

Modelado de Electroporación Celular

Mauricio Alfonso - LSC, FCEyN

Alejandro Soba - CSC-CONICET

Guillermo Marshall - INFIP, CONICET



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.

Teoría

Se calcula el potencial eléctrico en el dominio usando la ecuación de Poisson:

$$\sigma_e \nabla^2 \phi = 0 \quad (1)$$

Se asume que la membrana celular se carga como un capacitor en paralelo con una resistencia, por lo tanto el potencial transmembrana crece según la ecuación:

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

El crecimiento de poros en las distintas regiones de la membrana celular se calcula con la ecuación:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \alpha_e e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2}} \right) \quad (3)$$

Cada uno de los poros creados tiene un radio variable que se calcula de manera independiente:

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \frac{D}{kT} \left(\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_a)} + \frac{4\beta}{r} \left(\frac{r_s}{r} \right)^4 - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{eff}r \right), \text{ con } \sigma_{eff} = 2\sigma' - \frac{2\sigma' - \sigma_0}{(1 - A_p/A)^2} \quad (4)$$

Para la concentración de las especies iónicas estudiadas (H^+ , OH^- , Na^+ y Cl^-) se usa la ecuación de Nernst-Planck que tiene en cuenta la difusión por gradiente de concentración y migración por efecto del campo eléctrico:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left(D_i \nabla C_i + D_i z_i \frac{F}{RT} C_i \nabla \phi \right) \quad (5)$$

La conductividad de la membrana se recalcula según el área ocupada por los poros:

$$\sigma_e = \sigma_m(1 - p) + \sigma_p p \quad (6)$$

Lo mismo se hace con la difusión:

$$D_{i,e} = D_i(1 - p) + D_p \quad (7)$$

Implementación

- Métodos de elementos finitos para potencial eléctrico (ecuación de Poisson) y transporte de especies
- Diferencias finitas para generación y evolución de poros
- Implementado en C++
- Malla con coordenadas cilíndricas (2D)
- Elementos cuadriláteros
- Descomposiciones Cholesky (para Poisson) y Bi-gradientes conjugados estabilizados (para transporte)
- OpenMP para acelerar llenado de matrices (Poisson) y resolución en transporte

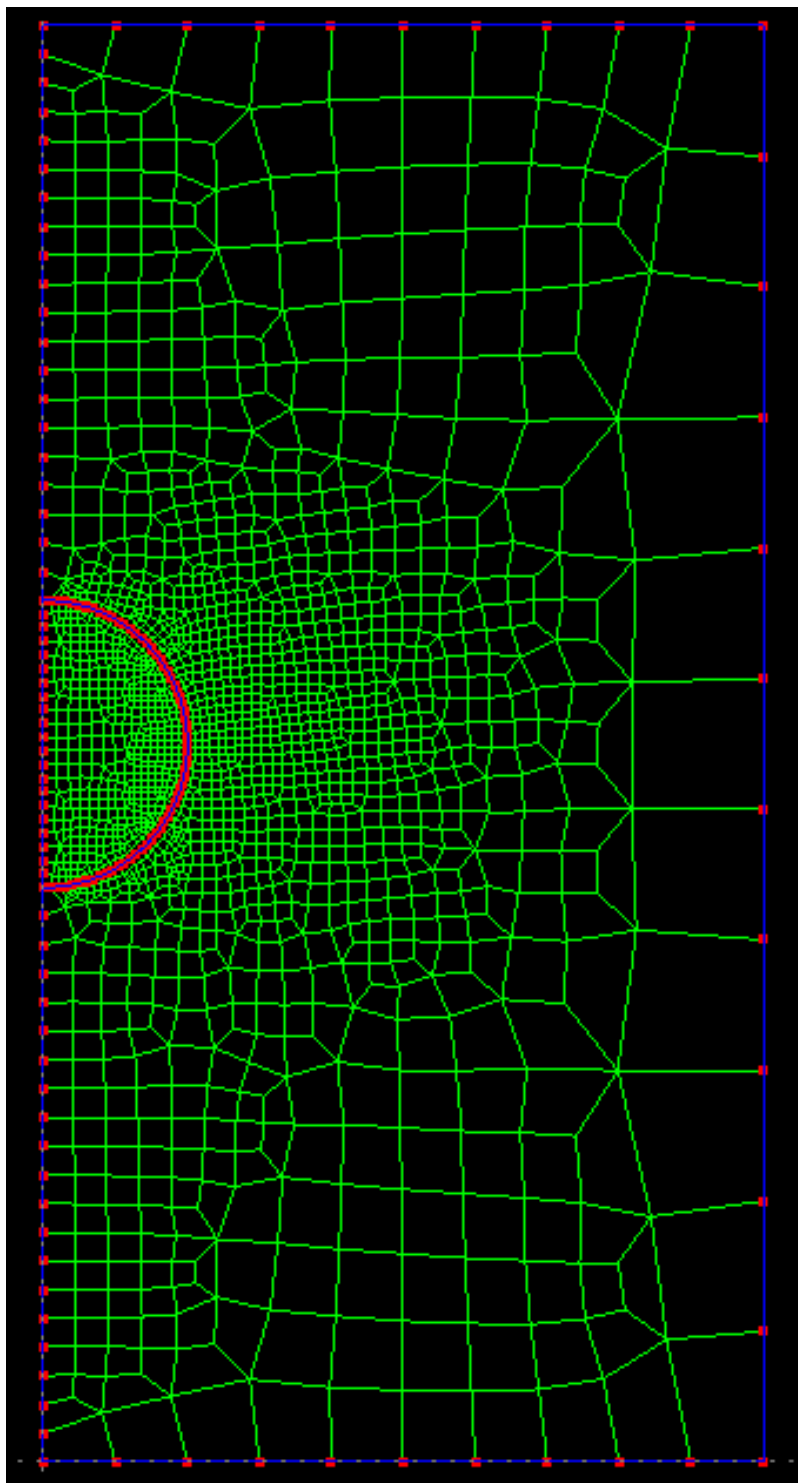


Figura 1: Ejemplo de mallado de un dominio de tres materiales con elementos de 4 nodos

Resultados

ITV en función del tiempo para diferentes ángulos:

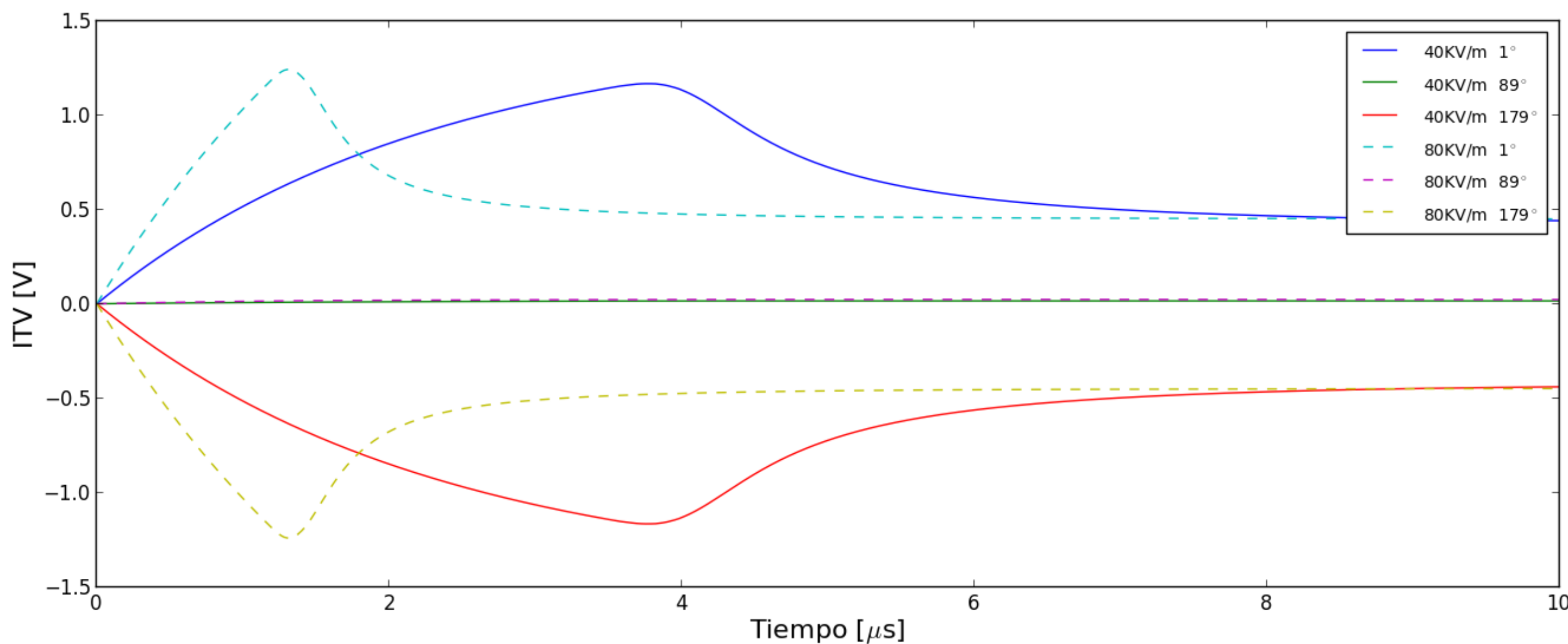


Figura 2: ITV para $\alpha = 25\mu m$ y dos potenciales diferentes

- 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.

ITV en función del ángulo para diferentes instantes

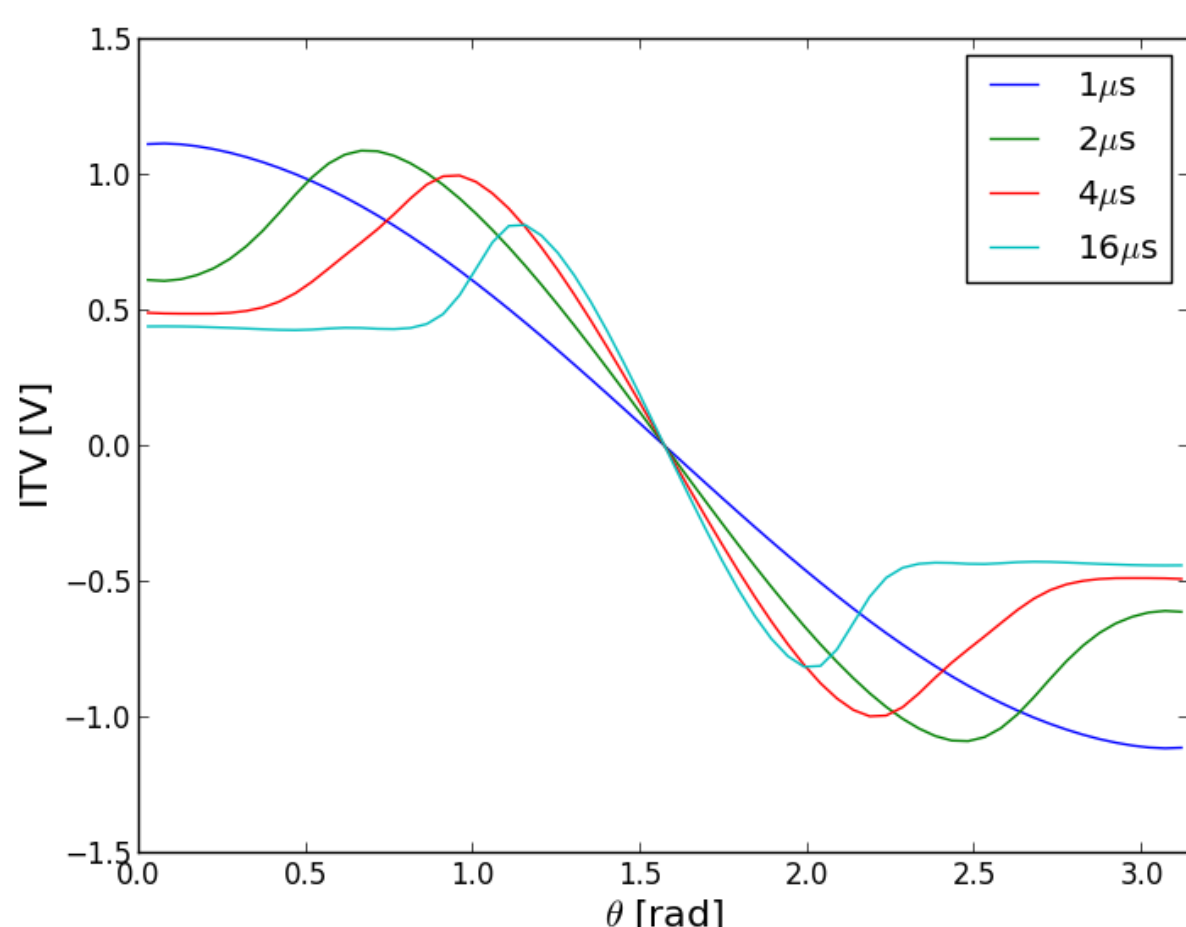


Figura 3: ITV para $\alpha = 50\mu m$ y $80kV m^{-1}$

Distribución de poros grandes según radio para distintos instantes de tiempo:

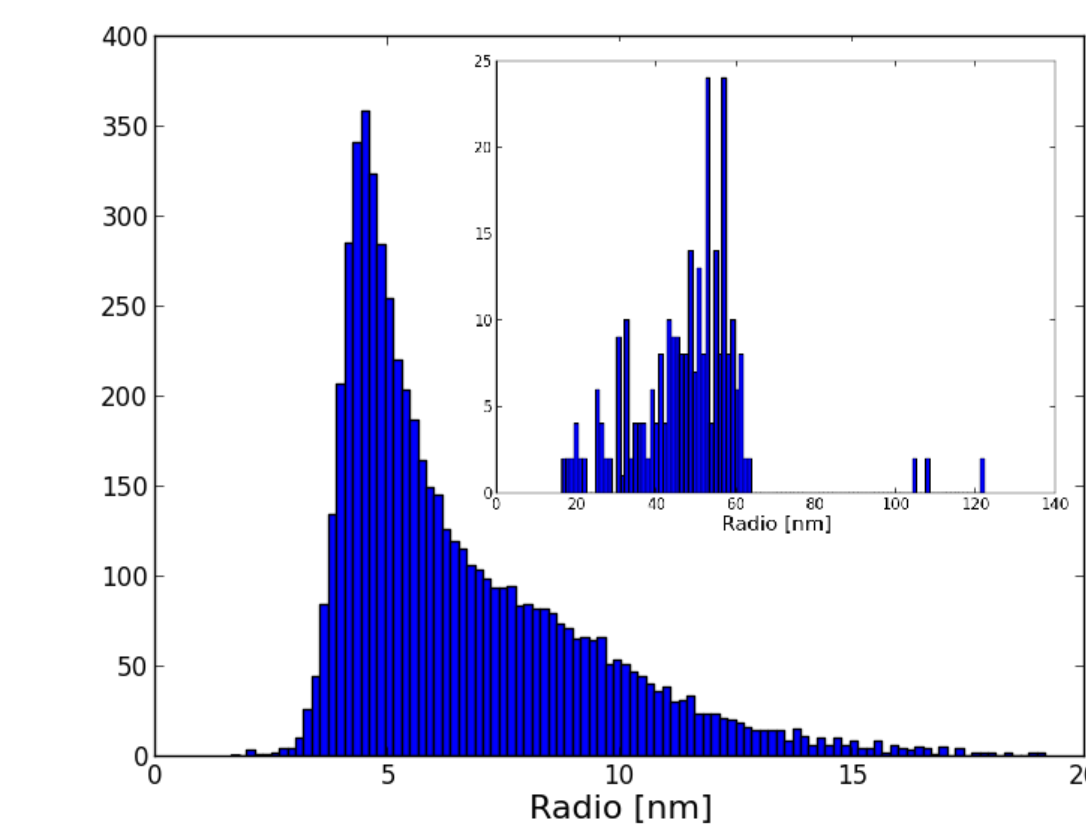


Figura 4: Radios de poros con $\alpha = 50\mu m$, $160kV m^{-1}$ para $t = 5\mu s$ y $5ms$

Para que se dé este proceso el campo eléctrico debe alcanzar un umbral mínimo. En los casos en los que el potencial necesario 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. El potencial transmembrana alcanzado casi no varía, influyendo el potencial aplicado solo en la velocidad en la que se producen las variaciones de ITV.

Concentraciones finales: Se analizó un caso con condiciones en los electrodos fijas y acumulación de especies iónicas en la membrana debido al ITV.

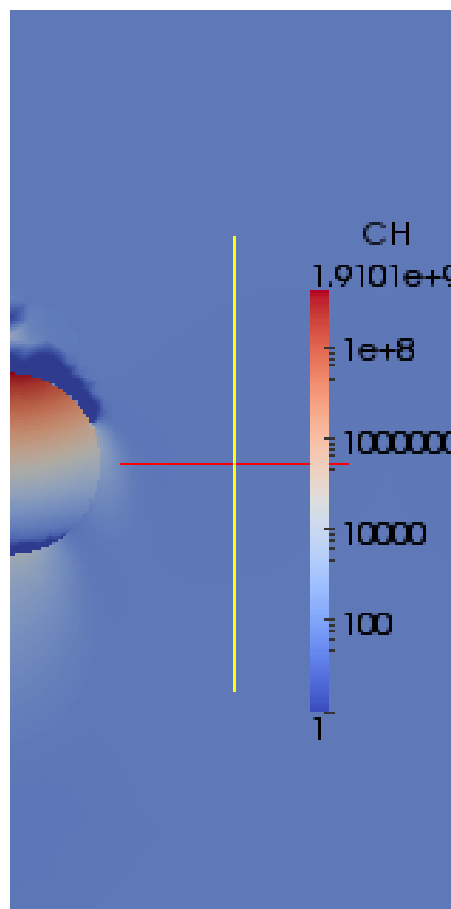


Figura 5: Concentración final de H^+

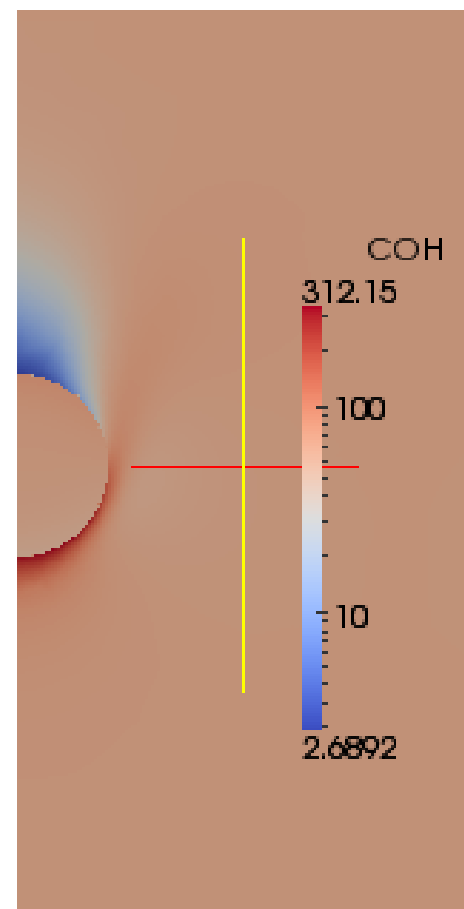


Figura 6: Concentración final de OH^-

Conclusiones

- Sólo los poros grandes (mayores a 1 nm), son de interés. 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 suelen tener mayor radio que la mayoría de los poros en los instantes anteriores. La corta vida de la mayoría de los poros puede 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.
- Las especies involucradas ingresan a la célula, pero los iones Na^+ y Cl^- requieren potenciales muy altos para ingresar ($200kV m^{-1}$ para células de 25 o 50 μm de radio).
- Los poros generados disminuyen la conductancia de la membrana, disminuyendo el ITV.
- El voltaje aplicado influye en la velocidad con la que se crean los poros, pero no aumenta el ITV, siempre que se alcance un valor mínimo, encontrado en $80kV m^{-1}$ para células de 10 μm de radio en las simulaciones realizadas.
- La mayoría de los poros creados se cierran muy rápidamente; antes de que lleguen las especies, luego no sirven para permeabilizar la membrana.
- Un alto porcentaje de los poros creados se cierran durante el primer milisegundo, por lo que si se pretende permeabilizar la membrana para las especies analizadas, se vuelve esencial repetir el pulso de potencial periódicamente.

Referencias

- 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
- Wanda Krassowska and Petar D. Filev *Modeling Electroporation in a Single Cell* Biophysical Journal Volume 92, Issue 2, 15 January 2007, Pages 404–417
- Jianbo Lia, Wenchang Tanb, Miao Yua, Hao Lina *The effect of extracellular conductivity on electroporation-mediated molecular delivery* Biochimica et Biophysica Acta 1828 (2013) 461–470