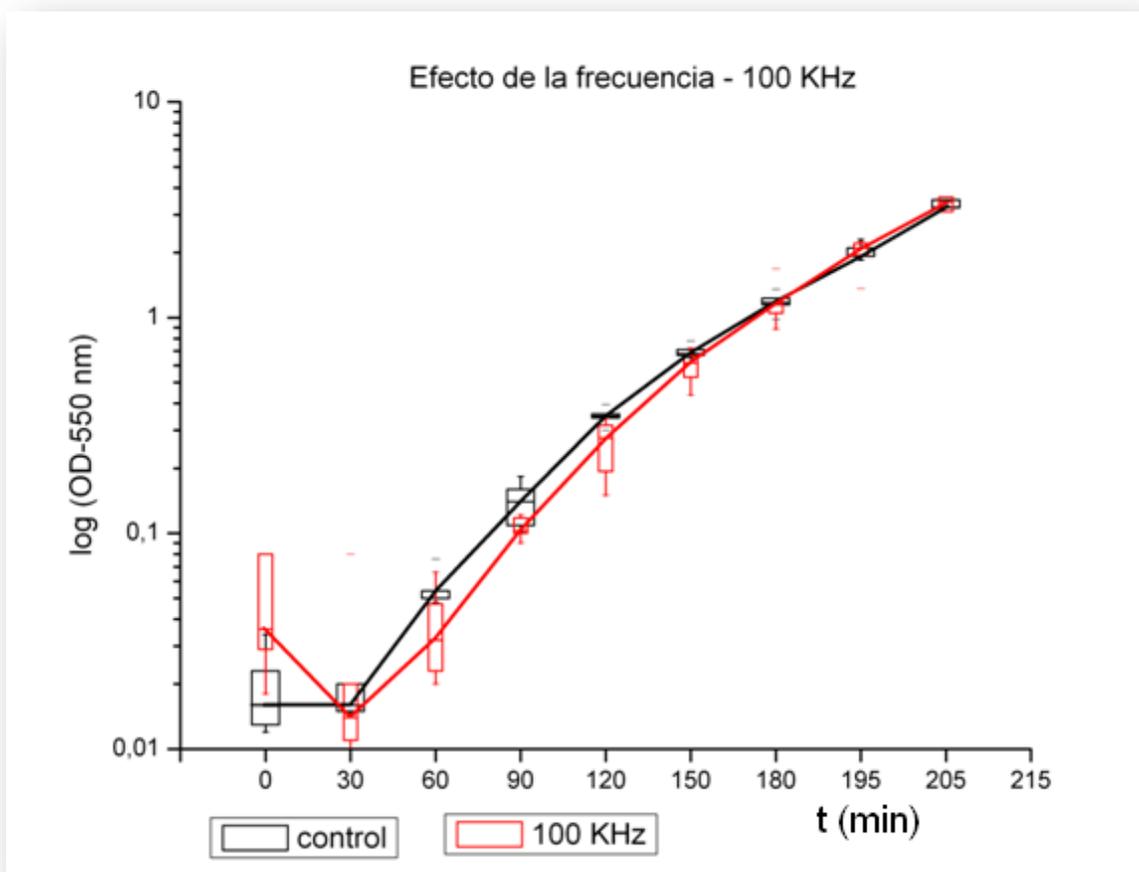


Fig 4.6: Representación de la variación de los cambios en la Densidad Óptica a lo largo del tiempo en una muestra control y en una muestra irradiada a 100 KHz.

En la curva de 100 KHz se observa que el valor inicial de la densidad óptica como nivel estimativo del número de células es superior en el caso de la muestra irradiada que la muestra control. Este dato no tiene más sentido que una falta de precisión en las medidas de densidad óptica. Como he mencionado anteriormente, a valores bajos de concentración la precisión de la medida no es muy grande. Si hay restos celulares dispersos se puede producir un incremento de la turbidez no asociado a un mayor número de bacterias, sino de fragmentos de las mismas. Se mantiene el comportamiento de “adaptación” de las células control durante los primeros 30 minutos. Pasado aproximadamente 1 hora, se observa que la muestra irradiada se mantiene ligeramente por debajo de la muestra control, pero las barras de error sugieren que ambos valores no tienen una diferencia que se pueda considerar estadísticamente significativa. Se ha calculado estadísticamente si las diferencias son significativas en los valores de densidad óptica de los diferentes intervalos. La tabla siguiente muestra los resultados de la hipótesis de que los valores control sea superiores a los valores irradiados. Los valores solo se pueden considerar estadísticamente significativos en las mediciones correspondientes al minuto 60.

0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
>0.05	>0.05	0.0047	>0.05	0.03	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

---

## 1 MHz

---

En la curva correspondiente a 1 MHz, sí se puede observar que hay un cierto retraso en la curva. El valor inicial no es inferior al del control. Posteriormente, estos valores van difiriendo, indicando que las dinámicas de crecimiento son diferentes. La muestra control tiene una fase de adaptación en el intervalo de 0 a 30 minutos y después crece de forma casi lineal (la gráfica es logarítmica) y a partir de un valor de unos 180 minutos el crecimiento se empieza a ralentiza. La muestra irradiada tiene una fase más larga de adaptación (los valores están muy dispersos) hasta el minuto 60 y a partir de ahí sigue un ritmo de crecimiento similar a la control, y a partir del minuto 180 se unen y siguen evoluciones muy similares. Esto indica que las células han sido capaces de repararse totalmente.

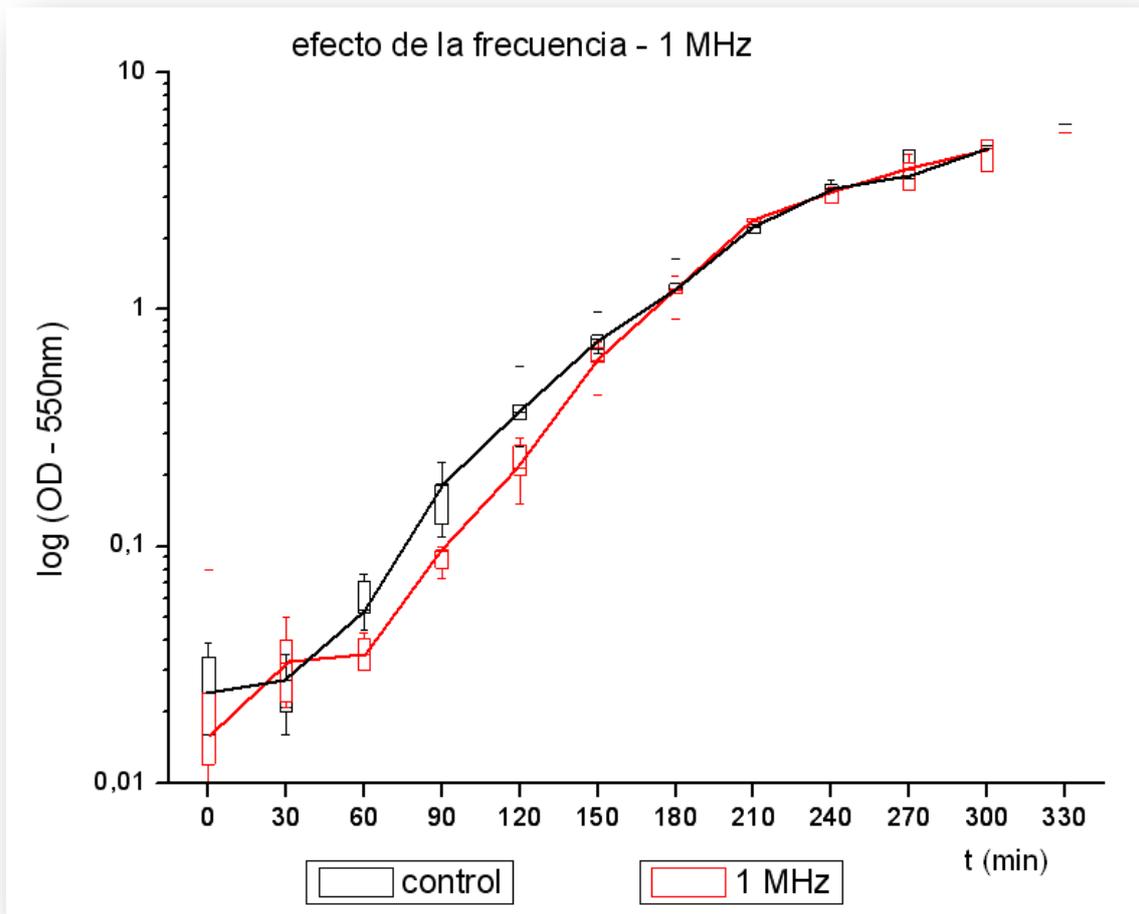


Fig 4.7: Representación de la variación de los cambios en la Densidad Óptica a lo largo del tiempo en una muestra control y en una muestra irradiada a 1 MHz.

Al aplicar el test estadístico U-Mann Withney para la hipótesis valores de control mayores que valores irradiados. Los resultados muestran que entre el minuto 60 y el 150 se pueden considerar estadísticamente significativos, como se ve en la tabla:

0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
>0.05	>0.05	0.0099	0.00609	0.01835	0.0473	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

El comportamiento observado en esta gráfica no se corresponde totalmente con el correspondiente al del análisis de intensidad de campo, realizado con la misma intensidad de campo y con la misma frecuencia, donde veíamos que la muestra irradiada siempre se duplicaba de forma mucho más lenta, y nunca alcanzaba a la muestra control. Probablemente se deba a que las puestas en marcha (*set up*) de ambas experimentaciones son diferentes. En este caso

estamos utilizando chips de oro con cámaras de 40  $\mu\text{m}$ , mientras que en el estudio de la intensidad de campo los chips tienen cámaras de 200  $\mu\text{m}$ . El motivo por el que se realizó este cambio en la configuración es que, para poder aplicar los campos deseados a una frecuencia de 10 MHz es necesario no utilizar el amplificador con el que habitualmente conseguíamos la señal deseada, puesto que dicho aparato no es capaz de trabajar a 10 MHz. Por ello se utilizaron chips más delgados que permitieran conseguir la misma intensidad de campo sin necesidad de amplificación.

---

### 10 MHz

---

Los resultados referentes a la irradiación a 10 MHz no muestran diferencias entre ambas muestras, siendo los valores muy similares, razón por la cual no se ha considerado necesario hacer el análisis estadístico.

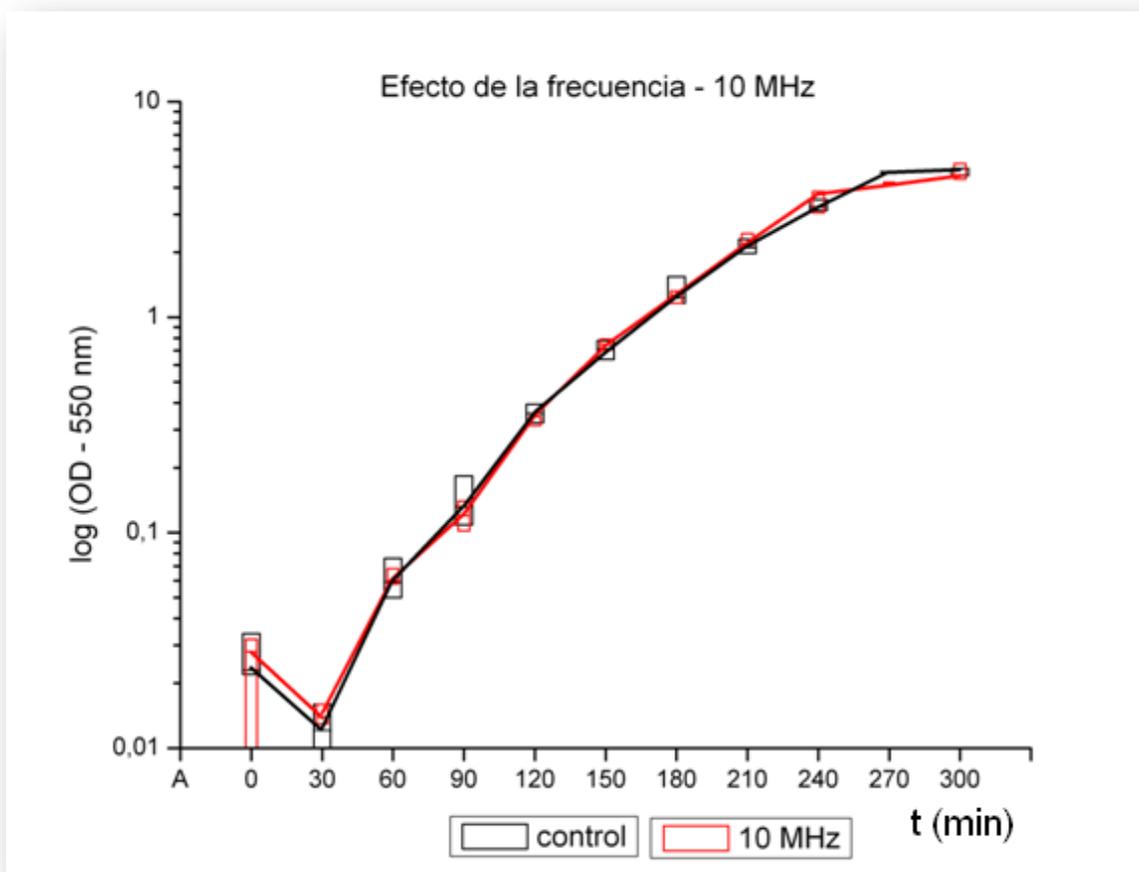


Fig 4.8: Representación de la variación de los cambios en la Densidad Óptica a lo largo del tiempo en una muestra control y en una muestra irradiada a 10MKHz.

Como he comentado anteriormente, los resultados al cambiar el *set up* de la cámara de 200  $\mu\text{m}$  a la cámara de 40  $\mu\text{m}$  son diferentes. Para asegurar que los resultados anteriores son correctos, se repitieron los experimentos con el último de los *set up* realizados, con los chips de ITO. El objetivo era confirmar los resultados anteriores, eliminando la posibilidad de que hubiera burbujas en el llenado que alteraran los valores de impedancia, y también hacer una última valoración del efecto tanto de la intensidad de campo como de la frecuencia. Los resultados se muestran en la gráfica siguiente, correspondiente a tiempos de exposición de 5 minutos. En este caso no se puede aplicar la frecuencia de 10 MHz, puesto que el amplificador no lo soporta, por ello se ha aplicado frecuencias de 10 KHz, 100 KHz y 1 MHz, que siguen estando en el intervalo detectado como crítico respecto al comportamiento simulado de la bacteria.

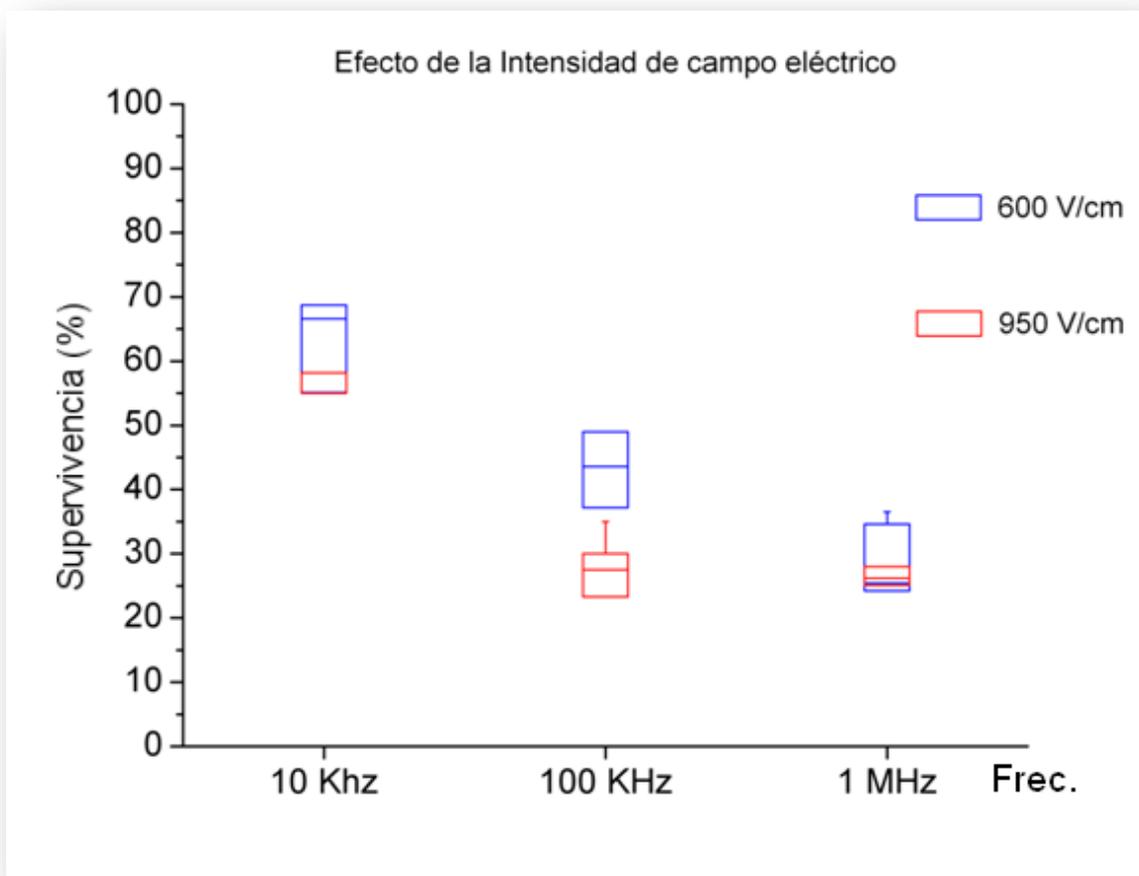


Fig 4.9: Comparación de los efectos producidos por la intensidad de campo eléctrico a varias frecuencias en la supervivencia celular.

Los resultados de esta gráfica corroboran la información obtenida anteriormente: la mortalidad es proporcional al campo aplicado, pero esta

mortalidad es dependiente de la frecuencia. A frecuencias superiores la mortalidad se hace más elevada. A frecuencias bajas, la mortalidad es muy inferior, no pudiéndose distinguir entre una intensidad de campo media y una elevada. A 1 MHz tampoco es posible distinguir las, pero en este caso la supervivencia es mucho menor. El hecho de que la frecuencia afecte a la impedancia hace imprescindible el estudio de la supervivencia respecto a la intensidad de campo, para descartar posibles hipótesis e interpretaciones erróneas.

---

### C. EFECTO DE LA CORRIENTE ELÉCTRICA

---

Los experimentos realizados muestran que, tras una exposición de 5 minutos a 1 MHz, la supervivencia varía de la siguiente manera:

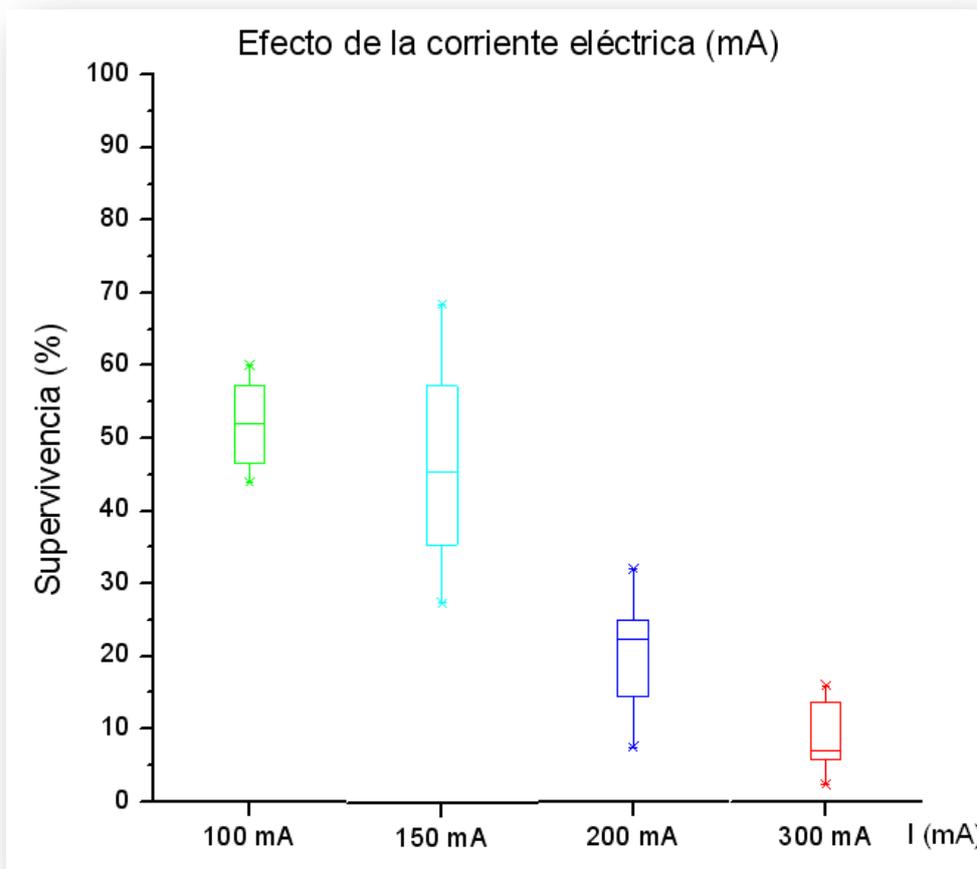


Fig 4.10: Comparación de los efectos producidos por diferentes valores de corriente eléctrica

En este gráfico podemos observar cómo la supervivencia es inversamente proporcional al valor de la corriente eléctrica que circula por el chip. Los resultados muestran una variabilidad mucho más alta que la esperada, por lo que las pruebas se repitieron con los chips de ITO, combinadas con la frecuencia para ver también los posibles efectos combinados. Los resultados se muestran a continuación:

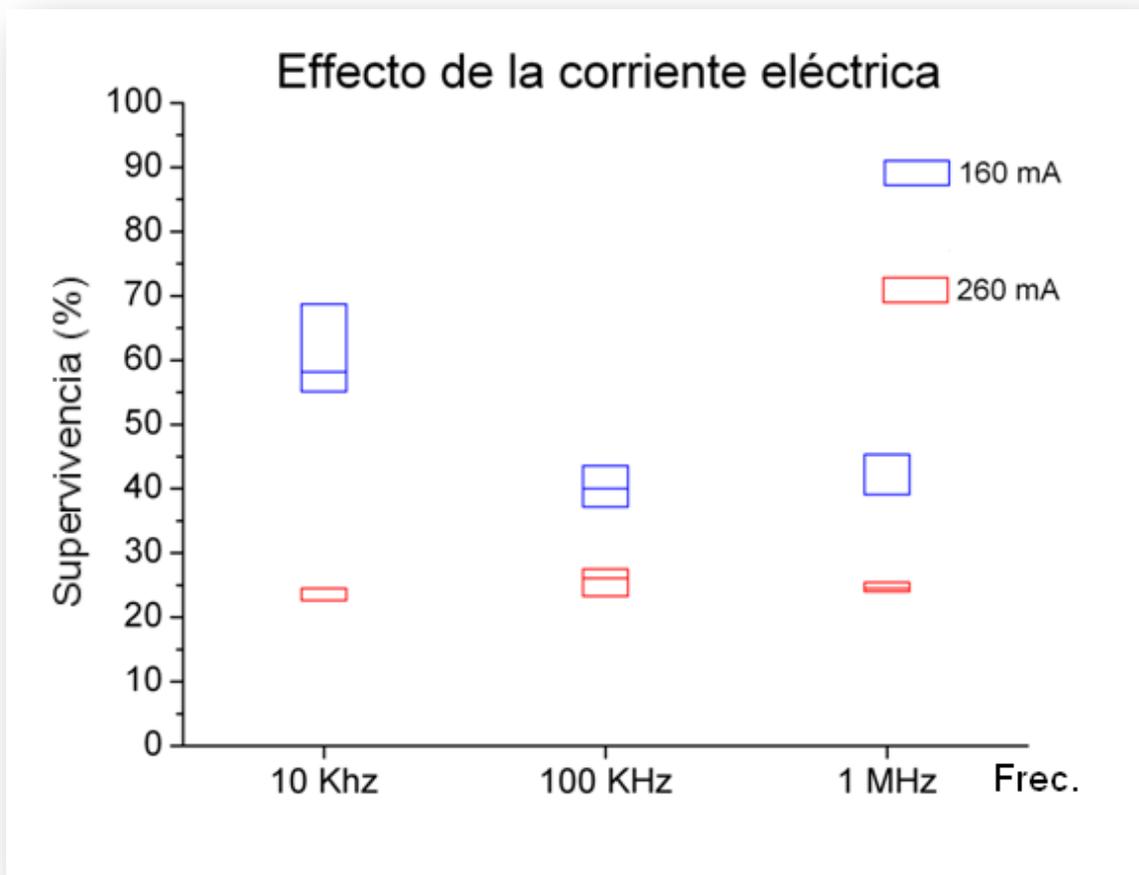


Fig 4.11: Comparación de los efectos producidos por la corriente eléctrica a varias frecuencias en la supervivencia celular

Por un lado, observamos que la variabilidad ha disminuido mucho con este procedimiento experimental, y que los valores de la mediana coinciden con los de la gráfica anterior, cosa que valida que, a pesar de la variabilidad obtenida anteriormente, el comportamiento estaba bien representado en líneas generales. Esta gráfica nos aporta además una información realmente interesante. Para la intensidad de 160 mA la frecuencia es un valor que afecta,

pero cuando la intensidad aumenta, la mortalidad no depende de la frecuencia. Es decir, la mortalidad es sobre todo, un asunto de la corriente eléctrica.

La curva experimental (y teórica) de la impedancia nos indicaban que a partir de 100 KHz la impedancia empieza a disminuir, siendo 1 MHz un valor en el que la impedancia ha disminuido a un valor cercano a la mitad de su valor inicial. Es decir, a partir de 100 KHz la intensidad empieza a aumentar. Por eso, fijar la corriente es la única forma de saber si el parámetro que afecta es realmente la frecuencia (como parecía en las gráficas de intensidad de campo combinadas con frecuencia), o la corriente eléctrica. Por la información que tenemos en esta gráfica podemos concluir que el parámetro fundamental no es la intensidad de campo sino la corriente eléctrica. Este es un dato importante, puesto que anteriormente, la mayoría de estudios no hacen esta distinción, atribuyendo a la intensidad de campo el efecto de la mortalidad. Tan solo en [140] se cita que la corriente eléctrica es la causa de la inactivación de la *Sacharomices Cerevisiae*, y en [141] que los efectos (relativos a la electroporación) dependen básicamente de la densidad de corriente y de la conductividad. Estos resultados (a los que se le une los obtenidos experimentalmente) están en conflicto con la literatura previa. Para un valor determinado de corriente eléctrica, la diferencia entre la supervivencia a 10 KHz y a 100 KHz es significativa, como ocurría también en la gráfica que representa el efecto de la intensidad de campo eléctrico. Recordemos que las simulaciones realizadas nos dicen que alrededor de los 100 KHz (independientemente de la posición de la bacteria), la corriente eléctrica empieza a penetrar en la bacteria. A partir de 1 MHz, la disipación de potencia se produce básicamente en el citoplasma de la célula. Es decir, en este caso la gráfica está indicando que mientras que la corriente circula por el exterior, tenemos una determinada mortalidad (si la intensidad es muy grande, la supervivencia se ve muy limitada), pero en el momento en que la corriente empieza a penetrar en la célula, la supervivencia disminuye. No depende tanto de la intensidad de campo que tenemos en las diferentes partes de la célula, que no se iguala en toda la célula con el buffer hasta valores muy superiores de frecuencia, dependiendo de la posición de la bacteria.

## 4. CONCLUSIONES

Para estudiar el efecto de los diferentes parámetros se han realizado muchos experimentos, más de 300, con más de 3000 placas sembradas. Todo ello ha sido necesario por causa de las variabilidades observadas, que iban más allá de lo esperado. Aparentemente había algún factor que no estábamos teniendo en cuenta y que distorsionaba los resultados. Es por ello que a lo largo de la experimentación se ha ido afinando el *setup*, de forma que cada vez aportara más seguridad en los resultados. El principal inconveniente ha sido la variabilidad observada en la supervivencia de las bacterias bajo las mismas condiciones de experimentación, variabilidad superior a la esperada por los procedimientos utilizados. El hecho de utilizar chips de oro no permite observar la formación de burbujas durante la introducción de la muestra. El uso de los chips de ITO permitió dar una visión más precisa a los resultados, a pesar de que las líneas generales de los resultados de ambos chips son coincidentes.

Las conclusiones a las que nos llevan son básicamente las siguientes:

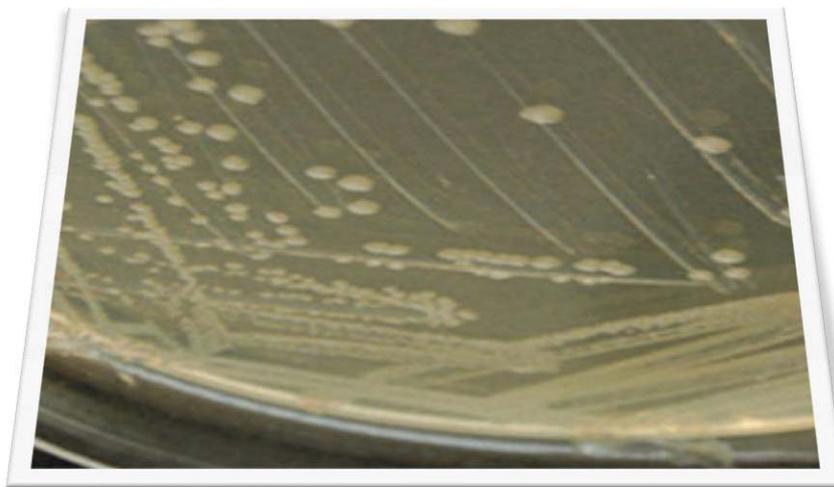
- Respecto a la variación de la intensidad de campo eléctrico, no es necesario llegar a un valor como el cifrado habitualmente de 1000 V/cm, pudiendo tener inactivaciones del 80% con una intensidad de campo de 660 V/cm, y de un 50 % con campos de 400 V/cm
- La inactivación de las bacterias es proporcional a la intensidad del campo eléctrico aplicado, cumpliéndose la máxima de que a mayor campo, mayor letalidad.
- Una vez aplicado el campo, hay una mortalidad inicial seguida de un proceso de reparación de daños subletales por parte de las bacterias supervivientes. La posibilidad de observar los daños producidos a nivel subletal depende no solo de las condiciones de irradiación, sino del posterior tratamiento de las muestras irradiadas. Si las bacterias son incubadas inmediatamente en medios favorables, muestran una recuperación mucho mayor. Por el protocolo seguido, esta reparación debería producirse en condiciones óptimas. Este proceso se evidencia en el aumento de los tiempos de generación (el tiempo que transcurre entre dos generaciones de bacterias) que es significativamente mayor

en las muestras irradiadas que en las muestras control. La dinámica de crecimiento entre las muestras control e irradiadas se puede considerar diferente, aunque no se puede distinguir claramente entre las distintas muestras irradiadas. También se ha observado que tras un cultivo *overnight* las muestras control siempre alcanzan valores más altos de población que las muestras irradiadas, lo cual indica probablemente que las condiciones del medio han cambiado.

- La frecuencia afecta especialmente a 1 MHz, valor esperado por los resultados obtenidos en las simulaciones, en las que se muestra que la corriente eléctrica empieza a atravesar la bacteria a partir de un valor entre los 100 KHz y 1 MHz.
- El parámetro que más afecta a la supervivencia es la corriente eléctrica. A través de las simulaciones realizadas tanto del comportamiento de la bacteria bajo el campo como de la impedancia del sistema, observamos que el aparente efecto de la frecuencia al analizar el efecto de la intensidad de campo, no es tal sino que es un efecto de la corriente eléctrica. Al aumentar la frecuencia por encima de 100 KHz la impedancia comienza a bajar, y la corriente eléctrica a aumentar, y es precisamente la corriente la que más afecta a la viabilidad. Por eso cuando la frecuencia aumenta a valores entre 100 KHz – 1 MHz, el comportamiento respecto a la supervivencia parece no depender de la frecuencia, por ser especialmente dependiente de la corriente eléctrica, que aumenta a casi el doble a partir de este intervalo.

# Capítulo 5

## ESTUDIO DE LAS MAGNITUDES NO ELÉCTRICAS Y LA SINERGÍA CON LOS EFECTOS ELÉCTRICOS EN *E. COLI*



# 1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior hemos estudiado exhaustivamente la contribución de las magnitudes eléctricas a la supervivencia de nuestro modelo bacteriano, detectando y distinguiendo entre efectos letales y subletales. En este capítulo analizamos cómo afectan las magnitudes no eléctricas, como la temperatura, el tiempo o la concentración, así como las sinergias que se producen entre ellas y con los parámetros eléctricos. Estas magnitudes son intrínsecas al procedimiento experimental, por eso es necesario estudiar también su contribución, de modo que al tenerlas caracterizadas se puedan diferenciar bien sus efectos y sus sinergias con los efectos de las magnitudes eléctricas.

---

## A. EFECTO DE LA TEMPERATURA

---

A pesar de que el enfoque de nuestra investigación se centra en los efectos no térmicos de los campos eléctricos y que para ello, se mantiene termostataado el sistema a 25°C, sabemos que no es posible evitar los calentamientos locales que se producen por efecto Joule. También se conoce que los efectos no térmicos actúan sinérgicamente con la temperatura [124][142]. Por un lado, se sabe que las células son más sensibles a los campos EM cuando están a alta temperatura. Estos resultados se pueden interpretar con la teoría de Rosen de las membranas [143]. Según esta teoría, los campos afectan a los organismos vivos por las propiedades de los fosfolípidos. La reorientación de estas moléculas con los campos EM resulta en la deformación de los canales iónicos alterando su cinética de activación. Al aumentar la temperatura, la excitación rotacional inducida térmicamente de la cadena de glúcidos facilita la reorientación de las moléculas, de modo que amplifica el efecto de los campos EM.

Una de las primeras respuestas de las células cuando son expuestas a una fuente térmica es la producción de las llamadas *Heat Shock Proteins* (HSP), encargadas de mantener la integridad del resto de proteínas, es decir, que actúan como elemento de protección de las proteínas celulares.

Por otro lado, los tratamientos previos de calentamiento y enfriamiento pueden modificar la resistencia de las células a los campos EM. El potencial crítico depende también de la estructura de la membrana y de la temperatura, disminuyendo si aumenta la temperatura [124]. Se conoce que *E. coli* resiste mejor si está a temperatura entre 7 y 24 °C. Esta resistencia puede ser debida a la baja fluidez de la membrana que previene la electroporación. Entre 24 y 30° C se observa un incremento en el daño y en la inactivación bacteriana. A partir de una temperatura de 38 °C, el proceso se convierte en todo o nada, con un incremento de la letalidad debido a la sinergia temperatura-electricidad. [122] Hay que considerar que el efecto es por sinergia, puesto que a 38° C las bacterias pueden sobrevivir y reproducirse sin mayor dificultad. Ciertamente, la sinergia entre los campos eléctricos y la temperatura es una estrategia bien conocida y utilizada para aumentar la letalidad [125], [144]

En general, la conductividad depende linealmente de la viscosidad, y la viscosidad de la suspensión depende a su vez de la temperatura. Por ello, la temperatura afecta directamente a la conductividad. Cuando la temperatura varía 1 °C, la conductividad del medio cambia alrededor de un 3% [141].

---

## B. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN

---

La concentración inicial microbiana parece tener un importante papel en el efecto de inactivación del campo eléctrico, a pesar de que hay controversia al respecto. Se ha dicho tanto que no afecta [145][142] como que la inactivación está inversamente relacionada con la concentración inicial de células [124][129], asumiendo la hipótesis de un mecanismo de protección por formación de *clusters* o grupos de bacterias. Las células dentro de estos *clusters* no tendrían un campo eléctrico tan fuerte como las que están en la parte exterior, lo cual haría que se inactivaran en menor medida. Sin embargo, otros autores afirman que la inactivación de microorganismos es linealmente proporcional al tamaño del inóculo. Proponen que las bacterias forman una especie de “collar de perlas” por las fuerzas atractivas que surgen de los dipolos. Cuando la concentración de la célula aumenta, la probabilidad de formar “collares” aumenta. Las células mayores son más frágiles que las más

pequeñas [123], y el tamaño de estas “células equivalentes” aumenta la eficiencia de un tratamiento eléctrico que lleva a un valor de campo eléctrico menor.

---

## C. EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN

---

No hay muchos estudios previos que analicen el efecto del tiempo de exposición en la supervivencia. La mayoría de estudios hacen referencia a campos pulsantes, que no son comparables a los aplicados en este dispositivo. Los que utilizan campos similares a los estudiados, aplican tiempos realmente distintos, sin justificar por qué los escogen o qué efecto pueden tener. De este modo, los tiempos pueden ser tan variables como 10 segundos [146], 90 segundos [147], entre 2 minutos y medio y 20 minutos [124], entre 15 y 40 minutos [148], 2 horas [64] e incluso 3 horas [140].

Respecto a la valoración que hacen sobre los tiempos aplicados en *setup* similares al utilizado en nuestra experimentación, tan solo hay dos referencias al efecto del tiempo. En la primera, se explica que hay un primer instante en el que la aplicación del campo produce una muerte importante de bacterias, pero posteriormente las células se adaptan al campo y el número de cfu deja de decrecer [120]

En la segunda, llegan a la conclusión de que un incremento de tiempo de 2 minutos a 20 minutos permite una acumulación del potencial transmembrana que hace que se llegue al umbral de rotura en los vértices de la bacteria, permitiendo inactivaciones a valores de campo del orden de 200 V/cm [124].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos utilizados son los mismos descritos en el capítulo anterior, referentes a:

- Preparación de las muestras
- Tratamiento eléctrico
- Evaluación de los resultados

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. EFECTO DE LA TEMPERATURA

En primer lugar, se ha comprobado que el efecto de la temperatura (sin campo eléctrico) no es suficiente para producir la letalidad observada. A pesar de controlar la excursión térmica global, no podemos estar seguros de que no haya incrementos locales. Este experimento nos permite ver hasta qué punto un incremento de temperatura puede alterar los resultados en cuanto a viabilidad.

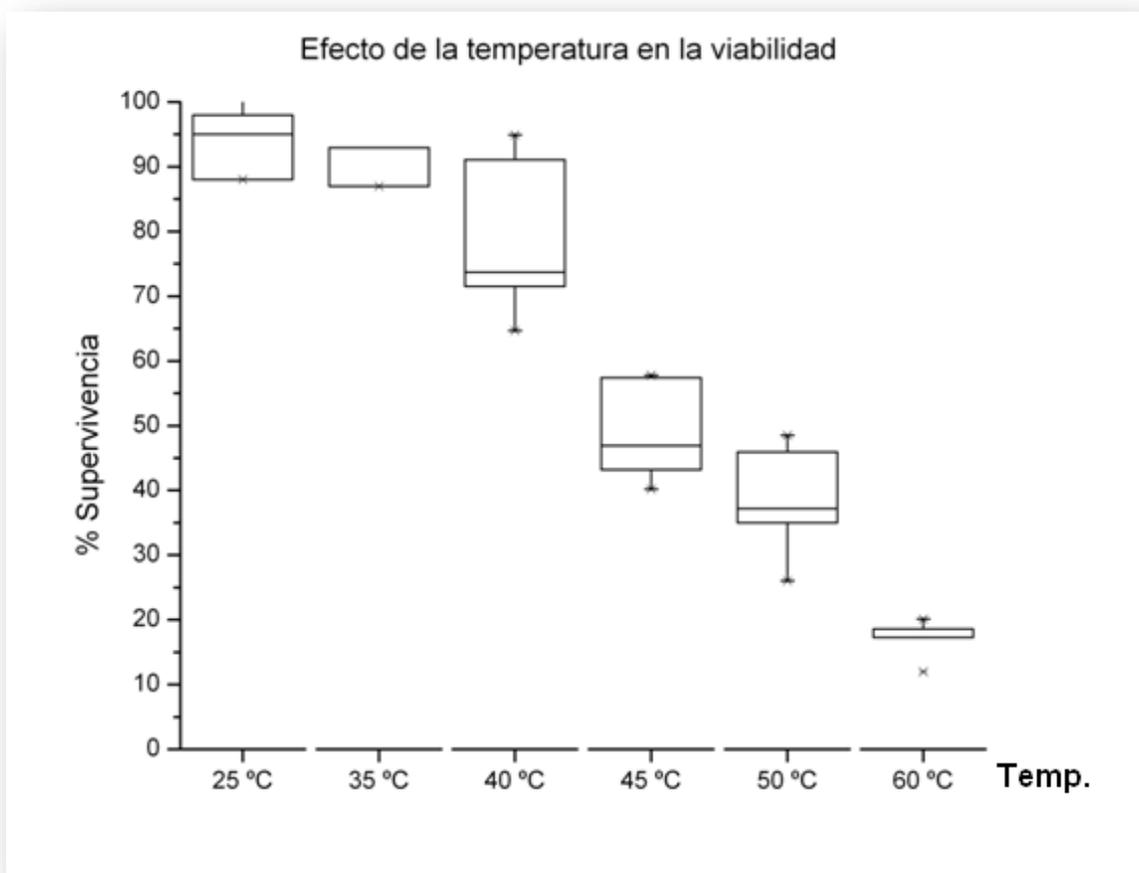


Fig 5.1: Efecto de la temperatura (sin exposición a campo eléctrico) en la viabilidad celular

Tal y como se esperaba, el efecto de la temperatura no explica los resultados obtenidos en los apartados anteriores. Se puede observar que hasta los 40 °C la viabilidad no se ve afectada. La alta variabilidad a esta temperatura hace pensar que probablemente alrededor de esta temperatura los efectos empiezan a hacerse importantes. A partir de 45 °C se puede observar como la supervivencia va disminuyendo a medida que aumenta la temperatura global del sistema.

Tampoco los tiempos de generación se ven alterados por la aplicación de temperatura de 40°C sin campo eléctrico, mientras que una muestra irradiada en un dispositivo termostataado a 25°C sí que muestra variaciones relevantes en los tiempos de generación.

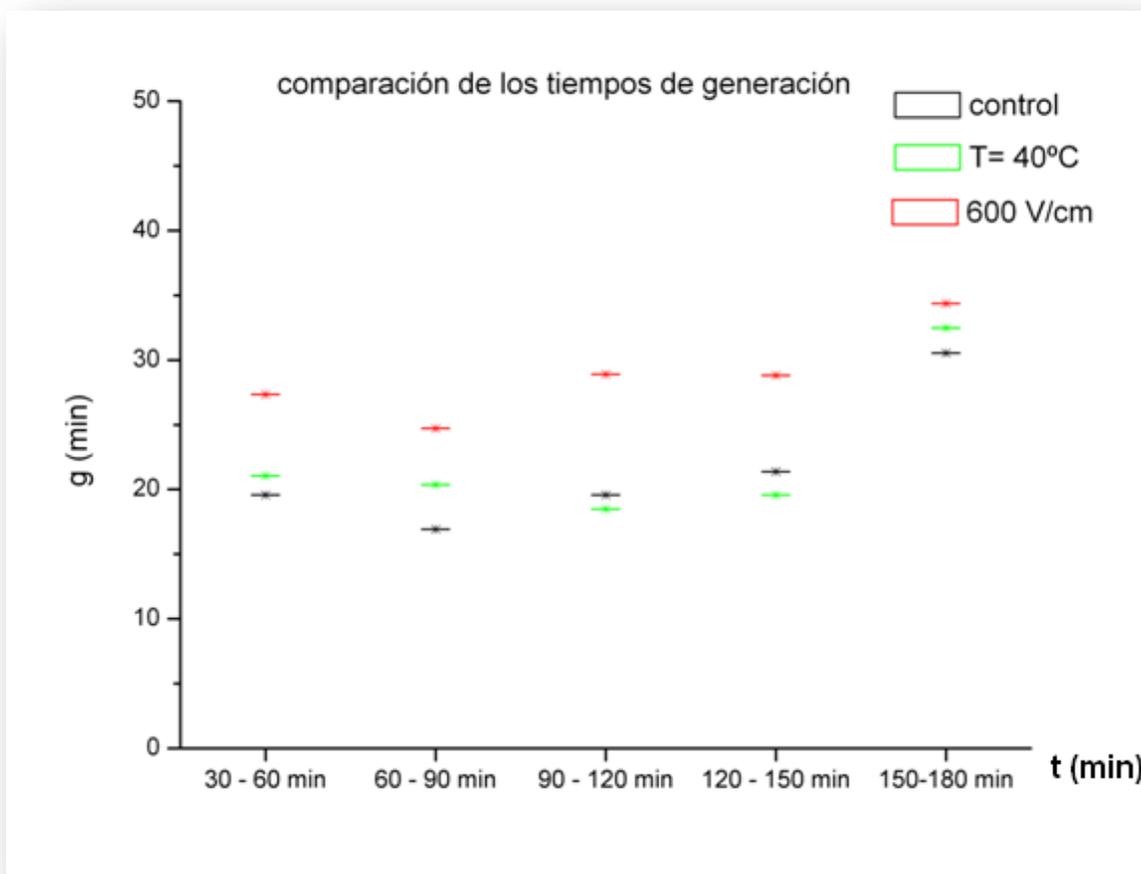


Fig 5.2: Comparación de los efectos producidos sobre los tiempos de generación por la intensidad de campo eléctrico y por la temperatura

A continuación se muestran los resultados de los experimentos en los que se trata de valorar los efectos combinados de Temperatura y campo eléctrico.

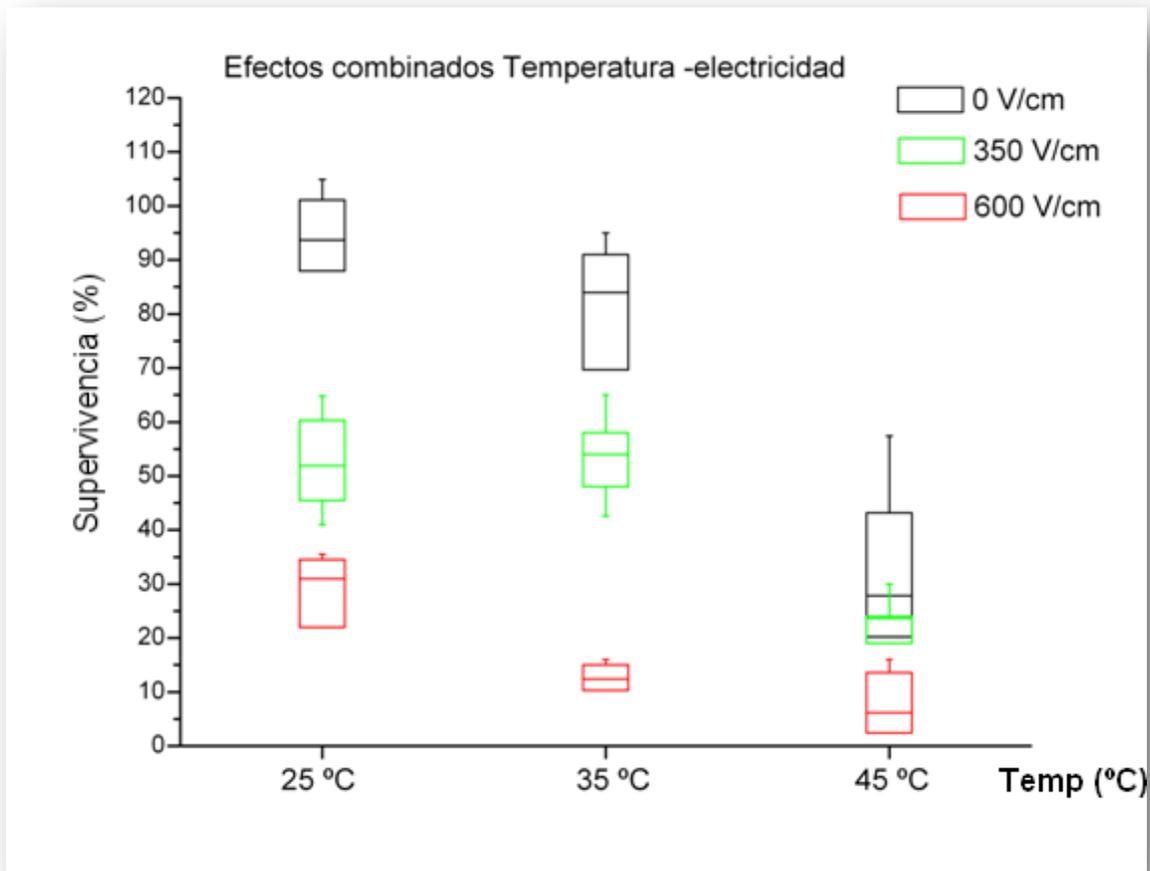


Fig 5.3: Comparación de los efectos producidos en la supervivencia celular la aplicación combinada de campo eléctrico y temperatura.

En esta representación se puede observar claramente el efecto sinérgico de ambas magnitudes. La aplicación de la temperatura amplifica el efecto del campo eléctrico en si mismo. Para valores de campo eléctrico pequeños se muestra como incrementos ligeros de la temperatura, por debajo del límite de reproducción de la bacteria, no producen efecto importante, mientras que si la temperatura sobrepasa este umbral, sí que se produce un efecto combinado de mayor letalidad. Cuando el campo aplicado aumenta de intensidad, aumentos leves en la temperatura pueden amplificar el efecto del campo eléctrico.

Este hecho se puede explicar por la combinación de dos efectos: el primero es que a medida que la temperatura aumenta, las proteínas de la membrana (incluidas las transmembrana) pueden verse afectadas. Los ácidos grasos de la bicapa lipídica pueden “fundirse” a altas temperaturas, de modo que se vuelve más fluido y por tanto, permite mayor movimiento. Esto afecta a la

permeabilidad de la célula que puede dejar paso a moléculas que no deberían entrar, y que por tanto, pueden dañar la célula [149]. La temperatura también produce una desnaturalización de las proteínas y un aumento de las reacciones que ocurren en las células, llevando a una mayor destrucción. El segundo hecho es que los valores de conductividad de la membrana celular y de la pared celular también aumentan a medida que aumenta la temperatura, llevando a un estado más conductivo en el que el campo eléctrico puede afectar más a la célula. El monitoreo de la corriente durante el experimento no mostró un aumento significativo de la intensidad sino una fluctuación suave, aunque no es posible saber qué es lo que está ocurriendo a nivel celular. Como ambos efectos afectan en la misma dirección, el resultado final es que el aumento de la temperatura (global y local) hace que las células sean más sensibles al campo eléctrico.

---

## B. EFECTO DEL TIEMPO

---

Se han analizado aplicaciones durante 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 90 minutos, a un valor de 160 mA – 500 V/cm y 1 MHz. Los resultados se muestran a continuación

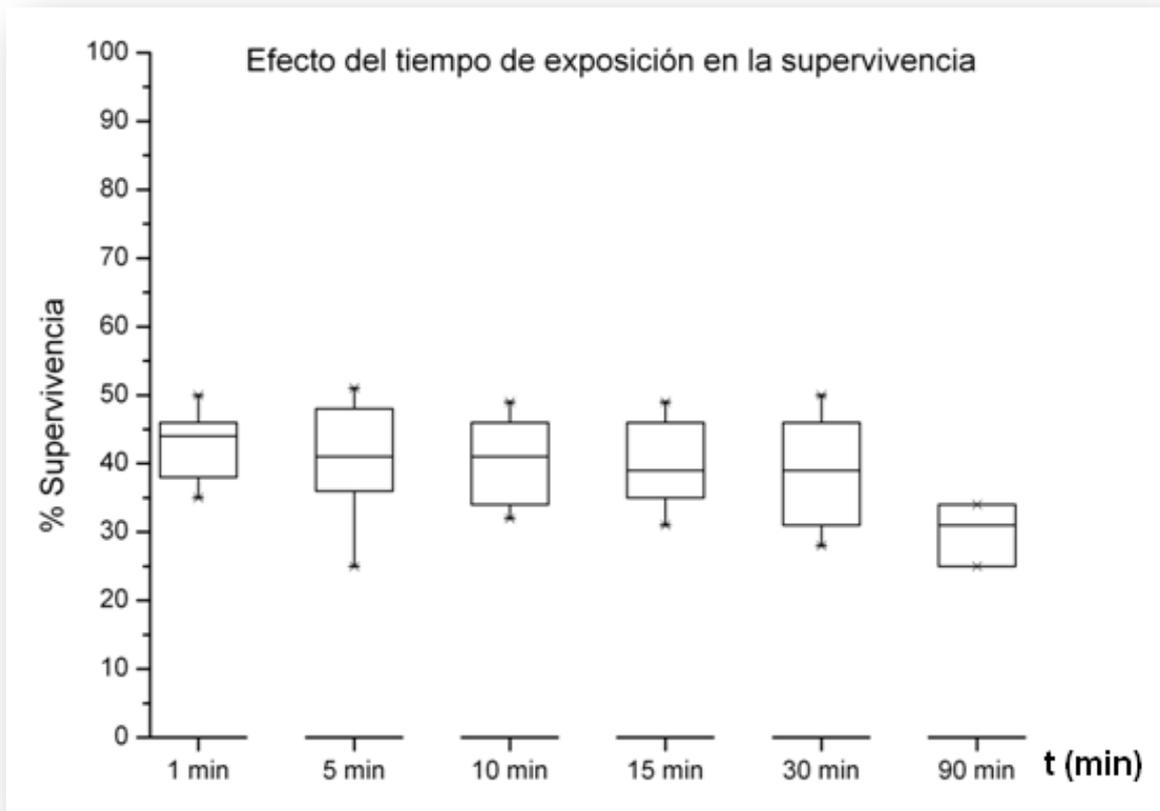


Fig 5.4: Efecto del tiempo de exposición del campo eléctrico sobre la supervivencia.

En la gráfica se puede ver cómo los valores de supervivencia son similares en todos los casos. Tan solo en exposiciones de 90 minutos se percibe una disminución en la supervivencia que se puede considerar estadísticamente significativo del control ( $p=0,0367$ , 2 colas). Sin embargo, tras 90 minutos de exposición pueden haber pasado muchas cosas, entre ellas que la conductividad del medio haya cambiado mucho y que por tanto, las condiciones eléctricas no sean las mismas que en los casos anteriores. En general, se puede observar que el tiempo no afecta de forma lineal, estando en desacuerdo con los resultados obtenidos por [124]. Tal y como se reporta en [120] parece haber una disminución de la viabilidad en el primer instante de aplicación del campo eléctrico. Posteriormente las células se adaptan y mayor tiempo de aplicación no repercute en una mayor letalidad.

### C. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL

Analizando los valores de la supervivencia a diferentes concentraciones, encontramos la distribución representada en la gráfica. En ella se han representado los valores de supervivencia en dos grupos principales de concentraciones diferentes, con valores de irradiación de 160 mA, 500 V/cm a 1 MHz durante 5 minutos.

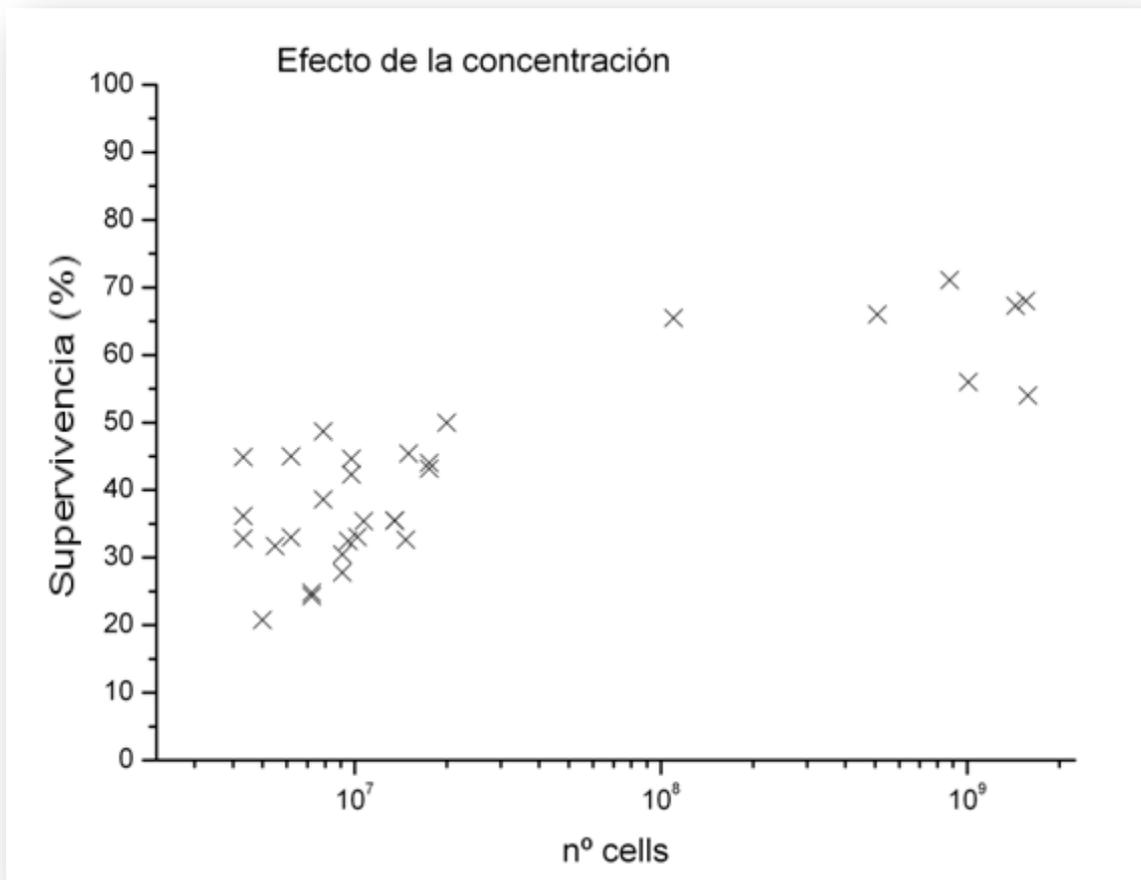


Fig 5.5: Efecto de la concentración inicial sobre la supervivencia celular en las mismas condiciones de irradiación.

La dispersión es la esperable como variabilidad interna de los experimentos, y los valores globalmente coinciden con los obtenidos en los estudios de corriente. Se puede observar que ambos grupos son claramente diferenciables, y que los valores de supervivencia para concentraciones superiores son mayores. Estos resultados corroboran la hipótesis mencionada del efecto protector de la concentración, en la cual probablemente se formen agrupaciones de bacterias que lleven a que las células situadas en el interior

no reciban la misma cantidad de campo. En términos de corriente, un cluster de bacterias equivale a una bacteria de tamaño efectivo mayor, que distorsionará más las líneas de corriente y hará que se necesiten valores superiores para penetrar en la célula.

También confirma la elección acertada de la concentración de la muestra utilizada a la hora de estudiar los efectos eléctricos, puesto que si trabajáramos con concentraciones más elevadas, los efectos se podrían ver enmascarados por la protección mutua entre las bacterias.

## 4. CONCLUSIONES

En este capítulo hemos estudiado la contribución de magnitudes no eléctricas a la valoración de los efectos de la aplicación del campo eléctrico en bacterias.

Los resultados indican que es muy importante la contribución de la temperatura, puesto que variaciones pequeñas, que por sí mismas no producirían ningún efecto sobre la viabilidad de las células, al actuar en combinación con el campo eléctrico hace que las células sean más vulnerables, aunque no se detectan cambios en los tiempos de generación, que indicarían daños subletales añadidos.

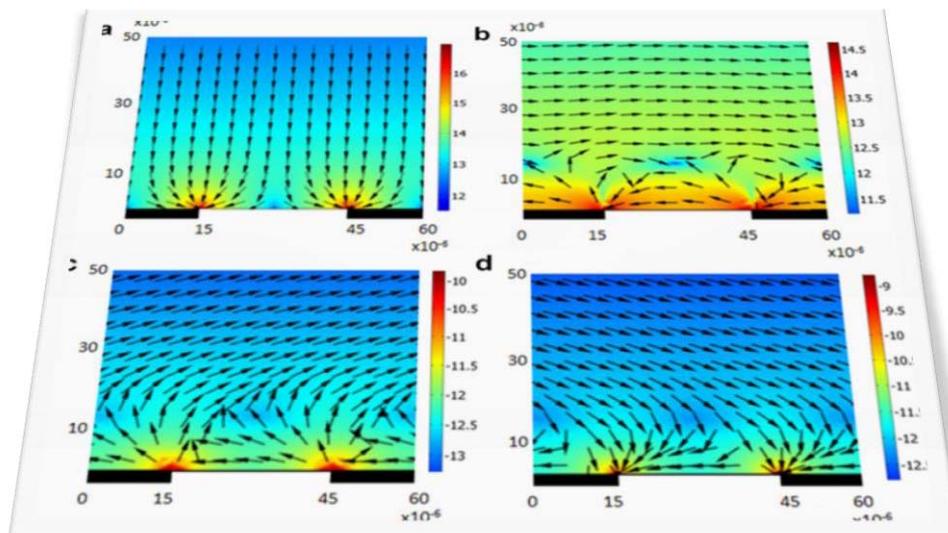
El tiempo, sin embargo, no es un parámetro importante, puesto que se obtiene la misma mortalidad para exposiciones de tan solo 1 minuto y de 30 minutos. Las exposiciones muy largas (90 min) sí producen un incremento suave de la mortalidad, pero que probablemente sea debida a otros fenómenos.

Por último, la concentración inicial también es un factor a tener en cuenta. Concentraciones muy altas producen un efecto de “protección” sobre las células, probablemente por la formación de grupos de bacterias que hacen que las que se encuentran en el interior reciban menor cantidad de campo eléctrico (y de corriente).

Una vez analizado el efecto de cada uno de los parámetros eléctricos y no eléctricos sobre la viabilidad y los posibles daños subletales del modelo bacteriano sobre *E. coli*, pasamos a analizar un caso práctico puntual de aplicación de campos eléctricos en un dispositivo LOC para concentrar bacterias.

# Capítulo 6

## APLICACIÓN AL ESTUDIO DE EFECTOS SUBLETALES EN DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS ESPECÍFICOS



# 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo analizamos un ejemplo práctico de aplicación de campos eléctricos a nuestro modelo bacteriano en un dispositivo LOC que utiliza dielectroforesis para concentrar las bacterias. Este dispositivo se ha diseñado dentro del laboratorio en el cual estoy realizando este trabajo de investigación, y es una interesante colaboración que enriquece los trabajos de las dos personas que estamos implicadas en él.

El control espacial y temporal de las especies biológicas es esencial en los biosistemas complejos microfluídicos. Además, si la especie biológica es una célula, la manipulación microfluídica debe asegurar que se mantienen la viabilidad metabólica celular. El uso para la manipulación de células en microfluídica tiene muchas ventajas porque es rápida y se pueden escalar los voltajes requeridos para el atrapamiento en función del tamaño del dispositivo [139].

La dielectroforesis [150] es el término que describe la polarización de una partícula en el interior de un campo eléctrico no uniforme. Aunque se conoce desde hace muchos años, la aplicación de esta técnica en los dispositivos Lab-on-a-Chip suscita un interés creciente, especialmente por su gran versatilidad para los análisis [151]. Realmente, la DEP permite un control y manipulación muy eficiente de biomoléculas y células. Además, como la fuerza dielectroforética está asociada a las propiedades dieléctricas de la partícula, se puede utilizar en muchas aplicaciones diferentes, como concentradores, clasificadores y selectores de material biológico [152].

Como el uso de DEP para manipular células incluye la utilización de campos localmente intensos de corriente alterna, es importante estudiar los posibles efectos adversos de dichos campos sobre el material biológico.

A las frecuencias utilizadas habitualmente para manipular las células (entre 1 y 25 MHz), la interacción dominante entre el campo eléctrico y las células se produce en el interior de las mismas [152]. Incluso algunos autores aseguran que los campos aplicados son suficientes para producir electroporación y electrofusión [153]. El conocimiento actual es que las fuerzas dielectroforéticas

operan cerca del límite de la viabilidad celular y es objeto de debate si las condiciones utilizadas en los experimentos con DEP pueden producir alteraciones en los potenciales de membrana celular y en las estructuras, así como en la maquinaria metabólica interna.

Bajo condiciones de estrés ambiental, las células responden modificando el patrón del metabolismo, lo que incluye cambios a nivel de expresión génica y también cambios en los perfiles de proteínas o síntesis de proteínas específicas [122]. Los análisis de perfil de proteínas o proteogramas suelen realizarse como una prueba para evaluar posibles diferencias de expresión entre la muestra control y la muestra irradiada.

En general, se ha constatado que la exposición a campos bajos no causa un cambio dramático en la expresión proteica [64], [122], [126], [140]. Cuando se estudian efectos no térmicos, normalmente los diseños de experimento hacen que no aparezcan cambios en las HSP. Se han reportado previamente cambios en proteínas involucradas en la respiración, glicólisis y biosíntesis de fosfolípidos, siendo todas ellas proteínas de membrana [64]. También se han identificado cambios en OmpA<sup>7</sup>, en las que las muestras irradiadas exhibían valores inferiores de proteína que la control [122]. Las OmpA son proteínas de la membrana exterior, una de las estructuras más dañadas por los campos eléctricos, eso podría explicar los cambios en el perfil del proteograma. Durante el proceso de recuperación celular se han hallado valores de OmpA más elevados que en la muestra control, lo que sugiere que la síntesis de esta familia de proteínas está relacionado con este proceso. Otras proteínas identificadas son las proteínas ribosomales involucradas en los procesos de translación en la biosíntesis de proteínas.

---

<sup>7</sup> Outer Membrane Protein A

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL CHIP

El chip utilizado ha sido diseñado y fabricado por Beatriz del Moral, y se trata de un concentrador basado en p-DEP, en el que se trata de maximizar la velocidad del flujo sin perder eficacia en la concentración para poderlo utilizar con los flujos deseados.

La fabricación se ha realizado en tres fases: fabricación de los microcanales, fabricación de los electrodos y ensamblado del chip.

El proceso de fabricación de los microcanales se ha realizado por *soft lithography* estándar, a través del sistema máster y réplica. Los electrodos se han fabricado por el mismo sistema descrito en el apartado 2. A del capítulo 3.

El diseño de los electrodos consiste en 40 pares de electrodos interdigitados como muestra la figura:

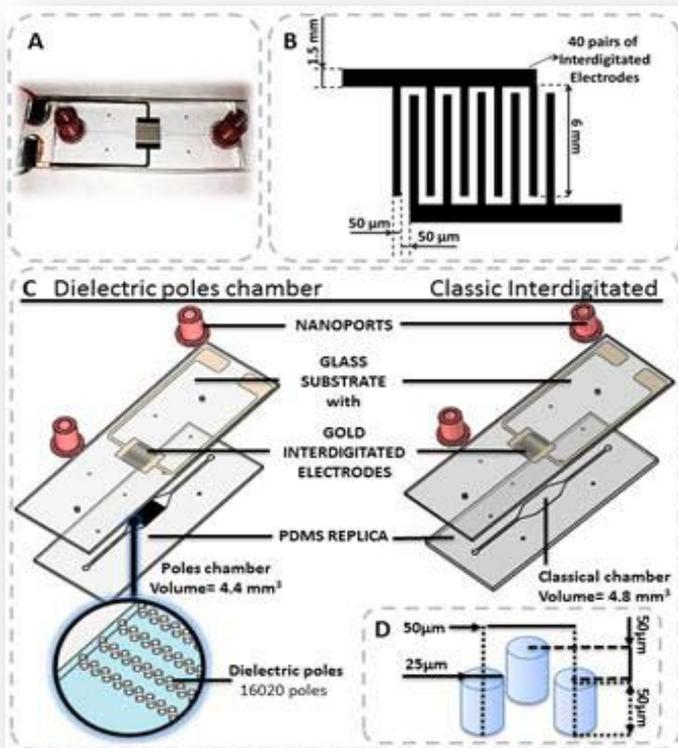


Fig 6.1: Diseño del dispositivo Lab-on-a-Chip

Se puede observar que hay dos versiones del mismo chip. Una con una cámara clásica en la que no se incluye ningún elemento adicional a los citados electrodos. El segundo modelo incorpora una cámara con pilares dieléctricos, diseño realizado para mejorar el atrapamiento a flujos elevados.

---

## B. CULTIVO BACTERIANO

---

Se utilizan *E.coli* 5K. Tras un cultivo ON en LB a 37°C, las células se lavan con agua desionizada en un protocolo paralelo al descrito en el capítulo 4, apartado 2-A.

La conductividad final obtenida es de 11,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Las muestras se diluyen a concentración de  $4 \cdot 10^6$  cel/ml. Finalmente, se obtienen diferentes alícuotas de 1 ml que se congelan para los diferentes experimentos.

Para los ensayos de fluorescencia se utilizan células *E coli* SAR20, que están modificadas con la inserción de un gen Ypf, es decir, que expresa la proteína fluorescente verde. El protocolo utilizado es el mismo que en el caso anterior.

---

## C. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

---

El chip microfluídico se sitúa en un microscopio invertido (Olympus™ IX71) que está conectado con una cámara digital (Hamamatsu™ Orca R2). El dispositivo está también conectado a una válvula manual de 6 posiciones (Valco™), que controla la inserción de la muestra a través de los tupos de FEP de 0,4 mm de diámetro interior (IDEX™) conectado al chip a través de nanoports (UpChurch Scientific™). La válvula conecta a una jeringa de 5 ml llena de agua desionizada controlada por una microbomba computerizada (Vetoni™ Nemesys) para asegurar el flujo continuo. Todo el dispositivo está conectado a una fuente de alimentación que proporciona el campo eléctrico deseado. Las condiciones eléctricas aplicadas son: 2120 V/cm, 10  $\mu\text{A}$ , 1 MHz.

---

## D. PROTOCOLO DE ANÁLISIS

---

El objetivo del dispositivo es la optimización del proceso de concentración. Sin embargo, la parte en la que he colaborado es en la valoración del efecto del campo aplicado en la viabilidad de las bacterias. Se ha realizado también un gel de proteínas para valorar los cambios en el proteograma.

Se realiza a través de electroforesis SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), método que permite separar las proteínas de acuerdo con su tamaño. Proteínas con tamaños semejantes pueden migrar de manera muy diferente debido a sus estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias, por lo que se utiliza SDS, un detergente aniónico, para reducir las proteínas a su estructura lineal (primaria) y recubrirlas uniformemente con cargas negativas.

El protocolo para la realización del gel es el siguiente:

1. **Lisis de las células:** se incuban las muestras control e irradiada durante 45 minutos. La hipótesis es que durante este tiempo las células se recuperan tras la irradiación y pueden producir algunos cambios de expresión. Posteriormente se centrifugan durante 5 minutos a 300 rpm y los pellets resultantes se resuspenden en una solución de lisis formada por un 78 % agua, 2% Trisaminometano / Hydrochloride (Tris/HCl – pH8) 1 M y 10 % BugBuster Protein Extract Reagent 10X (Novagen)
2. **Cuantificación de las proteínas por el sistema Bradford.** Se utiliza un sistema de análisis espectroscópico para medir la concentración de proteínas en la solución. Depende de la composición de aminoácidos de la proteína medida. El ensayo de Bradford es un ensayo de proteínas colorimétrico basado en los cambios de absorbancia de la tinción Coomassie Brilliant Blue G-250, que bajo condiciones ácidas pasa del color rojo a tonos azulados al unirse con las proteínas que deben ser medidas. Para realizar la cuantificación, que se tiene que hacer en cada serie de experimentos, se utilizan proteínas estándar diluidas que permiten hacer una recta de calibración usando el espectrofotómetro a 595 nm, y representando la absorbancia vs la concentración. Posteriormente se miden las proteínas resultantes de la lisis y se calcula

su concentración mediante la ecuación de regresión de la recta de calibración.

3. **SDS-PAGE:** se prepara un gel de poliacrilamida de acuerdo con el protocolo estándar. Antes de cargar las muestras en los pocillos, se mezclan con 4  $\mu$ l de Loading Buffer 5X (10% w/v SDS, 10mM Dithiothreitol, 20% v/v Glycerol, 0,2 M Tris-HCl (pH 6.8), y 0,05% w/v Bromophenol blue), se hierve durante 10 minutos y se centrifuga. El primer pocillo se carga con el marcador adecuado (Fermentas#SM0431) para poder localizar los pesos moleculares promedio de las proteínas analizadas. La separación de las proteínas en el gel se produce por electroforesis en el dispositivo PowerPac Basic, BioRad. Se carga el contenedor de electroforesis con 70 ml de Running Buffer 10X diluidos en 630 ml de agua desionizada. Se introduce el gel y se carga a 20 mA por gel alrededor de una hora. El gel activado se tiñe con Coomassie Brilliant Blue (CBB) en un contenedor plástico bajo rotación a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Pasado este tiempo el gel se lava con agua y 10% de ácido acético para desteñirlo, agitándolo durante unos 30 minutos hasta que las bandas se ven con claridad. Finalmente se fotografía el gel (o se escanea) y si se observan cambios en las bandas, éstas se pueden cortar y llevar a analizar al servicio correspondiente de Proteómica.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### A. ANÁLISIS DEL PROTEOGRAMA

---

Los resultados respecto a los cambios en la expresión proteica en el dispositivo LOC estudiado han sido negativos, es decir, no se observa ninguna banda en el gel que sea diferente en su expresión entre la muestra control y la muestra irradiada. La posible explicación a ello es que, a pesar de que la intensidad de campo eléctrico es muy elevada, el doble del valor considerado como umbral en cuanto a los efectos sobre la viabilidad de la bacteria, la intensidad que circula por el chip es realmente muy pequeña, varios órdenes de magnitud

inferior a las intensidades en las que hemos empezado a encontrar cambios en la viabilidad.

Previamente se habían realizado análisis de la expresión proteica en nuestro dispositivo, en el cual se pueden aplicar campos que difieren básicamente en el nivel de corriente eléctrica, que es varios órdenes de magnitud superior a la corriente que circula por el concentrador. Se realizaron varias pruebas, en las que no siempre se observaron cambios. Por el dispositivo experimental utilizado en ese momento, no es posible conocer con exactitud la corriente eléctrica que circulaba por la solución bacteriana, con lo cual no podemos saber si el hecho de que no se vean cambio es debido a que la intensidad en ese momento era demasiado baja. Tan solo en dos experimentos tenemos los datos de la corriente eléctrica que circulaba (calculada a partir de la conductividad), y son los que se muestran a continuación.

Se realizaron geles correspondientes a 2 experimentos en las cuales las muestras irradiadas se expusieron a:

- a) 600 V/cm, 75 mA, 1 MHz, 5 minutos.
- b) 600 V/cm, 280 mA, 1 MHz, 5 minutos

Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 45 minutos para dar tiempo a la bacteria a activar el metabolismo y producir las esperables reparaciones y/o cambios de expresión proteica.

Se hicieron dos geles de cada uno de los experimentos, uno con un 10% de acrilamida que permite ver un rango de proteínas con pesos moleculares entre 20 kDa y 300 kDa, y otro al 15%, que permite ampliar la visión de las proteínas de menor peso molecular, entre 3 kDa - 100 kDa.

Los resultados se pueden ver en las figuras siguientes. Cada figura corresponde a un gel de proteína en el que la primera columna corresponde al marcador (que permite ver los pesos específicos de las proteínas patrón). La segunda y cuarta columnas, identificadas como "Ctrl (X µg)" corresponden a la muestra control con 2 cantidades diferentes cargadas, indicadas por los µg correspondientes. Las columnas tercera y quinta identificadas con "Irr (X µg)" corresponden a las muestras irradiadas, con las mismas cargas que la muestra

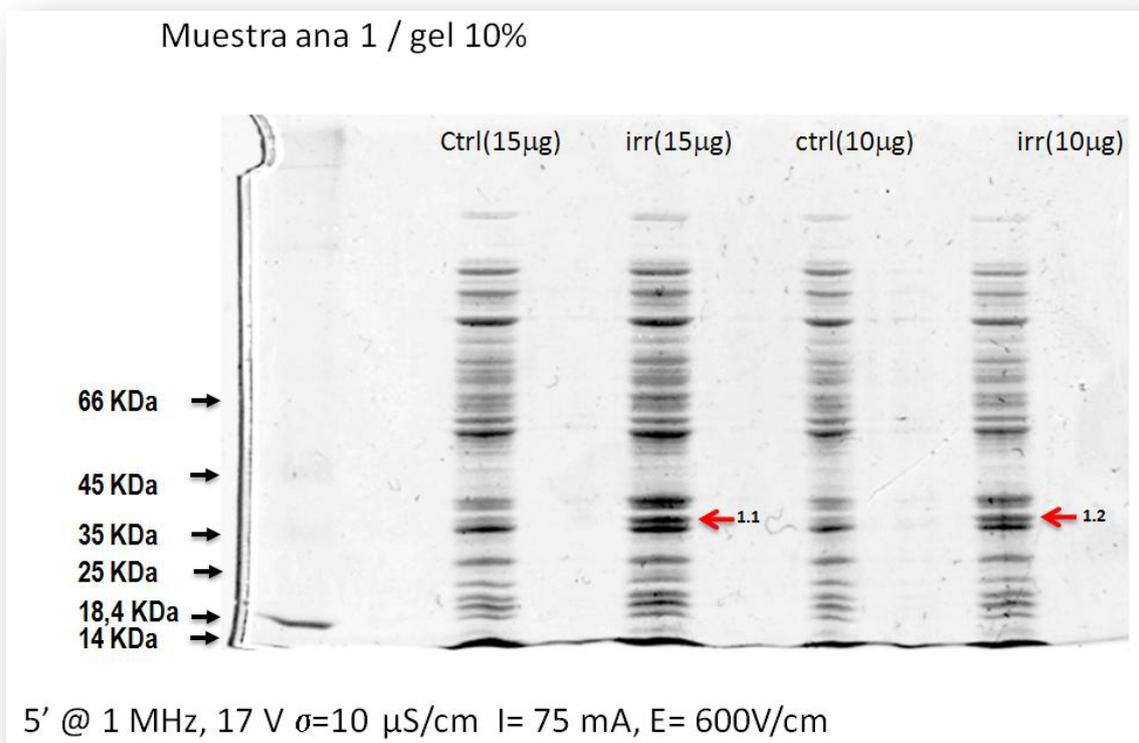
control. Es de esperar que las columnas control tengan el mismo patrón entre sí, al igual que las muestras irradiadas. Se espera también que las muestras con menor carga tengan las líneas menos marcadas que las muestras con mayor carga. Si hay algún cambio detectado entre la expresión de las proteínas de la muestra control frente a la muestra irradiada, esta diferencia se etiqueta con un número y se marca con una flecha roja en el dibujo. Posteriormente estas bandas serán las que se analizarán.

---

### MUESTRA A)

---

Muestra a) : 600 V/cm, 75 mA, 1 MHz, 5 minutos.



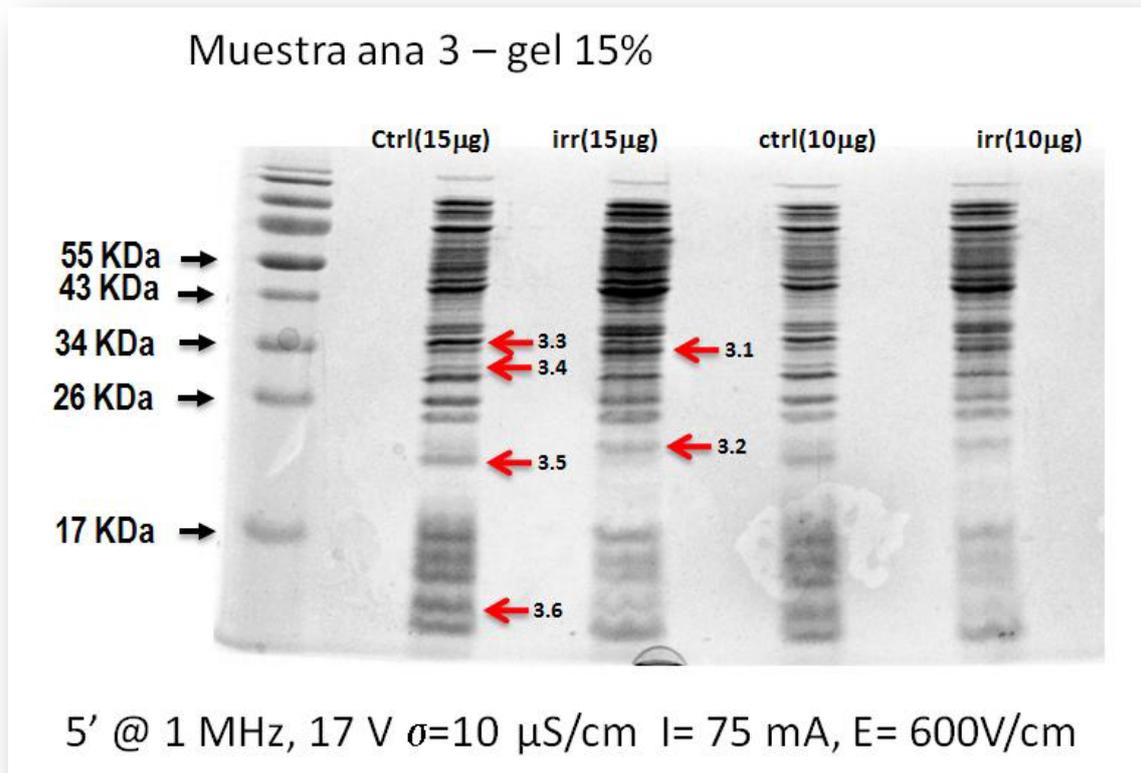


Fig 6.2: Imágenes de los geles de proteínas obtenidos con la muestra A.

---

#### MUESTRA B)

---

En este caso, la muestra ha sido expuesta a 600 V/cm, 280 mA , 1 MHz, durante 5 minutos

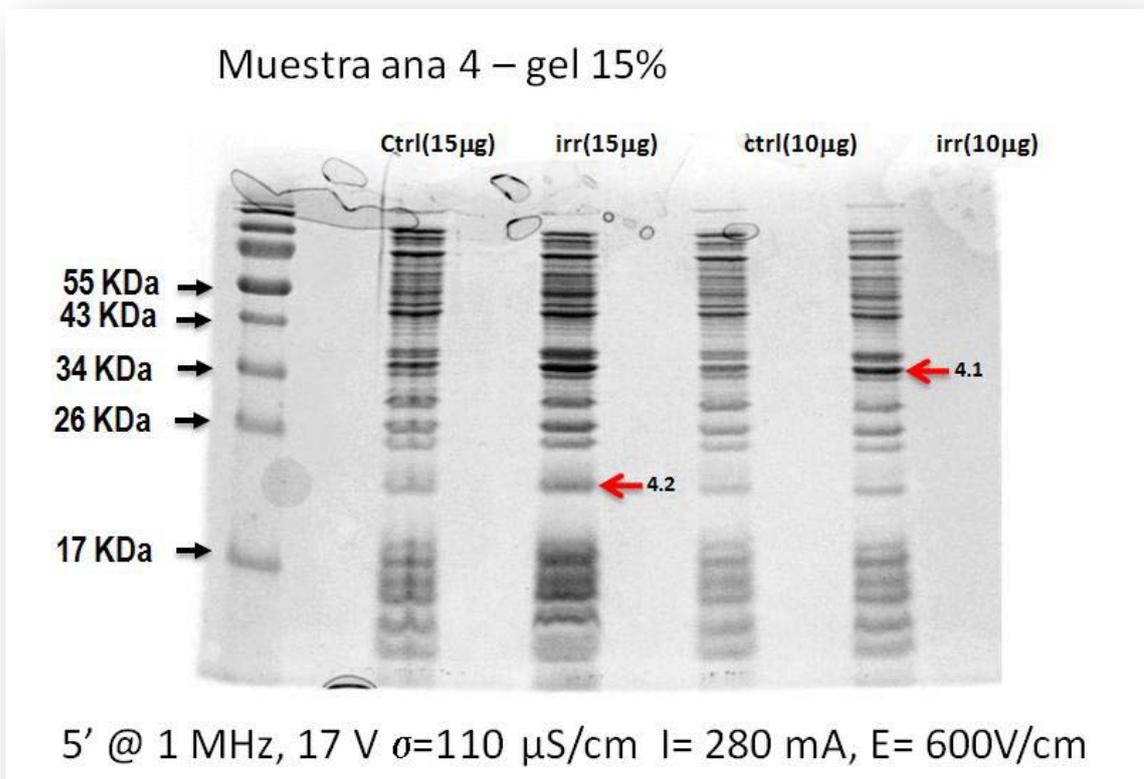
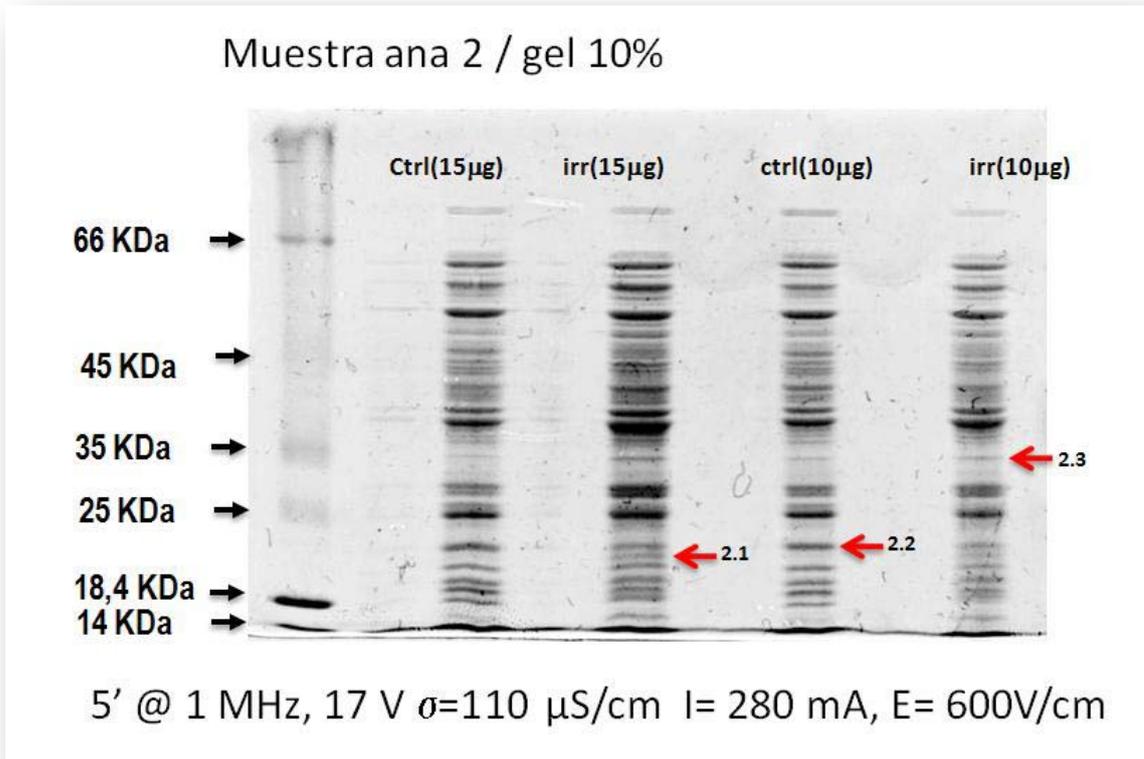


Fig 6.3: Imágenes de los geles de proteínas obtenidos con la muestra B.

Una vez llevadas a analizar cada una de las bandas (señaladas en rojo en la figura) al servicio de proteómica, los resultados se resumen en la Tabla 9. En ella se muestra el nombre de la banda, el nombre de acceso de la proteína, y los distintos parámetros con los que se valora la probabilidad de que la identificación sea correcta.

Banda	Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score
1.1	P0A911	71,39	442	20	346	37,18	6,42	1594,64
1.2	P0A911	71,39	416	22	346	37,18	6,42	1605,94
2.1	A7ZJD0	58,4	89	20	250	28,57	6,18	336,23
2.2	A7ZUJ7	70,09	107	22	234	24,70	9,64	465,51
	B7UIL4	63,49	81	19	241	26,70	7,14	364,27
2.3	P0AB72	23,96	12	9	359	39,10	5,86	49,61
3.1	A7ZHR0	80,21	79	28	283	30,40	5,29	479,48
3.2	P0AE10	66,84	48	10	187	20,70	5,17	219,95
	A7ZHR2	60,54	29	11	185	20,60	6,89	153,59
3.3	A7ZSK6	65,93	44	22	273	29,80	10,93	210,26
	P0A911	64,45	53	24	346	37,20	6,42	206,32
3.4	B7UIL4	65,98	58	22	241	26,70	7,14	269,92
3.5	A7ZSJ7	82,12	190	24	179	20,30	9,48	737,21
	A7ZSJ4	80,79	146	16	177	18,90	9,70	662,20
3.6	A7ZS81	44,71	48	5	85	9,10	10,58	202,29
	A7ZSL0	56,31	19	9	103	11,70	9,69	151,99
4.1	P0A911	72,83	365	23	346	37,18	6,42	1377,83
4.2	A7ZSJ7	78,21	147	23	179	20,3	9,48	595,1
	A7ZSJ4	61,58	79	17	177	18,9	9,7	367,52

Tabla 9: Resultados del análisis proteómico de los geles

En la actualidad existe discrepancia a cerca de los criterios que es necesario seguir para asignar una identificación inequívoca a cada una de las proteínas analizadas, pero todos ellos se basan fundamentalmente en la utilización de parámetros como el número masas de péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF y su correspondencia con las masas de péptidos resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos (*peptides matched*), probabilidad asociada a cada búsqueda (*score*) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptidos que hemos podido identificar (*sequence coverage*). Cuanto mayor sea el valor de esos tres parámetros (*matches*, *score* y *coverage*), mayor es la probabilidad de una

identificación correcta. En general, una identificación realizada con las herramientas y metodologías que hemos descrito debe superar unos determinados umbrales (valores numéricos de cada uno de los parámetros) para poder considerar que la identificación es suficientemente fiable. Estos umbrales son [154]:

- score  $\geq 1 \times 10^3$ ;
- peptides matched  $\geq 3$  y
- sequence coverage  $\geq 25\%$ .

En nuestro caso, los valores de la probabilidad no siempre cumplen los valores mínimos, por eso algunas de las proteínas supuestamente identificadas se han descartado.

Las que se consideran probablemente bien identificadas son las siguientes:

Banda	Nombre	Expresión en irradiada	Procesos en los que está involucrada
1.1	<b>ompA</b>	Sobreexpresada	Conjugación, transporte iónico
1.2	<b>ompA</b>	Sobreexpresada	Conjugación, transporte iónico
2.1	<b>gpmA</b>	Sobre expresada	Glucólisis
2.2	<b>rplA</b>	infra expresada	Regulación de la translación (represor)
2.3	<b>fbaA</b>	sobre expresada	Glicólisis
3.1	<b>EF Ts</b>	sobre expresada	Fase de elongación en la síntesis de proteínas
3.2	<b>RRF</b>	sobre expresada	Síntesis de proteínas (aumento de la eficiencia)
3.3	<b>rplB</b>	infra expresada	Translación. Una de las proteínas primarias para el proceso
3.4	<b>rpsB</b>	infra expresada	translación
3.5	<b>rplE</b>	infra expresada	translación
3.6	<b>rpmA</b>	infra expresada	translación
4.1	<b>ompA</b>	sobre expresada	Conjugación, transporte iónico
4.2	<b>rplE</b>	sobre expresada	translación

Tabla 10: Resumen de las proteínas identificadas en los geles y su nivel de expresión en las muestras

Como se puede observar, las proteínas identificadas corresponden mayoritariamente a dos grupos:

- **Outer Membrane Proteins A (ompA):** proteína mayoritaria en la membrana externa. Tiene un papel vital en la estructura y es importante

para la estabilidad de la membrana. Estas proteínas están sobre expresadas en la muestra tratada. Esto indica que la síntesis de la OmpA comienza durante la recuperación de la célula, probablemente para asegurar la estabilidad en la membrana externa para contrarrestar el efecto producido por el campo eléctrico, puesto que la membrana es la estructura que más afectada se ve por la aplicación de los campos EM, lo que también se ha observado en estudios previos [122]

- **Proteínas ribosomales implicadas en el proceso de translación**, en la cual se forman las proteínas en los ribosomas. Estas proteínas están expresadas de diferente manera, en algunas veces están sobreexpresadas y en otras infra expresadas. Uno de los mecanismos reguladores comunes implica la modificación de los factores de transcripción [128]. Esa puede ser la explicación de la variación en la expresión de este tipo de proteínas. Aparece también sobreexpresada una proteína asociada a la glicólisis. Otros autores han obtenido también alteraciones en proteínas asociadas en este proceso [64].

Es de mencionar que no se han observado expresión de Heat Shock Proteins, lo cual resulta una confirmación de que el protocolo experimental realizado no produce calentamiento elevado. Es interesante notar que cuando la intensidad de corriente eléctrica es más baja, las proteínas más afectadas son las OmpA, mientras que si la corriente aumenta, aparecen solo proteínas ribosomales. .

---

## B. OTRAS OBSERVACIONES

---

También se ha realizado una prueba para ver si se puede observar algún tipo de mecanismo reparador, con la tinción vida/muerte (LIVE/DEAD® Cell Viability BacLight™). Este sistema utiliza dos tinturas para diferenciar células en función del estado de sus membranas. Utiliza una tintura de ácidos nucleicos con fluorescencia verde (SYTO® 9), que es capaz de penetrar en las células sanas y *propidium iodide* como fluorescencia roja de los ácidos nucleicos solo de las células dañadas. De este modo, las células con la membrana comprometida se tiñen de rojo, mientras que las células con la membrana

intacta tienen fluorescencia verde. En caso de una célula dañada pero aún no muerta, la visualización pasa por la gama de naranjas.

Tras realizar la tinción, la muestra exhibe fluorescencia durante unos minutos, tiempo durante el cual las imágenes se pueden fotografiar y medir con el propio software del microscopio o posteriormente con programas como ImageJ.

A continuación se muestra una figura como ejemplo de los valores obtenidos en la muestra control y en la irradiada. Los valores numéricos de la longitud de cada bacteria se han medido con el programa *ImageJ*. Se puede observar que las longitudes de las bacterias en la muestra control son inferiores a las longitudes promedio de la muestra irradiada (5 minutos, 1 MHz, 770 V/cm, 160 mA)

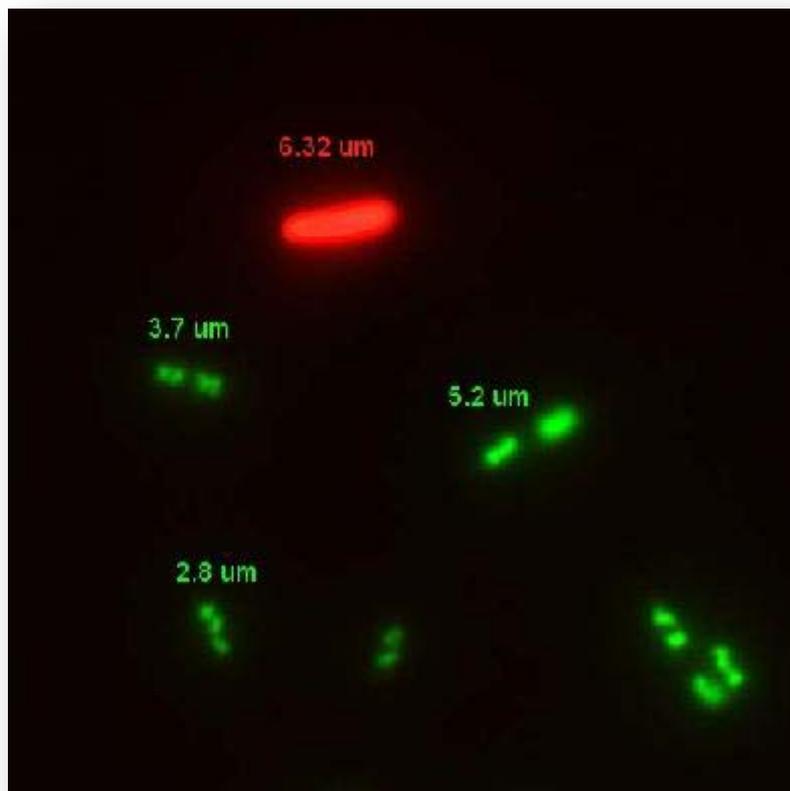


Fig 6.4: Imágenes de fluorescencia Dead/Live ® obtenidas en la muestra control

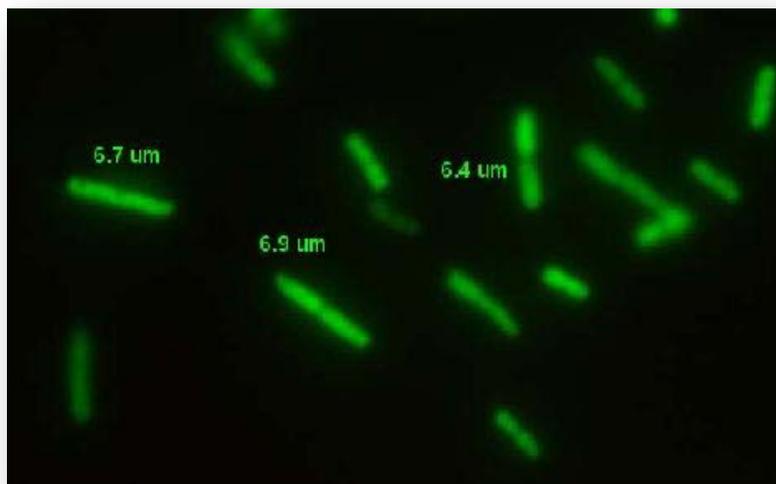


Fig 6.5: Imágenes de fluorescencia Dead/Live® obtenidas en la muestra irradiada

Tomando todos los valores de la longitud de las bacterias de cada una de las fotografías completas, se obtiene la siguiente estadística:

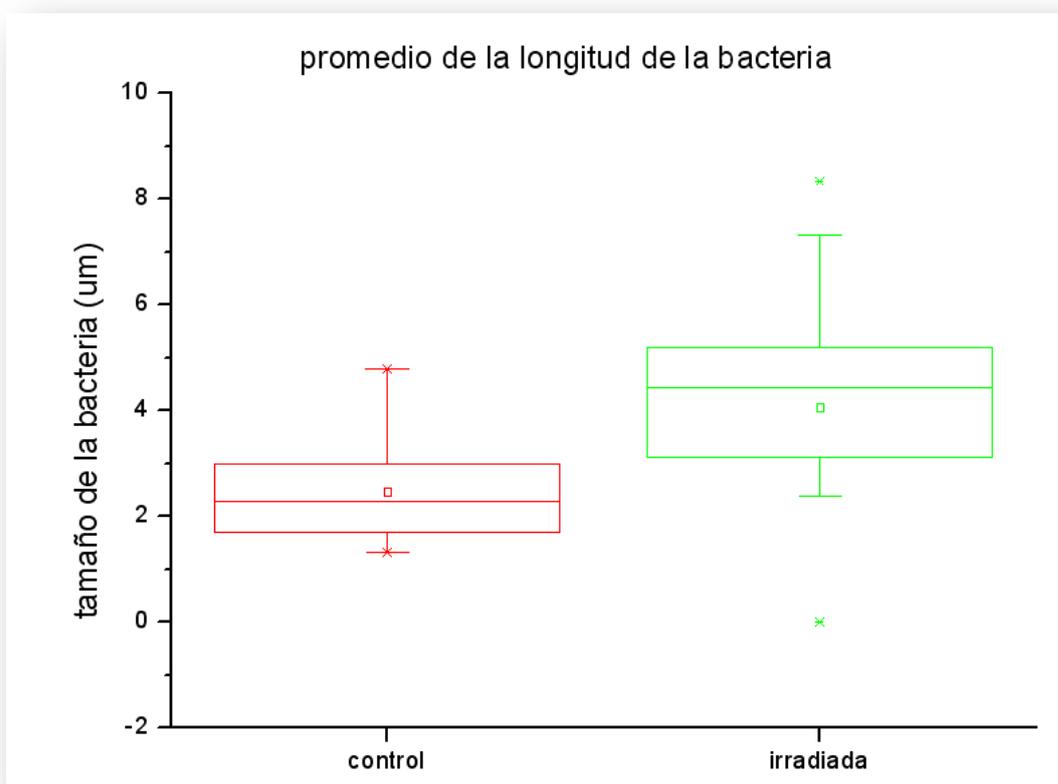


Fig 6.6: Comparación de los valores promedio de la longitud de la bacteria en muestras control e irradiada

Estadísticamente, la muestra irradiada tiene tendencia a ser significativamente mayor que la muestra control, para un nivel de significación de  $p=8.3 \text{ e-}9$  con la hipótesis "Muestra control diferente de Muestra irradiada".

Este dato es muy interesante, porque de alguna manera ilustra lo expuesto en capítulos anteriores sobre los daños subletales producidos en las células. Cuando las células tienen que autorepararse, ponen en marcha determinados mecanismos, como puede ser el mecanismo SOS. Puede ser que durante ese tiempo, las bacterias dejen de dividirse y empiecen a filamentar, a hacerse cada vez más largas pero sin terminar de dividirse. Esto explicaría la tendencia observada en las imágenes.

## 4. CONCLUSIONES

Analizamos la respuesta proteica a la exposición al campo eléctrico para identificar proteínas expresadas de forma diferente, lo cual puede ser importante para evaluar el efecto biológico del campo eléctrico en un dispositivo LOC.

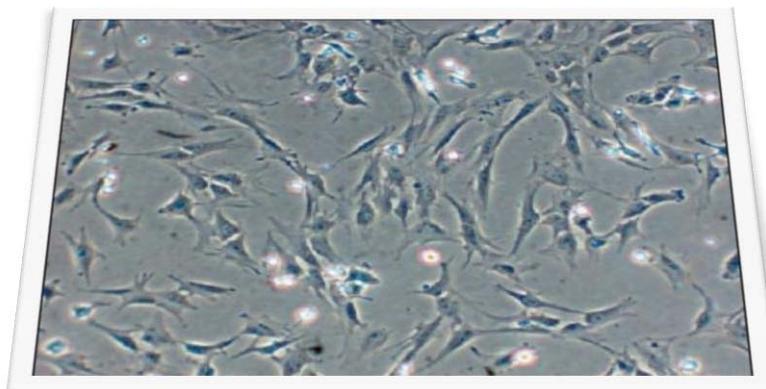
La principal conclusión que podemos obtener de los datos analizados es que la exposición a campos eléctricos no causa cambio en la expresión proteica, siempre que la intensidad de corriente eléctrica se mantenga a niveles también bajos. De nuevo, el factor clave para estudiar los cambios a nivel metabólico y de viabilidad que se producen como consecuencia de la aplicación de los campos eléctricos es la corriente eléctrica. La muestra obtenida en el concentrador basado en DEP no ha mostrado cambios en el proteograma. Al aplicar corrientes eléctricas superiores se han obtenido en 3 casos una variación de la expresión del proteograma, en concreto :

Las proteínas de la membrana externa están sobre expresadas en la muestra tratada. También hay cambios en proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas, con el proceso de translación. Como era de esperar, no encontramos alteración en la expresión de las *heat shock protein*. Eso corrobora que el experimento no ha tenido un efecto térmico importante, tal y como era deseable.

En cualquier caso, sería conveniente realizar más pruebas de geles con todas las magnitudes controladas para corroborar los resultados obtenidos.

# Capítulo 7

PUESTA A PUNTO DE UN  
SISTEMA DE APLICACIÓN  
DE CAMPO ELÉCTRICO EN  
LA LINEA CELULAR C2C12  
PARA POSIBLES ESTUDIOS  
SOBRE EFECTOS EN LA  
DIFERENCIACIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

El modelo bacteriano es, como hemos visto, un modelo muy utilizado por su gran versatilidad y la facilidad para obtener nuevas generaciones en un tiempo relativamente corto. El siguiente paso era ver si el mismo sistema utilizado para aplicar los campos a las bacterias se podía adaptar para estudiar el efecto que los mismos campos eléctricos tienen sobre células eucariotas. No es un resultado trivial, porque mientras las bacterias se duplican en tan solo 20 minutos, las células eucariotas necesitan mucho más tiempo para proliferar. Eso también significa que necesitan mucho más tiempo para mostrar los cambios, y por tanto, deben ser capaces de sobrevivir no sólo durante el tiempo de exposición a la corriente, sino que deben poder ser cultivadas en el interior del chip durante tiempos que pueden llegar a las 4 semanas.

Para este estudio se eligió una línea celular inmortalizada de pre-mioblastos de ratón, la línea C2C12. En condiciones normales, sin estímulo adicional, las células evolucionarán y se convertirán en miocitos. Pero si se le añaden determinados factores de diferenciación, las células cambiarán su linaje de destino convirtiéndose en osteocitos.

Los factores de diferenciación son habitualmente proteínas sintetizadas que dan el estímulo necesario para producir la evolución de las células hacia el destino deseado. Sin embargo, hay estudios que muestran que los campos eléctricos también pueden convertirse en “factores de diferenciación”, produciendo cambios en las células, tanto a nivel de proliferación y viabilidad, como incluso cambios en la diferenciación.

En las siguientes líneas vamos a conocer un poco más sobre estas células y qué estudios se han hecho sobre cómo los campos eléctricos pueden afectar a su viabilidad, diferenciación y proliferación.

---

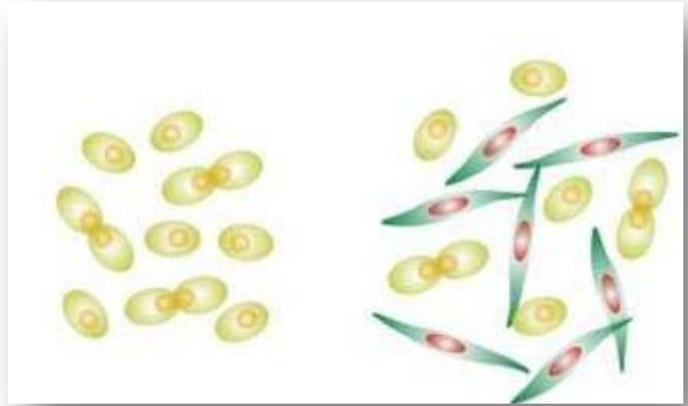
## A. C2C12

---

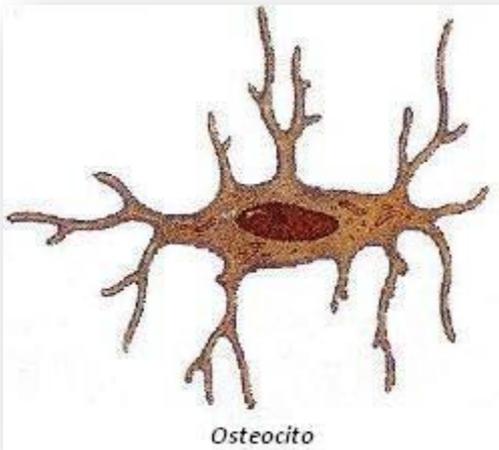
C2C12 es el nombre que recibe una línea celular de mioblastos inmortalizados de ratón. La línea celular C2 fue obtenida en el año 1977 por Yaffe y Saxel a

partir de células de músculo de la pata de los ratones de la cepa C3H. Se lesionaron los músculos de los animales mediante fórceps y 70 horas después se aislaron las células miogénicas [155].

Las C2C12 tienen morfología de fibroblastos y están determinadas a diferenciar el linaje mioblástico, por eso se dice que son pre-mioblastos. Se mantienen indiferenciadas cuando se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementadas con un 20% de FBS (Fetal Bovine Serum). Fueron obtenidas por Helen Blau aislando un clon de células de una línea preexistente llamada C2. Los cultivos de C2C12 se diferencian a miotubos multinucleados cuando la



*Fig 7.1: Representación gráfica de una célula C2C12 y su diferenciación espontánea en miocitos [170]*



*Fig 7.2: Representación gráfica de un osteocito [170]*

concentración de FBS en el medio de cultivo se reduce al 5%, por eso es importante que siempre tengan una elevada concentración de FBS en el medio (15%) mientras se cultivan. También es fundamental evitar que lleguen a confluencia, porque pierden la capacidad de diferenciación.

Estas células tienen también la capacidad de diferenciarse en osteocitos. Las proteínas BMP-2, que son proteínas morfogenéticas óseas, pertenecientes a la familia de las citoquinas, tienen la capacidad de promover la formación de hueso, regulando directamente la expresión de muchos genes específicos implicados en la diferenciación osteoblástica. [155] (A modo de curiosidad, las BMP-2

habitualmente se sintetizan a partir de nuestro modelo anterior, *E.coli*). De este modo, el tratamiento de las células C2C12 con BMP-2 causa un cambio en el linaje de destino de mioblástico a osteoblástico, por eso también se utilizan ampliamente como modelo celular para estudiar la formación ectópica de hueso producida por BMP.

Después de la adición de BMP-2 se observa la transdiferenciación de las células al linaje osteoblástico y la represión de los marcadores del linaje muscular. Las células C2C12 se pueden volver a diferenciar al linaje muscular cuando se retira el BMP del medio.

La línea celular es muy útil para estudiar aspectos de la miogénesis, metabolismo y biología muscular, así como para estudiar la diferenciación en mioblastos y osteocitos [156].

Además de las evidentes diferencias morfológicas entre osteocitos y miocitos, visibles a través del microscopio, hay dos marcadores específicos que permiten valorar la diferenciación de las células: osterix y ALP.

Osterix es un factor de transcripción específico de osteoblastos identificado por Nakashima en el año 2002 mediante PCR en células C2C12 inducidas por BMP-2. El gen promotor Osterix aparece en las primeras horas de acción de la BMP-2. Se empieza a observarse a nivel de ARN mensajero a las 2 horas de añadir BMP-2 a las células en cultivo, y a nivel de proteína empieza a ser perceptible a las 4 horas de añadir la BMP-2. La expresión es máxima a las 16h.

ALP (Fosfatasa Alcalina) es una enzima que se encuentra en casi todos los tejidos del cuerpo. Su concentración es especialmente alta en huesos, por eso la cuantificación de los niveles de ALP es un indicador de la diferenciación de las células en osteocitos. La presencia de FBS en el medio de cultivo impide la diferenciación al linaje miogénico, pero no al osteoblástico, y se ha observado la expresión de la Fosfatasa Alcalina inducida por BMP-2 en presencia de FBS 15% en el medio de cultivo.

A pesar de que la diferenciación celular se realiza de forma habitual por estímulo de la BMP-2, hay estudios incipientes que indican que se puede

estimular la diferenciación en osteocitos a través de campos eléctricos. No es algo extraño, puesto que el uso de campos eléctricos para la reparación ósea es algo ampliamente conocido. En su libro “The body electric” [157], Robert Becker muestra sus resultados de trabajar con generadores de pulsos electromagnéticos para conseguir unir fracturas no soldadas, dispositivo aprobado por la FDA y que tiene un 80% de tasa de éxito [158]. Los campos eléctricos aplicados in vivo estimulan la proliferación de los osteocitos, y por tanto, la diferenciación de las células multipotenciales que los originan. In vitro también se han realizado algunas pruebas para intentar entender los procesos involucrados en la osteogénesis.

---

## B. DIFERENCIACIÓN CELULAR MEDIADA POR CAMPOS ELÉCTRICOS

---

La bibliografía consultada refiere que la aplicación de campos eléctricos también puede producir modificaciones tanto en proliferación celular como en el linaje final in vitro como veremos a continuación. Los estudios muchas veces no son comparables, pues, tal y como se comentó en el capítulo 2, a menudo faltan datos sobre los parámetros de experimentación, especialmente en lo que a magnitudes eléctricas se refiere, como la intensidad de campo eléctrico aplicada, la frecuencia o la forma de onda utilizada. Otra dificultad añadida es la falta de homogeneidad en cuanto a líneas celulares investigadas.

La mayoría de estudios utilizan campos eléctricos pulsantes, que son también los que se suelen utilizar en los dispositivos de terapia. En concreto, hay estudios que muestran que la aplicación de campos pulsantes aumenta la proliferación y la viabilidad celular, promoviendo la actividad osteoblástica en forma de crecimiento, viabilidad y expresión de colágeno[159], y también hay resultados experimentales que muestran que producen cambios en la distribución de las proteínas del citoesqueleto de los osteoblastos [160]. Algunos autores incluso comparan los efectos producidos por los campos eléctricos (pulsantes) con los producidos por BMP, obteniendo que los efectos en osteogénesis son similares, aunque utilizan RCOB (*neonatal rat calvarian osteoblasts*), una línea celular diferente a la C2C12 [161].

En algunos casos se considera que el factor clave es la intensidad del campo utilizado, de modo que si es suficientemente elevada, los campos eléctricos pueden suprimir la proliferación y la mineralización osteoblástica [162]. En otros estudios se muestra que el factor predominante puede ser la componente magnética, puesto que la diferenciación y mineralización depende linealmente de la intensidad de campo magnético aplicado. [163]. Parece ser que uno de los mecanismos químicos que afecta a la diferenciación está mediada por la síntesis de NO, que aumenta tras la exposición a los campos eléctricos y magnéticos [164] [165].

El estudio que tal vez más se parezca al dispositivo experimental que hemos diseñado es el que lleva a cabo Hronik [166]. En él utilizan campos eléctricos sinusoidales de baja intensidad (20 mV/cm) a 60 KHz durante 40 minutos cada día un total de 28 días, y consiguen disminuir el tiempo de diferenciación en osteocitos. Entre los días 2 y 5 son capaces de detectar cambios morfológicos que indican cambios en la diferenciación en comparación con las muestras control, así como una expresión aumentada de la ALP en las muestras irradiadas respecto a las muestras control. La aparición de HSP indica que los campos utilizados (debido a la alta conductividad de los medios de cultivo) producen un calentamiento excesivo de las células. La principal diferencia es que utilizan células madre mesenquimales (HMSCs), y no sabemos si el comportamiento bajo campos eléctricos es diferente y en qué sentido lo es. Es de remarcar que el orden de magnitud de trabajo de la intensidad de campo eléctrico es muy inferior a la utilizada en bacterias. La razón principal es que la conductividad del medio de cultivo de las células es muy elevada, e intensidades más altas llevarían a incrementos de temperatura importantes. Por ello, se utilizan campos de muy baja intensidad.

A pesar de que los escasos estudios previos no nos permiten obtener una referencia en cuanto al tipo de campo a aplicar, sí aportan una valiosa información respecto al tipo de técnicas a utilizar para valorar los cambios, y de este modo, establecer un protocolo de experimentación adecuado. Básicamente, las técnicas utilizadas son:

- Ensayos de viabilidad:
  - o recuento del número de células a través de *cell counter* tras tripsinización
  - o método WST de conteo por absorbancia a través de espectrofotómetro de placas.
- Cuantificación de ALP (ensayo por absorbancia en Espectrofotómetro)
- Estudio morfológico por tinción de doble inmunofluorescencia indirecta
- Ensayos de actividad de la NOS (nitric oxide synthasa)
- Proteogramas
- Cuantificación ADN

Otro punto importante a tener en cuenta es la concentración inicial de las células, puesto que si las células entran en confluencia antes de aplicar el estímulo adecuado, no se obtendrá diferenciación. Sin embargo, no hay un consenso claro en ello, seguramente porque como las líneas celulares son diferentes, sus tamaños también lo son, y por tanto las concentraciones necesarias para llegar a la confluencia pueden variar en varios órdenes de magnitud. En la tabla siguiente se resumen los valores encontrados:

AUTOR	LINEA CELULAR	(cells/cm <sup>2</sup> )
Cheng [167]	ROB – osteoblastos de ratón	2x10 <sup>4</sup>
Diniz [164]	MC3T3-E1 osteoblastos	10 <sup>3</sup>
Hronik [166]	hMSC – human mesenchymal stem cells	5x10 <sup>3</sup>
Bodamyali [161]	RCOB- rat calvarial osteoblasts	5x10 <sup>4</sup>
Li [162]	MC3T3	10 <sup>4</sup>
Wu [168]	BMSC – bone marrow derived mesenchymal stem cells	5x10 <sup>5</sup>
Lin [159]	7F2 murine osteoblasts	1x10 <sup>5</sup>
Zhou [163]	Rat osteoblasts	3x10 <sup>3</sup>

*Tabla 11: Resumen de los valores de concentración inicial sembrados en diferentes experimentos*

Una vez revisada la bibliografía disponible, nos centramos en diseñar el objetivo relacionado con esta parte de la investigación.

---

## C. OBJETIVO

---

Se plantea una investigación sobre los protocolos a seguir para obtener una diferenciación celular en osteocitos mediada por la aplicación de campos eléctricos. Dada la gran cantidad de variables a fijar y, sobre todo, la falta de referencia en cuanto a los valores de campo a aplicar y el tiempo durante el cual aplicarlos, el objetivo principal que nos planteamos **es poner en marcha un sistema de aplicación de campo eléctrico controlado que permita la supervivencia de las células dentro del chip y la observación de los posibles fenómenos que ocurran a consecuencia de esta aplicación.**

Para conseguirlo, es necesario llegar a la consecución de los siguientes objetivos secundarios:

- 1- Diseñar un chip que permita sembrar, proliferar y diferenciarse a las células, así como observar los efectos producidos
- 2- Estudiar las pruebas a realizar para valorar la obtención o no de la diferenciación celular.
- 3- Establecer una referencia con la que comparar los resultados obtenidos
- 4- Poner en marcha todo el sistema adecuadamente y comprobarlo mediante un experimento que sirva de prueba de concepto.

Las principales dificultades que nos encontramos en esta tarea es, por un lado, la falta de estudios de referencia. Por otro lado, los largos tiempos de experimentación, que hacen que para cada cambio en una única variable represente una experimentación de un mes. No hay ningún estudio previo publicado que utilice campos eléctricos sinusoidales a baja intensidad para producir este efecto en la línea celular C2C12, sin embargo, el resultado en otras líneas celulares indica que es posible obtener los resultados deseados.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### A. DISEÑO DEL DISPOSITIVO

---

El diseño del chip debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Las células tienen que poder vivir durante suficiente tiempo (4 semanas) en su interior
2. Debe permitir sembrar las células a la concentración adecuada y permitir su proliferación y confluencia posterior
3. Debe permitir el aporte de nutrientes necesarios para asegurar la viabilidad
4. Debe ser transparente para permitir su observación al microscopio, incluso durante la exposición al campo eléctrico.
5. Debe permitir hacer los análisis necesarios para confirmar los efectos de los campos aplicados.

El primer punto es valorar la idoneidad de los chips de ITO diseñados para su uso con bacterias. Por su tamaño y características fluidicas, es de esperar que permitan una cantidad de medio de cultivo suficiente para garantizar la supervivencia y proliferación de las células. En caso de que no se pudiera realizar la experimentación en los chips de ITO, habría que realizar las modificaciones que fueran necesarias.

El chip está conectado a un generador de corriente, que proveerá el estímulo eléctrico escogido, y todo ello está dentro de un sistema de cultivo (baño térmico) que permita mantener las condiciones necesarias para la viabilidad celular.

---

### B. PRUEBAS A REALIZAR

---

También hay que diseñar las pruebas a realizar para confirmar los efectos. En principio, las pruebas a realizar son las siguientes:

- a) Confirmar que el chip permite la siembra y cultivo de las células a lo largo de, al menos 3 semanas. Para ello, realizar la siembra de y estudiar, a lo largo del tiempo:
  - a. Viabilidad / Proliferación: se cuentan las células viables tras ser tripsinizadas, con un *cell counter*
  - b. Cambios en la morfología: se estudian por observación bajo el microscopio a 20 aumentos. Para estudiarlo con mayor precisión se marcan en el chip unos puntos de referencia que serán los que se monitorearán cada día y se fotografarán.
- b) Obtener un patrón de referencia a partir de una diferenciación química que sirva de base para comparar los posibles resultados de diferenciación obtenidos eléctricamente. Para ello se realizarán las siguientes pruebas, siempre obteniendo los valores referentes a una muestra control y a otra diferenciada en osteocitos mediante BMP-2:
  - a. Cuantificación de la proliferación mediante conteo de número de células
  - b. Cuantificación de la ALP por espectrofotometría
  - c. Estudio de la expresión del gen anti-Osterix por inmunofluorescencia.
- c) Aplicar una condición eléctrica que sirva como prueba de funcionamiento para validar la puesta en marcha del sistema. A partir del único estudio de características similares [166], establecemos unas condiciones iniciales de irradiación lo más parecidas posible a dicho estudio:

E (V/cm)	I ( $\mu$ A)	Frec	t (min)
20 e-3	690	40 KHz	30

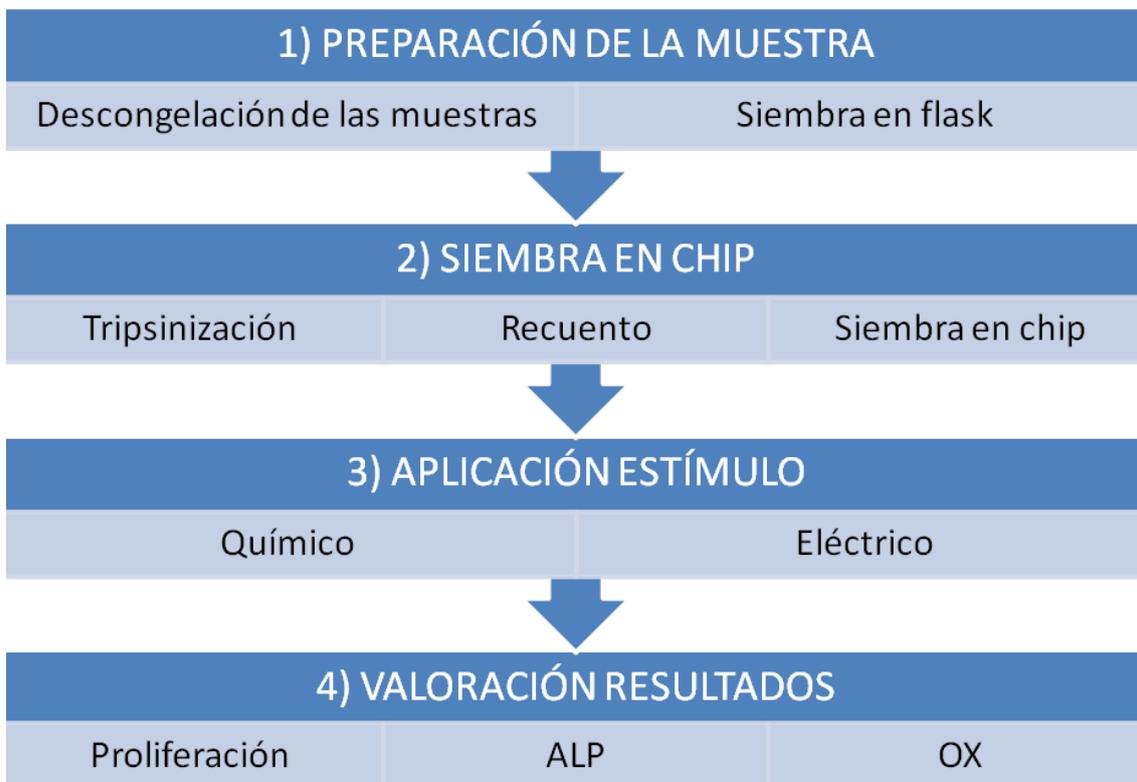
Una vez sometidas las células al estímulo eléctrico, se realizarán las mismas pruebas del apartado anterior para confirmar que dichas pruebas son viables tras la exposición al campo eléctrico y analizar los posibles cambios que se produzcan.

- d) Confirmar que las pruebas de inmunofluorescencia se pueden realizar con las muestras en el chip, sin necesidad de cambiarlas de soporte.

## C. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El experimento a realizar pretende obtener la comparación entre los resultados indicados para una muestra control y los resultados para una muestra estimulada por campo eléctrico, así como comparar estos resultados con los obtenidos por estímulo químico.

Para ello, es necesario seguir una serie de pasos, que se muestran resumidos en el siguiente diagrama:



En el anexo 2 se encuentran los protocolos utilizados para cada una de estas pruebas.

El primer paso consiste en la preparación de la muestra. Las células se encuentran congeladas en nitrógeno líquido, por lo cual es necesario descongelarlas y sembrarlas previamente en un *flask*, de modo que vuelvan a estar metabólicamente activas. Se considera que un tiempo razonable de cultivo una vez sembrados es de unos 3 días. Por tanto, entre el paso 1 y el 2 transcurren 3 días. Un punto crítico a la hora de sembrar las células, tanto en el paso 1 como en el 2, es hacerlo en una concentración adecuada para que las células no entren en confluencia antes del momento deseado, puesto que,

como se ha indicado anteriormente, si las células entran en confluencia se diferenciarán en miocitos sin posibilidad de cambio de linaje.

En el segundo paso las células son tripsinizadas para sacarlas del *flask*, y tras un recuento, se siembran en el chip. Es necesario tener en cuenta que como hay que hacer 3 tipos de pruebas diferentes a cada una de las muestras (control e irradiada), es necesario sembrar en 3 chips diferentes cada una de las pruebas. Es decir, cada experimento implica el uso de 6 chips, 3 de control y 3 irradiados en las mismas condiciones. Obviamente, los 6 chips deben tener el mismo número de células en idénticas condiciones.

Una vez sembradas en el chip, tras esperar 24h para que las células se adapten a su nuevo entorno, pasamos al paso 3, en el cual se aplica el estímulo de diferenciación. La aplicación del estímulo químico se realiza de forma rápida, simplemente adicionando la citada proteína BMP-2 en el medio. Los valores óptimos tanto de ALP como de Ox se obtendrán pasados unos 6 días desde la aplicación del estímulo químico. En caso de estímulo eléctrico no se dispone de referencia sobre la duración o la frecuencia de los tiempos a utilizar para detectar cambios. Como prueba de concepto, aplicaremos la corriente durante 30'.

El último paso es la valoración de resultados, que incluye tres pruebas diferentes. La prueba de proliferación se realiza por recuento en un contador de células, y se hace en el momento. La misma prueba da también los resultados del porcentaje de células viables de la muestra. La prueba de cuantificación de ALP por técnicas espectrofotométricas y la valoración de la expresión del osterix por inmunofluorescencia requieren ser realizada en dos días consecutivos.

Por tanto, la realización de un único experimento requiere un mínimo de 14 días.

### 3. PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA

Se ha puesto en marcha todo el dispositivo, realizándose las tres pruebas descritas en el apartado anterior. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

---

#### A. COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS EN EL CHIP

---

El primer punto a confirmar era que el chip es válido para realizar este tipo de estudios. Para ello se prepararon las células y posteriormente se sembraron en chips y en placas, para comparar el posible efecto de estar en la cámara fluidica. El volumen del chip permite que el medio permanezca al menos 1 día con suficientes nutrientes para las células, por tanto solo es necesario cambiar el medio 1 vez al día.

Las células se analizaron durante 21 días de forma diaria, observando los posibles cambios de forma o de número a través del microscopio con x20.

Los resultados son los siguientes:

Las imágenes no muestran diferencias entre ambas poblaciones.

Tras 21 días, las células están perfectamente vivas y viables.

Los recuentos de células sembradas en flask y en chip no muestran diferencias estadísticamente significativas, como muestra la siguiente figura:

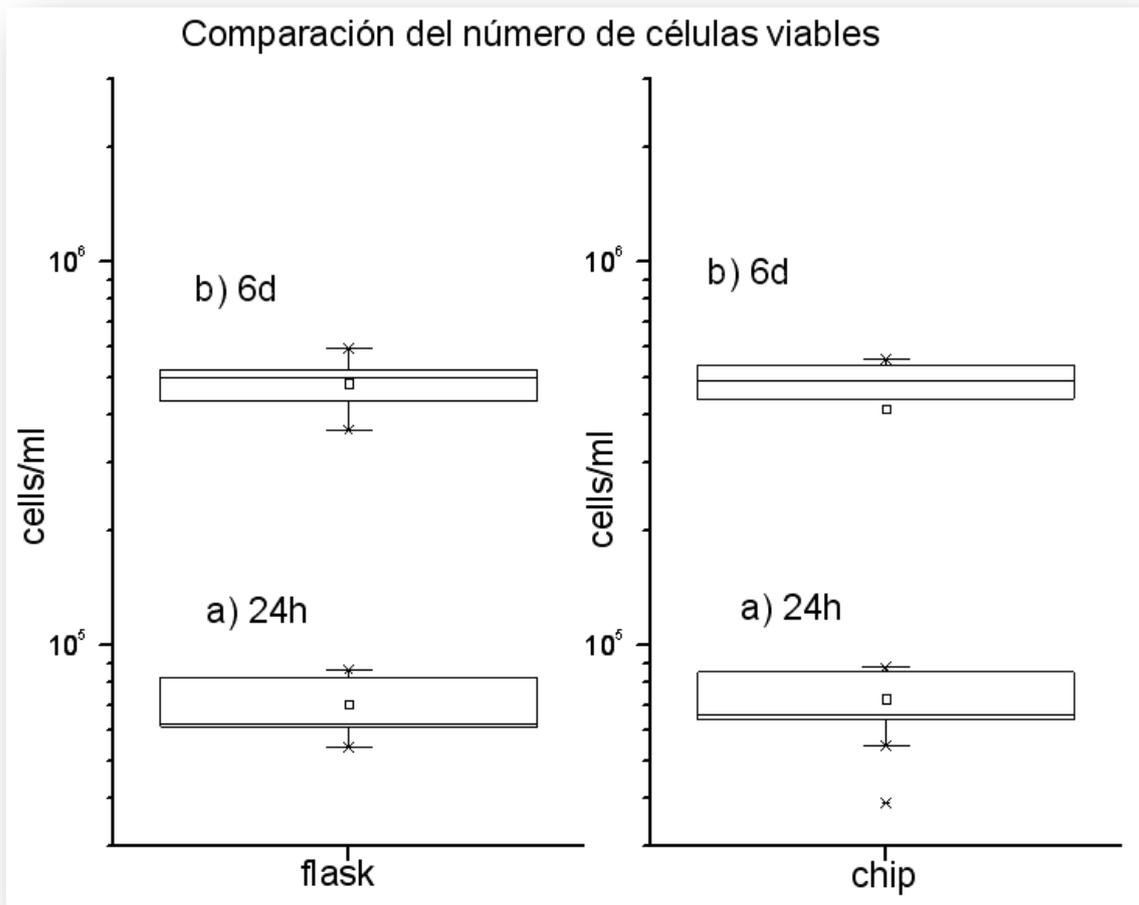


Fig 7.3: Comparación del número de células viables obtenidas en un cultivo convencional y en un cultivo en chip

El chip, por tanto, es adecuado para realizar las pruebas diseñadas.

## B. ESTABLECIMIENTO DE UN PATRÓN DE REFERENCIA

A la hora de estudiar si se ha producido la diferenciación en osteocitos, es vital saber qué tenemos que ver. Para ello primero se ha realizado una diferenciación mediante BMP-2, y se han practicado los protocolos de evaluación, de modo que tengamos una referencia de los valores esperados. En primer lugar, se establecen los valores de proliferación y viabilidad considerados normales. En segundo lugar, se realizan las pruebas de ALP y de Ox por inmunofluorescencia.

---

**PROLIFERACIÓN / VIABILIDAD**


---

El recuento se realiza por el contador celular CASEY®

Los resultados son los siguientes:

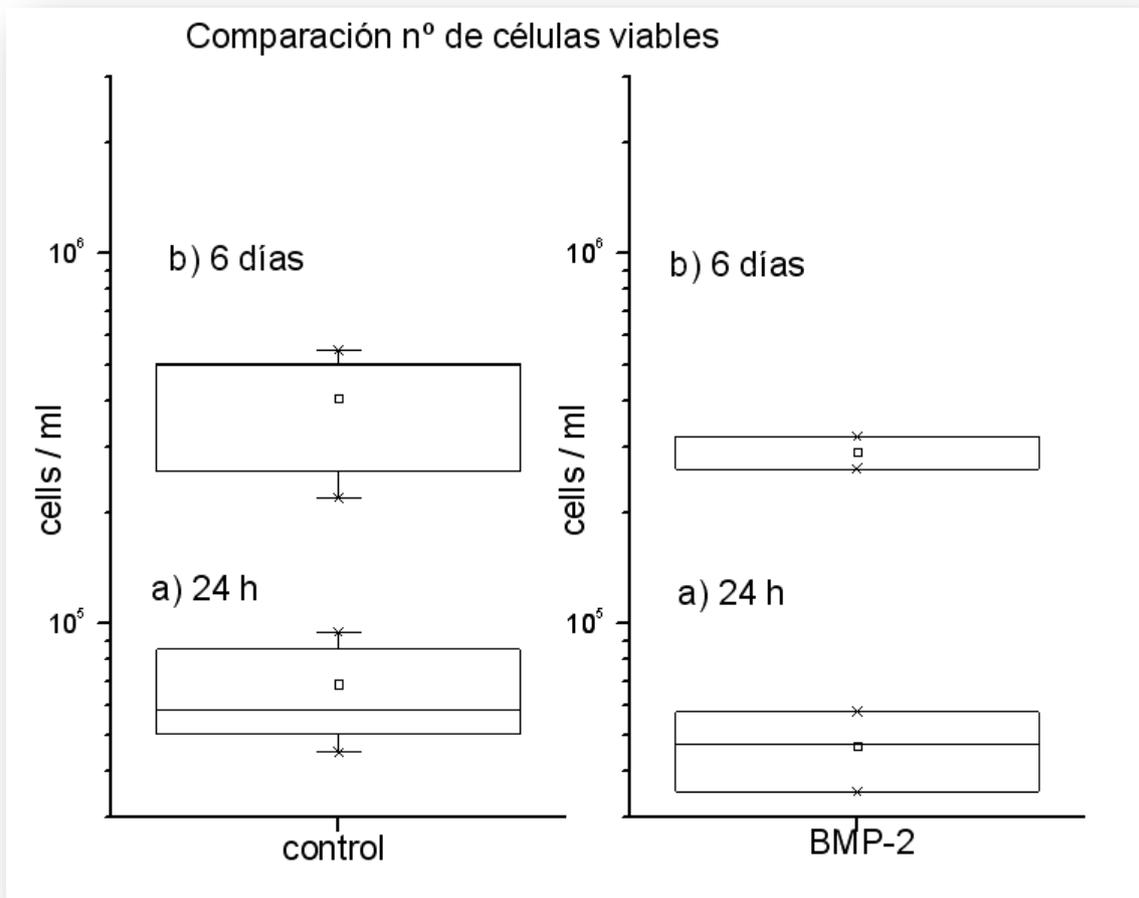


Fig 7.4: Comparación del número de células viables obtenidas en un cultivo control y en uno diferenciado con BMP-2

La dispersión de los valores medidos es grande. Las diferencias entre las muestras no son estadísticamente significativas para control > BMP y  $p > 0.05$ .

Si cuantificamos el porcentaje de supervivencia entre las poblaciones, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas.

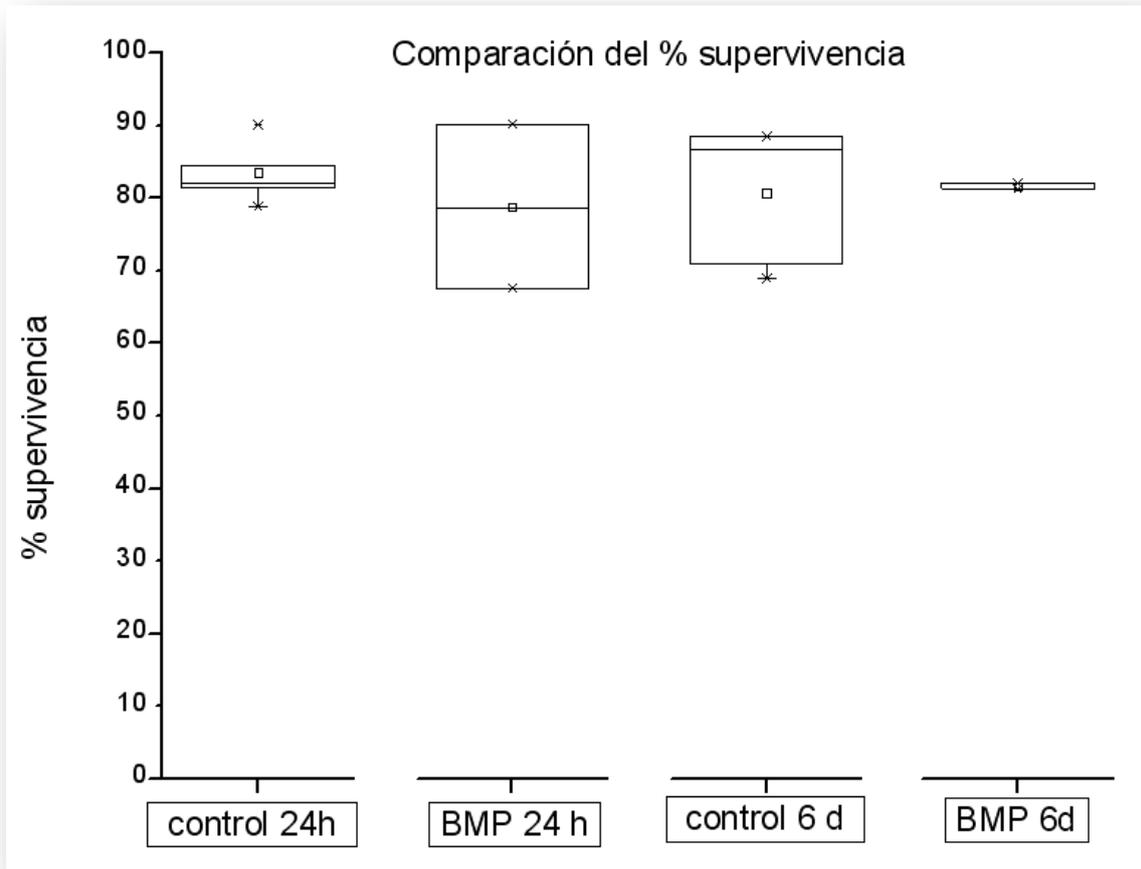


Fig 7.5: Comparación del número de células vivas tras la diferenciación con BMP-2 respecto al control

Los valores que consideramos de referencia son los que muestran las gráficas, entendiendo que la variabilidad entre ellos puede ser alta. El número de células viables tras 6 días de cultivo deben ser alrededor de 6 veces superior que el número inicial. La viabilidad debe estar alrededor del 80%

---

## CUANTIFICACIÓN DE LA ALP

---

La expresión de la ALP se ha medido a los 3 días y a los 6 días, para evaluar cuál es el mejor momento para analizarla.

Los resultados son los siguientes:

<b>MUESTRA</b>	<b>VALOR ALP (sigma units / ml)</b>
<b>3d control</b>	0,02
<b>3d BMP</b>	0,22
<b>6d control</b>	0,00
<b>6d bmp</b>	7,23

*Tabla 12: valores de Fosfatasa Alcalina medidos en las muestras control y diferenciada por BMP-2 a los 3 días y a los 6 días de aplicar la proteína*

Con estos resultados observamos que a los 3 días ya podemos observar un aumento de la expresión de ALP, aunque si esperamos 6 días la valoración cuantitativa será totalmente clara.

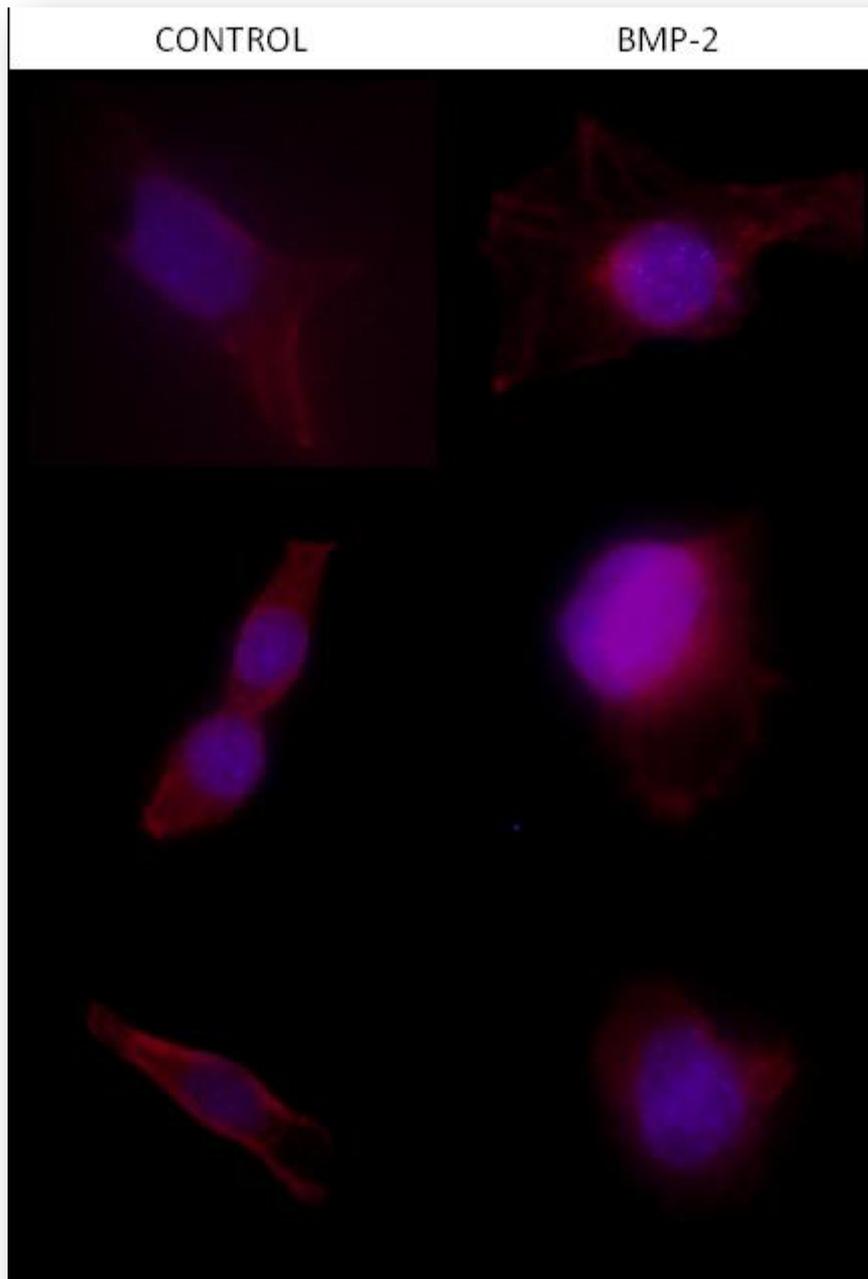
---

## EXPRESIÓN DE OX

---

Para analizar la expresión del Osterix que es exclusivo de los osteoblastos, se utiliza una prueba de doble inmunofluorescencia. Tras las diferentes etapas, las células muestran el Osterix expresado en el núcleo (osteocitos) o por toda la célula (miocitos). La valoración visual de esta expresión no es, sin embargo, sencilla para un ojo no experimentado.

Para hacerlo más sencillo se superpone la fluorescencia del núcleo (en azul) a la del Osterix (en rojo). De esta manera, se puede ver más claro como en la muestra control la expresión está diseminada por más partes de la célula que en la muestra diferenciada con BMP-2, que se puede observar cómo la imagen en rojo y en azul están prácticamente solapadas, indicando que la mayor parte de la expresión de Osterix se ha producido en el núcleo.



*Fig 7.6: imagen de doble inmunofluorescencia en el que se observan las diferencias morfológicas y de expresión de Osterix en muestras control y diferenciada por BMP-2*

Después de analizar las imágenes correspondientes a 3 días y 6 días, se valora que el mejor momento para sacar las imágenes es al cabo de 3 días.

Un dato importante es que se confirma que estas pruebas se pueden realizar sin necesidad de sacar las células del chip, pudiéndose inmovilizar sobre la misma superficie del electrodo, que como es transparente, no afecta a la visualización por el microscopio.

---

## C. PRUEBA DE CONCEPTO DE APLICACIÓN DE CAMPO:

---

Se compara la muestra obtenida tras aplicar un campo eléctrico con las características indicadas en el apartado de materiales y método (20 mV/cm, 40 KHz, 30', 690  $\mu$ A) con una muestra control en chip y otra muestra control en flask. Se realizan 3 copias de cada muestra, para poder hacer los estudios de viabilidad correspondientes. Este estudio se ha repetido 3 veces en idénticas condiciones. Los resultados son los siguientes:

---

### ESTUDIO DE VIABILIDAD / PROLIFERACIÓN

---

El análisis visual de las células irradiadas en comparación a las células control tanto en chip como en flask no muestra diferencias aparentemente significativas, como se puede ver en las imágenes a continuación:

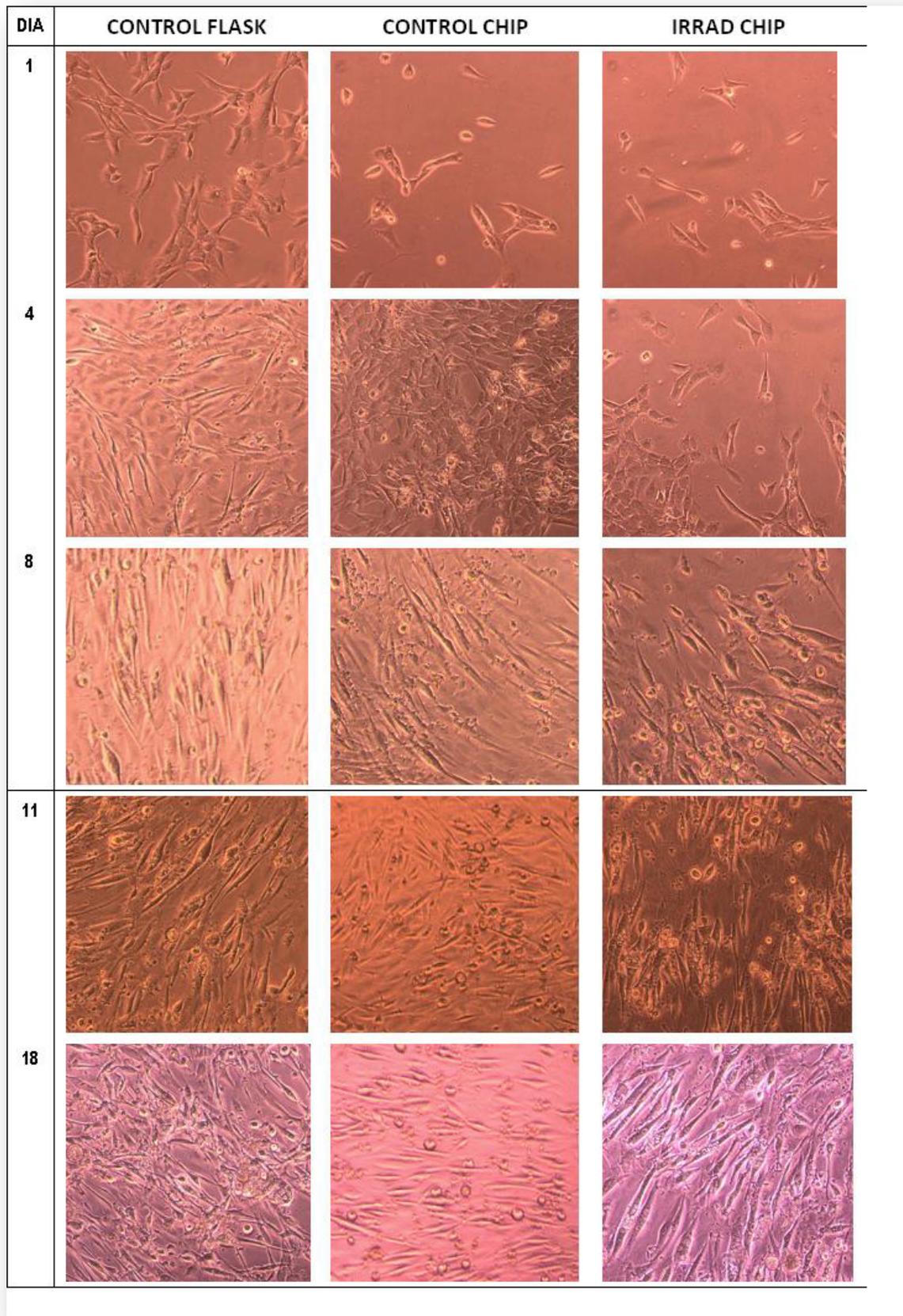


Fig 7.7: Evolución de las células cultivadas en flask y en chip tras 18 días de cultivo, tanto sin aplicar campo eléctrico (columnas control) como tras la aplicación

Las células aparentemente se comportan igual en los 3 casos. El recuento tras 24h y 6 días de cultivo arroja los siguientes resultados:

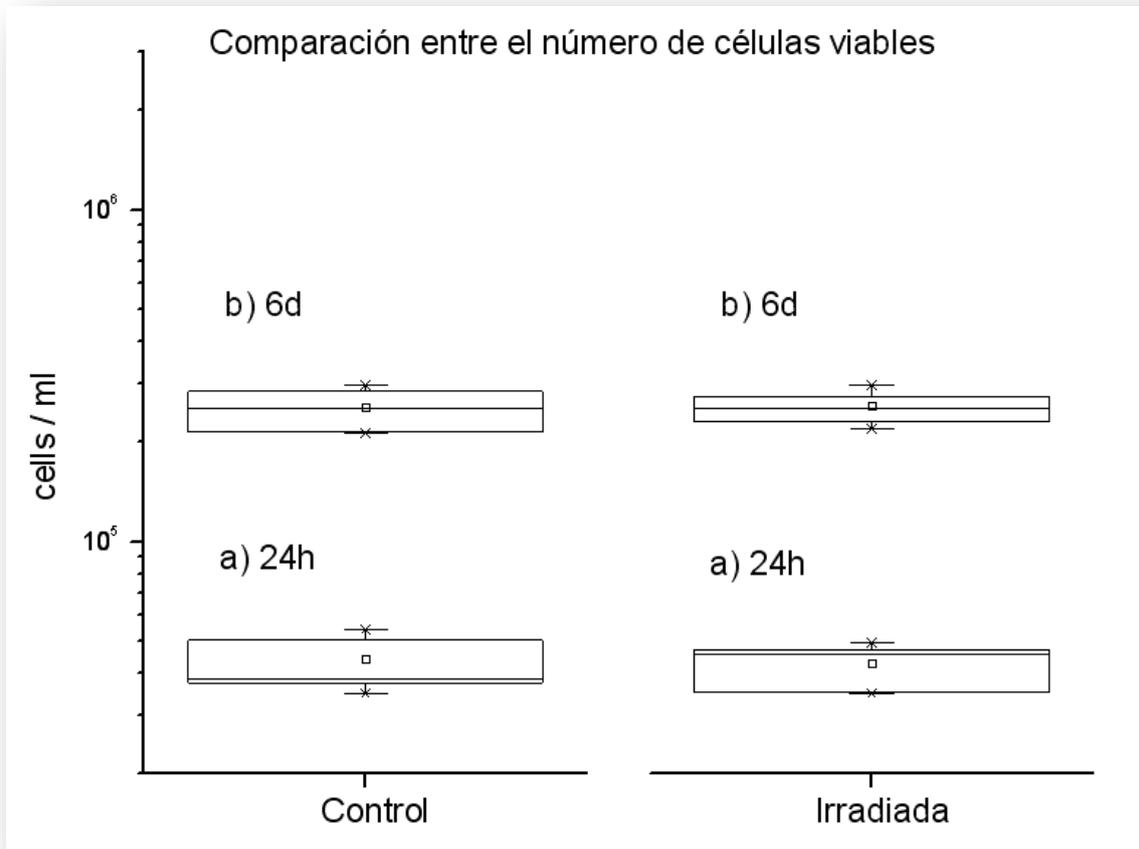


Fig 7.8: Comparación de la proliferación celular de la muestra control y la muestra irradiada tras 24h y 6 días de cultivo.

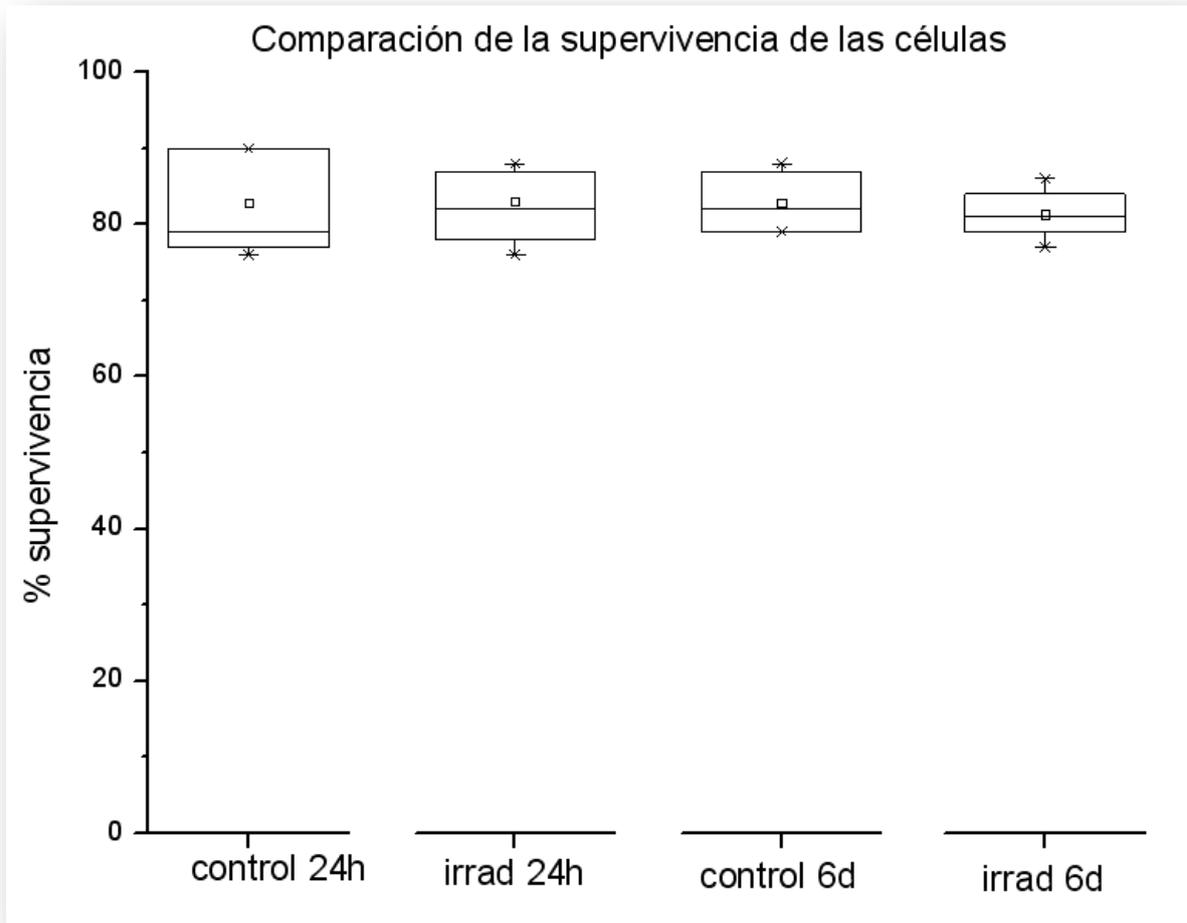


Fig 7.9: Comparación de la supervivencia celular en las muestras control e irradiada tras 24h y 6 días de cultivo

Por lo que se puede deducir de los datos anteriores, las células son capaces de vivir, proliferar y diferenciarse normalmente tanto en el chip de control como en el irradiado, es decir, el estímulo aplicado no ha producido cambios ni en la viabilidad, ni en la proliferación ni en el linaje de destino.

## 4. CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se ha diseñado y puesto en marcha un sistema que permite aplicar de forma controlada campos eléctricos a un cultivo celular C2C12 de forma que se pueda utilizar para estudiar si es posible llegar a producir cambios en el linaje de destino. Los chips diseñados han mostrado ser adecuado para este tipo de estudios, permitiendo una supervivencia y

proliferación totalmente normal, así como el tipo de pruebas escogidas para valorar la diferenciación celular.

Se han realizado pruebas con diferenciación mediada por BMP-2, obteniéndose los patrones de referencia tanto de viabilidad, proliferación, expresión de ALP y de Ox. Con los valores obtenidos, se puede valorar si las células han proliferado adecuadamente, así como tener una medida de la diferenciación celular. En caso de utilizar otro tipo de estímulos, se establece que el tiempo óptimo para valorar los efectos es transcurridos 3 días después del último estímulo, tanto para ALP como para Ox.

Se han realizado 3 pruebas de irradiación en idénticas condiciones en las que se ha podido observar que los valores de proliferación y supervivencia son normales. El análisis visual muestra que no ha habido cambios en la diferenciación celular, habiéndose convertido todos en miocitos.

Resumiendo, se puso en marcha el sistema, se han establecido las referencias y se ha confirmado que las células son viables tras esta exposición a campos eléctricos.

Es necesaria una investigación posterior para establecer los efectos que las diferentes magnitudes eléctricas producen, para encontrar las mejores condiciones para conseguir la diferenciación deseada.



# Capítulo 8

## CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO



# 1. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha estudiado de forma sistemática la relación entre los campos eléctricos y las células, y los efectos que éstos tienen a diferentes niveles (supervivencia, metabolismo, expresión proteica, forma), en dispositivos de tipo Lab-on-a-Chip y aplicándolo a un caso concreto de un concentrador basado en dielectroforesis. Se ha realizado de manera que se ha podido diferenciar la aportación de cada uno de los parámetros eléctricos a los cambios. A continuación se resumen los resultados y conclusiones más relevantes:

Se ha **diseñado, fabricado y comprobado** un **chip** que permite la aplicación de campos eléctricos controlados a células así como la evaluación posterior, y en algunos casos también *in situ*, de parámetros objetivos. En concreto, se han realizado dos versiones del mismo chip, una con electrodos en oro y otra con electrodos de ITO. La opción de ITO surgió por la necesidad de reducir la variabilidad experimental obtenida, de modo que pudiéramos en todo momento visualizar el interior de la cámara, así como para observar las células durante la exposición al campo eléctrico. El sistema se ha controlado en sus aspectos fluidicos y eléctricos, así como en el comportamiento térmico y la variación de la conductividad con el tiempo, estimando una variabilidad interna intrínseca al dispositivo en un 20%.

A la hora de diseñar los protocolos y condiciones de experimentación, y para acotar las numerosas combinaciones de parámetros, se ha realizado una **simulación** en COMSOL que permita determinar cuál es el rango en el que es más interesante centrar el estudio. Para ello se ha realizado un modelo realista de la bacteria *Escherichia coli* como una elipsoide alargada con 3 capas (citoplasma, membrana y pared celular), y se han simulado condiciones de campo eléctrico, analizando los resultados en frecuencia de la intensidad de campo eléctrico, densidad de corriente eléctrica y disipación de potencia. El análisis de los resultados muestra, entre otras cosas, que la corriente eléctrica comienza a atravesar la célula a una frecuencia entre 100 KHz y 1 MHz, y otorga un rol importante a la pared bacteriana en cuanto a diana de la corriente eléctrica.

A medida que aumenta la frecuencia, se produce un aumento en la disipación de potencia y en la densidad de corriente, indicando cambios en la impedancia del sistema (a igualdad de campo eléctrico aplicado). Por ello se ha considerado importante hacer un análisis adicional sobre la variación de la impedancia del sistema mediante un modelo que considere el chip y la solución de las bacterias a la concentración utilizada experimentalmente.

La combinación de ambas informaciones nos permite escoger como frecuencias más relevantes para el estudio las comprendidas entre 100KHz y 1 MHz, que es donde los cambios de comportamiento debidos a las características dieléctricas la membrana son más visibles.

**El primer bloque de investigación se ha realizado sobre el modelo biológico bacteriano: *E. coli*.** Las magnitudes evaluadas se han dividido en dos grupos: las magnitudes eléctricas (Intensidad de campo, corriente y frecuencia) y las magnitudes no eléctricas (tiempo, temperatura y concentración). Se ha independizado el efecto de cada una de las magnitudes, de modo que se ha observado lo siguiente.

- Respecto a la **intensidad de campo eléctrico**, se puede establecer un umbral de letalidad en un valor inferior al considerado habitualmente de 1000 V/cm, ya que se consigue una mortalidad del 80% de la población con una intensidad de campo de 660 V/cm, y de un 50 % con campos de 400 V/cm. Se han evidenciado daños subletales en el aumento de los tiempos de generación que es significativamente mayor en las muestras irradiadas que en las muestras control, así como en la dinámica de crecimiento. Una posible interpretación de ello puede ser que a valores inferiores de campo predominan los daños subletales, de los cuales las bacterias no siempre consiguen recuperarse, mientras que a valores superiores predomina la mortalidad, y las bacterias que consiguen sobrevivir parecen recuperarse con más facilidad de los daños.
- El estudio de la **frecuencia** ha mostrado que a frecuencias altas la mortalidad se hace más elevada.
- Las medidas referentes a la **corriente** eléctrica han arrojado los siguientes resultados: A una intensidad del orden de 100 mA, la frecuencia es un valor que afecta, pero cuando la intensidad aumenta, la

mortalidad no depende de la frecuencia. Por la información obtenida de los datos analizados, podemos concluir que el parámetro fundamental no es la intensidad de campo sino la corriente eléctrica. Este resultado es importante, puesto que es el primer estudio sistemático que lo muestra.

- La aplicación de la **temperatura** amplifica el efecto del campo eléctrico en sí mismo, mostrando una sinergia entre ambas magnitudes.
- En general, se puede observar que el **tiempo** no afecta de forma lineal. Parece haber una disminución de la viabilidad en el primer instante de aplicación del campo eléctrico. Posteriormente las células se adaptan y mayor tiempo de aplicación no repercute en una mayor letalidad.
- Analizando los valores de la supervivencia a diferentes **concentraciones**, encontramos que concentraciones muy altas producen un efecto de “protección” sobre las células.

Con estos análisis se ha completado la primera parte de los objetivos en los que se pretendía analizar la contribución específica de cada uno de los parámetros eléctricos y no eléctricos sobre la viabilidad y los posibles daños subletales del modelo bacteriano sobre *E. coli*. Posteriormente se ha profundizado en las implicaciones biológicas subletales que tienen los dispositivos LOC, aplicándolo a un **concentrador de bacterias**, y se han hecho estudios proteómicos y de alteraciones morfológicas.

Se ha utilizado un microdispositivo concentrador de células con flujo continuo basado en dielectroforesis (DEP). El diseño (realizado por Beatriz del Moral) se basa en electrodos interdigitados metálicos al que se le han añadido pilares dieléctricos que permiten aumentar la velocidad de flujo sin perder eficacia en el atrapamiento de las células.

Para valorar el efecto del campo eléctrico se ha realizado un análisis de expresión proteica mediante un SDS-PAGE. A las intensidades utilizados en el dispositivo concentrador no se observan cambios en el proteograma. Si aumentamos la corriente eléctrica, observamos variaciones en la expresión de las proteínas, correspondientes mayoritariamente a dos grupos:

- **Outer Membrane Proteins A** (ompA): proteína mayoritaria en la membrana externa. Estas proteínas están sobre expresadas en la muestra tratada, especialmente cuando la intensidad aplicada es baja
- **Proteínas ribosomales** implicadas en el proceso de translación, en la cual se forman las proteínas en los ribosomas. Estas proteínas están expresadas de diferente manera, especialmente cuando la intensidad aplicada es alta.

Los cambios morfológicos se han analizado mediante la tinción de fluorescencia LIVE/DEAD®. Las bacterias irradiadas muestran tener una longitud promedio mayor que las de la muestra control, siendo ésto un indicio de posibles **mecanismos SOS de reparación**.

**El segundo modelo biológico sobre el que se ha trabajado es la línea celular C2C12 de preioblastos inmortalizados de ratón**. En este caso, el estudio ha consistido en el diseño y puesta a punto del sistema para poder hacer los estudios:

- Se ha diseñado y construido un dispositivo capaz de albergar células, de permitir su crecimiento normal en el que también se puede aplicar campo eléctrico controlado.
- Se han realizado pruebas de viabilidad que muestran que dentro del dispositivo, las células pueden vivir y proliferar en condiciones normales.
- Se han determinado las pruebas a realizar para estudiar un posible cambio de linaje de destino inducido por campos eléctricos, obteniéndose un patrón de referencia con el cual comparar los resultados obtenidos.
- Se ha realizado también una prueba de concepto de aplicación del campo eléctrico, mostrándose que es el sistema diseñado permite la aplicación del campo y la valoración de los resultados, y que las células son capaces de proliferar en este entorno modificado.
- También se ha comprobado que es posible realizar las pruebas de evaluación de los resultados en este sistema, sin tener que realizar modificaciones.

El sistema queda a punto para poder realizar estudios sobre diferenciación celular mediante estímulo eléctrico.

El único punto que ha quedado sin poder verificar totalmente es el correspondiente a la **electroporación**, en el cual los resultados obtenidos no tienen la repetitibilidad suficiente como para establecer las condiciones idóneas y sacar conclusiones fiables y que por eso se muestra en el Anexo 1.

La principal aportación de los resultados obtenidos al panorama actual de conocimiento se basa en la importancia de establecer las condiciones de letalidad en función del valor de la intensidad de la corriente eléctrica (y no de la intensidad de campo eléctrico, como se hace actualmente), y en el rol que cumple la pared bacteriana, que habitualmente no se tiene en cuenta a la hora de hacer valoraciones biológicas del efecto de las magnitudes eléctricas.

## 2. LÍNEAS DE TRABAJO FUTURO

Después del trabajo realizado en esta tesis y de los años invertidos en esta investigación, creo que de nuevo tengo más preguntas que respuestas. Debo confesar que la lectura de la bibliografía me ha suscitado tantas preguntas, que me he sentido tentada de reenfocar la tesis infinitas veces para intentar responder cada cosa que iba asomando a mi mente. Supongo que es parte de mi naturaleza. A mi mente curiosa se le ocurren muchas, pero muchas, preguntas que seguir contestando: ¿de qué manera se comunican las células entre ellas por campos electromagnéticos? ¿cómo se ve alterada esta comunicación por la aplicación de los campos externos? ¿qué tipos de receptores tienen (además de los canales iónicos controlados por voltaje) que les permiten detectar y responder a señales tan débiles que se confunden con el ruido? ¿se puede llegar a encontrar algún elemento en las células (molécula, orgánulo) y en los organismos que sea realmente el transductor del estímulo eléctrico en señal química)? ¿Cómo estudiar el rol de los campos endógenos generados por los microtúbulos de las células eucariotas y su relación con la energía de las mitocondrias? ¿Intervienen estos campos también en el

mantenimiento del potencial transmembrana, y por tanto, en la viabilidad de la célula? ¿se podría “recargar” el potencial transmembrana de una célula externamente, favoreciendo su viabilidad? ¿cómo se puede obtener la información relevante que está codificada en los biofotones que emiten todas las células? ¿se puede modificar el comportamiento de las células a partir de emisiones electromagnéticas, en diferentes bandas de frecuencia, sin necesidad de aplicar un químico? ¿se puede hacer que una célula “enferma” recupere su estado óptimo aplicándole su frecuencia propia? De la misma manera que el uso de corriente promueve la regeneración ósea, ¿se puede promover la regeneración de otro tipo de lesiones, especialmente la nerviosa? ¿qué papel cumplen las proteínas, especialmente el colágeno con sus propiedades piezoeléctricas dentro del mundo electromagnético biológico? ¿por qué la propiedad semiconductor de las proteínas no se utiliza habitualmente para estudiar la interfaz eléctrica-bioquímica? ¿se puede utilizar esas mismas propiedades para mejorar la salud? ¿se puede llegar a encontrar un “antibiótico eléctrico” que permita matar selectivamente a microorganismos del cuerpo in vivo sin dañar al resto de células y estructuras?

La mayoría de estas preguntas, y otras que no me he atrevido a escribir en esta disertación, supongo que pertenecen al reino de lo “no posible” en cuanto a investigación se refiere. Algunas cosas que sí pueden ser realizables a continuación son las siguientes:

Respecto al trabajo con bacterias, por un lado, sería interesante profundizar en los cambios en la expresión genética de las bacterias que se producen a causa de los estímulos, diferenciando entre condiciones letales y subletales. También el tema de electroporación es una línea de investigación interesante. Algunas especies bacterianas son difíciles de electroporar por métodos clásicos (PEMF), por lo que conseguirlo a baja intensidad con señales sinusoidales abre la puerta a la posibilidad de electroporar otras familias de bacterias.

Por supuesto, como las bacterias tienen tantas aplicaciones biotecnológicas, también sería muy interesante explorar si los procesos que actualmente se llevan a cabo por estímulos químicos (como la diferenciación mediada por BMP-2 comentada en el capítulo 7) pueden ser amplificados y/o sustituidos por aplicación de campos eléctricos.

Respecto al trabajo con células eucariotas, las líneas de investigación que se abren son enormes. Por citar algunas, teniendo un sistema que permite aplicar los campos, se puede estudiar el efecto en la diferenciación celular no sólo de mioblastos en osteocitos, sino de cualquier otra línea celular pluripotencial en un linaje deseado, por ejemplo células madre en cardiomiocitos. También se puede investigar en este sistema el efecto sinérgico entre los campos eléctricos y determinados agentes químicos, como por ejemplo lo que se utiliza en la electroquimioterapia, en la que la aplicación de campos eléctricos de forma simultánea a los fármacos quimioterapéuticos permite la reducción de las dosis de estos últimos, incrementando la eficacia del tratamiento. O el efecto que las antenas que utilizan radiofrecuencia pueden tener sobre la “salud” de los tejidos circundantes, estudiándolo en términos diferentes al SAR.

Como reflexión final tan solo diría que el paradigma bioquímico que hasta ahora ha reinado en la interpretación de la vida y sus manifestaciones, queda ampliado de forma muy interesante cuando le aplicamos el concepto de campo. Y con ello no me refiero solo a incluir el bioelectromagnetismo dentro del estudio de los procesos vitales, cosa que ya se hace. La regulación conjunta e instantánea que se produce en los sujetos biológicos supone que el comportamiento de una región del organismo está conectado con el comportamiento de otras regiones. Y para este tipo de sistemas, la palabra campo es la que encaja por definición. Algunos autores como Liboff [169] explican que es posible conectar los seres vivos de forma unívoca al electromagnetismo. Esta conexión se basa en leyes físicas. Los campos electromagnéticos se definen respecto a la densidad de cargas y la densidad de corriente. Todos los seres vivos tienen ambas cosas, lo que asegura que todos los seres vivos tienen, por definición, un campo electromagnético asociado. Pero hay más. Las fuentes de cargas y corrientes en los seres vivos son características. Con la muerte, este campo electromagnético no es viable. Por eso la vida se podría decir, según el autor, que es una expresión de este campo electromagnético. Liboff describe matemáticamente este campo de modo que crece a medida que nos desarrollamos y envejecemos, y es el producto de la evolución, relacionándonos a cada uno con nuestra especie y con todo lo que nos ha precedido. Este campo refleja los cambios en el desarrollo embrionario y la manera en la que nos desarrollamos hacia la

madurez después del nacimiento. También refleja los cambios traumáticos asociados a las heridas. Estos cambios en los campos no solo muestran los cambios en la densidad, sino en la plantilla para la restauración del sistema a su estado normal. Los seres vivos se convierten de este modo en expresiones de campos electromagnéticos.

Pero eso sería otra tesis...

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS RELACIONADAS CON LA TESIS

- Presentación Oral en Congreso Internacional Medicon 2013. Finalista (4º puesto) en el Concurso de Jóvenes investigadores.  
Trabajo presentado: "*Effect of Electric Field and Temperature in E. coli viability*". Publicado como capítulo de libro en [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-00846-2\\_452](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-00846-2_452)
- B. del Moral, J.M. Álvarez-Azpeitia, A.M. Oliva, J.Colomé-Farrarons, M. Castellarnau, P.L. Miribel-Català, A. Homs, A. Juarez and J. Samitier. "*Continuous flow dielectrophoretic concentrator enhancement based on dielectric poles*". Microfluid. Nanofluidics, 2013
- A.M. Oliva, A. Homs, A. Juarez and J, Samitier, "*Electric current: the key factor to inactivate bacteria at room temperature*". Submitted to Biophys. J., 2014



# ANEXO 1

## ELECTROPORACIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones de los campos eléctricos más utilizadas es la electroporación. Como se ha comentado en el Capítulo 2, a través de este fenómeno una célula expuesta a un campo eléctrico concreto se permeabiliza de modo que se puede producir un intercambio de material con el exterior, es decir, puede incorporar moléculas externas o permitir la salida de moléculas internas.

Generalmente los campos eléctricos utilizados para la electroporación son de muy alta intensidad y pulsantes. Ello repercute de una forma especial en la viabilidad de la muestra, a pesar de que no acostumbra a ser un factor que impida su uso. Sin embargo, hay al menos dos precedentes de utilización de campos de baja energía para conseguir el mismo efecto.

Los estudios de Xie [56] han mostrado que campos eléctricos alternos de baja intensidad, entre 20 y 160 V/cm, pueden cambiar la conductividad de la membrana y permitir la trasfección de plásmido. El proceso es muy sensible a la frecuencia, siendo más efectivo a extra bajas frecuencias, y casi inexistente a 1MHz. La electroporación también resulta ser extraordinariamente sensible a la temperatura, de modo que ligeros incrementos de temperatura impiden totalmente que el fenómeno ocurra.

Por otro lado, Loghavi [127] también sugiere que hay un espectro de baja frecuencia al cual las células reaccionan. Los resultados no son tan concluyentes como los del estudio anterior, pero en sus conclusiones manifiestan que se espera que la electroporación sea función de la frecuencia. La difusión amplificada a baja frecuencia permite más tiempo para los cambios en la membrana celular, por eso se espera que se produzca más poros a baja frecuencia.

El principal factor del cual depende la eficiencia de la transformación se asume que es la conductividad del medio que contiene la muestra bacteriana y el ADN, y la densidad de corriente del campo eléctrico aplicado [141]. Varios autores afirman que también la temperatura tiene una gran influencia en la eficiencia de la electroporación [122] [132].

Teniendo en cuenta estos precedentes, se han realizado varias pruebas de electroporación mediante el uso de campos eléctricos de baja intensidad y sinusoidales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los estudios de electroporación se ha utilizado el modelo celular bacteriano, que ha sido preparado como se ha indicado en el capítulo 4, apartado 2 A. El plásmido elegido es el pBR32, uno de los más ampliamente utilizados en E.coli. Una vez transferido a la célula, le confiere a ésta resistencia a Ampicilina y a Tetraciclina, por lo cual resulta sencillo comprobar si se ha producido la electrotrasfección o no. Basta con sembrar las bacterias en una placa con LB Agar y el antibiótico y ver si crecen o no. En concreto, el protocolo seguido es el siguiente:

La muestra se divide en dos grupos. Al primero se le añade una concentración de plásmido de 0,5  $\mu\text{gr} / \mu\text{l}$  mientras que al segundo se le añade el doble de concentración. Cada grupo es a su vez dividido en una muestra que servirá de control y otra muestra que será tratada mediante la aplicación de campo eléctrico. Todas las muestras son sembradas en placas con Agar y en placas con Agar y ampicilina. Posteriormente se recuentan todas las placas.

El esquema siguiente representa este proceso para mayor claridad:

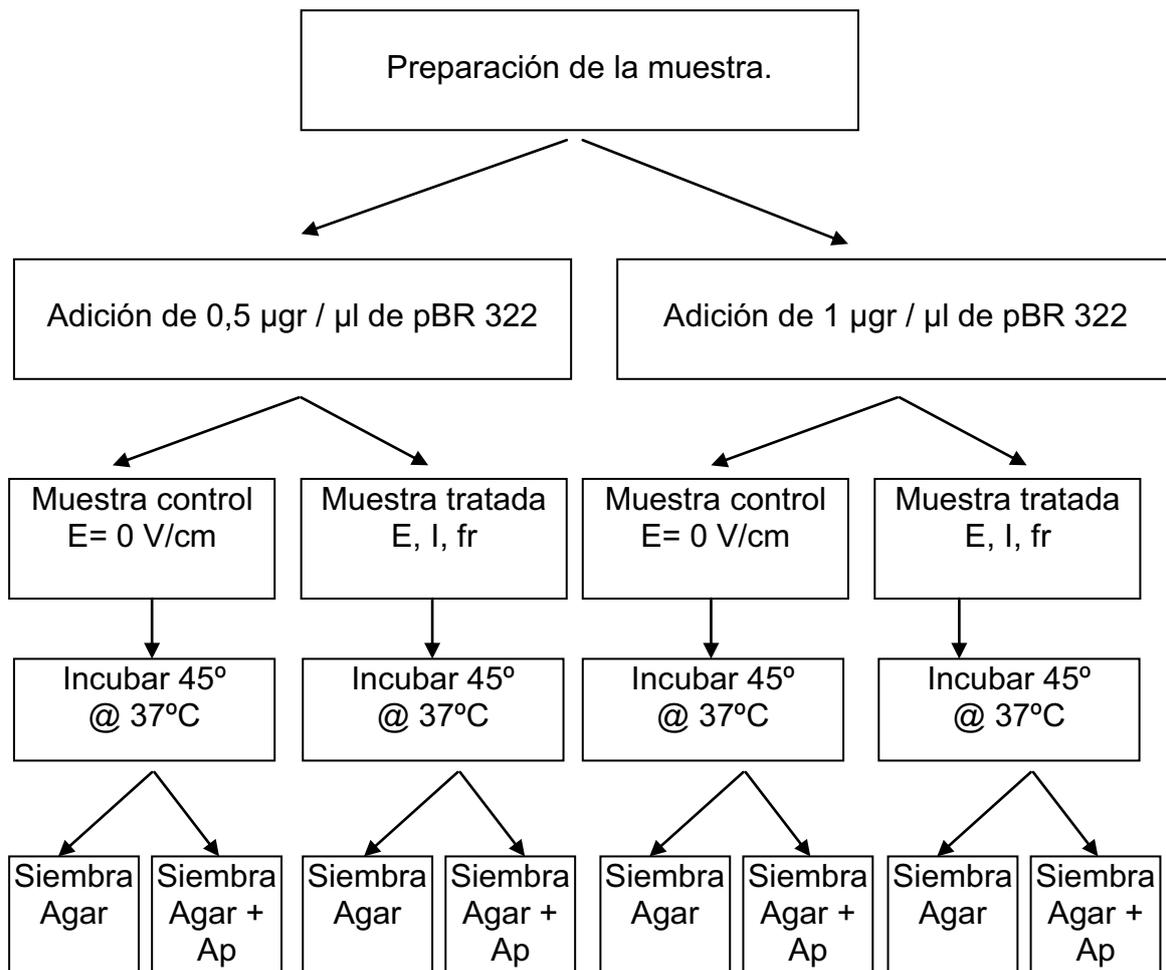


Fig A.1: Diagrama de experimentación en electroporación

Si el recuento en ampicilina es positivo, se siembra la muestra en otra placa con LB Agar + tetraciclina para confirmar la doble resistencia a los antibióticos.

Al sembrar las células en LB Agar se obtiene la referencia de la cantidad de células viables, y posteriormente, al contar las células que han crecido sobre la placa con antibiótico se puede calcular la eficiencia de la electroporación.

Las condiciones de experimentación utilizadas han sido las siguientes:

- Intensidad de campo eléctrico: 600 V/cm
- Frecuencias: 1 KHz, 100 KHz, 140 KHz, 1 MHz

- Tiempo: 5 minutos
- Temperatura: 25 °C

También se han utilizado las condiciones descritas en el trabajo de Xie [56] , con la única diferencia del tipo de *E.coli* utilizada.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la reproducción del experimento descrito anteriormente y que había obtenido altos niveles de electrotransfección de pBR32, no hemos conseguido reproducir sus resultados. Es más, no hemos obtenido transfección alguna, siendo el recuento en Ampicilina nulo para todos los casos estudiados.

En el resto de experimentos, los resultados son los siguientes:

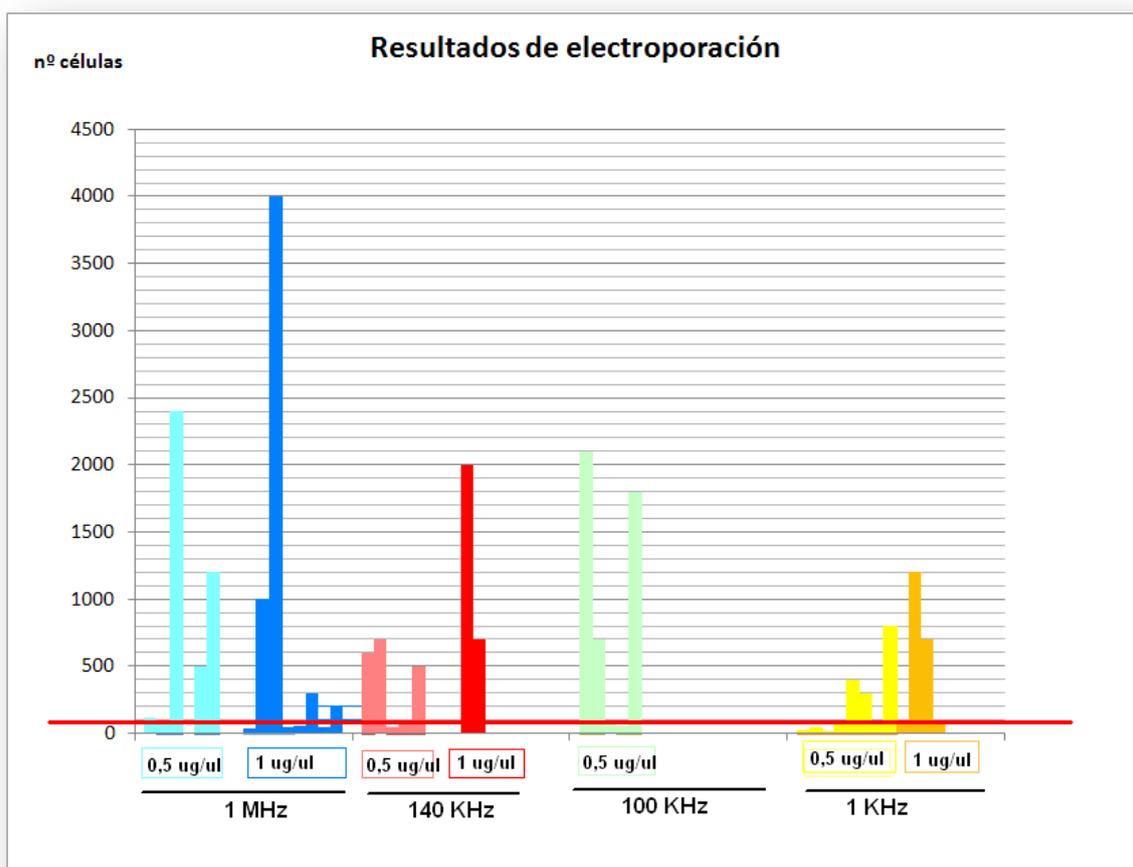


Fig A 2: Resultados de electroporación para diferentes frecuencias

En esta gráfica se encuentran representados los resultados de todos los experimentos para cada frecuencia, para dos valores de concentración de plásmido. La línea horizontal roja representa el valor umbral (100 células) de lo que se considera una transformación espúrea. Es decir, un recuento por debajo de 100 células (para la concentración que tenemos que es del orden de  $10^8$ ) no se puede considerar consecuencia de ninguna intervención, sino que es algo que puede producirse de forma espontánea. Como se puede observar, los resultados son altamente variables.

En algunos casos se obtienen mejores resultados con una concentración de plásmido más elevada, pero no siempre. Además, es importante ajustar la cantidad de ADN que se introduce junto con la muestra para que no aumente demasiado la conductividad y se produzcan otro tipo de fenómenos no controlados. El problema es que la eficiencia de la electrotransformación también depende de esta concentración.

La frecuencia a la que se han obtenido mejores resultados parece ser, en contra de lo leído en la bibliografía, 1 MHz. No obstante, la eficiencia de transfección es muy baja, y los resultados excesivamente variables. Según se reporta en la bibliografía, uno de los factores más importantes es la temperatura. En todos los casos se ha trabajado con un baño térmico a 25 °C, pero tal vez hubiera sido interesante probar con un baño a temperatura inferior, y ver si con ello se consigue mayor eficacia. También sería interesante tener la medida de la intensidad de la corriente eléctrica que circula en cada momento, para poder analizar los datos con mayor precisión.

## 4. CONCLUSIONES

Se han realizado experimentos para conseguir una electrotransfección del plásmido pBR32 que confiere a la célula resistencia a ampicilina y a tetraciclina. Los resultados son altamente variables y no se ha conseguido una alta eficiencia de transformación génica. No obstante, se ha conseguido electroporar con éxito células bacterianas a baja intensidad. Sería interesante

continuar realizando más experimentos bajando la temperatura y controlando la corriente eléctrica.

# ANEXO 2

## PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA C2C12

A continuación se describen los diferentes protocolos seguidos para la experimentación con células C2C12.

### 1. PROTOCOLO DE MANIPULACIÓN

---

#### A. MEDIOS DE CULTIVO

---

1. **Medio de cultivo base .**
  - a. DMEM
  - b. 1% de L-glutamina
  - c. 1% de penicilina-streptomina
  - d. 1% de piruvato sódico

- e. 10% de FBS
- 2. **Serum Free:** Lo mismo pero sin FBS
- 3. **Low serum Medium: para 50 mL**
  - a. DMEM.
  - b. 1% de L-glutamina
  - c. 1% de penicilina-streptomina
  - d. 1% de piruvato sódico
  - e. 2% Horse Serum

---

## B. DESCONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

---

1. Material necesario:
  - a. 30ml de medio de cultivo base
  - b. Flask
  - c. Pinzas
  - d. Hielo
  - e. Tubo centrífuga
  - f. Cámara Neubauer
2. La descongelación de las células ha de ser rápida. El criotubo se traspassa del nitrógeno líquido a hielo. En el momento de la descongelación, el criotubo se sumerge en un baño a 37°C.
3. Tan pronto como la suspensión celular esté descongelada se traspassa a un tubo de centrífuga que contendrá medio de cultivo+FBS (unos 10 ml): 9 ml DMEM + 1 ml cels
4. La suspensión se homogeneiza con la ayuda de una pipeta y se centrifuga a 900 rpm durante 5 min.  
El pellet se resuspende en 20 mL de medio de cultivo+FBS (va a estar todo el fin de semana). En cada flask está previamente puesto el medio.
5. Se cuenta con la cámara de Neubauer. Se limpia con etanol la cámara y el cubre. Se cogen 18µL y se ponen entre el cristal y la cámara. Se mira al microscopio con objetivo 10X
6. Anotamos 4 mediciones y realizamos el promedio. El número de células será el promedio  $\times 10^4$ .

7. Se distribuye en frascos de cultivo. En cada flask ponemos previamente 10mL de medio. Ponemos 1 frascos:
  - a. el primero con 100.000 cels
  - b. el segundo con 200.000 cels
8. poner los frascos en el incubador B

---

## C. TRIPSINIZACIÓN

---

### Material necesario

- a) PBS 1X → 20 ml autoclavado
- b) Medio de cultivo → 30ml
- c) Medio serum free → 500µl /pocillo
- d) Medio serum free con factores de diferenciación
- e) Tripsina → 5 ml

### Procedimiento

1. poner el baño térmico y dejar calentar PBS 1X, tripsina, medio+FBS
2. Preparar 10mL de medio+Hs + factores
3. Coger los frascos del incubador.
4. Sacar el medio con la pipeta (inclinarse y aspirar desde una esquina)
5. Lavar 2 veces con PBS 1X (5mL). Echarlo sobre la pared contraria, no directamente sobre las células.
6. Añadir 5mL de tripsina
7. Incubar 5 min
8. Añadir 5 ml de medio DMEM completo + 10%FBS para parar la actividad enzimática de la tripsina.
9. Resuspender bien y recogerlo todo para poner en un tubo de centrifuga de 30 ml.
10. Centrifugar 5 min a 900-1000 rpm
11. Tirar el sobrenadante y resuspender muy bien el pellet de células en 10 ml de medio DMEM completo + 10%FBS.
12. Contar células en cámara de Neubauer. Calcular el volumen necesario para sembrar 5000 cels / pocillo

Usamos 2 placas idénticas, una para 24h y otra para 4 días. La primera fila será un control de proliferación. La segunda fila un control de diferenciación sin factores

13. La tercera fila un control de diferenciación con factores.

---

## D. CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

---

Para congelar, se centrifugan, se tira el sobrenadante y se resuspende en FBS con un 10% de DMSO. Calcular los ml para resuspender de modo que queden 1 millón de células por criotubo. Resuspender y anotar el pase correspondiente.

## 2. PROTOCOLOS DE ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

### A. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

---

Para analizar la proliferación celular se cuentan las células en un contador celular (*cell counter*). El procedimiento comienza con una tripsinización como se ha explicado en el apartado anterior. Posteriormente las células son contadas de la siguiente manera:

Se utiliza CASY cell counter + analyser model TT

1. Limpiar el contador con CASY ton durante 3 ciclos
2. Elegir el protocolo de medida deseado en el menú, en función del tipo de célula a contar.
3. Poner 10 ml de CASY ton en un tubo con una alícuota de la muestra a medir diluída a 1/200 (50 µl). Mezclar suavemente evitando la formación de burbujas o espuma.
4. Insertar el tubo en el medidor. Después de pulsar START aparecerán en pantalla la distribución del tamaño de la muestra.

5. Presionando NEXT aparece en la pantalla la evaluación numérica completa de la medición realizada.

La concentración máxima de la muestra es de 20.000 cels/ml

---

## B. MEDIDA CUANTITATIVA DE LA DIFERENCIACIÓN

---

Para obtener una valoración cuantitativa de la diferenciación en osteocitos se utiliza el método de la fosfatasa alcalina.

### PROTOCOLO FOSFATASA ALCALINA (PA) (para muestras lisas)

La P.A. en cultivo se cuantifica por ensayo colorimétrico. Es un enzima de la membrana que transforma el p-nitrofenil (sustrato) en p-nitrofenol (da color).

1. Lavar las células del cultivo con PBS varias veces para eliminar el rojo fenol del medio.
2. Poner 150  $\mu$ l de M-PER (es jabonoso) (ref. 78501, Pierce) a las células para lisar la membrana. Resuspender bien (dejar 5min) y recoger los 150  $\mu$ l y poner en un eppendorf. (se puede congelar)
3. Centrifugar 10 min. a 14000g ).
4. Preparar el sustrato (Phosphate substrate, tablets 40 mg P5994-25TAB, Sigma) (congelador): disolver una pastilla en 10 ml de agua milliQ.
5. Preparar la "diluted p-nitrophenol standard solution" (ref. N7660-100ML, Sigma) para la curva de calibración (nevera)

Partimos de la solución que hay a 10 mM y la diluimos en 0,02 N NaOH.

<u>p-nitrophenol</u>	<u>(10mM)</u>	<u>NaOH</u> <u>(0,02N)</u>	<u>Sigma</u> <u>Units/ml</u>
A	100 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1
B	200 $\mu$ L	900 $\mu$ L	2
C	400 $\mu$ L	700 $\mu$ L	4
D	600 $\mu$ L	500 $\mu$ L	6
E	800 $\mu$ L	300 $\mu$ L	8
F	1000 $\mu$ L	100 $\mu$ L	10

Blanco (recta patrón): NaOH 0,02N

- Muestras: (primero incubar en un baño a 37°C los tubos con el AMP y el sustrato para equilibrar antes de añadir la muestra)

\*Blancos (x1): 0,5 ml AMP (Alkaline Buffer Solution, A9226-100ML, Sigma)

0,5 ml sustrato (P5994-25TAB, Sigma)

0,1ml agua destilada

\*Muestras (x3): 0,1 ml de muestras

0,5 ml sustrato

0,5 ml AMP

\*recta patrón (x3): 0,5mL AMP

0,1mL de cada concentración

0,5mL de agua

Preparar en una gradilla todos los tubos : A, B,C,D,E,F,3d controlx2, 3d BMPx2, 6d controlx2, 6d BMPx2,

- Poner en un baño a 37°C 15 min (muy importante controlar el tiempo exacto de la incubación)

- Parar la reacción con NaOH 0,05N (10 ml) y agitar por inversión los tubos (se para la reacción y se revela el color que es estable durante horas)

- Leer absorbancia a 400-420 nm (405 nm, en Espectrofotómetro de placas Power WaveX, Bio-Tek Instruments, Inc.) Abs vs. Blanco. Para ello poner las diferentes muestras en una placa de 96 pocillos, a razón de 200µL por cada pocillo. Se puede leer todo a la vez.

- Determinar Sigma Units/ml de fosfatasa alcalina según recta patrón

- Añadir 200µL de HCl en cada tubo y agitar (elimina el color debido al p-nitrofenol y solo mediremos absorvaciencia debida a la muestra)

- Leer absorbancia a 405 nm (Abs vs, blanco)

- Determinar Sigma Units/ml de fosfatasa alcalina según recta patrón.

- El valor obtenido de restar la 1ª lectura (después del NaOH) de la 2ª lectura (después del HCl) es el que nos dará el valor de fosfatasa alcalina en Sigma

Units/ml. Para pasarlo a unidades internacionales se multiplica por 16,7 (Unidades/Litro)

---

## C. MEDIDA CUALITATIVA DE LA DIFERENCIACIÓN

---

El segundo método elegido para medir la diferenciación producida en las células es la inmunofluorescencia. En concreto, el protocolo es denominado doble inmunofluorescencia indirecta.

### Material

- células crecidas sobre un portaobjetos de vidrio. (170 $\mu$ m de grosor i 1.525 índice de refracción).
- PBS 100 mM
- PBS Gly= PBS 10mM Gly 20mM
- Fijador: PF 3% en PB 0.1M Sacarosa 60 mM:
  - 760  $\mu$ l de paraformaldehído 16%
  - 240  $\mu$ l de sacarosa 1M
  - 2 ml de PB 0.2M
  - 1 ml de agua MilliQ
- Solución de lavado: PBS 10 mM Gly 20 mM
- Solución de permeabilización: tritón 0.05% en PBS 10 mM Gly 20mM (5 $\mu$ L en 10mL)
- Solución de bloqueo: PBS 10 mM Gly 20mM BSA 1% (1gr BSA en 100ml $\rightarrow$ 100mgr en 10mL)
- Solución de incubación: PBS 10mM Gly 20mM BSA 1% = solución de bloqueo

### FIJACIÓN

1. aspirar el medio de cultivo de la placa donde se encuentran los cubreobjetos
2. cubrir la placa con PBS 100 mM y aspirar

3. cubrir la placa con la solución de fijación (PF3%) un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente. El tiempo ideal es entre 10 y 20 minutos.
4. Aspirar la solución de fijación y hacer un lavado rápido con PBS
5. Llenar la placa con PBS 10 mM
6. El proceso se puede parar en este punto. Si se desea guardar el material durante un par de días a 4°C es conveniente añadir azida sódica como conservante y sellar las placas con parafilm para evitar la evaporación.

### PROCESO DE INMUNODETECCIÓN

Si no se indican cantidades, siempre es cubrir.

1. Lavar con PBS Gly, 2 x 5 minutos
2. Permeabilización entre 7 y 19 minutos a temperatura ambiente (TA)
3. Lavado con PBS GLy 2x 5 minutos
4. Bloqueo con PBS GLy 20 minutos a TA
5. Incubación con anticuerpo primario (diluído en solución de incubación) entre 45 minutos y una hora a 37 °C en estufa con control de humedad o en cámara húmeda.

Anti Osterix → 1:250 (500 µL de incubadora + 2 µl de anti Ox)

6. Poner 40 µl / vidrio x 12 = 480 µL. se cubre la tapa de la placa con parafilm. Se pone una gota de la solución de incubación y el cristal boca abajo. Se pone papel mojado alrededor. Tapa y al horno.
7. Lavado con PBS Gly 2 x 5 minutos
8. Incubación con anticuerpo secundario (diluido en la solución de incubación) entre 45 minutos y una hora a 37 °C en estufa con control de humedad o en cámara húmeda. A partir de este momento las muestras se deben proteger de la luz para evitar la pérdida de fluorescencia de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos secundarios.

Goat anti-rabir → 1:400 + Hoerscht 1:1000 en solución de bloqueo o de incubación

9. Lavado con PBS 10 mM 2 x 5 minutos

10. Montaje sobre portaobjetos con un medio específico para inmunofluorescencia. Poner una gota de fluoromunt en un portaobjetos y el vidrio boca abajo. Dejar tapado y en la nevera hasta el día siguiente.



# REFERENCIAS

- [1] "WHO | The top 10 causes of death," OMS, 2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. [Accessed: 12-Dec-2013].
- [2] L. A. M. S. y E. M. Sierra, *Biología 1*, Primera. Mexico, 2011.
- [3] T. M. Devlin, *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones medicas*, 4ª Edicion. Barcelona, 2004.
- [4] J. M. Valpuesta, *A la búsqueda del secreto de la vida*, Primera. Barcelona, 2012.
- [5] L. A. Loeb, J.-S. Hoffmann, and C. Cazaux, "Aberrant expression of alternative DNA polymerases: A source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 312–319, 2010.
- [6] C. A. I. John L. Ingraham, *Introduccion a la microbiología*. 1998.
- [7] CSIC - Delegacion de Cataluña, "Quizás el ser vivo mas conocido." [Online]. Available: <http://seresmodelicos.csic.es/bacteri.html>. [Accessed: 09-Dec-2013].
- [8] Q. Li, C. Kang, and C. Zhang, "Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 873–877, 2005.
- [9] T. Matsuo, F. Nakajima, N. Kamiko, and K. Yamamoto, "Organic wastewater treatment without greenhouse gas emission by photosynthetic bacteria," *Water Sci. Technol.*, vol. 35, no. 8, pp. 285–291, 1997.
- [10] L. Snyder and W. Champness, *Molecular Genetics of Bacteria*, Third Edit. 2007.
- [11] N. Iwabe, K. Kuma, M. Hasegawa, S. Osawa, and T. Miyata, "Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 23, pp. 9355–9359, Dec. 1989.
- [12] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis, "Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, no. June, pp. 4576–4579, 1990.
- [13] F. D. Ciccarelli, T. Doerks, C. von Mering, C. J. Creevey, B. Snel, and P. Bork, "Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life.," *Science*, vol. 311, no. 5765, pp. 1283–7, Mar. 2006.
- [14] S. Aldridge, *El hilo de la vida*, First. 1999, p. 224.

- [15] J. Cairns, G. S. Stent, and J. D. Watson, *Phage and the Origins of Molecular Biology*. 2007, p. 394.
- [16] NIH, "Biodefense Image Library, NIAID, NIH." [Online]. Available: [http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image\\_library.aspx](http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image_library.aspx). [Accessed: 09-Dec-2013].
- [17] N. Jacques and N. Ngo, "Escherichia coli - MicrobeWiki," *European Journal of Biochemistry*, 2004. [Online]. Available: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia\\_coli](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia_coli).
- [18] F. C. Neidhardt, R. C. III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, B. Low, and B. Magasanik, *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 1996, p. 2898.
- [19] J. Domka, J. Lee, T. Bansal, and T. K. Wood, "Temporal gene-expression in Escherichia coli K-12 biofilms.," *Environ. Microbiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 332–46, Feb. 2007.
- [20] E.Coli Genome Project, "Strain Information of E. coli K12 MG1655," *University of Wisconsin*. [Online]. Available: <http://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm>.
- [21] R. H. W. Funk, T. Monsees, and N. Ozkucur, "Electromagnetic effects - From cell biology to medicine.," *Prog. Histochem. Cytochem.*, vol. 43, no. 4, pp. 177–264, Jan. 2009.
- [22] C. D. McCaig, A. M. Rajnicek, B. Song, and M. Zhao, "Controlling cell behavior electrically: current views and future potential.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 3, pp. 943–78, Jul. 2005.
- [23] K. R. Robinson, "The responses of cells to electrical fields: a review.," *J. Cell Biol.*, vol. 101, no. 6, pp. 2023–7, Dec. 1985.
- [24] F. S. Barnes and A. B. Physics, "Advances in Magnetics Mechanisms for Electric and Magnetic Fields Effects on Biological Cells," vol. 41, no. 11, pp. 4219–4224, 2005.
- [25] H. Arkin, L. X. Xu, and K. R. Holmes, "Recent developments in modeling heat transfer in blood perfused tissues.," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 41, no. 2, pp. 97–107, Feb. 1994.
- [26] W. Chen and W. Wu, "Electric field-induced changes in membrane proteins charge movement currents.," *Burns*, vol. 32, no. 7, pp. 833–41, Nov. 2006.
- [27] Y. Kang, "on-chip separation and detection of biological particles using dielectrophoresis and resistive pulse sensing," Vanderbilt University, 2008.
- [28] S. P. Desai and J. Voldman, "measuring the impact of dielectrophoresis on cell physiology using a high-content screening platform," pp. 1308–1310, 2008.
- [29] S. P. Desai and J. Voldman, "Cell-based sensors for quantifying the physiological impact of microsystems.," *Integr. Biol. (Camb)*, vol. 3, no. 1, pp. 48–56, Jan. 2011.

- [30] IEEE Standards, *IEEE Recommended Practice for Measurements and Computations of Radio Frequency Electromagnetic Fields With Respect to Human Exposure to Such Fields*, 100 kHz – 300 GHz, vol. 2002. 2008.
- [31] M. Cifra, J. Z. Fields, and A. Farhadi, "Electromagnetic cellular interactions.," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 105, no. 3, pp. 223–46, May 2011.
- [32] C. D. McCaig, B. Song, and A. M. Rajnicek, "Electrical dimensions in cell science.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 23, pp. 4267–76, Dec. 2009.
- [33] K. U. and P. G. V. Gowrisree, "Electrical Field Modelling of E. coli Bacteria," *Asian J. Biochem.*, vol. 2, no. 3, pp. 198–207, 2007.
- [34] F. Bezanilla, "How membrane proteins sense voltage.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 323–32, Apr. 2008.
- [35] R. Pethig, "Review article-dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications.," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, Jan. 2010.
- [36] J. Malmivuo and R. Plonsey, *Bioelectromagnetism*. 1993.
- [37] T. Kotnik and D. Miklavcic, "Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields.," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 2, pp. 480–91, Jan. 2006.
- [38] S.-A. Zhou and M. Uesaka, "Bioelectrodynamics in living organisms," *Int. J. Eng. Sci.*, vol. 44, no. 1–2, pp. 67–92, Jan. 2006.
- [39] M. J. Allen, S. F. Cleary, A. E. Sowers, and D. D. Shillady, Eds., *Charge and Field Effects in Biosystems—3*. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 1992.
- [40] J. C. Murphy, D. A. Kaden, J. Warren, and A. Sivak, "Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology," *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, vol. 296, no. 3, pp. 221–240, 1993.
- [41] A. Chionna, M. Dwikat, E. Panzarini, B. Tenuzzo, E. C. Carlà, T. Verri, P. Pagliara, L. Abbro, and L. Dini, "Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure.," *Eur. J. Histochem.*, vol. 47, no. 4, pp. 299–308, Jan. 2003.
- [42] C. L. M. Bauréus Koch, M. Sommarin, B. R. R. Persson, L. G. Salford, and J. L. Eberhardt, "Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes.," *Bioelectromagnetics*, vol. 24, no. 6, pp. 395–402, Sep. 2003.
- [43] S. P. Hendee, F. A. Faour, D. A. Christensen, B. Patrick, C. H. Durney, and D. K. Blumenthal, "The effects of weak extremely low frequency magnetic fields on calcium/calmodulin interactions.," *Biophys. J.*, vol. 70, no. 6, pp. 2915–23, Jun. 1996.
- [44] G. Colacicco and A. A. Pilla, "Transduction of electromagnetic signals into biological effects," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 12, no. 3, pp. 259–265, 1984.

- [45] B. R. McLeod, A. R. Liboff, and S. D. Smith, "Electromagnetic gating in ion channels," *J. Theor. Biol.*, vol. 158, no. 1, pp. 15–31, 1992.
- [46] L. F. Jaffe, "Electrophoresis along cell membranes," *Nature*, vol. 265, no. 5595, pp. 600–602, Feb. 1977.
- [47] M. Poo, "In situ electrophoresis of membrane components.," *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 10, pp. 245–76, Jan. 1981.
- [48] T. R. Gowrishankar and J. C. Weaver, "An approach to electrical modeling of single and multiple cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 6, pp. 3203–8, Mar. 2003.
- [49] V. Vajrala, J. R. Claycomb, H. Sanabria, and J. H. Miller, "Effects of oscillatory electric fields on internal membranes: an analytical model.," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 6, pp. 2043–52, Mar. 2008.
- [50] D. Nawarathna, J. R. Claycomb, J. H. Miller, and M. J. Benedik, "Nonlinear dielectric spectroscopy of live cells using superconducting quantum interference devices," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 86, no. 2, p. 023902, Jan. 2005.
- [51] I. M. Kalinina, V. Krstić, and I. M. Tolić-Nørrelykke, "Cell polarity: which way to grow in an electric field?," *Curr. Biol.*, vol. 20, no. 8, pp. R355–6, Apr. 2010.
- [52] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research.," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 177, no. 4, pp. 437–47, Apr. 2003.
- [53] J. C. Weaver, "Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 10, no. 5, pp. 754–768, Oct. 2003.
- [54] Z. Wang, "Electromagnetic Field Interaction with Biological Tissues and Cells," University of London, 2009.
- [55] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, and J. A. Evans, "Membrane electroporation theories: a review.," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 44, no. 1–2, pp. 5–14, Mar. 2006.
- [56] T. D. Xie and T. Y. Tsong, "Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. II. Transfection by low-amplitude, low-frequency alternating electric fields.," *Biophys. J.*, vol. 58, no. 4, pp. 897–903, Oct. 1990.
- [57] B. Nikolova, M. Georgieva, D. Savu, I. Tsoneva, and N. Engineering, "CELL MEMBRANE ALTERATION BY WEAK ALTERNATING," vol. 64, no. 4, pp. 1046–1052, 2012.
- [58] K. M. Tyner, R. Kopelman, and M. A. Philbert, "'Nanosized voltmeter' enables cellular-wide electric field mapping.," *Biophys. J.*, vol. 93, no. 4, pp. 1163–74, Aug. 2007.
- [59] A. Foletti, A. Lisi, M. Ledda, F. de Carlo, and S. Grimaldi, "Cellular ELF signals as a possible tool in informative medicine.," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 28, no. 1, pp. 71–9, Jan. 2009.

- [60] A. Lisi, A. Foletti, M. Ledda, E. Rosola, L. Giuliani, E. D'Emilia, and S. Grimaldi, "Extremely low frequency 7 Hz 100 microT electromagnetic radiation promotes differentiation in the human epithelial cell line HaCaT.," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 25, no. 4, pp. 269–80, Jan. 2006.
- [61] S. M. Ross, "Combined DC and ELF magnetic fields can alter cell proliferation.," *Bioelectromagnetics*, vol. 11, no. 1, pp. 27–36, Jan. 1990.
- [62] L. O. Santos, R. M. Alegre, C. Garcia-Diego, and J. Cuellar, "Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 8, pp. 1362–1367, 2010.
- [63] L. Fojt, P. Klapetek, L. Strasák, and V. Vetterl, "50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria.," *Micron*, vol. 40, no. 8, pp. 918–22, Dec. 2009.
- [64] M. Giladi, Y. Porat, A. Blatt, Y. Wasserman, E. D. Kirson, E. Dekel, and Y. Palti, "Microbial growth inhibition by alternating electric fields.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 10, pp. 3517–22, Oct. 2008.
- [65] F. Tian, T. Nakahara, M. Yoshida, N. Honda, H. Hirose, and J. Miyakoshi, "Exposure to power frequency magnetic fields suppresses X-ray-induced apoptosis transiently in Ku80-deficient xrs5 cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 292, no. 2, pp. 355–61, Mar. 2002.
- [66] S. Tofani, D. Barone, M. Cintorino, M. M. de Santi, A. Ferrara, R. Orlassino, P. Ossola, F. Peroglio, K. Rolfo, and F. Ronchetto, "Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis.," *Bioelectromagnetics*, vol. 22, no. 6, pp. 419–28, Sep. 2001.
- [67] R. Goodman, C. A. L. Bassett, and A. S. Henderson, "Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription," *Science (80-. )*, vol. 220, no. 4603, pp. 1283–1285, 1983.
- [68] R. Goodman and M. Blank, "Insights into electromagnetic interaction mechanisms.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 192, no. 1, pp. 16–22, Jul. 2002.
- [69] W. J. Sun, H. Chiang, Y. T. Fu, Y. N. Yu, H. Y. Xie, and D. Q. Lu, "exposure to 50 hz electromagnetic fields induces the phosphorylation and activity of stress-activated protein kinase in cultured cells," Jul. 2009.
- [70] M. Milani, M. Ballerini, L. Ferraro, M. Zabeo, M. Barberis, M. Cannone, and M. Faleri, "magnetic field effects on human lymphocytes," Mar. 2001.
- [71] A. Jandová, J. Hurych, J. Pokorný, A. Čoček, S. Trojan, M. Nedbalová, and A. Dohnalová, "effects of sinusoidal magnetic field on adherence inhibition of leukocytes," Jul. 2009.
- [72] A. Popp, "Recent Advances in Biophoton Research and its Applications." Technology Center Kaiserslautern International Institute of Biophysics Germany, World Scientific, 1992.
- [73] M. Konishi, M. Cifra, J. Z. Fields, and A. Farhadi, "Electromagnetic cellular interactions," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 105, no. 3, pp. 223–246, 2011.

- [74] M. Cifra, "Study of electromagnetic oscillations of yeast cells in kHz and GHz region," Czech Technical University in Prague, 2009.
- [75] H. Fröhlich, "Evidence for coherent excitation in biological systems," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 1589–1595, Apr. 1983.
- [76] , and V. Trkal, "Electric field around microtubules," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 45, no. 2, pp. 239–245, 1998.
- [77] H. Frohlich, "Coherent Electric 'Vibrations in Biological Systems and," 1978.
- [78] J. Pokorný, J. Hasek, J. Vanis, and F. Jelínek, "Biophysical aspects of cancer--electromagnetic mechanism.," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 46, no. 5, pp. 310–21, May 2008.
- [79] M. V. Satarić, J. Pokorny, J. Fiala, R. B. Zakula, and S. Zeković, "Microtubules in interactions with endogenous d.c. and a.c. fields in living cells," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 41, no. 1, pp. 53–58, 1996.
- [80] D. Havelka, M. Cifra, O. Kučera, J. Pokorný, and J. Vrba, "High-frequency electric field and radiation characteristics of cellular microtubule network," *J. Theor. Biol.*, vol. 286, pp. 31–40, 2011.
- [81] J. Pokorný, J. Hašek, F. Jelínek, J. Šaroch, and B. Palán, "electromagnetic activity of yeast cells in the m phase," Jul. 2009.
- [82] H. A. Pohl, "Electrical oscillation and contact inhibition of reproduction in cells," *J. Biol. Phys.*, vol. 9, no. 4, pp. 191–200, Dec. 1981.
- [83] H. A. Pohl, *Natural alternating fields associated with living cells*, vol. 11. pp. 367–368.
- [84] H. A. Pohl, *Natural cellular electrical resonances*, vol. 9. pp. 399–407.
- [85] H. A. Pohl, "Oscillating fields about growing cells," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 18, no. S7, pp. 411–431, Jun. 2009.
- [86] D. Fels, "Cellular communication through light.," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, p. e5086, Jan. 2009.
- [87] J.-J. Chang, "Physical properties of biophotons and their biological functions.," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 46, no. 5, pp. 371–7, May 2008.
- [88] G. Reguera, "When microbial conversations get physical.," *Trends Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 105–13, Mar. 2011.
- [89] Y. Chisti, "Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity.," *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 2, pp. 89–93, Feb. 2003.
- [90] P. Ellappan and R. Sundararajan, "A simulation study of the electrical model of a biological cell," *J. Electrostat.*, vol. 63, no. 3, pp. 297–307, 2005.
- [91] F. D. Saraví, "Modelo eléctrico de la membrana y fenómenos electrotónicos," 2011. [Online]. Available: <http://medunc.blogspot.com.es/2011/07>.

- [92] H. Fricke, "A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems ii. The Capacity of a Suspension of Conducting Spheroids Surrounded by a Non-Conducting Membrane for a Current of Low Frequency," *Phys. Rev.*, vol. 26, no. 5, pp. 678–681, Nov. 1925.
- [93] J. Voldman, "A microfabricated dielectrophoretic trapping array for cell-based biological assays by," University of Massachusetts at Amherst, 2001.
- [94] A. Sanchis Otero, "Aplicación de la dielectroforesis a la caracterización dieléctrica de células," Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 2008.
- [95] K. Asami, T. Hanai, and N. Koizumi, "Dielectric analysis of Escherichia coli suspensions in the light of the theory of interfacial polarization.," *Biophys. J.*, vol. 31, no. 2, pp. 215–28, Aug. 1980.
- [96] D. Wachner, M. Simeonova, and J. Gimsa, "Estimating the subcellular absorption of electric field energy: equations for an ellipsoidal single shell model.," *Bioelectrochemistry*, vol. 56, no. 1–2, pp. 211–3, May 2002.
- [97] A. Sanchis, A. P. Brown, M. Sancho, G. Martínez, J. L. Sebastián, S. Muñoz, and J. M. Miranda, "Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis.," *Bioelectromagnetics*, vol. 28, no. 5, pp. 393–401, Jul. 2007.
- [98] M. Castellarnau, "Development of microdevices for cell handling and characterization . Applications to the study of electrical properties of cells," Universidad de Barcelona, 2008.
- [99] B. Srinivasan, S. Tung, Y. Li, and M. Varshney, "Simulation of an Electrical Impedance Based Microfluidic Biosensor for Detection of E . coli cells," *Proc. COMSOL Users Conf. 2006 Bost.*, 2006.
- [100] G. P. Drago and S. Ridella, "Evaluation of electrical fields inside a biological structure.," *Br. J. Cancer. Suppl.*, vol. 5, pp. 215–9, Mar. 1982.
- [101] H. P. Schwan, "Field interaction with biological matter.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 303, pp. 198–216, Dec. 1977.
- [102] D. Mietchen, T. Schnelle, T. Müller, R. Hagedorn, and G. Fuhr, "Automated dielectric single cell spectroscopy - temperature dependence of electrorotation," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 35, no. 11, pp. 1258–1270, Jun. 2002.
- [103] J. Suehiro, R. Hamada, D. Noutomi, M. Shutou, and M. Hara, "Selective detection of viable bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method," *J. Electrostat.*, vol. 57, no. 2, pp. 157–168, 2003.
- [104] C. Zhang, K. Khoshmanesh, A. Mitchell, and K. Kalantar-Zadeh, "Dielectrophoresis for manipulation of micro/nano particles in microfluidic systems.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, no. 1, pp. 401–20, Jan. 2010.
- [105] T. Muller, A. Pfennig, P. Klein, G. Gradl, M. Jager, and T. Schnelle, "The potential of dielectrophoresis for single-cell experiments," *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, vol. 22, no. 6, pp. 51–61, Nov. 2003.

- [106] J. Voldman, M. Toner, M. L. Gray, and M. A. Schmidt, "Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps," *J. Electrostat.*, vol. 57, no. 1, pp. 69–90, 2003.
- [107] J. Nilsson, M. Evander, B. Hammarström, and T. Laurell, "Review of cell and particle trapping in microfluidic systems," *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 2, pp. 141–157, 2009.
- [108] E. B. Cummings and A. K. Singh, "Dielectrophoresis in microchips containing arrays of insulating posts: theoretical and experimental results.," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 18, pp. 4724–31, Sep. 2003.
- [109] B. H. Lapizco-Encinas and M. Rito-Palomares, "Dielectrophoresis for the manipulation of nanobiotparticles.," *Electrophoresis*, vol. 28, no. 24, pp. 4521–38, Dec. 2007.
- [110] F. F. Becker, X. B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, and P. R. Gascoyne, "Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 3, pp. 860–4, Jan. 1995.
- [111] A. Docoslis, N. Kalogerakis, L. A. Behie, and K. V Kaler, "A novel dielectrophoresis-based device for the selective retention of viable cells in cell culture media.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 54, no. 3, pp. 239–50, May 1997.
- [112] G. H. Markx, M. S. Talary, and R. Pethig, "Separation of viable and non-viable yeast using dielectrophoresis," *J. Biotechnol.*, vol. 32, no. 1, pp. 29–37, 1994.
- [113] S. K. Srivastava, P. R. Daggolu, S. C. Burgess, and A. R. Minerick, "Dielectrophoretic characterization of erythrocytes: positive ABO blood types.," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 24, pp. 5033–46, Dec. 2008.
- [114] M. S. Pommer, Y. Zhang, N. Keerthi, D. Chen, J. A. Thomson, C. D. Meinhart, and H. T. Soh, "Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels.," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 6, pp. 1213–8, Mar. 2008.
- [115] J. Wu and M. Gu, "Microfluidic sensing: state of the art fabrication and detection techniques.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 8, p. 080901, Aug. 2011.
- [116] H. Ahn, K. J. Lee, A. Shim, J. a Rogers, and R. G. Nuzzo, "Additive soft-lithographic patterning of submicrometer- and nanometer-scale large-area resists on electronic materials.," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 12, pp. 2533–7, Dec. 2005.
- [117] A. Castelo, "Diseño y Fabricacion de dispositivos híbridos planares para microóptica mediante irradiacion y ablacion láser de sustrato de vidrio," Universidad de Santiago de Compostela.
- [118] W. Childs, K. Lee, S. Mitrovski, L. Elliott, and J. Rogers, "An Overview of Soft-Lithographies for Materials Patterning and Device Fabrication." University of Illinois at Urbana-Champaign.
- [119] Y. Lin, "Modeling of dielectrophoresis in micro and nano systems by," Stockholm, Sweden, 2008.

- [120] W. Ji, H. Huang, A. Deng, and C. Pan, "Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*," *Micron*, vol. 40, no. 8, pp. 894–898, 2009.
- [121] W. Zhao, R. Yang, H. Q. Zhang, W. Zhang, X. Hua, and Y. Tang, "Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques," *Food Control*, vol. 22, no. 3–4, pp. 566–573, Mar. 2011.
- [122] A. Rivas, M. C. Pina-Pérez, S. Rodríguez-Vargas, M. Zuñiga, A. Martínez, and D. Rodrigo, "Sublethally damaged cells of *Escherichia coli* by Pulsed Electric Fields: The chance of transformation and proteomic assays," *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 1, pp. 1120–1127, 2013.
- [123] A. K. Mahapatra, D. L. Harris, C. N. Nguyen, and G. Kannan, "Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on beef surfaces using low-voltage direct electric current and the impact on sensory properties," *J. Electrostat.*, vol. 69, no. 1, pp. 30–35, 2011.
- [124] L. F. Machado, R. N. Pereira, R. C. Martins, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, "Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature," *J. Food Eng.*, vol. 96, no. 4, pp. 520–527, 2010.
- [125] K. Aronsson, U. Rönner, and E. Borch, "Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 19–32, Mar. 2005.
- [126] H. El Zakhem, J.-L. Lanoisellé, N. I. Lebovka, M. Nonus, and E. Vorobiev, "Influence of temperature and surfactant on *Escherichia coli* inactivation in aqueous suspensions treated by moderate pulsed electric fields," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 120, no. 3, pp. 259–265, 2007.
- [127] L. Loghavi, S. K. Sastry, and A. E. Yousef, "Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 1, pp. 148–53.
- [128] T. Abee and J. a Wouters, "Microbial stress response in minimal processing," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 50, no. 1–2, pp. 65–91, Sep. 1999.
- [129] C. for F. S. and A. N. FDA, "Safe Practices for Food Processes - Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies." Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- [130] K. Aronsson, E. Borch, B. Stenlöf, and U. Rönner, "Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 93, no. 1, pp. 1–10, May 2004.
- [131] E. L. Carstensen, H. A. Cox, W. B. Mercer, and L. A. Natale, "Passive Electrical Properties of Microorganisms: I. Conductivity of *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*," *Biophys. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 289–300, May 1965.

- [132] D. García, N. Gómez, P. Mañas, J. Raso, and R. Pagán, "Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 113, no. 2, pp. 219–27, Jan. 2007.
- [133] L. Yang, H. Li, K. Wang, W. Tan, W. Yang, and J. Zheng, "Atomic force microscopy study of the effect of pulsed electric field on *Staphylococcus epidermidis*," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 16, pp. 6222–7, Aug. 2008.
- [134] J. M. Kralj, D. R. Hochbaum, A. D. Douglass, and A. E. Cohen, "Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein.," *Science*, vol. 333, no. 6040, pp. 345–8, Jul. 2011.
- [135] T. Y. Tsong, "On electroporation of cell membranes and some related phenomena," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 299, no. 3, pp. 271–295, 1990.
- [136] S. Shim, S. H. Hong, Y. Tak, and J. Yoon, "Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by electric currents.," *Biofouling*, vol. 27, no. 2, pp. 217–24, Mar. 2011.
- [137] Z. Gitai, "The New Bacterial Cell Biology: Moving Parts and Subcellular Architecture," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 577–586, 2005.
- [138] A. Fanous, A. Görg, and H. Parlar, "Proteomic study on the cellular responses to non-thermal low electric field in *Saccharomyces cerevisiae*," *Parlar Sci. Publ.*, no. 0, pp. 1–15, 2011.
- [139] S. S. Donato, V. Chu, D. M. F. Prazeres, and J. P. Conde, "Metabolic viability of *Escherichia coli* trapped by dielectrophoresis in microfluidics.," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 4, pp. 575–82, Feb. 2013.
- [140] S. Guillou and N. El Murr, "Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in solution by low-amperage electric treatment," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92, no. 5, pp. 860–865, May 2002.
- [141] B. C. Brambach, A. Michels, J. Franzke, and R. Kettler, "Current density and conductivity dependent electroporation of *Escherichia coli* C600," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 111, no. 1, pp. 46–54, 2013.
- [142] H. Vega-Mercado, O. Martín-Belloso, F.-J. Chang, G. V. Barbosa-Canovas, And B. G. Swanson, "Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 20, no. 6, pp. 501–510, Dec. 1996.
- [143] A. D. Rosen, "Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na<sup>+</sup> channels in GH3 cells.," *Bioelectromagnetics*, vol. 24, no. 7, pp. 517–23, Oct. 2003.
- [144] J. Korolczuk, J. Rippoll Mc Keag, J. Carballeira Fernandez, F. Baron, N. Grosset, and R. Jeantet, "Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation," *J. Food Eng.*, vol. 75, no. 1, pp. 11–20, Jul. 2006.

- [145] I. Álvarez, J. Raso, A. Palop, and F. J. Sala, "Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 55, no. 1, pp. 143–146, 2000.
- [146] A. Pareilleux and N. Sicard, "Lethal effects of electric current on *Escherichia coli*," *Appl. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 421–4, Mar. 1970.
- [147] C. D. La Rosa and K. V. I. S. Kaler, "Electro-Disruption of *Escherichia Coli* Bacterial Cells on a Microfabricated Chip," pp. 4096–4099, 2006.
- [148] L. R. S. Tonuci, C. F. P. R. Paschoalatto, and R. Pisani, "Microwave inactivation of *Escherichia coli* in healthcare waste.," *Waste Manag.*, vol. 28, no. 5, pp. 840–8, Jan. 2008.
- [149] S. Chandler, "The Effect of Temperature on Cell Membranes | eHow." [Online]. Available: [http://www.ehow.com/about\\_5516866\\_effect-temperature-cell-membranes.html](http://www.ehow.com/about_5516866_effect-temperature-cell-membranes.html). [Accessed: 09-Sep-2012].
- [150] H. A. Pohl, "The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields," *J. Appl. Phys.*, vol. 22, no. 7, p. 869, Apr. 1951.
- [151] R. Pethig and G. H. Markx, "Applications of dielectrophoresis in biotechnology," vol. 15, no. October, pp. 426–432, 1997.
- [152] Y. Demircan, E. Özgür, and H. Kùlah, "Dielectrophoresis: applications and future outlook in point of care.," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 7, pp. 1008–27, Apr. 2013.
- [153] J. Oblak, D. Krizaj, S. Amon, A. Macek-Lebar, and D. Miklavcic, "Feasibility study for cell electroporation detection and separation by means of dielectrophoresis.," *Bioelectrochemistry*, vol. 71, no. 2, pp. 164–71, Nov. 2007.
- [154] J. Casado Vela, "Aproximación proteómica al estudio de podredumbre apical," *Universidad de Alicante*. [Online]. Available: [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9919/6/Casado Vela, Juan\\_5.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9919/6/Casado_Vela_Juan_5.pdf). [Accessed: 18-Feb-2014].
- [155] A. Ulsamer, "regulació d'Osterix, un gen clau per a la diferenciació osteoblàstica induïda per BMP-2," Universitat de Barcelona, 2009.
- [156] J. (Melbourne U. Ryall, "Working with the C2C12 cell line | Research in Myogenesis." [Online]. Available: <http://jgryall.wordpress.com/muscle-methods/working-with-the-c2c12-cell-line/>. [Accessed: 19-Feb-2014].
- [157] R. O. Becker and G. Selden, *The body electric*. New York: Harper Science, 1985.
- [158] T. Valone, *Bioelectromagnetic Healing - A rationale for its Use*, 9th ed. Beltsville: Integrity Research Institute, 2003, p. 130.
- [159] H.-Y. Lin and Y.-J. Lin, "In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment.," *Bioelectromagnetics*, vol. 32, no. 7, pp. 552–60, Oct. 2011.

- [160] B. Noriega-Luna, M. Sabanero, M. Sosa, and M. Avila-Rodriguez, "Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth.," *Micron*, vol. 42, no. 6, pp. 600–7, Aug. 2011.
- [161] T. Bodamyali, B. Bhatt, F. J. Hughes, V. R. Winrow, J. M. Kanczler, B. Simon, J. Abbott, D. R. Blake, and C. R. Stevens, "Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 250, no. 2, pp. 458–61, Sep. 1998.
- [162] K. Li, Y. Hui, S. Ma, G. Ding, Y. Guo, J. Liu, Y. Li, and G. Guo, "Inhibition of Bone Formation by High Intensity Pulsed Electromagnetic Field in Mc3t3-E1 Cells," *Prog. Electromagn. Res.*, vol. 112, pp. 139–153, 2011.
- [163] J. Zhou, L.-G. Ming, B.-F. Ge, J.-Q. Wang, R.-Q. Zhu, Z. Wei, H.-P. Ma, C. J. Xian, and K.-M. Chen, "Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts.," *Bone*, vol. 49, no. 4, pp. 753–61, Oct. 2011.
- [164] P. Diniz, K. Soejima, and G. Ito, "Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation.," *Nitric Oxide*, vol. 7, no. 1, pp. 18–23, Aug. 2002.
- [165] Y. Yang, C. Tao, D. Zhao, F. Li, W. Zhao, and H. Wu, "EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes.," *Bioelectromagnetics*, vol. 31, no. 4, pp. 277–85, May 2010.
- [166] M. Hronik-Tupaj, W. L. Rice, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, "Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields.," *Biomed. Eng. Online*, vol. 10, no. 1, p. 9, Jan. 2011.
- [167] G. Cheng, Y. Zhai, K. Chen, J. Zhou, G. Han, R. Zhu, L. Ming, P. Song, and J. Wang, "Sinusoidal electromagnetic field stimulates rat osteoblast differentiation and maturation via activation of NO-cGMP-PKG pathway.," *Nitric Oxide*, vol. 25, no. 3, pp. 316–25, Oct. 2011.
- [168] W. Wu, H. Zhao, B. Xie, H. Liu, Y. Chen, G. Jiao, and H. Wang, "Implanted spike wave electric stimulation promotes survival of the bone marrow mesenchymal stem cells and functional recovery in the spinal cord injured rats.," *Neurosci. Lett.*, vol. 491, no. 1, pp. 73–8, Mar. 2011.
- [169] A. R. Liboff, "Toward an electromagnetic paradigm for biology and medicine.," *J. Altern. Complement. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 41–7, Feb. 2004.
- [170] Salod, "Biologia." [Online]. Available: <http://biologiasalod.blogspot.com.es/>. [Accessed: 13-Jan-2014].

