

Electroporación como Método para Fusionar Células de Ovario de Hámster Chino y Vesículas Poliméricas Unilamelares Gigantes

L. Delgado Rojo ¹, T. Batista Napotnik ², D. Miklavčič ³

¹ Ingeniería Biomédica, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España {laauradelgado@gmail.com} laura.delgado.rojo@alumnos.upm.es

^{2,3} Laboratorio de Biocibernética, Escuela de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Ljubljana, Ljubljana, Eslovenia, tina.batistanapotnik@fe.uni-lj.si, damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si

Resumen

Los procesos de fusión en sistemas biológicos suceden de forma específica y están facilitados por proteínas. Sin embargo, mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje sobre estructuras membranosas, fenómeno conocido como electroporación, es posible inducir la fusión no específica entre moléculas. Para ello se requieren dos condiciones: primera, un contacto adyacente que posibilite la interacción entre membranas; y segunda, la consecución del estado fusogénico. Éste estado, en el que las membranas están electroporadas tras la aplicación de los pulsos eléctricos, se ajusta de forma específica para cada tipo de molécula a fusionar, ya sea de naturaleza biológica o artificial, variando los parámetros amplitud, duración, número y frecuencia de los pulsos.

Con este estudio, tratamos de explicar el mecanismo de electrofusión entre células de ovario de hámster chino (CHO) y vesículas poliméricas unilamelares gigantes, o polimerosomas, que en un futuro estarán funcionalizadas con proteínas de membrana. Este procedimiento permitirá la inserción de receptores de membrana, sintetizados in vitro, directamente en la bicapa celular.

Finalmente, concluimos que los ratios de fusión y viabilidad obtenidos entre células CHO son significativos y comparables con los de la línea celular B-16, donde se utilizaron parámetros eléctricos más bajos. Así, la línea celular CHO es más adecuada para la fusión con polimerosomas, los cuales requieren elevados parámetros eléctricos debido a la rigidez de su membrana. También se propone estudiar otros métodos para mejorar el contacto entre células y polimerosomas, y un procedimiento sistemático que permita la adecuada identificación de los híbridos.

1. Introducción

La electroporación es el fenómeno que ocurre en la membrana celular tras la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje [1]. Debido a las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica, la célula puede considerarse una esfera aislante rodeada por un electrolito, y por tanto, la aplicación externa de pulsos eléctricos provoca un aumento transitorio en su potencial de reposo (ver *Ec.1*) [2].

$$V_{ind}(t) = fER \cos\theta \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad Ec. 1$$

con V_{ind} potencial inducido en una célula esférica, f factor adimensional función de las propiedades eléctricas y

geométricas de la célula y el medio, E intensidad de campo eléctrico homogéneo, R radio celular, θ ángulo entre el vector normal a la membrana y la dirección del campo eléctrico, y τ constante de tiempo de la membrana ($f = 1.5$ y $\tau = 0.5 \mu s$ en condiciones fisiológicas).

Cuando el potencial de membrana total, resultado de la superposición de la componente externa inducida a la componente basal, excede un valor umbral, la membrana sufre una ruptura eléctrica, lo que induce la formación de pequeños poros acuosos hidrofílicos en la bicapa [2]. Así, su conductividad aumenta de forma transitoria, y moléculas naturalmente impermeables pueden atravesar la membrana e introducirse en el citoplasma celular. Este mecanismo se utiliza para la inserción de fármacos quimioterapéuticos, proteínas, oligonucleóticos o ADN [1,2].

Adicionalmente, si entre células en estado electroporado se establece contacto adyacente, sus membranas interaccionan de manera que se forma un poro de fusión, el cual evoluciona hacia un estado de fusión completa (ver *Figura 1*) [2,4]. El método más utilizado para inducir el contacto es la dielectroforesis, en el que mediante la aplicación externa de una señal alterna sinusoidal, las células se alinean en cadena en la dirección del campo aplicado, como resultado de interacciones dipolo-dipolo (ver *Figura 3c*) [5].

De este modo, la electrofusión posibilita la inserción de moléculas exógenas en la membrana celular, imitando el mecanismo natural de exocitosis [4,6]. Sin embargo, a diferencia de en éste, donde la fusión ocurre de forma específica facilitada por proteínas especializadas, en la electrofusión ocurre de forma no específica. Además, la electroporación se puede modular para cada tipo de molécula a fusionar mediante la variación de los parámetros eléctricos de los pulsos: amplitud, duración, número y frecuencia [7]. La amplitud y el número de pulsos son directamente proporcionales al aumento de la permeabilidad, i.e. electroporación [8]. Respecto a la duración, la fusión se ha conseguido exitosamente con magnitudes de mili-, micro- y nano-segundos, sin embargo, éstos últimos han reportado eliminar la dependencia de la electroporación con el tamaño celular, haciéndolos más adecuados (ver *Ec.1*) [9]. Y por último, las células son aparentemente más susceptibles a los

pulsos cuando se disminuye la frecuencia de repetición [2]. En última instancia, los parámetros han de elegirse de forma que se mantenga la viabilidad de las células, i.e. la electroporación sea reversible [10].

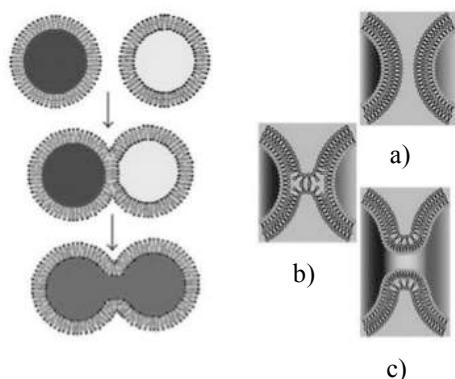


Figura 1. Izquierda: proceso de electrofusión en el que son necesarias dos condiciones: primera, las moléculas tienen que estar electroporadas o en 'estado fusogénico', y segunda, tienen que estar en contacto adyacente. Derecha: a) membranas electroporadas en contacto adyacente cuya interacción provoca b) un cuello de fusión que evoluciona a c) poro de fusión. [6]

Por tanto, la electroporación es una atractiva alternativa a la transfección génica. Hará posible la introducción de proteínas de membrana, sintetizadas *in vitro* artificialmente, directamente en la membrana celular, evitando la carga metabólica de la manipulación genética. Las proteínas de membrana son sensores (o receptores) y actuadores de las señales del entorno celular, y su ausencia o incorrecto funcionamiento están relacionados con la aparición de enfermedades como la diabetes, el Alzheimer o el Parkinson, y la proliferación de células cancerígenas o metástasis [10,11].

Mediante la electrofusión se han fusionado células entre sí, y células con vesículas lipídicas (o liposomas) [9,12]. Sin embargo, las plataformas sintéticas de naturaleza polimérica, o polimerosomas, plantean un amplio campo de estudio acerca de su utilización como vesículas transportadoras, ya que es posible tunear todos los parámetros que conforman sus propiedades mecánicas y eléctricas, y además es posible sintetizarlas con proteínas insertadas, sintetizadas *in vitro* [13].

2. Objetivos

En este trabajo proponemos la electroporación como método para fusionar células de ovario de hámster chino y vesículas poliméricas unilamelares gigantes, que potencialmente portarán proteínas de membrana.

En primer lugar, establecimos un protocolo eléctrico efectivo y reproducible con el que las células exhibieron una tasa de fusión significativa permaneciendo viables. Para ello, variamos los parámetros amplitud y número de los pulsos eléctricos. Además, estudiamos el efecto de la duración de la señal alterna aplicada, del método dielectroforesis, para inducir el contacto. De esta manera, sugeríamos que un incremento en el tiempo de contacto provocaría un aumento en la tasa de fusión. Por último, tras determinar las condiciones adecuadas de trabajo para las células, tratamos de fusionarlas con vesículas

poliméricas no funcionalizadas sintetizadas *in vitro*, i.e. polimerosomas, los cuales han reportado recientemente exitosa electroporación y no tener efectos tóxicos sobre las células [13].

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1 Células y Polimerosomas

Las células de ovario de Hámster chino CHO-K1 (*CHO*, del inglés *Chinese Hamster Ovary*) se cultivaron en medio F-12 HAM. En todos los experimentos, antes de la aplicación del protocolo eléctrico, las células se colocaron en buffer hipotónico, para provocar por ósmosis un incremento en su tamaño y mejorar el contacto entre ellas.

Los polimerosomas (PS) son vesículas unilamelares gigantes de naturaleza polimérica, sintetizados mediante electroformación en la Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida de Viena, Austria [13]. Están compuestos de copolímeros amfifílicos en bloque (poly(ethylene oxide)-b-poly(butadiene)), con 13 bloques hidrofílicos PEO y 22 bloques hidrofóbicos PBD (OB₁₃₋₂₂). Su medio interno tiene mayor conductividad que el medio hipotónico externo en el que se colocaron para la aplicación del protocolo eléctrico (con valores 925 y 131.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente). Con esta diferencia en conductividades se busca mejorar la alineación dielectroforética entre las vesículas.

3.1.2 Equipo Electrónico

El equipo electrónico para la aplicación del protocolo eléctrico está compuesto por dos bloques. El primero consta de un generador de nano-pulsos y un osciloscopio, para la aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje, que electroporarán las células. El segundo está compuesto por un generador de funciones y un osciloscopio, para crear el contacto entre células mediante la aplicación de la señal dielectroforética (una senoide de frecuencia 20 MHz y 10 V_{pp}). Ambos bloques están acoplados utilizando un relé, mediante un controlador de conmutación, accionado manualmente con un pulsador. Adicionalmente, la configuración está conectada a un microscopio invertido, cámara digital y ordenador, para la obtención de imágenes. En la platina del microscopio se coloca la cámara de fusión, contenedora de los electrodos de cables paralelos con 0.2 mm de separación, sobre la cual se coloca la solución a electroporar.

3.2. Métodos

3.2.1 Protocolo Eléctrico

El protocolo eléctrico consistió en aplicar a las muestras tres señales consecutivas por medio del equipo electrónico: i) señal sinusoidal para lograr el contacto entre moléculas, ii) nano-pulsos eléctricos de alto voltaje para electroporar las moléculas en contacto, iii) señal sinusoidal para mantener el contacto entre las moléculas electroporadas, y facilitar así la fusión.

Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos de idéntica manera. En el primero, las señales dielectroforéticas i y iii tuvieron duración 30 s; en el

segundo, 60 s. Cada experimento se repitió tres veces, en días separados.

Los parámetros de los pulsos fueron: frecuencia de repetición 100 KHz y duración 150 ns, ambos constantes en todos los experimentos. Para cada valor de número de pulsos: 10, 50 y 100, las amplitudes se variaron a 180, 240 y 340 V.

3.2.2 Microscopía y Presentación de Resultados: Ratio de Fusión y de Viabilidad

Los núcleos de las células se tiñeron al comienzo de los experimentos con marcador fluorescente Hoechst para evaluar la tasa de fusión, y diez minutos después del protocolo eléctrico con Ioduro de Propidio (IP) para evaluar la viabilidad. Las membranas de los PS están marcadas con Rodamina. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Visicam 1280 mediante un microscopio fluorescente de inversión Axiovert 200, y software MetaMorph 7.7.

Las imágenes fluorescentes y de contraste de fase se analizaron utilizando el software ImageJ. Los ratios de fusión (RF) y de viabilidad se cuantificaron en porcentaje de acuerdo a *Ec.2* y *Ec.3*, respectivamente.

$$RF = \frac{n^{\circ} \text{ de células polinucleadas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\text{Células viables} = 1 - \frac{n^{\circ} \text{ de células marcadas con IP}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \quad \text{Ec. 3}$$

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. Los asteriscos [*] muestran diferencias estadísticamente significativas con control 1, en el que no se aplicó el protocolo eléctrico. En control 2, sólo se aplicaron las señales dielectroforéticas.

4. Resultados

Fusión y viabilidad de células CHO

En primer lugar, buscamos los parámetros eléctricos de los pulsos que provocaran los mayores porcentajes de fusión entre células CHO. La fusión se calculó como se muestra en *Ec. 2*, 8 y 15 minutos después de la aplicación

de los pulsos, para dos duraciones de señal dielectroforética. Puesto que los tests estadísticos mostraron que no hay diferencias entre los resultados a 8 y 15 minutos, asumimos que la máxima fusión se obtiene a los 8 minutos. La viabilidad se cuantificó 15 minutos después. Los resultados se muestran en la *Figura 2*. Los máximos porcentajes de fusión fueron 8.4 ± 2.6 % (100 pulsos, 12 kV/cm, y 30 s DEP) y 8 ± 3.4 % (100 pulsos, 17 kV/cm, y 30 s DEP). La viabilidad en todos los casos fue superior al 96 %.

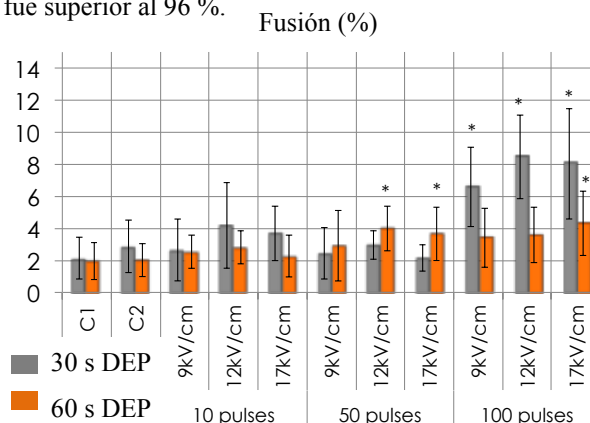


Figura 2. Porcentajes de fusión para dos duraciones de señal dielectroforética (DEP): 30 y 60 s, 8 minutos después de la aplicación del protocolo eléctrico para distintos valores de número de pulsos (10, 50 y 100), e intensidad de campo eléctrico (9, 12 y 17 kV/cm).

Fusión entre células CHO y PS

No observamos casos evidentes de fusión entre células CHO y PS, ya que con el microscopio de inversión no distinguimos si se trataban de híbridos, o si las especies estaban en distintos planos espaciales. Se utilizaron los parámetros eléctricos más elevados (100 pulsos y 17 kV/cm), con los que las células mostraron significativos ratios de fusión, y se mantuvieron viables. En la *Figura 3a* y *3b* se muestra un ejemplo de posible fusión entre una célula y un polimerosoma.

5. Discusión

a) Fusión y viabilidad de células CHO

Obtuvimos fusión entre células CHO, y los valores más

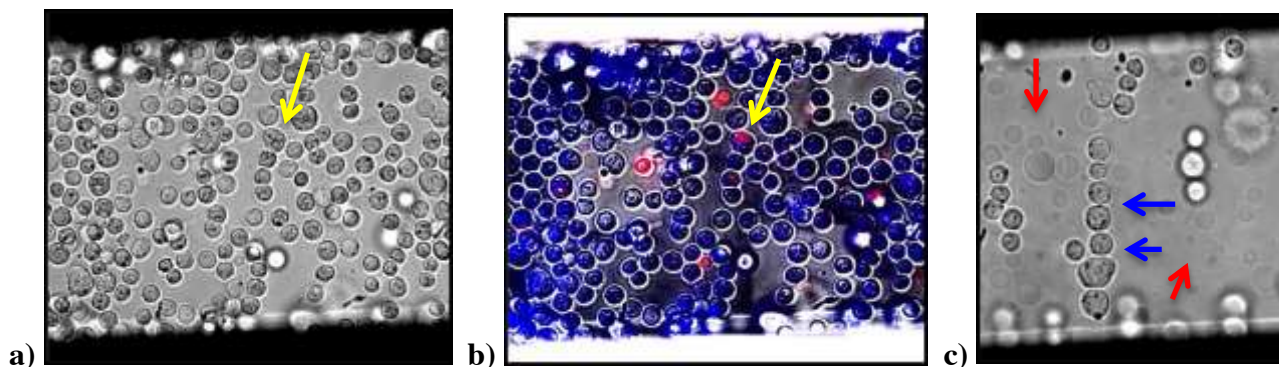


Figura 3. Imágenes de a) contraste de fase y b) fluorescencia, donde los núcleos de las células están marcados en azul con Hoechst, y las membranas de los PS en rojo con Rodamina. La flecha amarilla señala un posible caso de fusión donde hay ambas fluorescencias en una célula. c) Células y PS durante la aplicación de la señal dielectroforética, tras la cual las células se alinean en cadena pero los PS se mantienen dispersos. Las células tienen un contorno más oscuro y en ellas se distinguen los orgánulos internos (flechas azules). Los PS son más claros y traslúcidos (flechas rojas).

elevados resultaron con 100 pulsos (ver *Figura 2*). Para analizar correctamente los resultados hay que considerar el valor basal de polinucleación de las células, comparando los grupos experimentales con los controles. El máximo porcentaje fue $8.4 \pm 2.6 \%$, 8 minutos después de 100 pulsos, de 150 ns, con 12 kV/cm y 30 s DEP. Los resultados son comparables a los obtenidos entre células B-16, para las cuales el máximo porcentaje fue $8.7 \pm 1.5 \%$, 8 minutos después de 20 pulsos, de 100 ns, con 9 kV/cm y 30 s DEP [9]. Por tanto, las células CHO requieren parámetros eléctricos más elevados para reportar tasas de fusión similares a las de las células B-16, lo que las hace más apropiadas para la fusión con PS, cuya rigidez de membrana requiere valores eléctricos más elevados para su electroporación [13]. Además, la elevada viabilidad, superior al 96%, sugiere que es posible aplicar valores más elevados a las células para evaluar un posible incremento en el porcentaje de fusión.

Comparando los resultados mostrados en la *Figura 2* de los experimentos con diferentes duraciones de señal DEP (30 y 60 s), se concluye que un contacto prolongado entre las células impide la fusión. Esto puede deberse a que, mantenidas en el tiempo, las fuerzas repulsivas resultantes de la interacción entre membranas en contacto aumentan, requiriendo mayor energía posterior para electroporar las células, lo que requeriría aumentar los parámetros eléctricos de los pulsos. Un estudio de la tasa de electroporación clarificaría esta hipótesis.

b) Fusión entre células CHO y PS

En los experimentos observamos numerosos posibles casos de fusión. Un microscopio confocal habría permitido distinguir si las especies estaban fusionadas o en diferentes planos espaciales. En cualquier caso, sobre el comportamiento fusogénico de las vesículas poliméricas hay poco conocimiento, y surge la cuestión de cuál debería ser la apariencia teórica de un híbrido, y la manera de identificarlos con fluorescencia. Además, sería interesante considerar si la fusión entre células y PS se vería favorecida tras la funcionalización de los últimos, ya que disminuiría la tensión de su membrana, y en cualquier caso, las proteínas serán un factor condicionante en las interacciones en la fusión. También observamos que la velocidad electroforética de las vesículas poliméricas es menor que la de las células, y por tanto el contacto se induce mayoritariamente entre las últimas. A este respecto, se propone el estudio de métodos mecánicos para lograr el contacto, como centrifugación, sedimentación o succión en filtros.

6. Conclusiones y Trabajo Futuro

El mecanismo de fusión entre células CHO y PS no se comprende todavía. Los resultados sugieren que la línea celular CHO es más apropiada que la B-16 para fusión con PS, ya que requieren valores eléctricos más elevados para su fusión y además se mantienen viables. Se propone, por tanto, el estudio de la fusión de células CHO con valores eléctricos más elevados. Además, debido a que un incremento en el tiempo de contacto utilizando dielectroforesis, causa un decremento en el porcentaje de fusión, se propone el estudio de otros métodos para

inducir el contacto, para eliminar las posibles interacciones adversas de la señal alterna, y para además mejorar el contacto con los PS. Futuros estudios deben también enfocarse a la caracterización de las condiciones de trabajo para los PS, como aquí se ha propuesto y realizado con las células.

Así pues, la falta de conocimiento debe incentivar y motivar el desarrollo de futuros estudios que revelen las incógnitas planteadas.

Agradecimientos

A los comités organizadores del CASEIB por la oportunidad concedida, así como a Elena Hernando, responsable de la gestión de trabajos de la Escuela Técnica de Ingenieros de Telecomunicación, Universidad Politécnica de Madrid. Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Biocibernética, en la Escuela de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Ljubljana, Eslovenia, gracias al programa de intercambios del marco europeo Erasmus, ofrecido por la Universidad Politécnica de Madrid.

Referencias

- [1] Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavčič D, Tarek M. Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon. *IEEE Elec Ins Mag*, vol 28, sup 5, n 5, 2012 pp 14-23 (ISSN: 0883-7554)
- [2] Rems L, Miklavčič D. Tutorial: Electroporation of cells in complex materials and tissue. *J Appl Phys*, vol 119, sup 20, n 20, 2016, pp 1-21 (ISSN:0021-8979)
- [3] Teissié J, Ramos C. Correlation between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes. *Biophys J*, vol 74, sup 4, n 4, 1998, pp 1889-1898 (ISSN: 0006-3495)
- [4] Ramos C, Teissié J. Electrofusion: A biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis. *Biochimie*, vol 82, sup 5, 2000, pp 511-518 (ISSN: 0300-9084)
- [5] Pethig R. Review Article-Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics*, vol 4, sup 2, n 2, 2010, pp 2811:1-35 (ISSN: 1932-1058)
- [6] Mondal RS, Sarkar M. Membrane fusion Induced by Small Molecules and Ions. *Hind Pub Corp J Lip*, vol 2011, 2011, pp 528784:1-14 (PMID:528784)
- [7] Pucihar G, Krmelj J, Reberšek M, Napotnik TB, Miklavčič D. Equivalent Pulse Parameters for Electroporation. *IEEE TBME*, vol 58, sup 11, 2011, pp 3279-3288 (ISSN: 0018-9294)
- [8] Miklavčič D, Maček-Lebar A. Cell electroporability to small molecules in vitro: control by pulse parameters. *Radiol Oncol*, vol 35, sup 3, n 3, 1992, pp 193-202 (ISSN: 1318-2099)
- [9] Rems L, et al. Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. *Sci Rep*, vol 3, 2013, pp 3382:1-10 (ISSN: 2045-2322)
- [10] Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng*, vol 16, 2014, pp 295-320 (ISSN: 1545-4274)
- [11] Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins A. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, vol 5, 2006, pp 993-996 (ISSN: 1474-1776)
- [12] Shirakashi R, Reuss R, Schulz A, Sukhorukov V, Zimmermann U. Effects of a Pulse Electric Field on Electrofusion of Giant Unilamellar Vesicle (GUV)-Jurkat Cell. *J Therm Sci Tech*, vol 7, sup 4, n 4, 2012, pp 589-602 (ISSN: 1884-8346)
- [13] Napotnik TB, Bello G, Sinner EK, Miklavčič D. The Effect of Nanosecond, High-Voltage Electric Pulses on the Shape and Permeability of Polyerosome GUVs. *J Memb Biol*, vol July, 2017, pp 1- 13 (ISSN: 1432-1424)