

Estudio de los Mecanismos Básicos de Electroporación a Través de la Modelación Numérica

Trabajo para optar por el título de
Licenciado en Ciencias de la Computación

Mauricio Alfonso

Departamento de Computación
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

11 de mayo de 2015

Electroporación

- La **Electroporación** o **Electropermeabilización (EP)** consiste en la aplicación de pulsos eléctricos a una membrana biológica con el objetivo de incrementar su permeabilidad.
- De esta manera se facilita el ingreso de agentes terapéuticos a una célula.
- En la medicina se utiliza EP en la electroquimioterapia (ECT), la electrotransferencia génica (GET) y la electroporación irreversible (IRE).
- También tiene aplicaciones en el procesamiento de alimentos y la gestión ambiental.

Modelo

En esta tesis se simula numéricamente la aplicación de pulsos eléctricos a un dominio que contiene a una célula y se estudia su respuesta eléctrica, la permeabilización lograda y el transporte de especies iónicas.

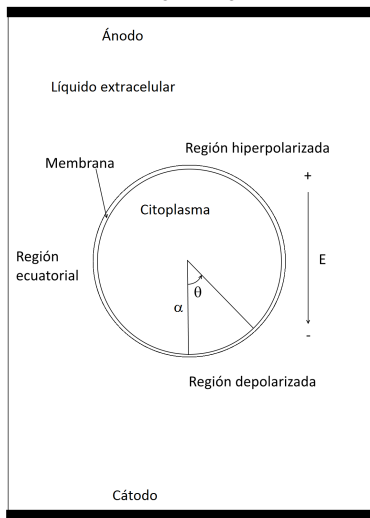
Se estudiaron tres tipos de fenómenos físicos por separado:

- El potencial eléctrico en todo el dominio
- La creación y evolución de poros en la membrana celular
- El transporte de especies iónicas

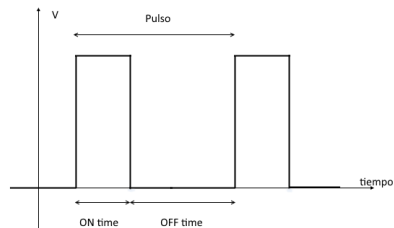
Por último se analizaron todos los fenómenos acoplados.

Modelo

Dominio:



Pulso:



Detalles

- Células esféricas de entre 10 y 50 μm de radio.^{1,2}
- Membrana celular de 5 nm de espesor.³
- Pulsos eléctricos de pocos milisegundos de duración, que generan campos de hasta 2000 V/cm.⁴
- Se considera un modelo donde la densidad de poros en la membrana celular y sus radios dependen del potencial transmembrana.¹
- Se estudia la evolución de la concentración de 4 especies iónicas: H^+ , OH^- , Na^+ y Cl^- .

¹Biophysical journal, 92(2), 404-417, 2007.

²Annals of biomedical engineering, 34(4), 642-652, 2006.

³Bioelectrochemistry 82, 10-21, 2011.

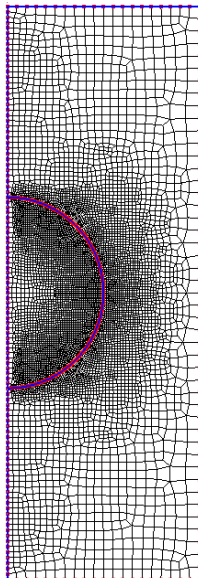
⁴Biophysical journal, 98(11), 2506-2514, 2010.

Métodos Computacionales

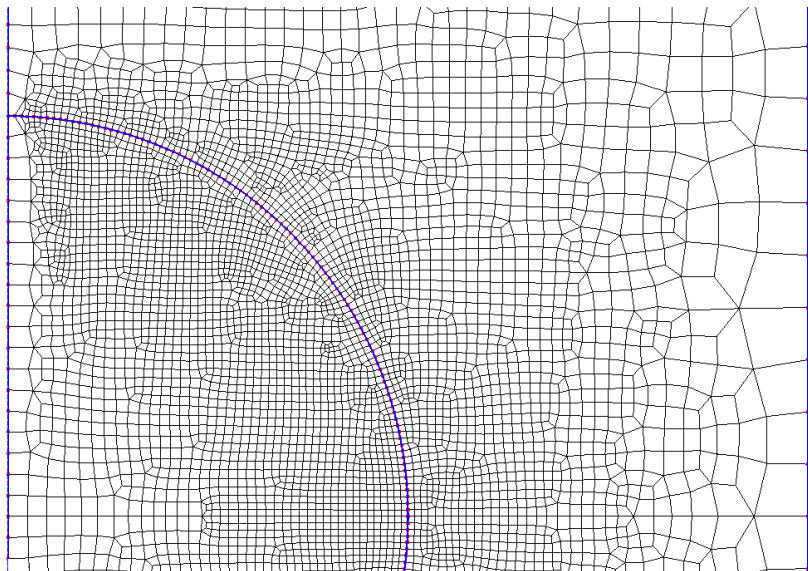
- Se implementaron las simulaciones desde cero en **C++**.
- Se utiliza principalmente el **Método de Elementos Finitos** y en menor medida diferencias finitas.
- Se modela la membrana explícitamente, en lugar de considerarla una condición de borde.
- Se trabaja en un dominio bidimensional con coordenadas cilíndricas.
- Se hizo uso de la biblioteca de álgebra lineal **Eigen** para C++.
- Descomposiciones **BiCGSTAB** y **LDL** con matrices esparsas para resolver los sistemas de ecuaciones del método de elementos finitos.
- Se paralelizaron partes del código en varios hilos con **OpenMP**.
- Adicionalmente se utilizó **Python** y la biblioteca **matplotlib** para procesar las salidas.

Mallado

- Coordenadas cilíndricas (2D)
- Elementos cuadrilaterales
- Tamaño variable de los elementos
- Generadas con AutoMesh2D
- Entre 7000 y 9000 elementos según la malla

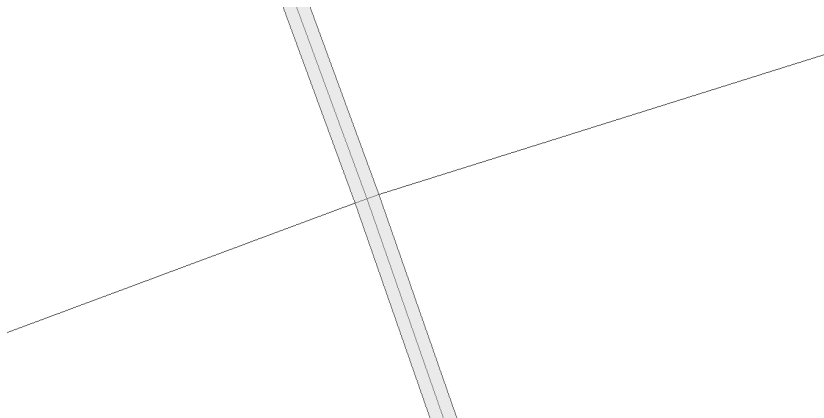


Mallado (detalle)



Mallado (membrana)

La membrana se modela explícitamente en la malla con dos elementos de ancho en la dirección radial.



Potencial Eléctrico

Ecuación de Poisson:

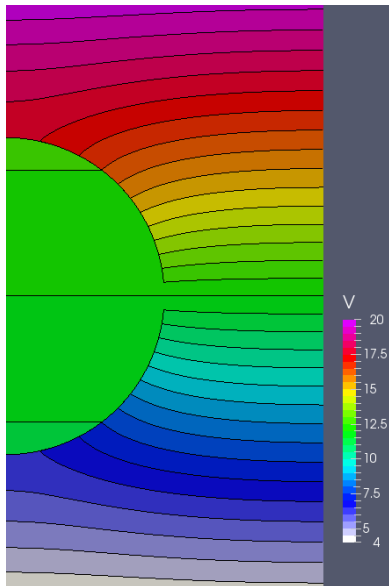
$$\nabla(\sigma_{elem} \cdot \nabla \phi) = 0$$

Condiciones de borde de Dirichlet en los electrodos y de Neumann en el borde restante.

La solución analítica del potencial transmembrana (PTM) puede aproximarse como:

$$PTM^{\theta} = f_s E \alpha \cos(\theta)$$

Potencial Eléctrico



Ejemplo para $E = 1600 \text{ V/cm}$

$$\alpha = 25 \text{ } \mu\text{m}$$

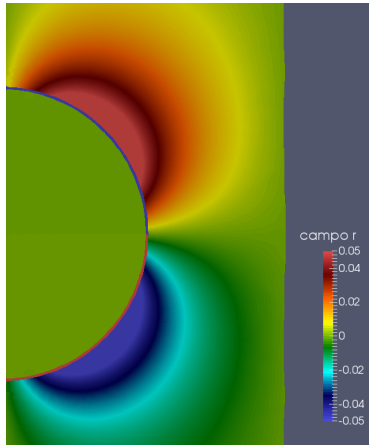
$$\sigma_o = 0.20 \text{ S/m}$$

$$\sigma_i = 0.15 \text{ S/m}$$

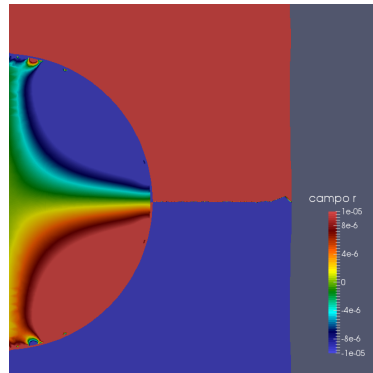
$$\sigma_m = 5 \times 10^{-6} \text{ S/m}$$

Campo eléctrico (componente horizontal)

En el exterior:

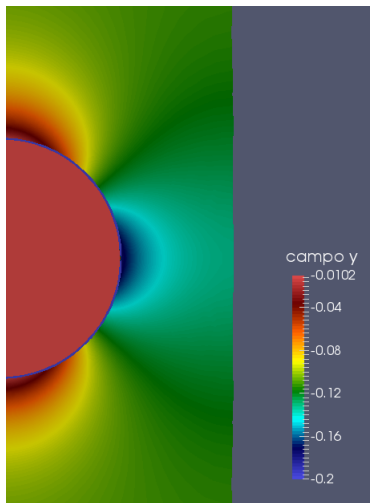


En el interior:

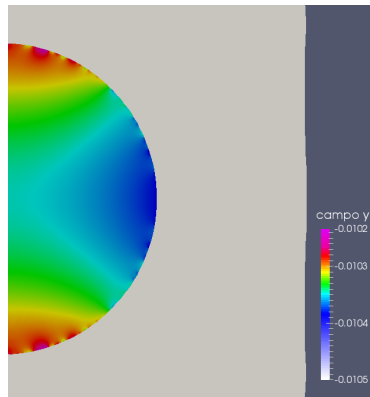


Campo eléctrico (componente vertical)

En el exterior:

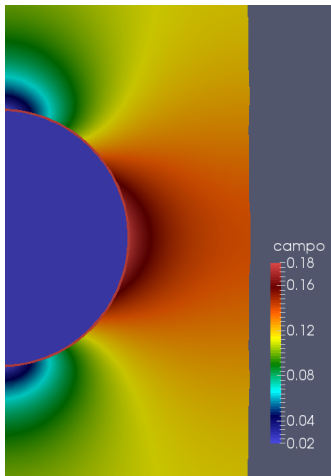


En el interior:

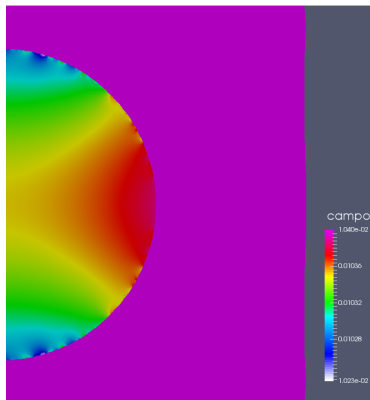


Campo eléctrico (módulo)

En el exterior:

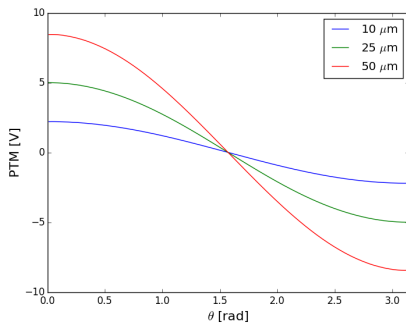


En el interior:

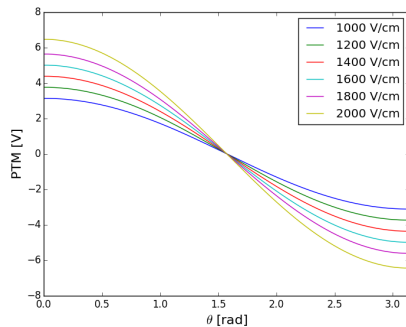


Potencial Transmembrana

Para diferentes radios:



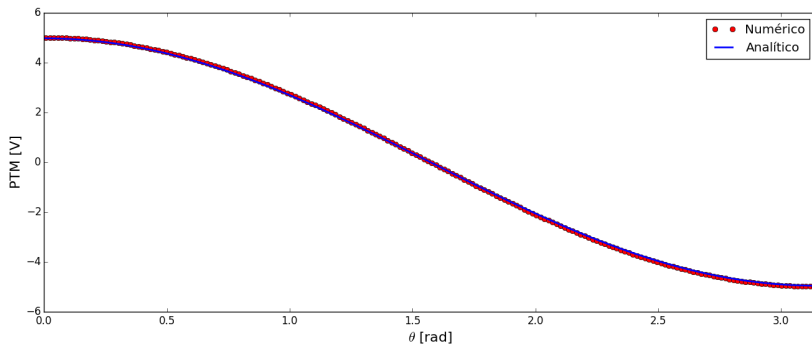
Para diferentes potenciales aplicados:



Potencial Transmembrana

Comparación entre simulación y solución analítica

$$PTM^{\theta} = f_s E \alpha \cos(\theta)$$



$$E = 1600 \text{ V/cm y } \alpha = 25 \text{ } \mu\text{m}$$

Generación y evolución de poros en la membrana

Densidad de poros:

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

Radios de los poros:

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

con

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

Generación y evolución de poros en la membrana

Se asume que la membrana se carga como un capacitor y una resistencia en paralelo:

$$PTM = V_p (1 - e^{-t/\tau}),$$

donde $\tau = \alpha C_m \left(\frac{1}{\sigma_i} + \frac{1}{2\sigma_o} \right)$

Se actualizan los valores de conductividad de la membrana:

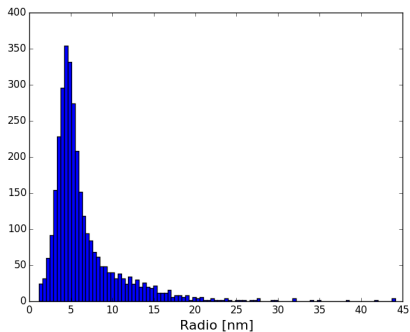
$$\sigma_{\text{elem}} = \sigma_m(1 - p) + \sigma_p p$$

Y se actualizan los valores de difusión de la membrana:

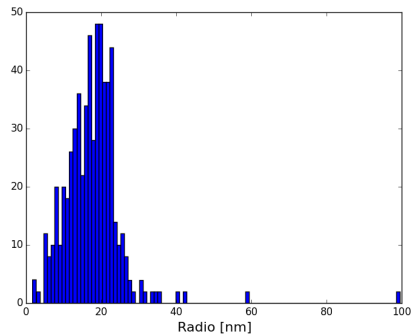
$$D_{\text{elem}} = D_m(1 - p) + D_p p$$

Densidades de radios para 1200 V/cm

En $t = 20 \mu\text{s}$:

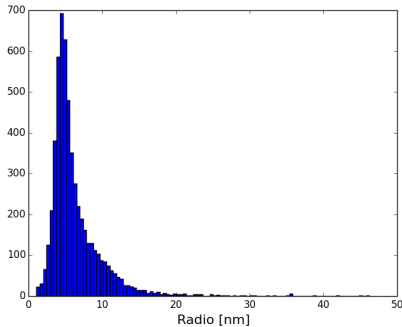


En $t = 500 \mu\text{s}$:

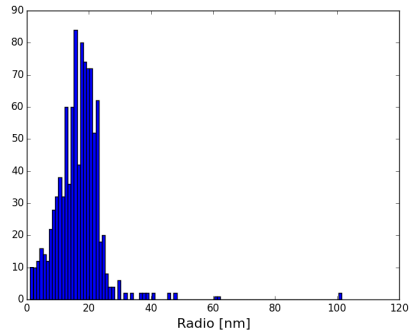


Densidades de radios para 1600 V/cm

En $t = 20 \mu\text{s}$:



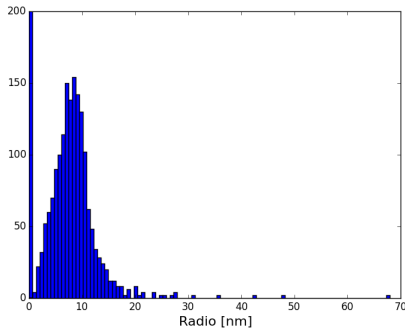
En $t = 500 \mu\text{s}$:



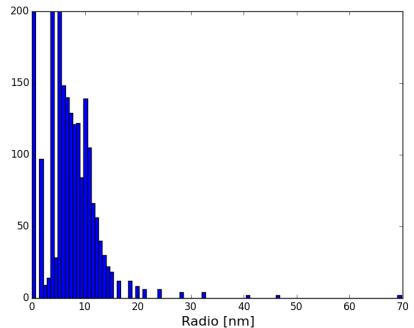
Densidades de radios con varios pulsos

Para $E = 1600 \text{ V/cm}$ y $\alpha = 25 \text{ }\mu\text{m}$

Primer pulso:

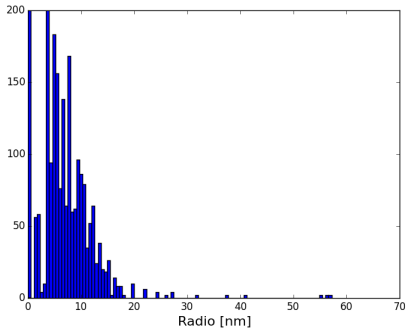


Segundo pulso:

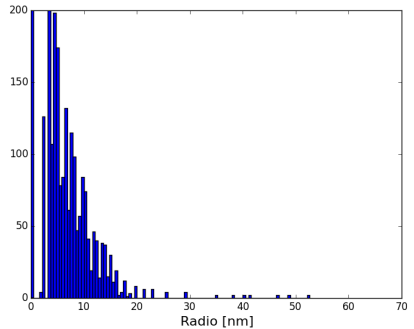


Densidades de radios con varios pulsos

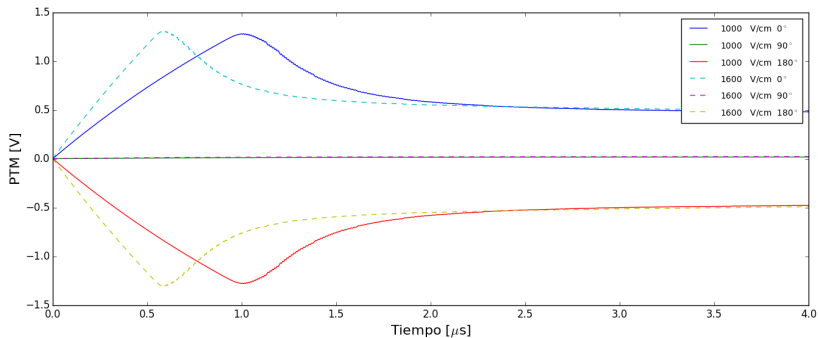
Tercer pulso:



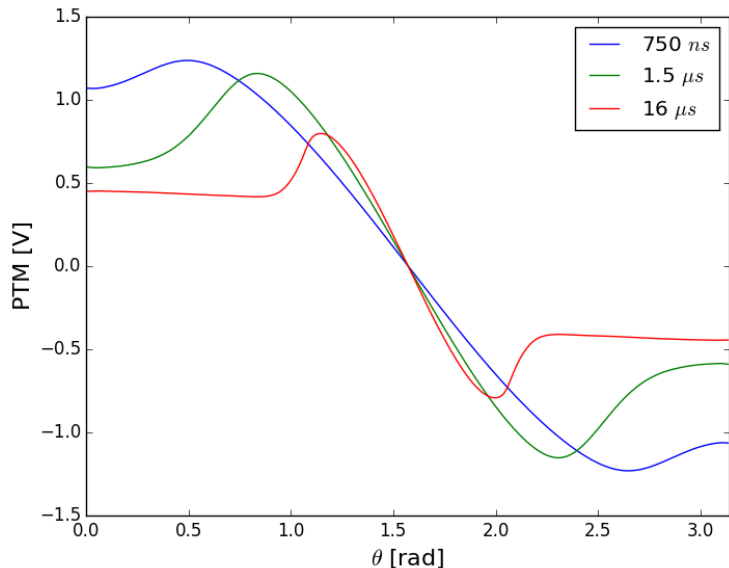
Cuarto pulso:



PTM en función del tiempo



PTM en función del ángulo polar para $E = 1600 \text{ V/cm}$



Cálculo del transporte de especies en el dominio y a través de la membrana

Se sigue la ley de Nernst-Planck:

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

Para $i = \text{H}^+, \text{OH}^-, \text{Na}^+ \text{ ó } \text{Cl}^-$.

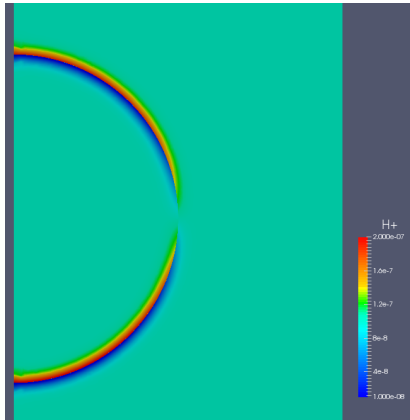
Condiciones de contorno de Dirichlet para los electrodos y Neumann para el borde restante. Concentraciones molares de especies en $t = 0$:

Especie	H^+	OH^-	Na^+	Cl^-
Interna	$0.3978 \times 10^{-7} \text{ M}$	$0.3978 \times 10^{-7} \text{ M}$	142 mM	108 mM
Externa	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$14 \times 10^{-7} \text{ mM}$	$4 \times 10^{-7} \text{ mM}$

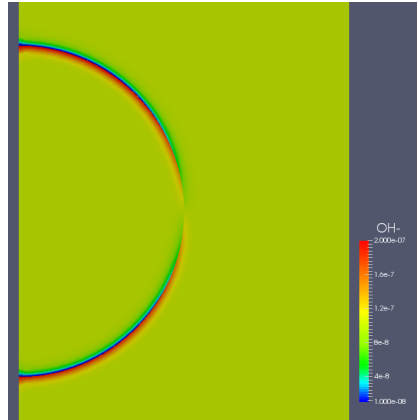
Concentraciones

Concentraciones para un pulso de 100 V/cm en $t = 380 \mu\text{s}$

H^+

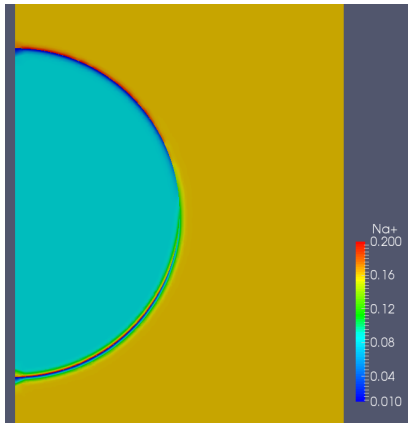


OH^-

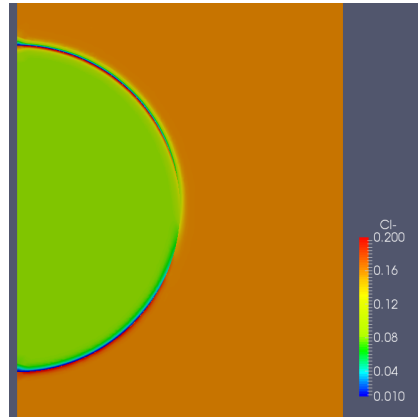


Concentraciones

Na^+



Cl^-



Modelo acoplado

Se acoplaron todos los fenómenos físicos anteriores en una sola simulación y se obtuvieron resultados muy diferentes de concentraciones de especies.

Poros Cálculo de población de poros y sus radios individuales, además de cómo afecta las constantes de conductividad y difusión de la membrana celular. Se utiliza un intervalo temporal constante de 1 ns.

Potencial Cálculo del potencial eléctrico en todo el dominio, con un intervalo temporal dinámico:

$$\Delta_t = 2\mu\text{s} (1 - e^{t/-217\text{ns}})$$

Transporte Cálculo de las concentraciones de especies en el dominio. Se utiliza un intervalo temporal constante de 200 ns.

Modelo acoplado

- El campo eléctrico influye en la creación de poros y en la evolución de sus radios, a través del potencial transmembrana.
- Los poros disminuyen la conductividad de la membrana, influyendo en los resultados de campo eléctrico.
- El campo eléctrico influye en los resultados de transporte de especies.
- Los poros también influyen en el transporte de especies disminuyendo la difusión de la membrana.

Concentraciones con un pulso



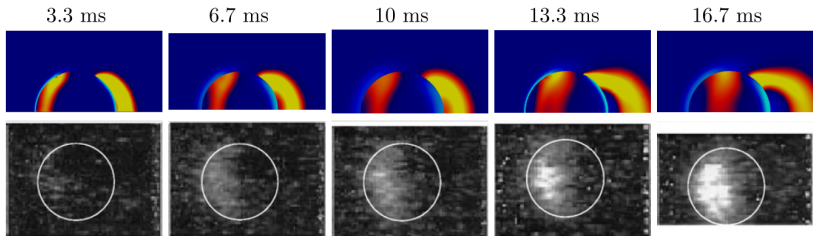
Para un pulso de 5 ms con $E = 1600 \text{ V/cm}$ y $\alpha = 25 \text{ }\mu\text{m}$

Concentraciones con varios pulsos



Para 4 pulsos de 5 ms con $E = 1600 \text{ V/cm}$ y $\alpha = 25 \text{ }\mu\text{m}$

Comparación con resultados experimentales⁵



⁵Biophysical journal, 76(4), 2158-2165, 1999.

Escalabilidad

Se utiliza OpenMP:

- Para llenar en paralelo la matriz usada en el método de elementos finitos para resolver la ecuación de potencial eléctrico.
- Para resolver en paralelo las ecuaciones de transporte de las 4 especies iónicas diferentes.

Resultados de escalabilidad:

	1 thread	2 threads	3 threads	4 threads
Tiempo [s]	1995	1331	1489	1233
Speedup	1	1.50	1.34	1.63
Eficiencia	100 %	74.9 %	44.7 %	40.5 %

Conclusiones

- El código implementado logra resolver correctamente la dinámica de creación y evolución de poros, la respuesta eléctrica de la célula y el transporte de cuatro especies iónicas, todo esto de manera acoplada.
- Se discretizó la membrana explícitamente utilizando un mallado adaptativo, en lugar de considerar la membrana una condición de borde, logrando así resultados que se acercan más a la realidad que los obtenidos en trabajos anteriores.
- Se observó el transporte de especies a través de la membrana y se verificó que la apertura de poros contribuye a este fenómeno, ya que se obtuvieron resultados muy diferentes al no considerar electroporación.

Conclusiones

- Se notó claramente que una vez alcanzado un umbral mínimo, aumentar la intensidad del pulso eléctrico no aumenta el potencial transmembrana, pero sí acelera el proceso de permeabilización de la membrana.
- Se observó que la mayoría de los poros creados se sellan muy rápidamente, por lo que es necesario repetir el pulso eléctrico periódicamente si se pretende permeabilizar la membrana para introducir especies a la célula.

Trabajo Pendiente

- Simular distintos tipos de pulsos.
- Estudiar un dominio con más de una célula.
- Estudiar el efecto de las concentraciones de especies (en especial el pH) sobre las conductividades.
- Modelar células irregulares en lugar de esféricas, como las encontradas en los tejidos.
- Modelar la deformación de las células producto del campo eléctrico (está siendo realizado en otro trabajo de tesis).

¡Muchas gracias!

¿Preguntas?