

Modelado de Electroporación Celular

Mauricio Alfonso

June 20, 2014

1 Introducción

La electroporación reversible es un método consistente en la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad a una célula con el objetivo de permeabilizar su membrana creando poros, y así permitir el ingreso de drogas o moléculas de ADN a su interior. Esto permite tratar tumores con menores cantidades de drogas, reduciendo los efectos secundarios.

En este trabajo se simula una célula esférica a la que se le aplica un pulso eléctrico de 20ms de duración a través de dos electrodos, y se estudia el ingreso al interior de la célula de 4 especies iónicas: el ión hidrógeno (H^+), el hidróxido (OH^-), el catión sodio (Na^+) y el cloruro (Cl^-). Para eso se tiene en cuenta el campo eléctrico producido por los electrodos, la generación y evolución de poros en la membrana celular producto de la diferencia de potencial entre el interior y exterior de la célula, y la migración de las especies mencionadas, producto de la diferencia de potencial.

Las simulaciones se realizaron con el método de elementos finitos sobre mallas bidimensionales que representan el dominio sobre un sistema de coordenadas cilíndricas usando elementos cuadriláteros.

2 Teoría

2.1 Potencial eléctrico

El campo eléctrico en el dominio es generado por dos electrodos con un potencial constante durante la duración del pulso. El potencial eléctrico en todo el dominio se calcula según la ecuación

$$\nabla \sigma_{elem} \cdot (\nabla \phi) = 0 \quad (1)$$

donde ϕ representa el potencial eléctrico y σ_{elem} la conductividad del material [4, p. 88].

Para los bordes ocupados por los electrodos se usan condiciones de borde de Dirichlet con potenciales fijos, mientras que para los bordes no ocupados por electrodos se usan condiciones de borde de Neumann:

$$\frac{\partial \phi}{\partial \mathbf{n}} = 0 \quad (2)$$

donde \mathbf{n} representa la normal al borde.

La diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula en un punto de su superficie se conoce como potencial transmembrana (ITV). Si la célula es esférica este potencial se puede aproximar de manera independiente del tiempo como

$$V^\theta = 1.5 E \alpha \cos(\theta) \quad (3)$$

donde E es el campo eléctrico, θ el ángulo polar respecto del campo eléctrico y α el radio de la célula [1]. Esta fórmula no tiene en cuenta que el ITV puede variar en el tiempo por la creación de poros, por eso en este trabajo no se la usa directamente, si no que usan las ecuaciones diferenciales.

2.2 Transporte de especies

Para el transporte de especies se usa la ecuación de conservación de masa de Nernst-Planck:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left(D_i \nabla C_i + D_i z_i \frac{F}{RT} C_i \nabla \phi \right) \quad (4)$$

donde C_i , D_i y z_i representan la concentración, el coeficiente de difusión y la valencia respectivamente de la especie i , para $i = \text{H}^+$, OH^- , Na^+ ó Cl^- . F es la constante de Faraday, R la constante de los gases y T la temperatura [2]. Esta ecuación tiene en cuenta la difusión de las partículas pero también el efecto que puede tener el campo eléctrico.

Como condiciones iniciales se usan las concentraciones descritas en la tabla 1: $C_{e,i}^0$ siendo $e = i$ ó o si se refiere a los nodos del interior o del exterior de la célula respectivamente e $i = \text{H}^+$, OH^- , Na^+ ó Cl^- para la concentración de cada especie y $C_{e,i}$ con $e = a$ ó c si es para el ánodo o el cátodo respectivamente.

Como condición de borde en el borde no ocupado por los electrodos se usa

$$\frac{\partial C_i}{\partial \mathbf{n}} = 0 \quad (5)$$

Para los bordes ocupados por los electrodos se usan los valores fijos $C_{e,i}$ descritos anteriormente.

2.3 Generación de poros

Con el ITV se crean poros hidrofílicos en la membrana. La densidad de poros se calcula según la ecuación diferencial

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \alpha_c e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2}} \right) \quad (6)$$

donde N es la densidad de poros en un determinado tiempo y posición de la membrana celular, α_c es el coeficiente de creación de poros, V_m es el potencial transmembrana, V_{ep} es el voltaje característico de electroporación, N_0 es la densidad de poros en equilibrio (cuando $V_m = 0$) y q es una constante igual a $(r_m/r_*)^2$, donde r_m es el radio de mínima energía para $V_m = 0$ y r_* es el radio mínimo de los poros [3].

Los poros se crean con un radio inicial r_* y su radio varía en el tiempo según el potencial transmembrana de acuerdo a la ecuación diferencial

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \frac{D}{kT} \left(\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_a)} + \frac{4\beta}{r} \left(\frac{r_*}{r} \right)^4 - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{\text{eff}} r \right) \quad (7)$$

donde r es el radio de un poro, D es el coeficiente de difusión para los poros, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, V_m el potencial transmembrana, F_{max} la máxima fuerza eléctrica para V_m de 1V, r_h y r_a son constantes usadas para la velocidad de advección, β es la energía de repulsión estérica, γ es la energía del perímetro de los poros, y σ_{eff} es la tensión efectiva de la membrana, calculada como

$$\sigma_{\text{eff}} = 2\sigma' - \frac{2\sigma' - \sigma_0}{(1 - A_p/A)^2} \quad (8)$$

donde σ' es la tensión de la interfase hidrocarburo-agua, σ_0 es la tensión de la bicapa sin poros, A_p es la suma de las áreas de todos los poros en la célula, y A es el área de la célula. En la ecuación 7, el primer término corresponde a la fuerza eléctrica inducida por el potencial transmembrana, el segundo a la repulsión estérica, el tercero a la tensión de línea que actúa en el perímetro del poro y el cuarto a la tensión superficial de la célula [3].

Por otra parte se asume que la membrana celular se carga como un capacitor y una resistencia en paralelo. De esta manera el potencial transmembrana no aumenta bruscamente al iniciarse el pulso eléctrico, si no que crece de manera paulatina según la ecuación:

$$V_m = V_p(1 - e^{-t/\tau}), \quad \text{con } \tau = \alpha C_m \left(\frac{1}{\sigma_i} + \frac{1}{2\sigma_o} \right) \quad (9)$$

donde V_m es el potencial transmembrana en un punto de la superficie de la célula, V_p es el potencial obtenido por las ecuaciones de potencial eléctrico en ése mismo punto, t es el tiempo transcurrido desde el comienzo del pulso eléctrico, α es el radio de la célula, C_m es la capacitancia superficial de la célula y σ_i y σ_o las conductancias intra y extracelulares respectivamente [3].

2.4 Método de Elementos Finitos

El método de elementos finitos (FEM) sirve para resolver ecuaciones diferenciales de manera aproximada, discretizando el dominio en zonas pequeñas y disjuntas llamadas elementos, y resolviendo un sistema de ecuaciones lineales que obtiene la solución de las ecuaciones diferenciales en un conjunto de puntos del dominio. La aplicación del método de elementos finitos consiste en: [5]

- Discretizar el dominio continuo en una malla formada por elementos unidos por nodos. Cada uno de estos elementos debe ser pequeño y tener una forma simple (por ejemplo triángulos o cuadriláteros). El conjunto de elementos debe ser disjunto y ocupar todo el dominio; es decir, cada punto del dominio debe estar ocupado por uno y sólo un elemento. Los vértices de los elementos se llaman nodos, y suelen ser un punto en común entre dos o más elementos. Cuántos más pequeños sean los elementos, mayor será la precisión de la solución al aplicar el método, pero se necesitarán más elementos para cubrir el dominio, y por lo tanto un mayor poder de cómputo.
- Desarrollar para cada elemento un sistema de ecuaciones lineales que relacione los valores en los nodos. Esto se hace generalmente aplicando el método de residuos ponderados a cada uno de los elementos. El sistema resultante suele tener tantas incógnitas y ecuaciones como nodos por elemento.
- Ensamblar todos los sistemas de ecuaciones elementales en un sistema grande, con tantas ecuaciones e incógnitas como nodos en la malla del dominio.
- Agregar las condiciones de borde al sistema. En algunos casos se realiza este paso al generar las ecuaciones elementales, es decir antes de ensamblar el sistema.
- Resolver el sistema ensamblado con algún método de resolución de ecuaciones lineales. Dado que la matriz ensamblada es muy poco densa (muy pocos elementos distintos de cero), se suele representar con estructuras especiales para matrices dispersas. En algunos problemas la matriz generada es simétrica definida positiva, lo que permite usar métodos como descomposición de Cholesky o gradientes conjugados.

2.5 Constantes

A continuación se presenta la definición y valores de las constantes usadas.

Símbolo	Definición	Valor
σ_o	Conductividad de la zona extracelular	0.20 S m^{-1}
σ_i	Conductividad de la zona intracelular	0.15 S m^{-1}
σ_m	Conductividad de la membrana celular	$5 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$
σ_p	Conductividad del líquido que llena el poro	2 S m^{-1}
E	Campo eléctrico aplicado	$40 \text{ kV m}^{-1} - 200 \text{ kV m}^{-1}$
α	Radio de la célula	$10 \text{ }\mu\text{m} - 50 \text{ }\mu\text{m}$
d	Ancho de la membrana	5 nm
D_{H^+}	Coficiente de difusión para H^+	$12500 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$
D_{OH^-}	Coficiente de difusión para OH^-	$7050 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$
D_{Na^+}	Coficiente de difusión para Na^+	$1780 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$
D_{Cl^-}	Coficiente de difusión para Cl^-	$3830 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$
C_{i,H^+}^0	Concentración inicial de H^+ en citoplasma	$0.3978 \times 10^{-7} \text{ M}$
C_{i,OH^-}^0	Concentración inicial de OH^- en citoplasma	$0.3978 \times 10^{-7} \text{ M}$
C_{i,Na^+}^0	Concentración inicial de Na^+ en citoplasma	142 mM
C_{i,Cl^-}^0	Concentración inicial de Cl^- en citoplasma	108 mM
C_{o,H^+}^0	Concentración inicial externa de H^+	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$
C_{o,OH^-}^0	Concentración inicial externa de OH^-	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$
C_{o,Na^+}^0	Concentración inicial externa de Na^+	$14 \times 10^{-7} \text{ mM}$
C_{o,Cl^-}^0	Concentración inicial externa de Cl^-	$4 \times 10^{-7} \text{ mM}$
C_{a,H^+}	Concentración de H^+ en el ánodo	$1.5 \times 10^7 \text{ at }\mu\text{m}^{-3}$
C_{a,OH^-}	Concentración de OH^- en el ánodo	0
C_{a,Na^+}	Concentración de Na^+ en el ánodo	$1 \times 10^{12} \text{ at }\mu\text{m}^{-3}$
C_{a,Cl^-}	Concentración de Cl^- en el ánodo	0
C_{c,H^+}	Concentración de H^+ en el cátodo	0
C_{c,OH^-}	Concentración de OH^- en el cátodo	$1.806 \times 10^7 \text{ at }\mu\text{m}^{-3}$
C_{c,Na^+}	Concentración de Na^+ en el cátodo	0
C_{c,Cl^-}	Concentración de Cl^- en el cátodo	0
r^*	Radio mínimo de los poros	0.51 nm
r_m	Radio del poro de mínima energía	0.80 nm
α_c	Coficiente de creación de poros	$1 \times 10^9 \text{ m}^{-2}\text{S}^{-1}$
V_{ep}	Voltaje característico	0.258 V
N_0	Densidad de poros en equilibrio	$1.5 \times 10^9 \text{ m}^{-2}$
D	Coficiente de difusión para poros	$5 \times 10^{-14} \text{ m}^{-2}\text{S}^{-1}$
F_{max}	Máxima fuerza eléctrica	$0.7 \times 10^{-3} \text{ NV}^{-2}$
r_h	Constante usada para la velocidad de advección	$0.97 \times 10^{-9} \text{ m}$
r_a	Constante usada para la velocidad de advección	$0.31 \times 10^{-9} \text{ m}$
β	Repulsión estérica	$1.4 \times 10^{19} \text{ J}$
γ	Energía del perímetro de los poros	$1.8 \times 10^{11} \text{ J m}^{-1}$
σ'	Tensión de la interfase hidrocarburo-agua	$2 \times 10^{-2} \text{ J m}^{-2}$
σ_0	Tensión de la bicapa sin poros	$1 \times 10^{-6} \text{ J m}^{-2}$
C_m	Capacitancia superficial de la célula	$1 \times 10^{-14} \text{ F m}^{-2}$
F	Constante de Faraday	$9.648534 \text{ C mol}^{-1}$
R	Constante de los gases	$8.3144621 \text{ J C}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
T	Temperatura	310 K
k	Constante de Boltzmann	$1.3806488 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

Table 1: Valores constantes usados. Valores obtenidos de [3], [1] y [6]

3 Método Numérico / Implementación

Se modeló una célula esférica como un sólido de revolución, para así trabajar con una malla bidimensional usando un sistema de coordenadas cilíndricas. Se resolvieron las ecuaciones diferenciales mencionadas anteriormente usando los métodos de elementos finitos y diferencias finitas. El trabajo fue implementado en C++.

3.1 Mallado

Se generaron mallas con elementos cuadrilaterales de tamaño variable usando el programa AutoMesh-2D¹. Se malló de manera que los elementos cercanos a la membrana celular sean de menor tamaño, por ser ésta la zona de mayor interés. Los elementos fueron numerados por AutoMesh-2D de manera tal de reducir el ancho de banda de la matriz de rigidez usada posteriormente en el método de elementos finitos.

3.2 Potencial eléctrico

La ecuación 1 se resolvió usando el método de elementos finitos. Para resolver el sistema de ecuaciones generado se usó la librería de álgebra lineal Eigen² para C++. El sistema se resolvió usando el método de descomposición de Cholesky, aprovechando que la matriz de rigidez generada es simétrica definida positiva. Se usaron estructuras para representar matrices esparsas provistas por la librería Eigen, para aprovechar la poca densidad de elementos en la matriz de rigidez. Para acelerar la generación de la matriz de rigidez se usó la interfaz OpenMP³, paralelizando en varios threads el proceso de recorrer todos los elementos, encontrar los valores correspondientes y ensamblarlos.

3.3 Transporte de especies

La ecuación de 4 también fue resuelta con el método de elementos finitos. Para eso se resolvieron 4 sistemas distintos, uno por cada especie. Los sistemas de ecuaciones fueron resueltos usando el método iterativo de bi gradientes conjugados estabilizado sin preconditionador, dado que las matrices generadas no son simétricas definidas positivas, a diferencia de las generadas al resolver la ecuación de Poisson para el potencial eléctrico. Para acelerar la resolución se usa OpenMP resolviendo en threads separados las iteraciones de cada especie.

3.4 Generación de poros

Las ecuaciones de generación de poros se resolvieron con el método de diferencias finitas. La ecuación 6 se discretizó como

¹<http://www.automesh2d.com/>

²<http://eigen.tuxfamily.org/>

³<http://www.openmp.org/>

$$\frac{N_{t+1} - N_t}{\Delta t} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N_t}{N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2}} \right) \quad (10)$$

y la ecuación 7 como

$$\frac{r_{t+1} - r_t}{\Delta t} = \frac{D}{kT} \left(\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r_t + r_a)} + \frac{4\beta}{r_t} \left(\frac{r_*}{r_t} \right)^4 - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{eff}r_t \right) \quad (11)$$

En cada paso temporal y por cada ángulo θ discreto se crean tantos poros como indique la ecuación 10 con radio inicial r_* , y se actualizan los radios de los poros existentes según la ecuación 11, aplicada a cada poro individual. Para esto se guarda por cada ángulo discreto un vector con el radio de cada uno de los poros. La cantidad de poros en cada ángulo discreto se calcula como la densidad obtenida multiplicada por el área de la zona esférica, calculada como

$$A = 2\pi\alpha^2(\cos(\theta_1) - \cos(\theta_2)) \quad (12)$$

siendo α el radio de la célula y θ_1 y θ_2 los ángulos que delimitan la zona esférica.

Para mejorar los tiempos de ejecución se consideran todos los poros con radio muy pequeño y con cierta antigüedad como iguales en vez de tratarlos individualmente, mientras que a los poros grandes o recién creados se los trata individualmente, aplicando la ecuación 11 a cada uno. Los potenciales transmembrana V_m de cada ángulo discreto en cada paso temporal se obtienen de la ecuación 9, que tiene en cuenta las soluciones del sistema de potencial eléctrico y la capacitancia de la célula.

3.5 Acoplamiento

Las ecuaciones de potencial, transporte y poros se acoplaron en un ciclo principal. Luego de cada iteración de las ecuaciones de poros, se alteran los valores de conductividad de los elementos pertenecientes a la membrana celular según la ecuación

$$\begin{aligned} \sigma_{elem} &= \sigma_m(1 - p) + \sigma_p p, \\ \text{con } p &= \frac{\sum_{r \in R} \pi r^2}{A_z} \end{aligned} \quad (13)$$

donde σ_{elem} es la conductividad de una zona esférica de la membrana, σ_m es la conductividad de la membrana cuando no hay poros, σ_p es la conductividad del líquido que llena los poros, y p representa la proporción de la superficie (en la zona esférica actual) ocupada por los poros, con R un conjunto con todos los radios de los poros en esa zona y A_z el área de la zona, calculada según la ecuación 12.

Esto hace que la próxima ejecución de la ecuación de potencial eléctrico genere resultados diferentes, y esto a su vez altera las ejecuciones posteriores de

las ecuaciones de transporte y nuevamente las de poros por alterar el potencial transmembrana.

La difusión de los elementos de la membrana para cada especie se calcula como la difusión de ésta especie en el exterior de la célula multiplicado por la proporción del área del elemento ocupada por poros. De ésta manera se simula la permeabilización creada por los poros.

Las distintas ecuaciones se ejecutan con distintos pasos temporales, necesitando las ecuaciones de poros un paso temporal muy pequeño, las de potencial un paso más grande y las de transporte un paso aún más grande. Debido a que al comienzo del pulso eléctrico se crean muchos poros y cambia muy rápidamente el voltaje transmembrana, los valores del paso temporal se eligieron más pequeños para los primeros instantes y más grandes para los instantes posteriores cuando el sistema se estabiliza.

4 Resultados

4.1 Potencial Transmembrana

En las figuras 1 a 12 se puede ver el potencial transmembrana (ITV) para distintos valores de ángulo θ durante los primeros $10 \mu s$ para células de diferentes tamaños y diferentes campos eléctricos. Se puede observar el mismo patrón en varios casos:

- En una primera etapa la tensión sube al iniciarse el pulso. Esto no se da de manera inmediata debido a que la membrana se carga como un capacitor. El ITV crece de manera más rápida en las regiones celulares cercanas a los polos, mientras que en las regiones cercanas al ecuador casi no deja de ser cero.
- Al alcanzar un pico de tensión, el ITV comienza a disminuir. Esto se debe a que los valores altos de tensión alcanzados crearon poros que aumentan significativamente la conductividad de la membrana, reduciendo su caída de tensión. Este proceso se da de manera más precipitada en las regiones cercanas a los polos, y más lentamente en las regiones cercanas al ecuador.

Este proceso no se nota cuando el campo eléctrico y el radio de la célula son muy chicos, como en la figura 1 debido a que no se alcanza el potencial necesario para generar poros que reduzcan la conductividad de la membrana.

Un fenómeno interesante que se nota es que en los casos en los que el potencial necesario sí fue alcanzado, un incremento en el campo eléctrico aplicado parece prácticamente no influir en los valores de ITV alcanzados, pero sí en la velocidad en la que se produce el proceso descrito: por ejemplo en la figura 5 el pico de tensión se alcanza cerca de los $4 \mu s$ con un campo eléctrico de 40 kV m^{-1} , mientras que en la figura 6, para la misma célula pero un campo de 80 kV m^{-1} , el pico se alcanza entre los 1 y $2 \mu s$, y para la figura 7 el pico se alcanza aún más temprano al aumentar el campo eléctrico. Sin embargo en todos estos casos el potencial transmembrana alcanzado casi no varía, influyendo el potencial aplicado solo en la velocidad en la que se producen las variaciones de ITV.

En las figuras 7 y 8 se comparan la misma célula y potencial aplicado con dos mallas diferentes: una de 1930 elementos (usada en la mayoría de las simulaciones) y otra de 7439 elementos. Como se puede ver la mayor densidad en la malla no parece afectar el ITV obtenido.

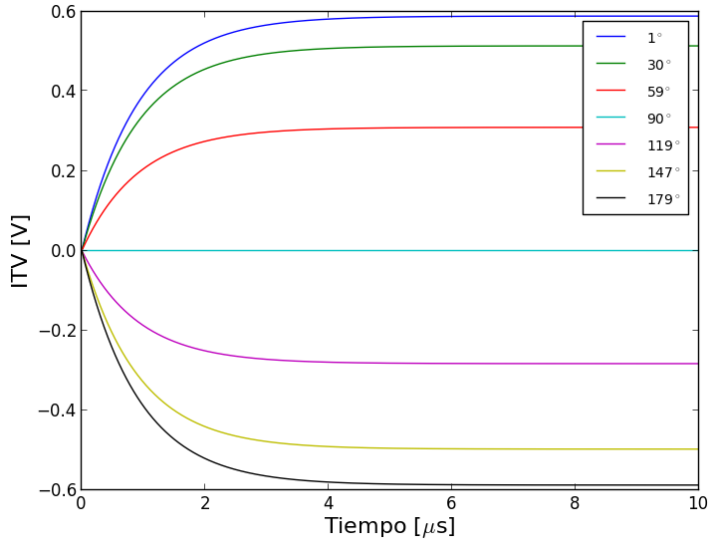


Figure 1: ITV al inicio para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

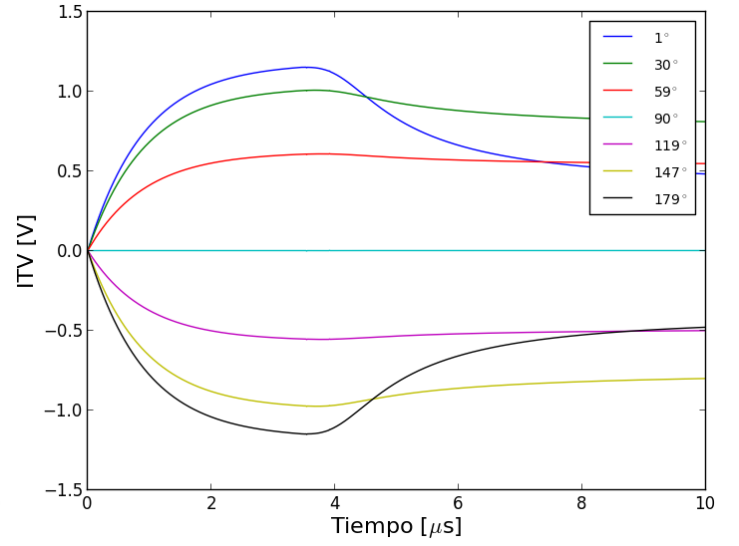


Figure 2: ITV al inicio para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

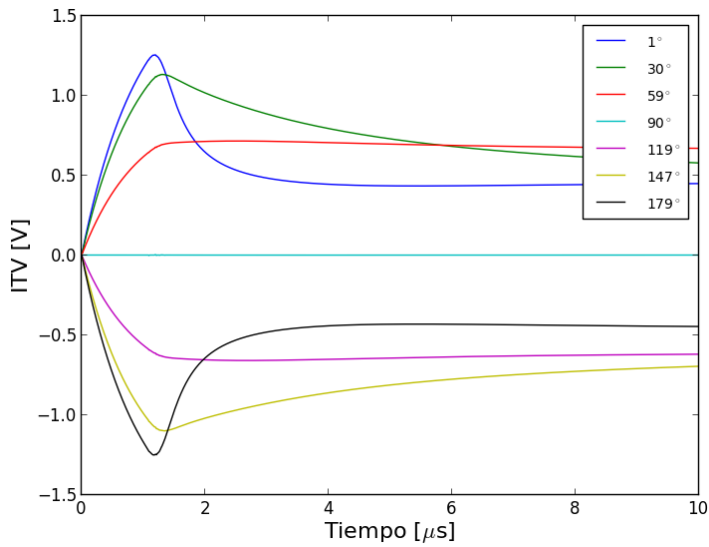


Figure 3: ITV al inicio para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

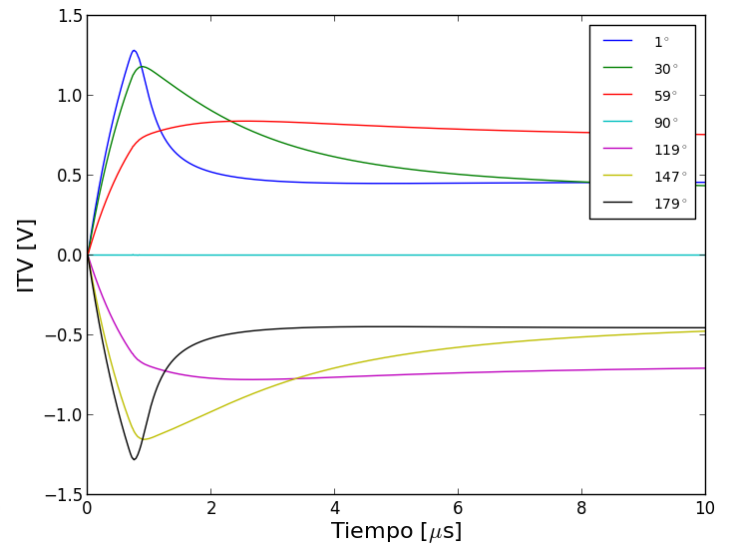


Figure 4: ITV al inicio para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

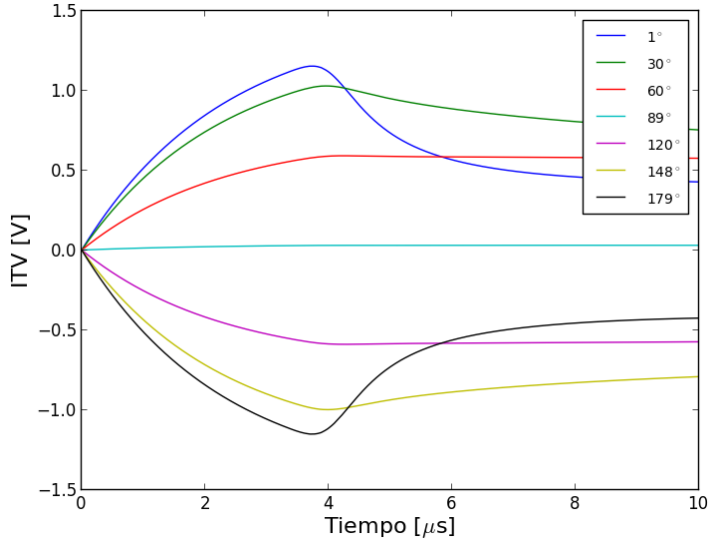


Figure 5: ITV al inicio para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

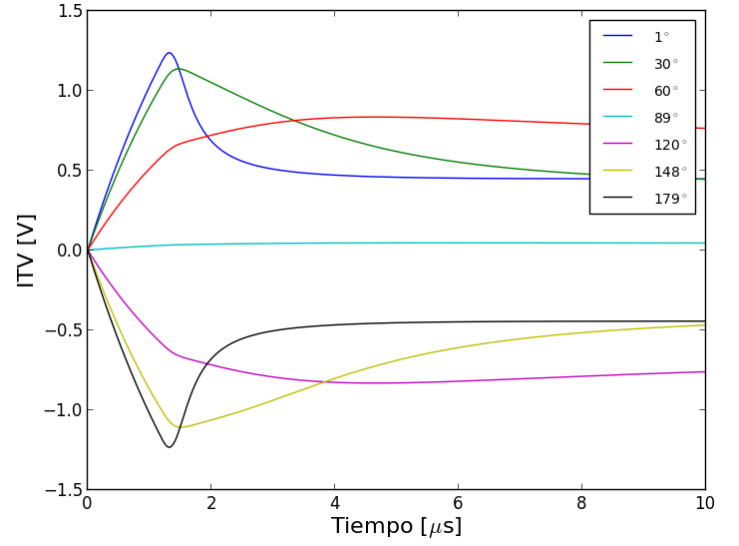


Figure 6: ITV al inicio para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

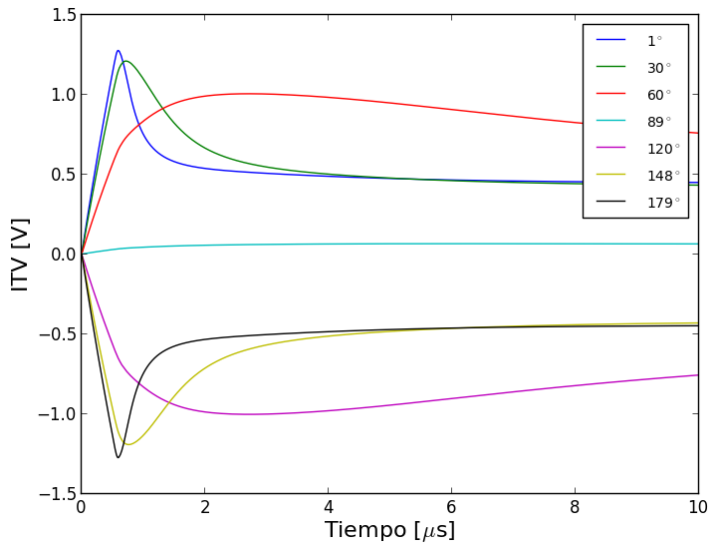


Figure 7: ITV al inicio para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ con malla de pocos elementos

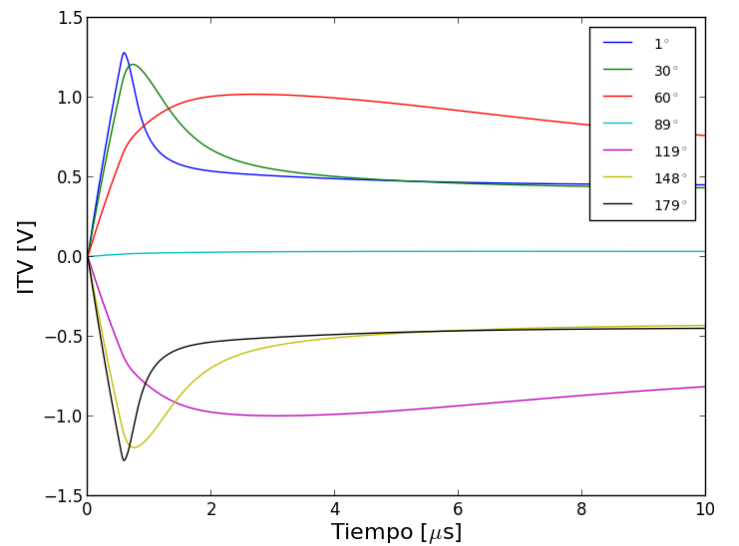


Figure 8: ITV al inicio para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ con malla de muchos elementos

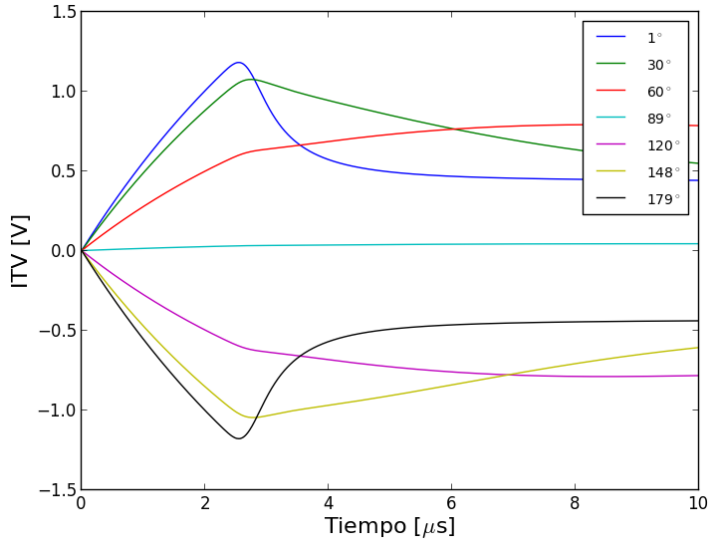


Figure 9: ITV al inicio para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

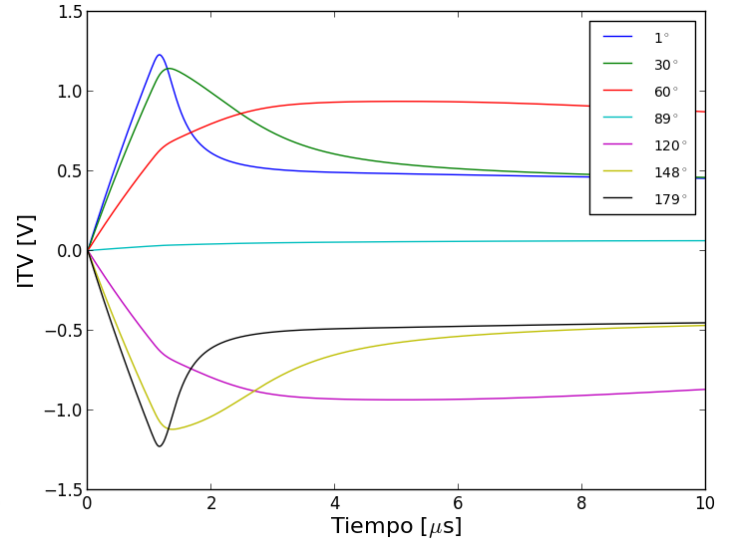


Figure 10: ITV al inicio para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

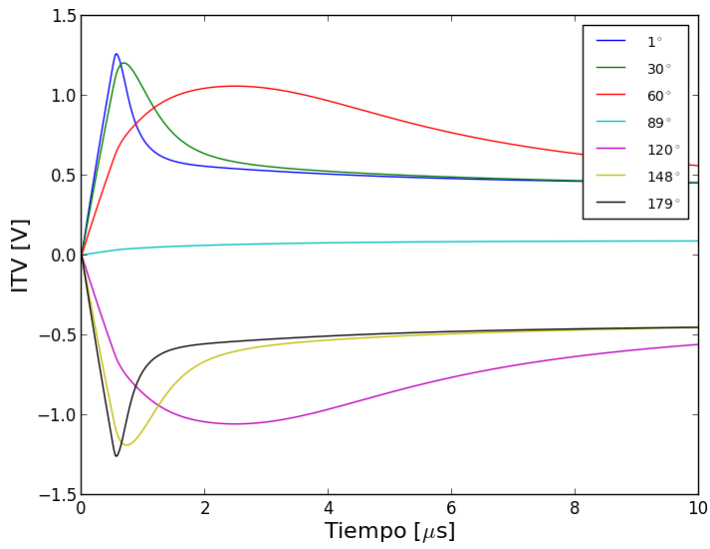


Figure 11: ITV al inicio para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

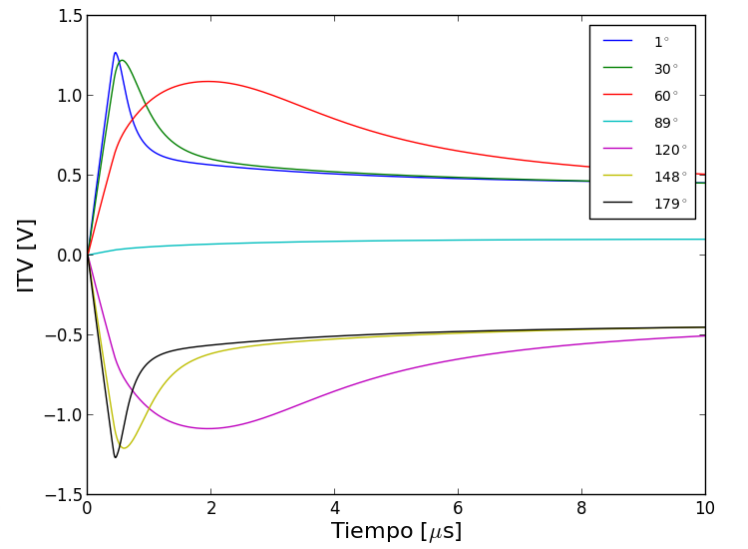


Figure 12: ITV al inicio para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

En las figuras 13 a 24 se graficó lo mismo que en las figuras anteriores, pero sobre todo el pulso de 20 ms y con una escala logarítmica para el tiempo. Se observa que las regiones cercanas al ecuador no dejan de tener un potencial muy cercano a cero durante todo el pulso, mientras que las regiones más alejadas del ecuador terminan alcanzando valores muy similares entre sí: positivos para las regiones del hemisferio hiperpolarizado (θ menor a 90 grados) y negativos para las regiones del hemisferio depolarizado (θ mayor a 90 grados).

Se observa también en la figura 13 que si el radio de la célula y el campo eléctrico son muy pequeños, el potencial transmembrana no alcanza nunca el valor suficiente como para generar poros y reducir aumentar la conductancia y así el ITV.

En las figuras 25 a 36 se observa el voltaje transmembrana en función del ángulo θ , en diferentes instantes para diferentes radios y potenciales aplicados. Se observa que la similitud con la fórmula 3 sólo se observa durante los primeros instantes del pulso, deformándose rápidamente la curva obtenida.

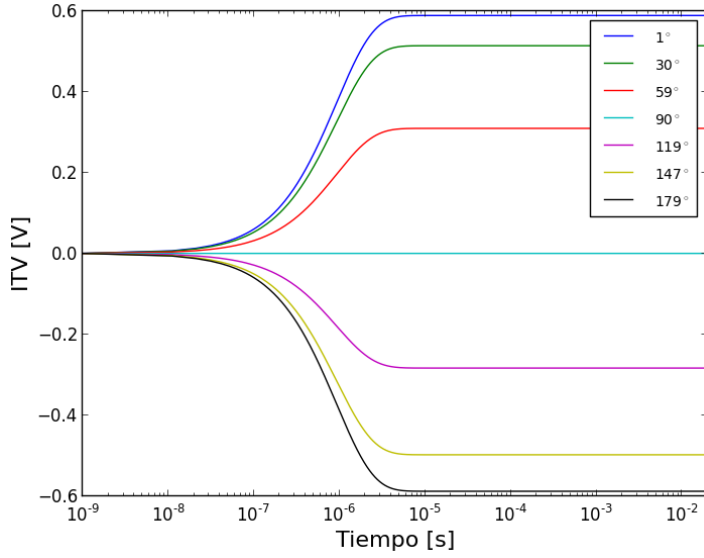


Figure 13: ITV durante el pulso para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

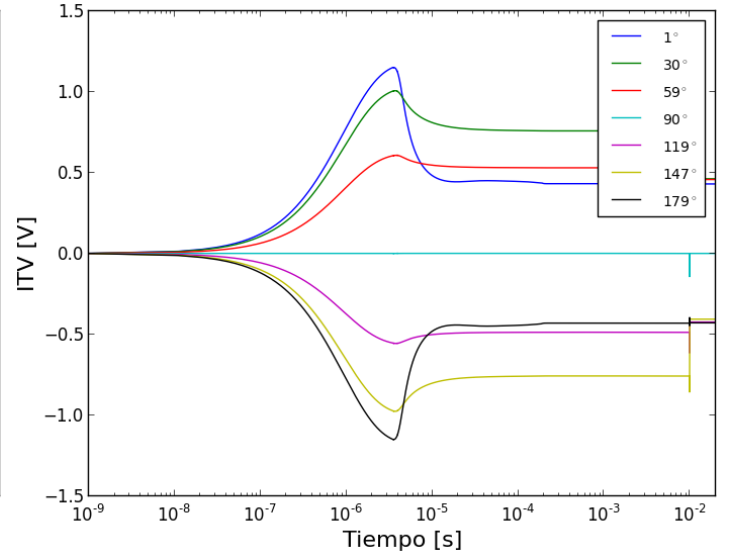


Figure 14: ITV durante el pulso para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

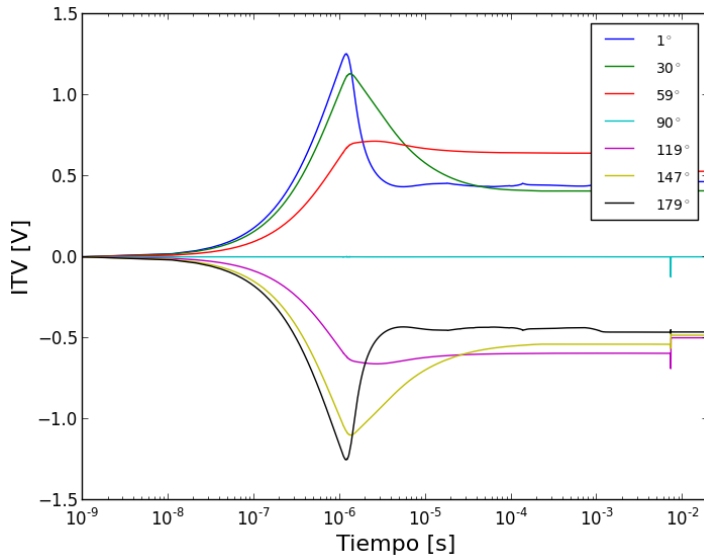


Figure 15: ITV durante el pulso para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

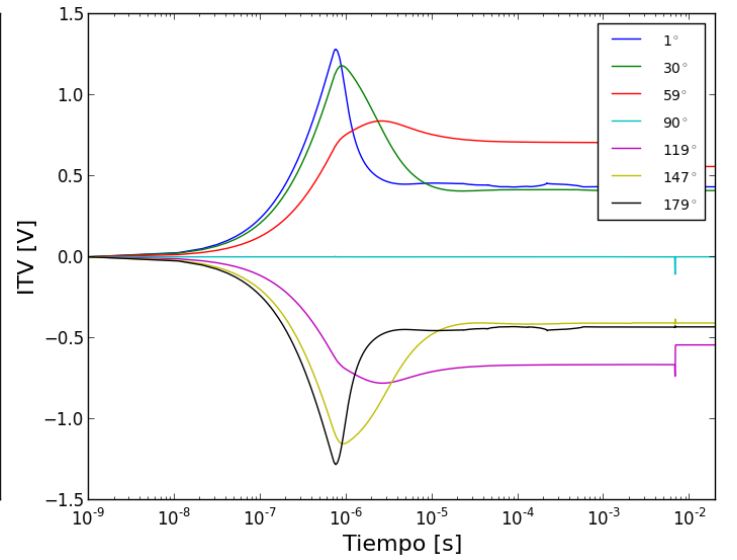


Figure 16: ITV durante el pulso para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

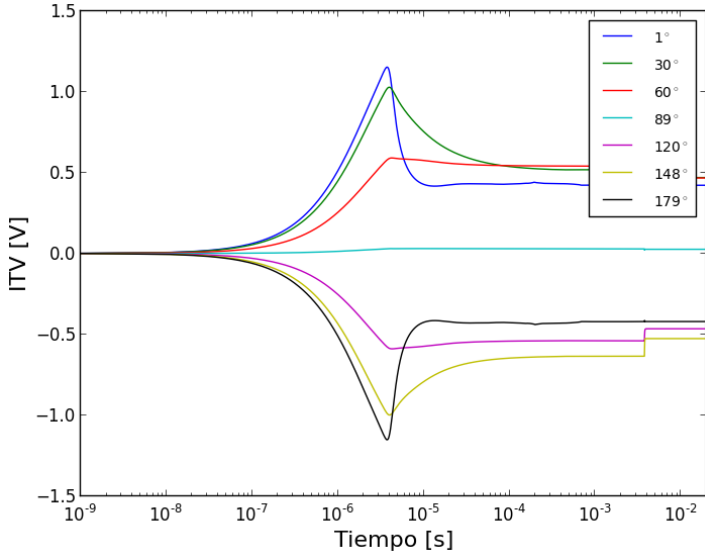


Figure 17: ITV durante el pulso para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

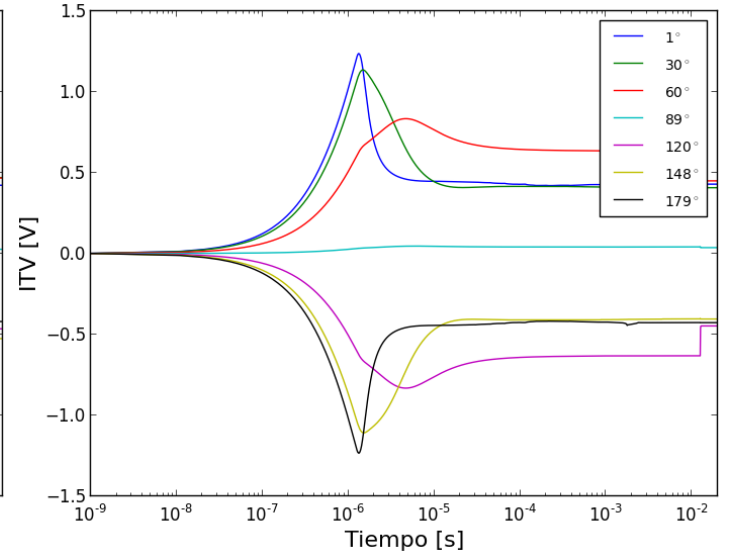


Figure 18: ITV durante el pulso para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

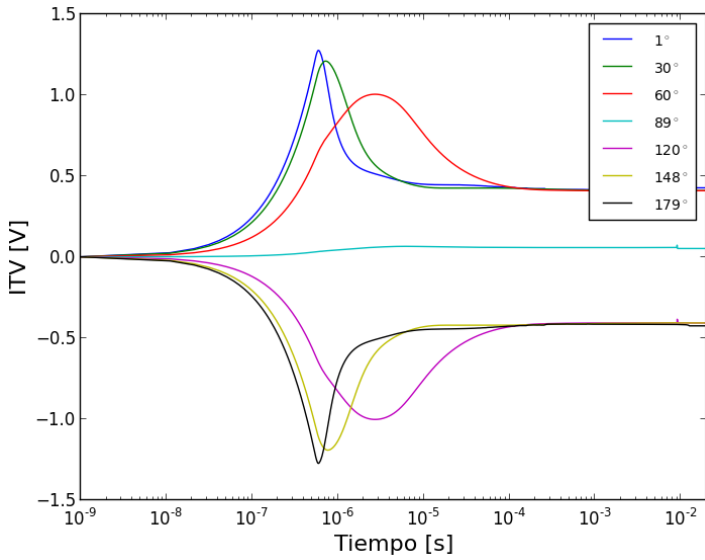


Figure 19: ITV durante el pulso para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

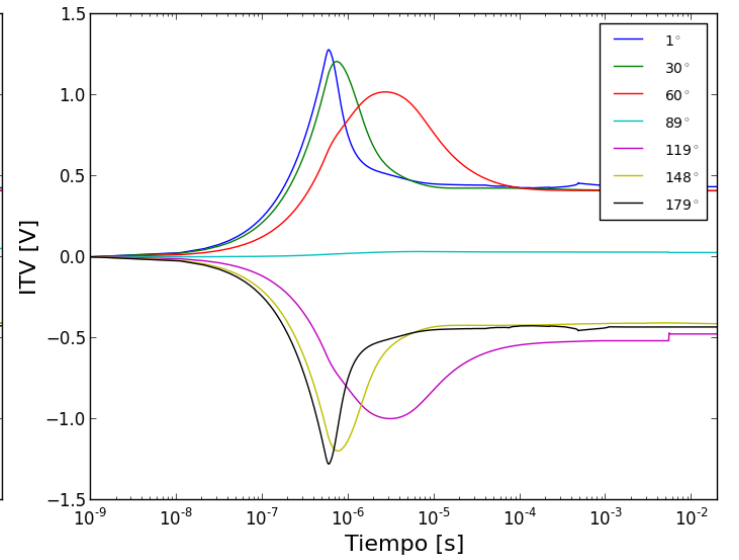


Figure 20: ITV durante el pulso para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

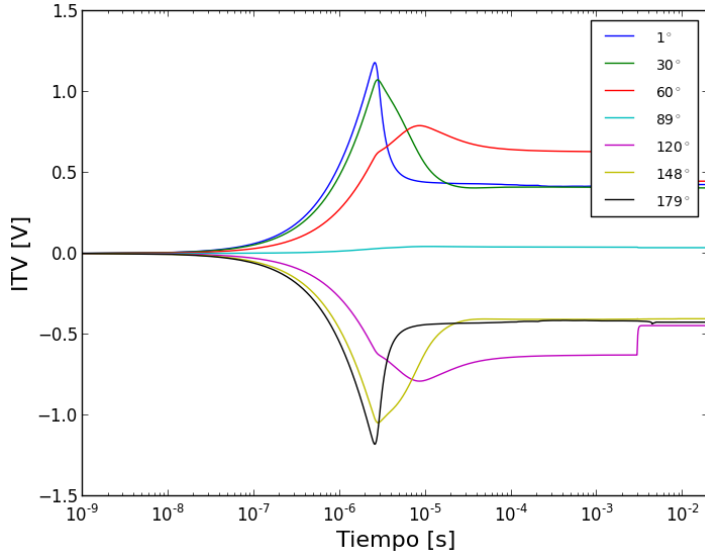


Figure 21: ITV durante el pulso para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

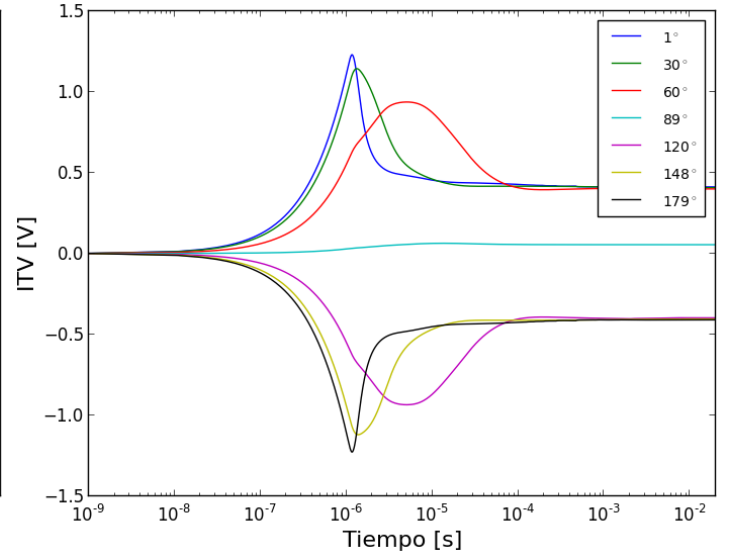


Figure 22: ITV durante el pulso para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

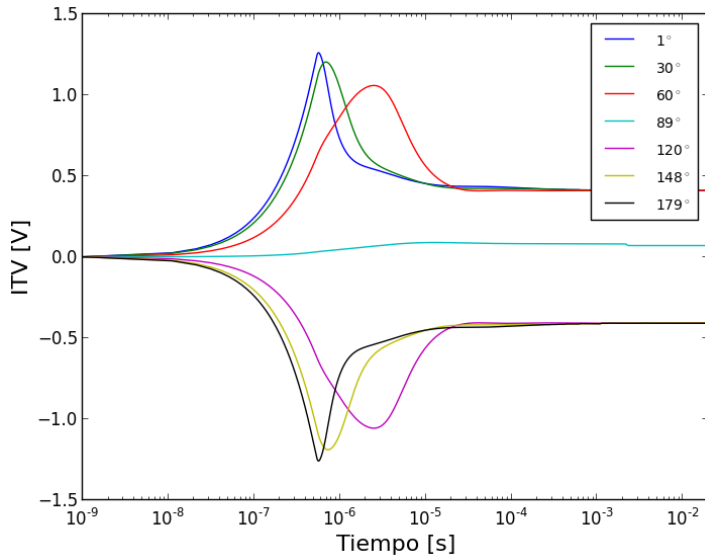


Figure 23: ITV durante el pulso para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

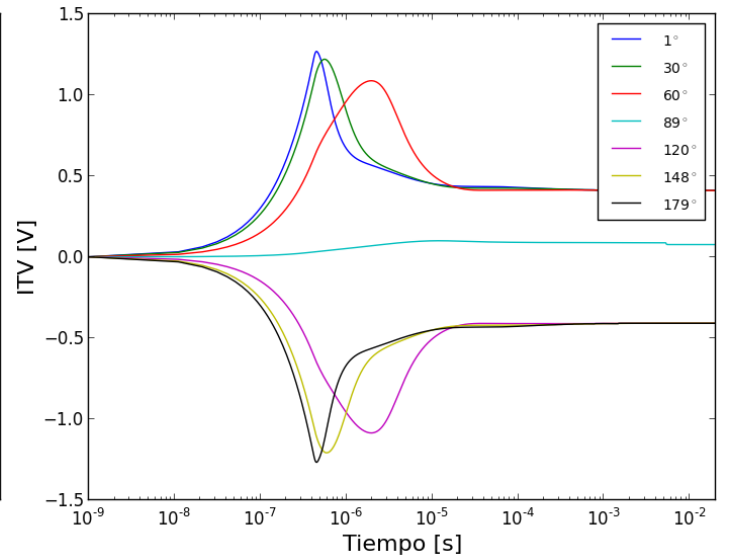


Figure 24: ITV durante el pulso para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ (escala logarítmica)

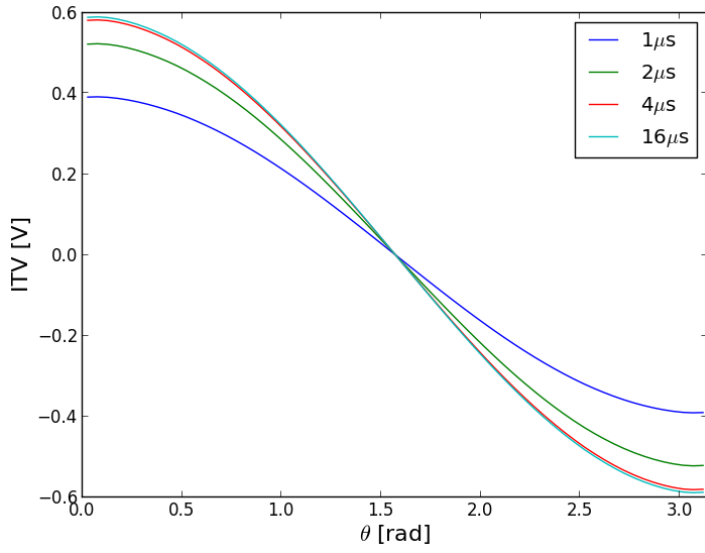


Figure 25: ITV según ángulo θ para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

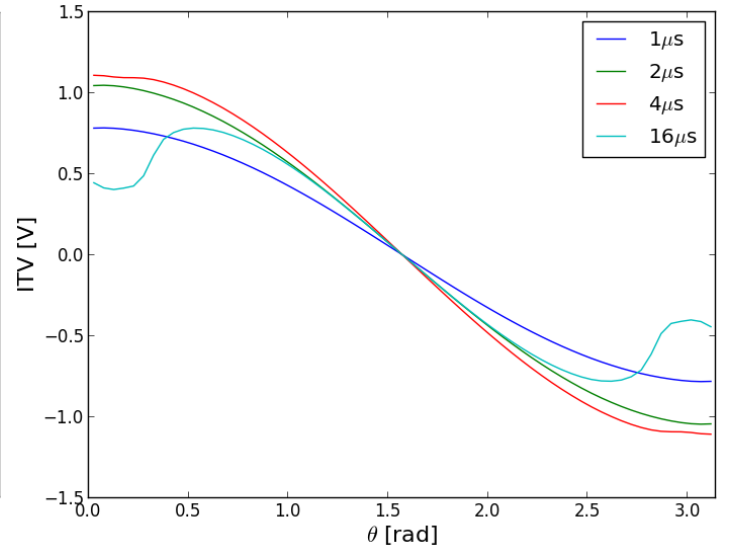


Figure 26: ITV según ángulo θ para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

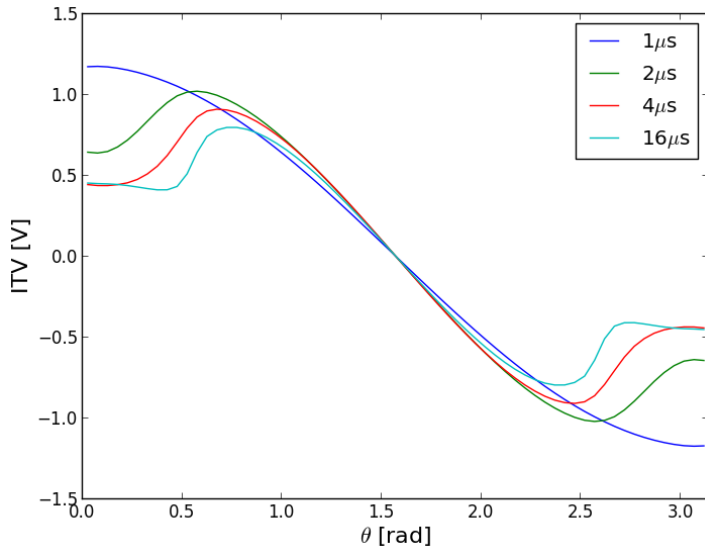


Figure 27: ITV según ángulo θ para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

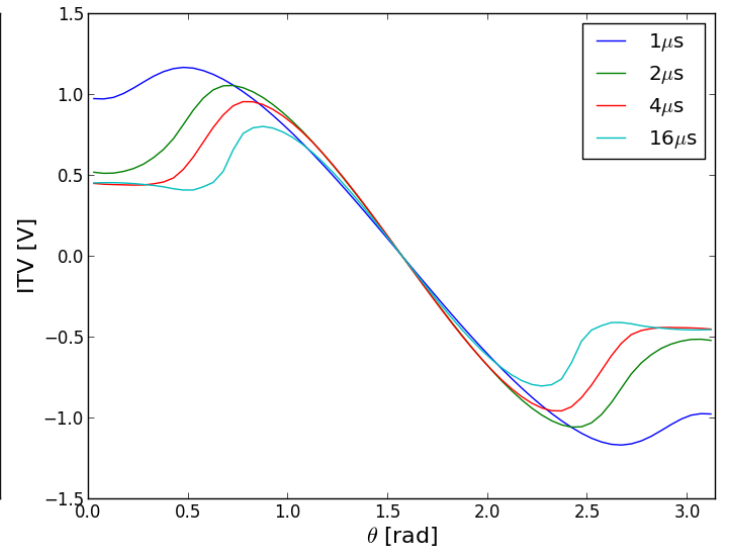


Figure 28: ITV según ángulo θ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=10\mu\text{m}$

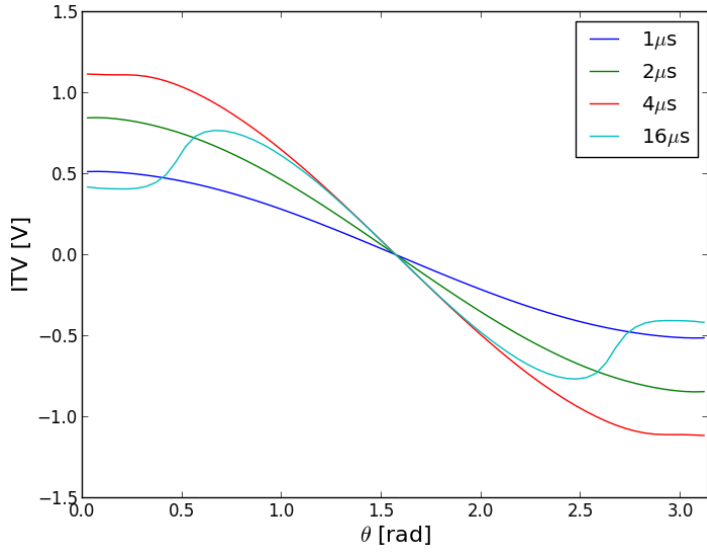


Figure 29: ITV según ángulo θ para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

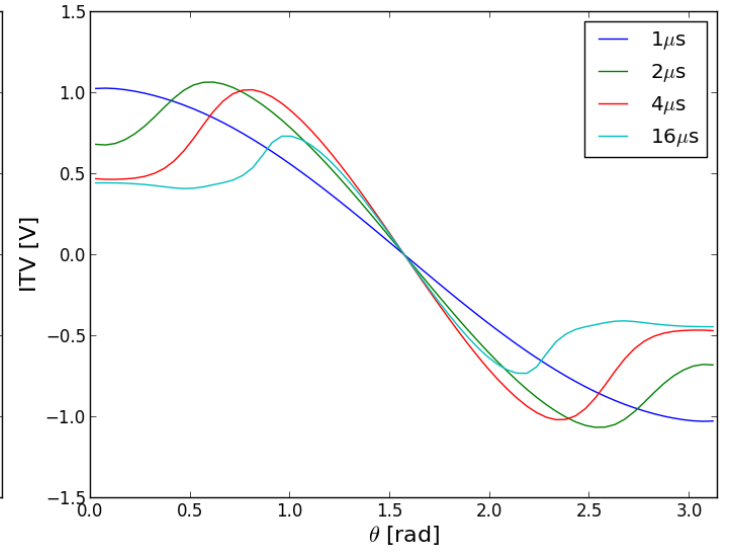


Figure 30: ITV según ángulo θ para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

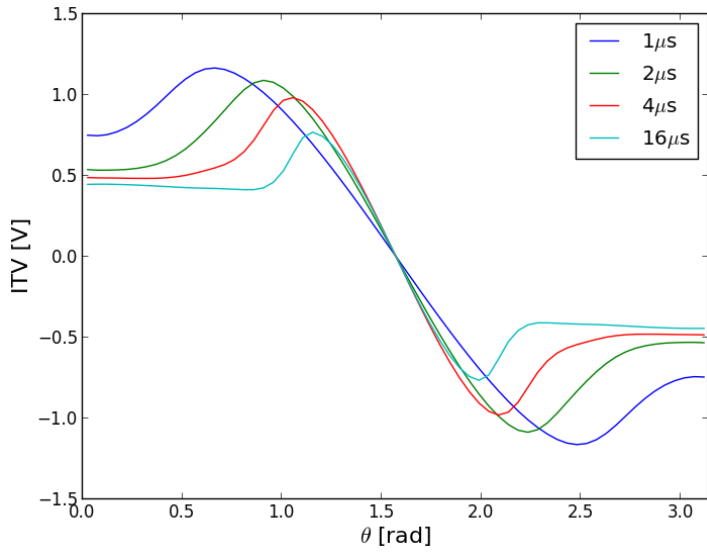


Figure 31: ITV según ángulo θ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

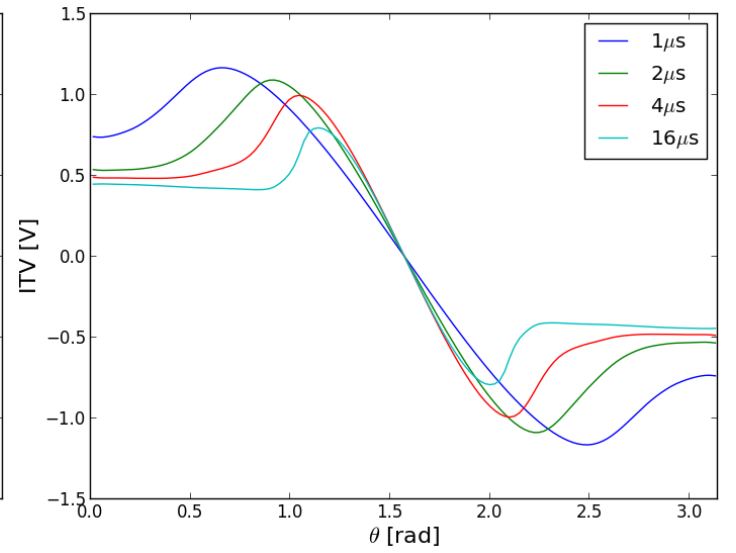


Figure 32: ITV según ángulo θ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

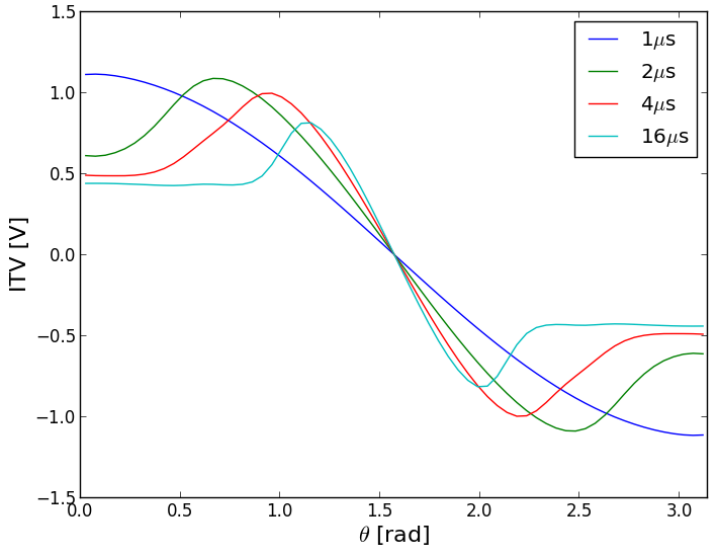
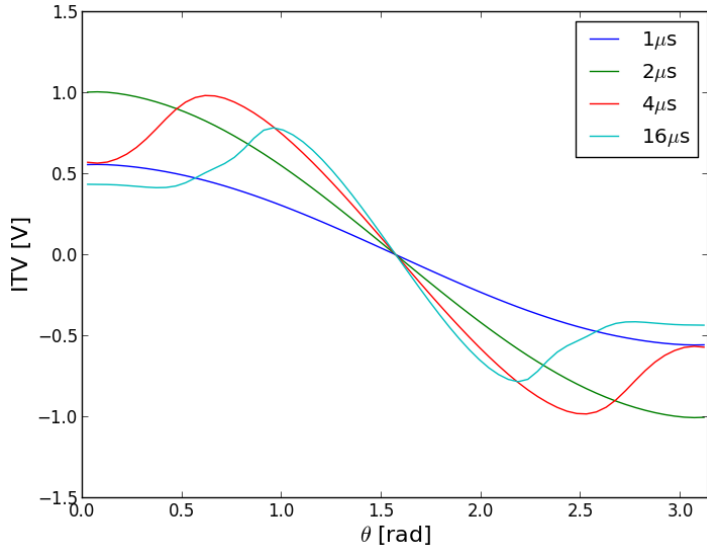


Figure 33: ITV según ángulo θ para $E=40\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ Figure 34: ITV según ángulo θ para $E=80\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

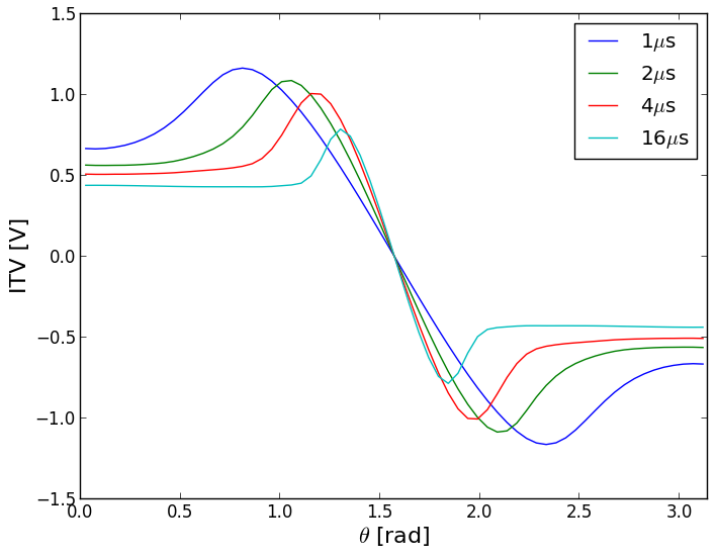
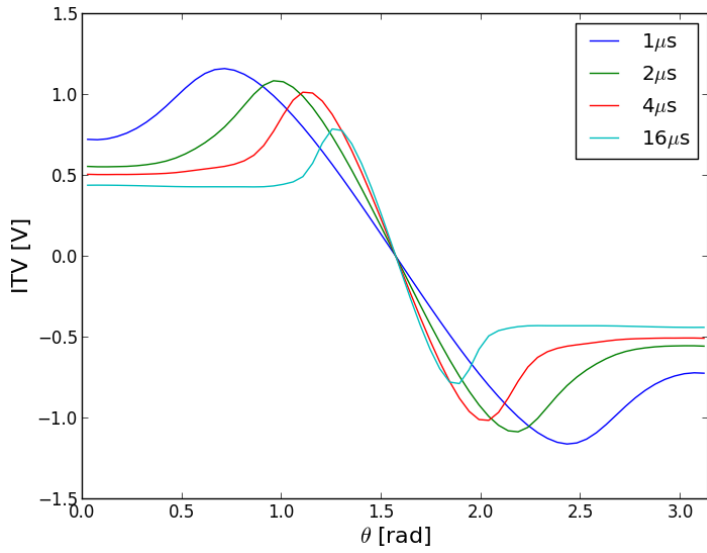


Figure 35: ITV según ángulo θ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ Figure 36: ITV según ángulo θ para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

4.2 Poros

En las figuras 37 a 48 fueron realizados histogramas con la distribución de los radios de los poros grandes generados en distintos instantes y para distintos campos eléctricos aplicados y distintos radios. Sólo fueron graficados los poros grandes (mayores a 1 nm), que son los de interés.

Se observa que si bien se crean muchos poros, éstos se sellan rápidamente con el paso del tiempo: a los 5 ms del pulso en todos los casos la cantidad de poros es mucho menor en instantes anteriores, aunque los pocos poros grandes que siguen existiendo parecen tener mayor radio que la mayoría de los poros en los instantes anteriores. La corta vida de la mayoría de los poros parece deberse a que la alta densidad de los primeros instantes reduce significativamente la conductancia de la membrana, y por lo tanto el ITV necesario para mantener los poros abiertos.

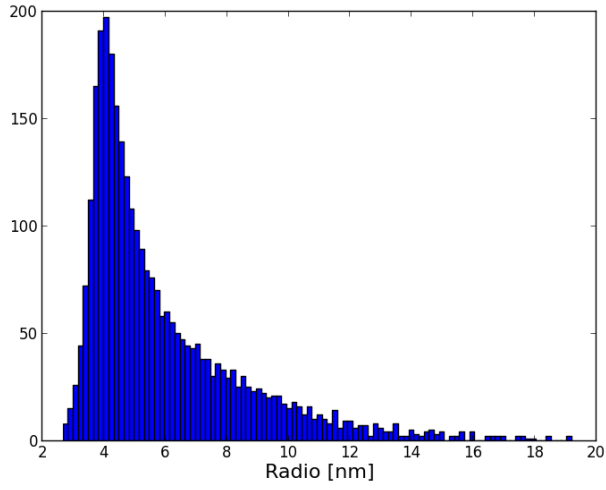


Figure 37: Distribución de radios en los poros grandes para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ en $t=5\mu\text{s}$

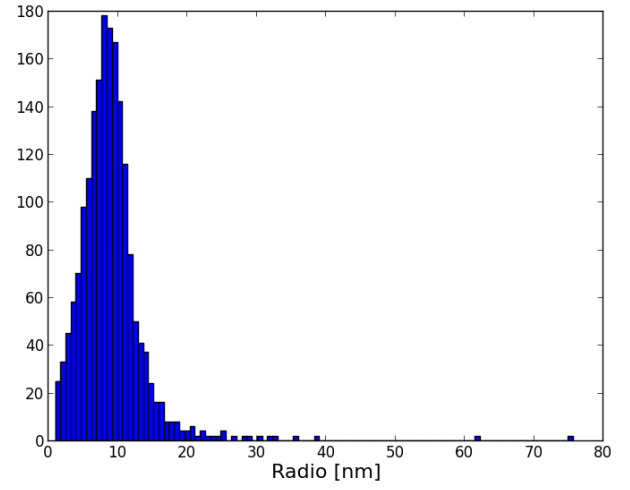


Figure 38: Distribución de radios en los poros grandes para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ en $t=100\mu\text{s}$

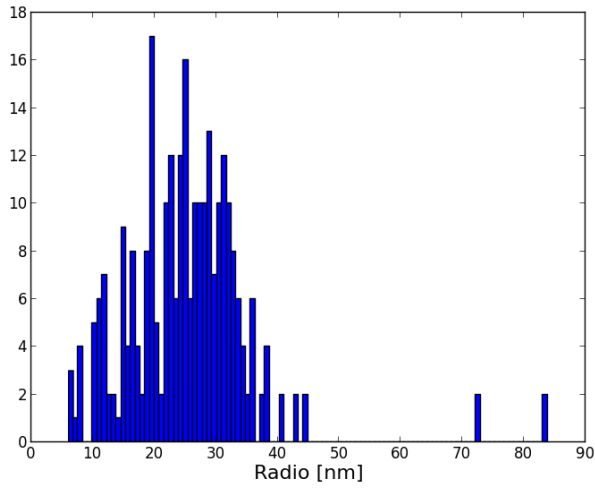


Figure 39: Distribución de radios en los poros grandes para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ en $t=1\text{ ms}$

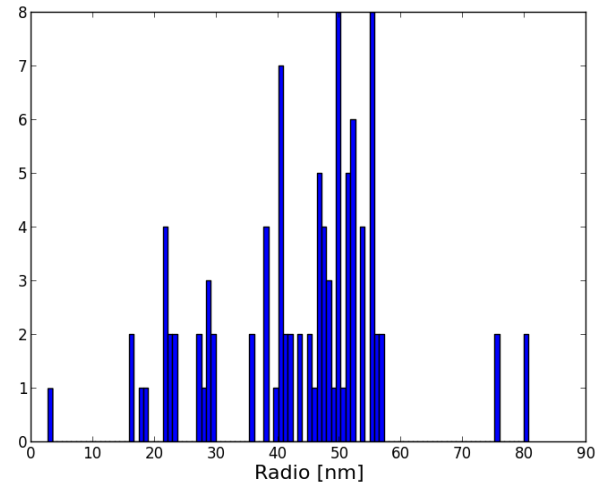


Figure 40: Distribución de radios en los poros grandes para $E=200\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$ en $t=5\text{ ms}$

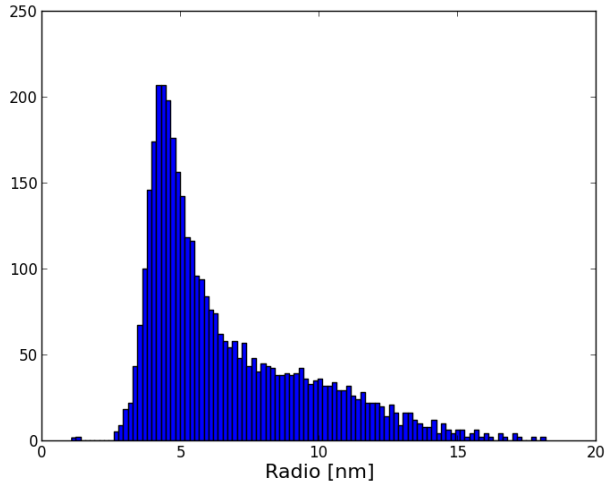


Figure 41: Distribución de radios en los poros grandes para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=5\mu\text{s}$

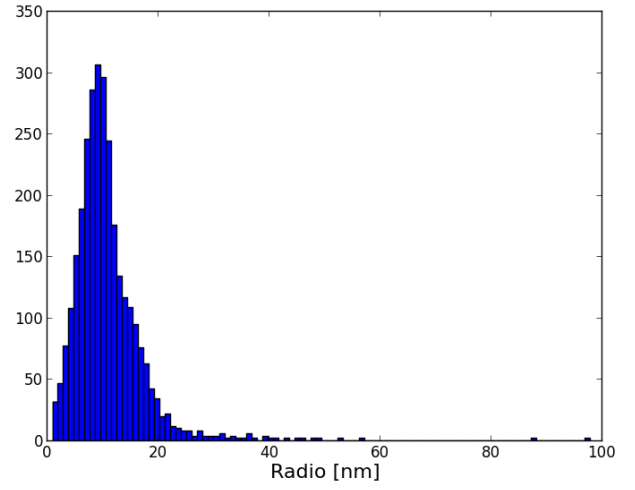


Figure 42: Distribución de radios en los poros grandes para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=100\mu\text{s}$

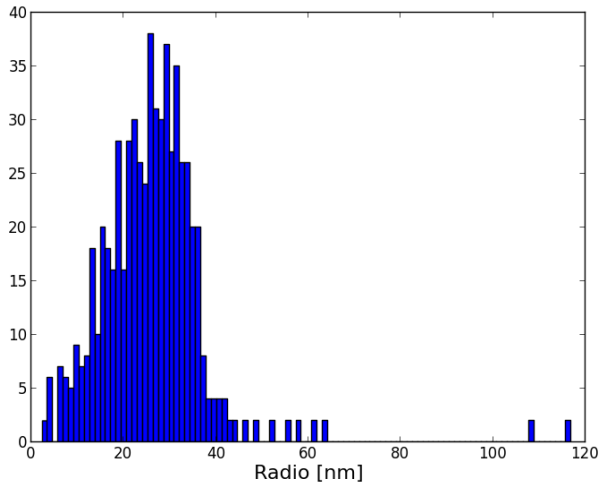


Figure 43: Distribución de radios en los poros grandes para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=1\text{ ms}$

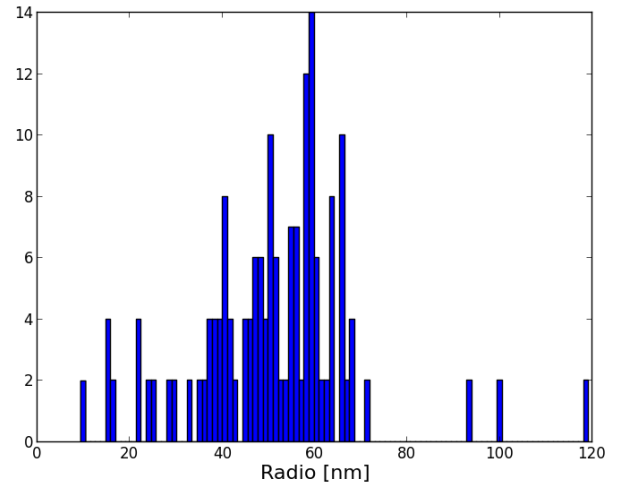


Figure 44: Distribución de radios en los poros grandes para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=5\text{ ms}$

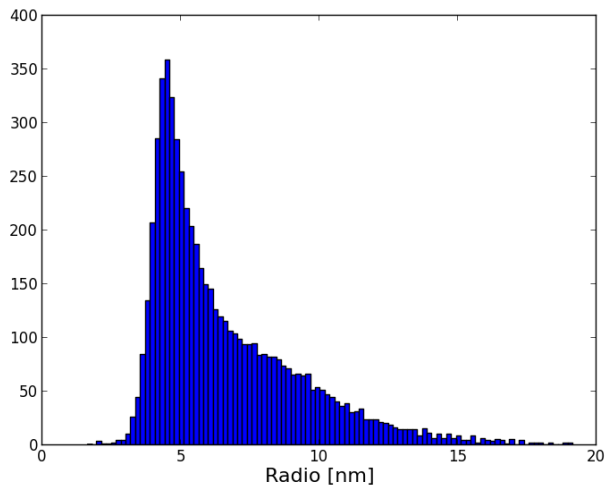


Figure 45: Distribución de radios en los poros grandes para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=5\mu\text{s}$

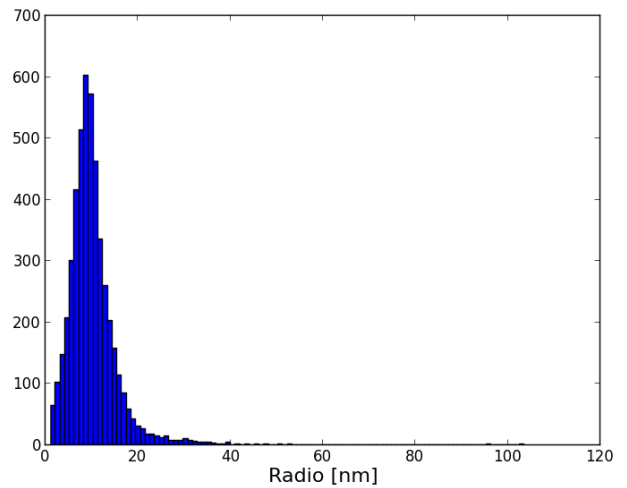


Figure 46: Distribución de radios en los poros grandes para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=100\mu\text{s}$

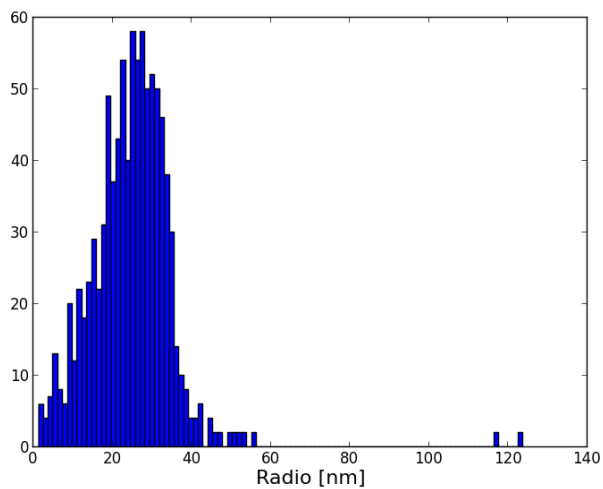


Figure 47: Distribución de radios en los poros grandes para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=1\text{ ms}$

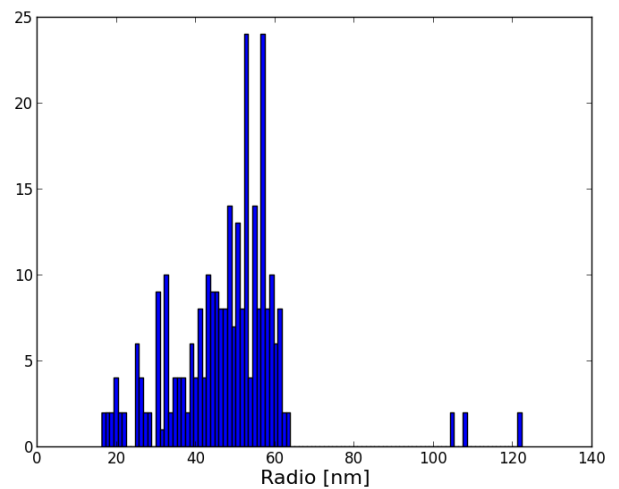


Figure 48: Distribución de radios en los poros grandes para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$ en $t=5\text{ ms}$

4.3 Transporte de especies

Se graficaron en las figuras 49 a 76 las concentraciones de las especies de interés en escala logarítmica para curvas de nivel $r = 0$, con los valores iniciales en azul y finales (luego del pulso de 20 ms) en rojo, ambos en escala logarítmica. Los valores de Y centrales corresponden al interior de la célula.

H^+ Se observa que el ión hidrógeno ingresa muy fácilmente a la célula, obteniendo concentraciones muy altas, con varios órdenes de magnitud mayores a las iniciales. Se observa también que el potencial aplicado incide considerablemente en la densidad de H^+ en el interior de la célula.

OH^- Se observa que se logra también el ingreso de grandes cantidades del anión hidróxido a la célula, en particular en las regiones depolarizadas, pero se requiere un campo eléctrico más grande. Por ejemplo, para una célula de $25\ \mu m$ se requieren $120\ kV\ m^{-1}$ para lograr el ingreso en concentraciones significativas.

Na^+ Se nota que el ingreso del catión sodio a la célula es mucho menor a los anteriores, requiriendo de potenciales mayores, al menos para un solo pulso de 20 ms. Para células de 25 o $50\ \mu m$ de radio se requiere un campo eléctrico de $200\ kV\ m^{-1}$ para lograr un ingreso significativo al interior, obteniendo incluso en ese caso concentraciones menores a las iniciales en las regiones hiperpolarizadas.

Cl^- Para células de $25\ \mu m$ o $50\ \mu m$ el anión cloruro ingresa en la célula con campos eléctricos de $160\ kV\ m^{-1}$ o $200\ kV\ m^{-1}$, con concentraciones mayores en el segundo caso y concentraciones mayores a las iniciales en toda la célula. Potenciales menores no producen el ingreso en cantidades significativas, e incluso reducen las concentraciones en algunas regiones.

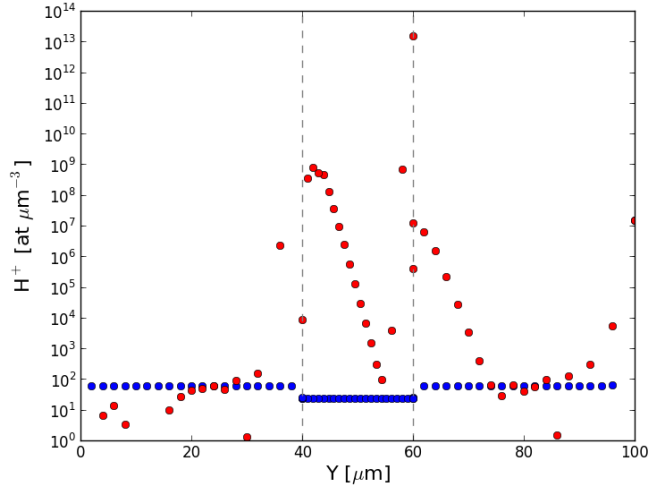


Figure 49: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=120KV/m$ y $\alpha=10\mu m$

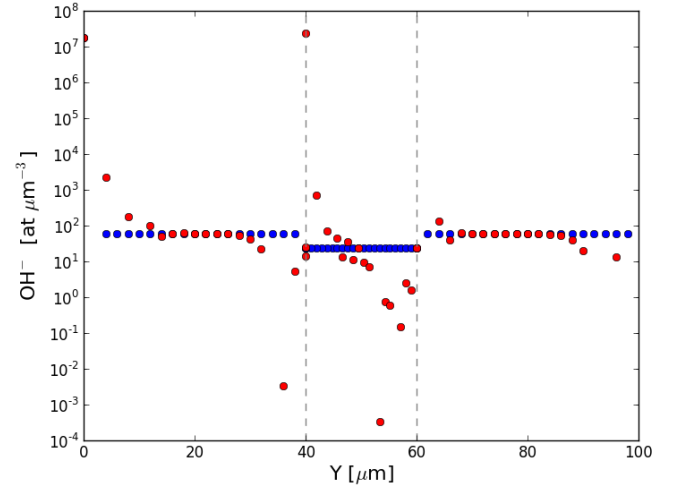


Figure 50: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=120KV/m$ y $\alpha=10\mu m$

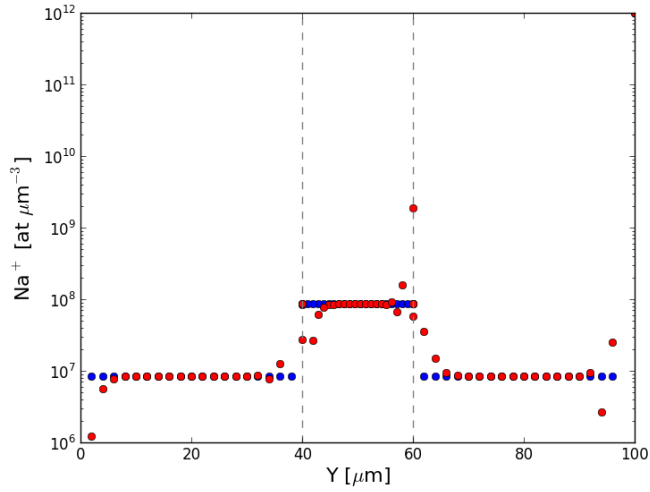


Figure 51: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=120KV/m$ y $\alpha=10\mu m$

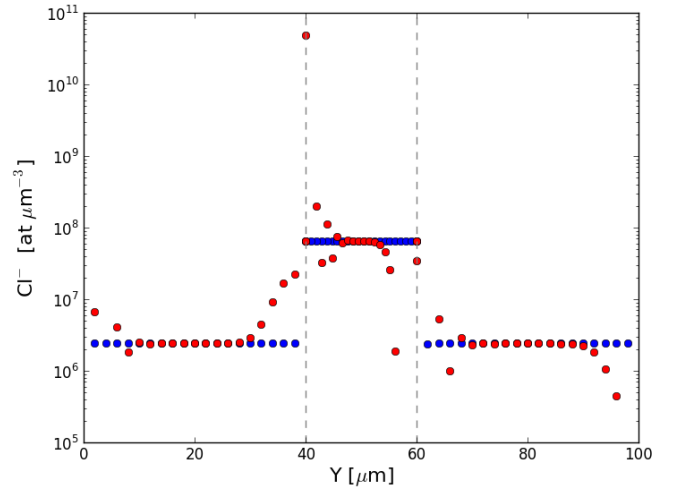


Figure 52: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=120KV/m$ y $\alpha=10\mu m$

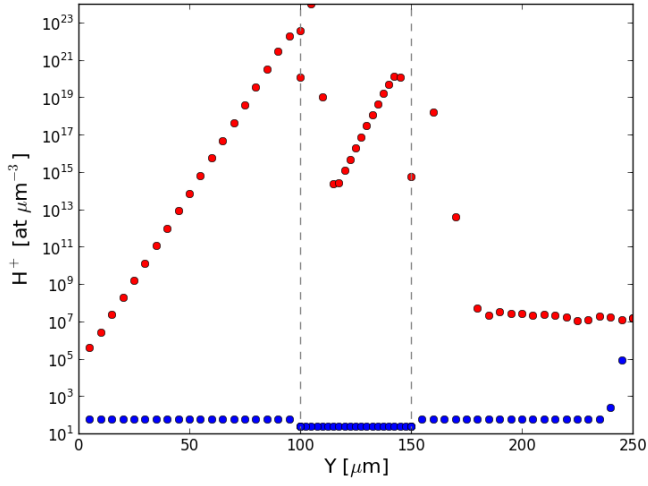


Figure 53: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

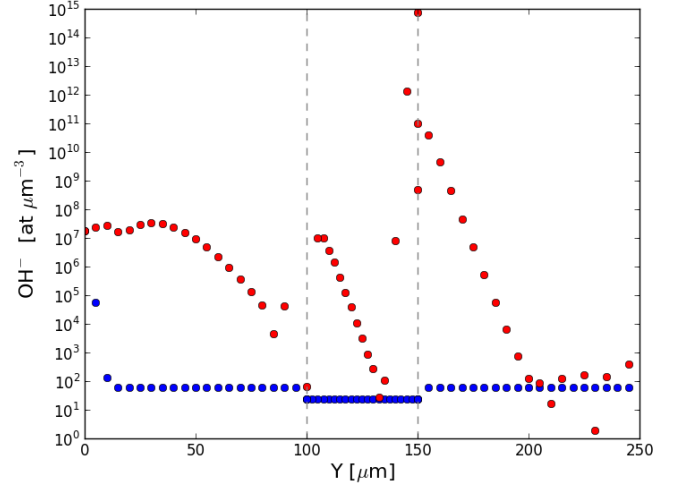


Figure 54: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

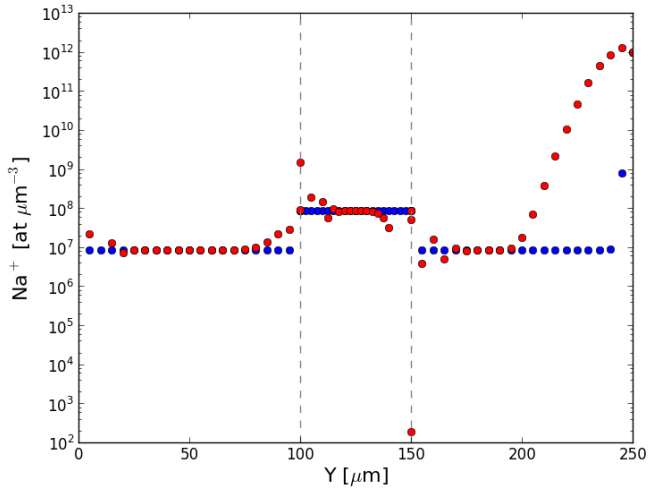


Figure 55: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

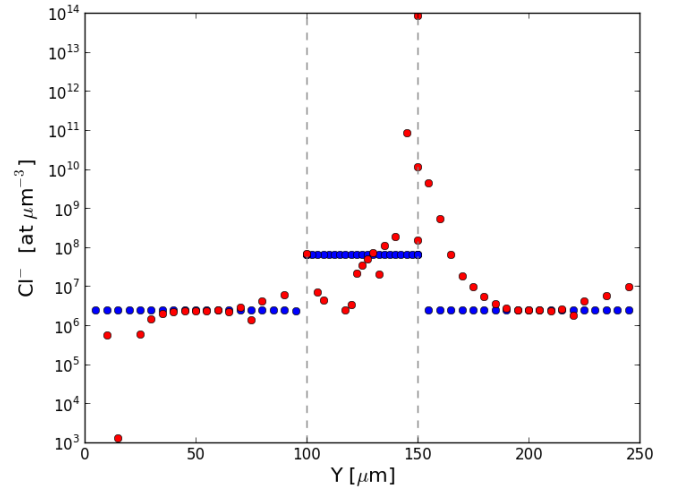


Figure 56: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=120\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

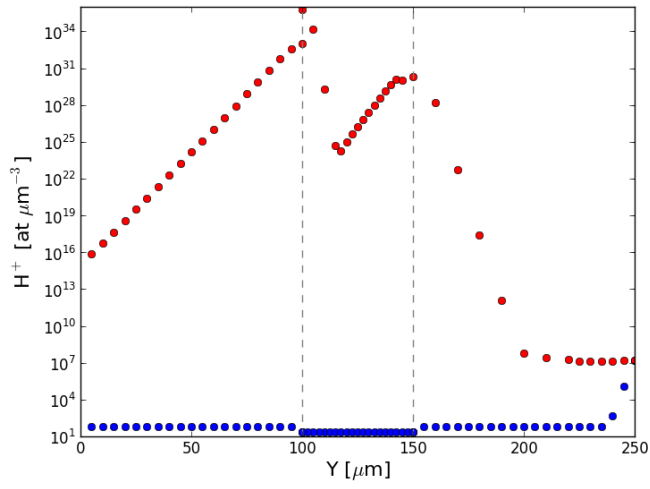


Figure 57: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

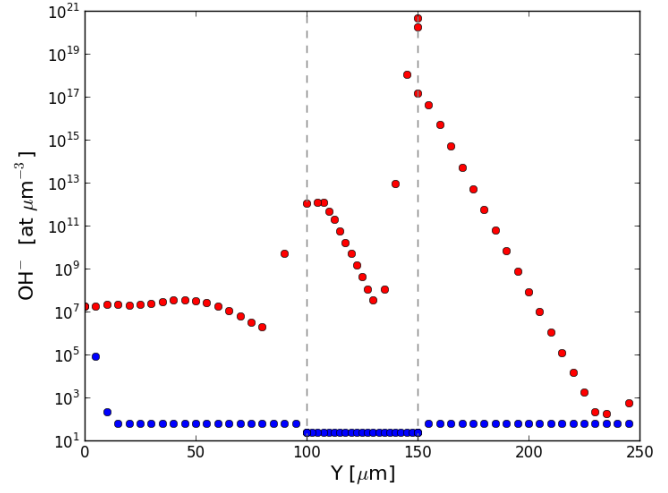


Figure 58: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

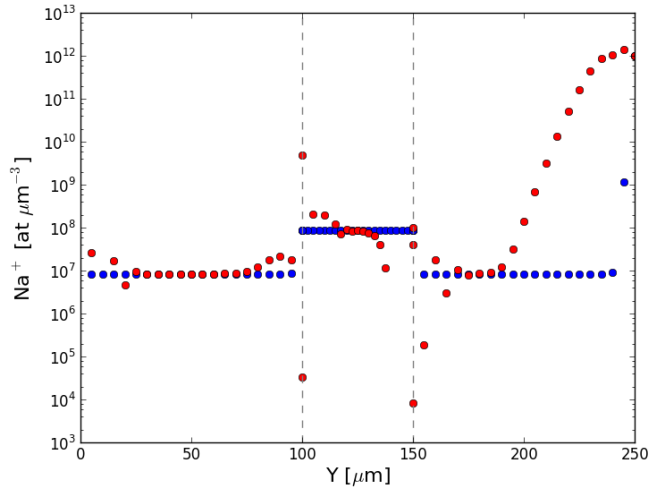


Figure 59: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

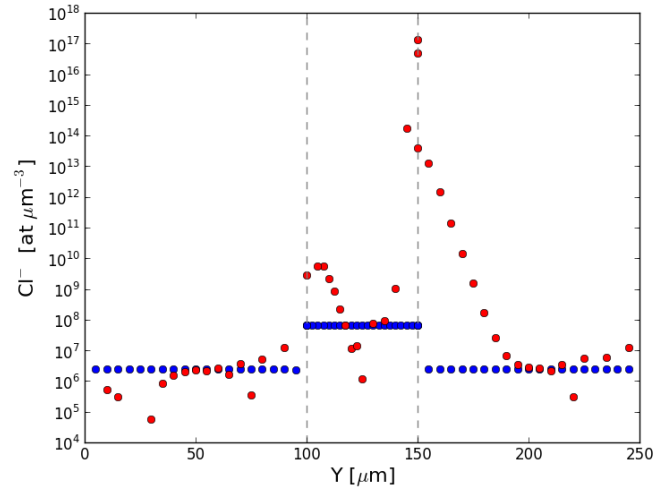


Figure 60: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=25\mu\text{m}$

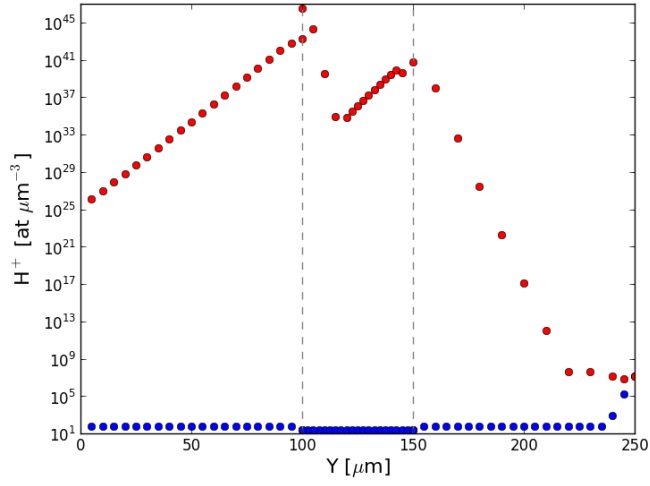


Figure 61: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=25\mu m$

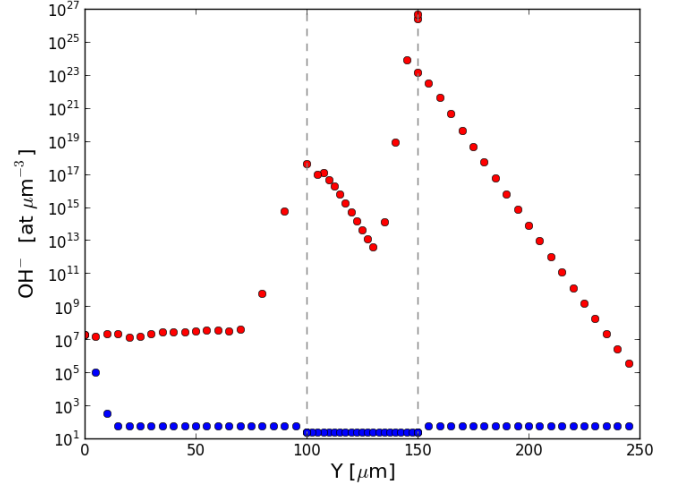


Figure 62: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=25\mu m$

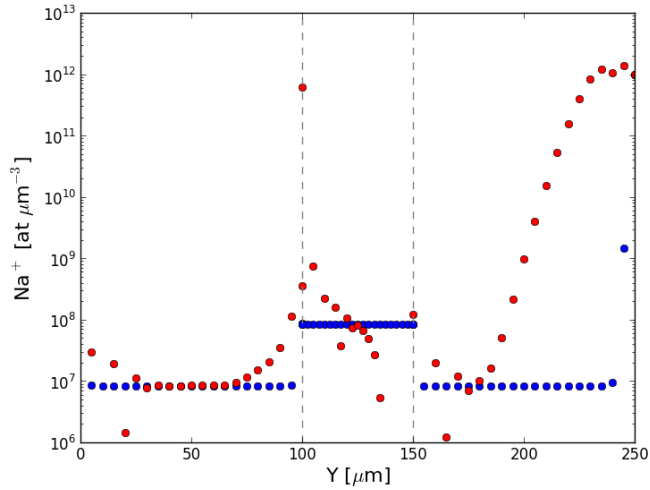


Figure 63: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=25\mu m$

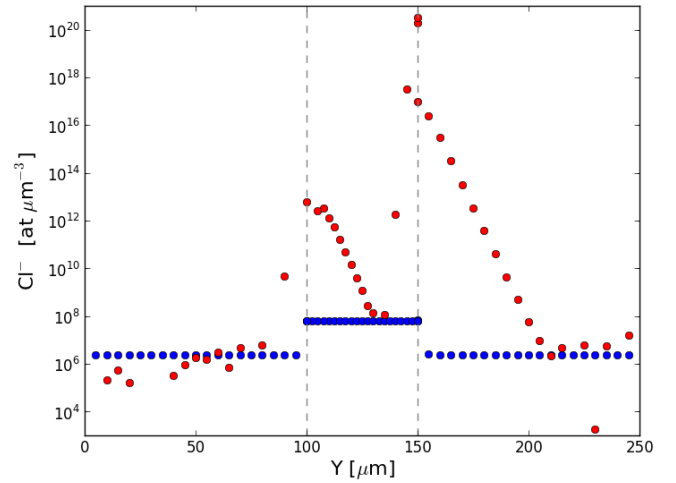


Figure 64: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=25\mu m$

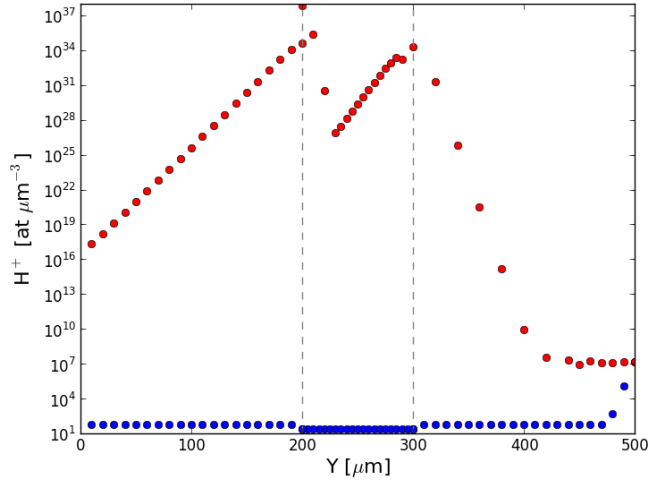


Figure 65: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

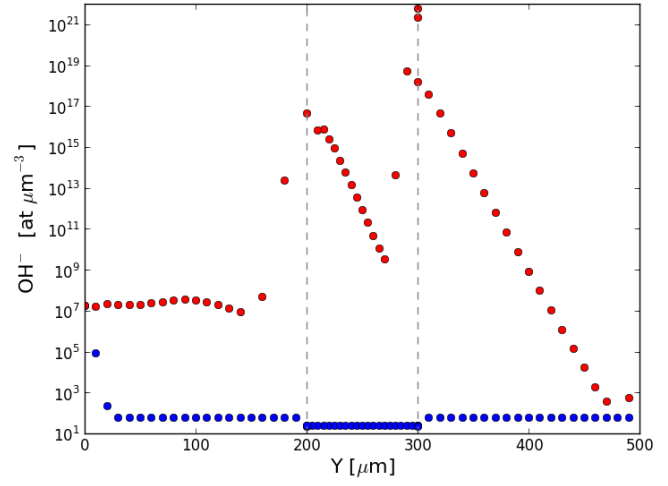


Figure 66: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

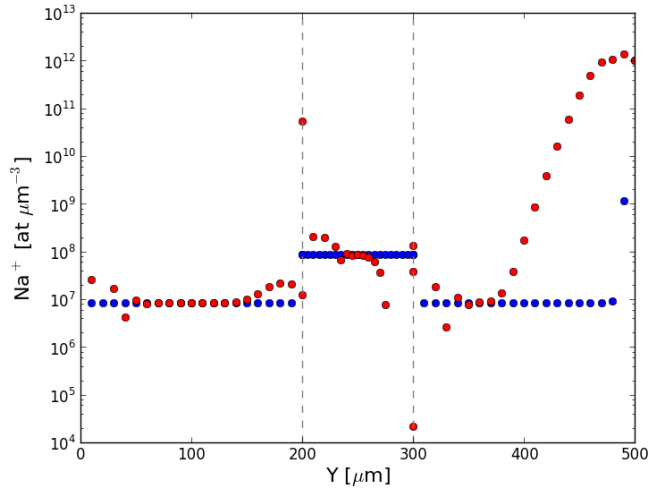


Figure 67: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

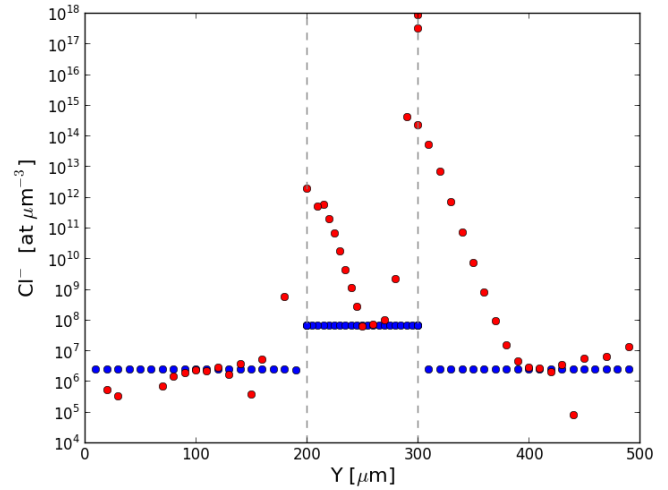


Figure 68: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=160\text{KV/m}$ y $\alpha=50\mu\text{m}$

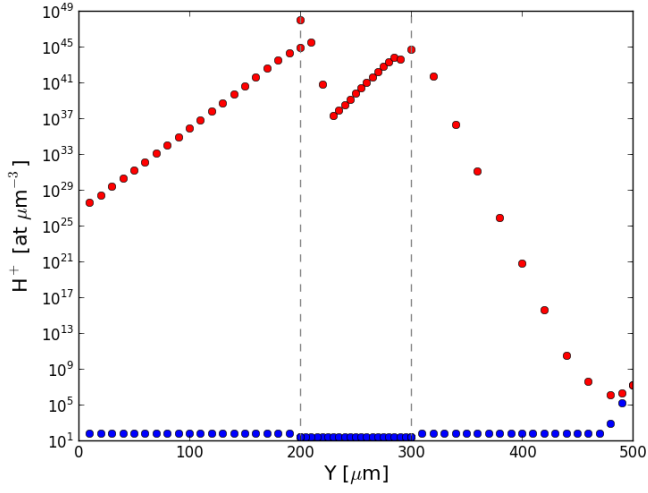


Figure 69: Concentraciones de H^+ en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=50\mu m$

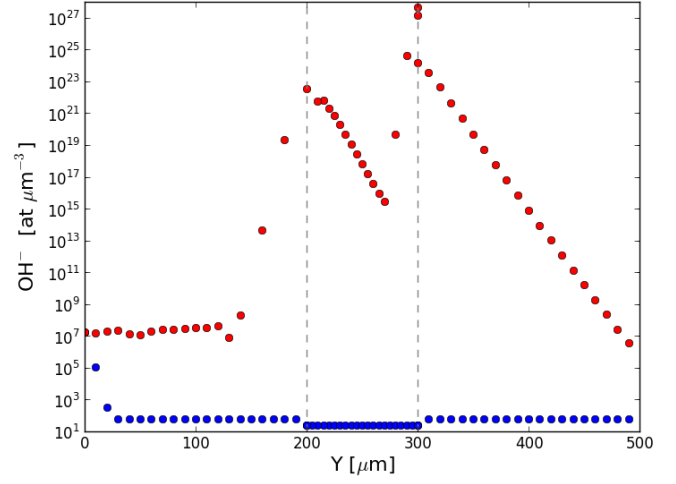


Figure 70: Concentraciones de OH^- en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=50\mu m$

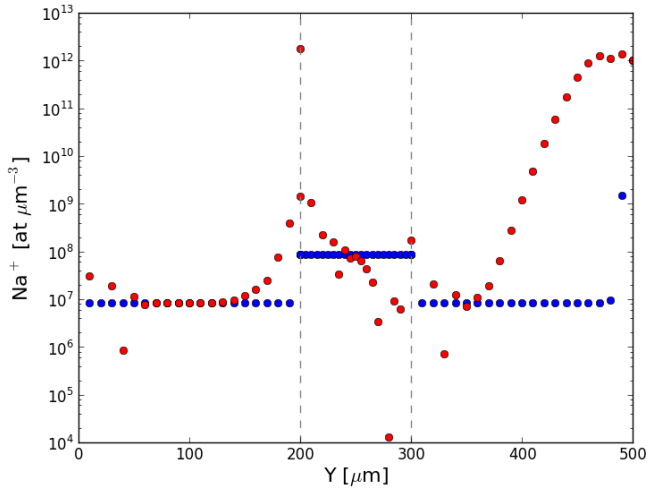


Figure 71: Concentraciones de Na^+ en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=50\mu m$

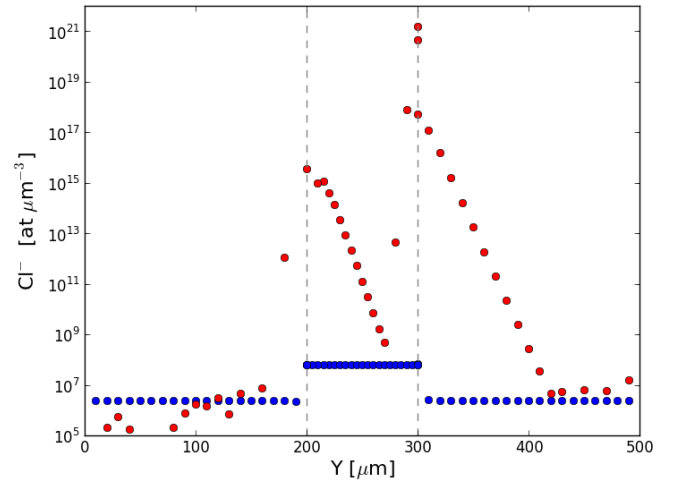


Figure 72: Concentraciones de Cl^- en $r=0$ para $E=200KV/m$ y $\alpha=50\mu m$

5 Conclusiones y trabajo futuro

Del trabajo realizado se concluye que es posible ingresar las especies de interés al interior de la célula con la ayuda de un pulso eléctrico para generar poros en la membrana celular e impulsar la migración de las especies. Sin embargo es necesario el uso de campos eléctricos con potencial muy alto para lograr el ingreso del sodio y cloruro a la célula, al menos para un único pulso de 20 ms.

Se tiene como primer resultado interesante que una vez alcanzado un potencial aplicado mínimo para generar poros, aplicar potenciales más grandes no aumenta el ITV, sino que sólo reduce el tiempo necesario para que la célula alcance un equilibrio entre el ITV y la densidad y tamaño de poros. Es decir, un mayor voltaje en los electrodos no produce un mayor ITV (una vez alcanzado un valor mínimo).

Otro resultado interesante es que la mayoría de los poros grandes creados permanecen abiertos por un tiempo muy pequeño y mucho antes de que las especies estudiadas lleguen a la membrana celular. Esto quiere decir que se produce una permeabilización considerable en la membrana, pero no parece servir al ingreso de especies. Otros tipos de pulsos podrían solucionar este problema, haciendo coincidir la llegada de las especies a la membrana con la creación de los poros.

Para el potencial transmembrana al comienzo del pulso se combinan los potenciales obtenidos por la ecuación de potencial eléctrico (1) con la fórmula 9 de carga de un capacitor. Esto significa que los potenciales obtenidos por el método de elementos finitos, usado para el transporte de especies, difieren de los potenciales usados para la creación y crecimiento de poros, usando dos sistemas de ecuaciones dos potenciales diferentes para un mismo instante, pudiendo afectar la precisión de los resultados. Sin embargo el efecto de la capacitancia de la membrana celular solo afecta durante los primeros microsegundos del pulso, como puede observarse en las imágenes de ITV en función del tiempo, en los cuáles el transporte de especies es casi nulo. Dado que la capacitancia de la célula no es muy grande, el valor de $(1 - e^{(-t/\tau)})$ en la fórmula 9 se hace rápidamente muy cercano a 1, y el efecto de la capacitancia se vuelve despreciable, eliminándose la discrepancia entre los potenciales usados para resolver la evolución de los poros y el transporte de especies. Sin embargo queda pendiente para el futuro obtener los resultados de potencial en todo el dominio modelando un sistema que tenga en cuenta la capacitancia de la membrana directamente en vez de usar la ecuación 1.

También queda pendiente simular distintos tipos de pulsos, en vez de variar sólo su potencial. Es posible que las especies Na^+ y Cl^- ingresen [?] al interior de la célula en mayores concentraciones o con campos eléctricos menores si se aplican pulsos de mayor duración o si se simulan varios pulsos en vez de uno solo.

References

- [1] G. Puchiar, T. Kotnik, B. Valič and D. Miklavčič *Numerical Determination of Transmembrane Voltage Induced on Irregularly Shaped Cells* Annals of Biomedical Engineering April 2006, Volume 34, Issue 4, Pages 642-652
- [2] Qiong Zheng, Duan Chen and Guo-Wei Wei *Second-order Poisson Nernst-Planck solver for ion channel transport* Journal of Computational Physics Volume 230, Issue 13, 10 June 2011, Pages 5239–5262
- [3] Wanda Krassowska and Petar D. Filev *Modeling Electroporation in a Single Cell* Biophysical Journal Volume 92, Issue 2, 15 January 2007, Pages 404–417
- [4] Stanley Humphries, Jr. *Finite-element Methods for Electromagnetics* 2010
- [5] O.C. Zienkiewicz and R.L. Taylor *The Finite Element Method Volume I: The Basis* Butterworth-Heinemann, 5th edition, 2000
- [6] Matías Daniel Marino, Dr. Pablo Turjanski, Dr. Nahuel Olaiz *Electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales* 2013