

# ESTUDOS NUMÉRICOS DOS INFLUENTES PARÂMETROS DA ELETROPORAÇÃO ATRAVÉS DE MICROCAPILARES ESTIRADOS

J. Anselmo\*, D.O.H.Suzuki\* e J.L.B. Marques\*

\*IEB/UFSC, Florianópolis/SC, Brasil

janio.anselmo@ieb.ufsc.br

**Resumo:** Através de aplicação de campos elétricos intensos consegue-se alterar transitoriamente a condutividade da membrana celular, permitindo o transporte de moléculas e íons através da mesma, esse fenômeno é conhecido como eletroporação. Essa técnica ainda requer melhores explicações quanto à criação e evolução dos poros. Este trabalho apresenta estudos voltados para eletroporação em célula única utilizando microcapilar estirado repleto por eletrólito (EFC). Definiu-se um modelo matemático e investigou-se variações de parâmetros como raio da célula, distâncias dos campos elétricos aplicados e condutividades intracelular e extracelular. Os resultados mostraram-se satisfatórios e condizentes com dados encontrados nas bibliografias.

**Palavras-chave:** Eletroporação em células isoladas, SCEP, Eletropermeabilização, Modelos matemáticos, MEF, COMSOL Multiphysics®.

**Abstract:** Through the application of electric fields it is possible to temporarily change the conductivity of the cell membrane, allowing the transport of molecules and ions there through, this phenomenon is known as electroporation. This technique also requires better explanations about the creation and evolution of pores. This paper presents studies on electroporation in a single-cell with Electrolyte-filled Capillary (EFC). Defined a mathematical model and investigated the variations of parameters such as cell radius, distance of the applied electric field and intracellular and extracellular conductivities. The results prove to be satisfactory and consistent with data found in the bibliographies.

**Keywords:** Electroporation in single cells, SCEP, Electropermeabilization, Mathematical models, FEM, COMSOL Multiphysics®.

## Introdução

Quando uma célula biológica é inserida na presença de um campo elétrico externo surge uma diferença de potencial entre as faces internas e externas da membrana, denominada potencial transmembrana ( $V_m$ ). Se esta tensão induzida for reversível ( $0,2 V < V_m < 1,0 V$ ) a membrana plasmática oferece um aumento de permeabilidade de forma transitória. Essa técnica é conhecida como eletropermeabilização ou eletroporação [1], [2]. Através desse procedimento permite-se a

transferência de íons e/ou moléculas através da membrana [3]. A eficiência deste procedimento tem uma dependência direta dos parâmetros elétricos como: amplitude do pulso, duração e forma [4]. Nesse artigo define-se um modelo matemático da condutividade da membrana celular. Posteriormente, investiga-se variações elétricas (condutividade do meio – intra e extracelular), geométrica (raio da célula), distâncias de aplicação do potencial elétrico e seus respectivos efeitos na eletroporação em células biológicas isoladas.

## Materiais e métodos

Ramos *et al* [5], realizou uma adequação do modelo matemático apresentado por Glaser *et al* [6] em seus experimentos com membranas planares. Considerando que a alteração da corrente no experimento de Glaser *et al*. ocorreu apenas devido a formação de poros na membrana, e sendo  $J = \sigma_m E$ , teremos uma nova equação da condutividade da membrana variante no tempo. Conforme descrito na Equação 1:

$$\frac{\Delta\sigma_m}{\Delta t} = K\alpha e^{\left(\frac{V_m}{V_{pp}}\right)^2} \quad (1)$$

onde  $K$  é uma constante de equilíbrio, obtida através das comparações dos primeiros  $100 \mu s$  dos dados experimentais de Ramos *et al* [8],  $\alpha$  é uma constante,  $V_m$  é a tensão transmembrana e  $V_{pp}$  é o parâmetro da mobilidade relativa da membrana (limiar de surgimento dos poros). Os demais parâmetros utilizados na simulação e suas respectivas fontes de origem estão localizados na Tabela 1.

### A. Validação do modelo matemático

A validação do modelo deu-se seguindo os princípios e parâmetros encontrados em Zudans *et al* [9], onde o mesmo inseriu uma célula esférica isolada na presença de um campo elétrico uniforme, formado por placas paralelas.

O potencial elétrico na membrana externa ( $V_e^m$ ) e interna ( $V_i^m$ ) foi determinado utilizando a equação de Laplace, conforme Equação 2:

$$\begin{aligned} \nabla(\sigma_e \nabla V_e^m) &= 0 \\ \nabla(\sigma_i \nabla V_i^m) &= 0 \end{aligned} \quad (2)$$

onde  $\sigma_e$  e  $\sigma_i$  são as condutividades externa e interna da membrana, respectivamente.

Tabela 1: Parâmetros do modelo matemático utilizado.

Parâmetros	Símbolos	Valores
Constante de equilíbrio do modelo	$K$	$3 E^{-2}$
Constante da mobilidade relativa da membrana <sup>†</sup>	$\alpha$	$1 E^{-11}$
Área da membrana <sup>‡</sup>	$A_m$	$8 \times 10^{-7} m^2$
Mobilidade relativa da membrana	$V_{pp}$	0,20V
Tensão transmembrana*	$V_m$	0,30V
Arranjo cúbico de face centrada*	$N$	4,0
Fração de volume da suspensão*	$p$	0,28
Potencial total aplicado <sup>§</sup>	$V_{total}$	500 V
Potencial total simulado	$V_a$	105 V
Comprimento total do capilar <sup>§</sup>	$L_{total}$	15,0 cm
Comprimento da ponta do capilar estirado <sup>§</sup>	$l$	0,2 cm
Diâmetro interno do capilar não estirado	$D_i$	0,1 cm
Diâmetro interno na ponta do capilar estirado	$D_i^{est}$	5,0 $\mu m$
Condutividade da solução <sup>§</sup>	$\sigma_e$	0,60 S/m
Condutividade do citoplasma <sup>§</sup>	$\sigma_i$	0,13 S/m
Raio da célula <sup>§</sup>	$r_{cell}$	10,0 $\mu m$
Espessura da membrana <sup>§</sup>	$\delta$	7,0 nm
Largura da simulação	$w_s$	1,0 mm
Altura da simulação	$h_s$	2,0 mm
Distância entre a ponta do capilar e membrana celular	$d^1$	0,5 – 8,0 $\mu m$

\* Ramos *et al* [8] † Ramos [5] ‡ Sukhakev *et al* [10] § Zudans *et al* [9]

## B. Modelagem geométrica e numérica

As simulações e estudos foram realizadas utilizando o software COMSOL Multiphysics® versão 4.4 (COMSOL Inc., Burlington, MA), módulo AC/DC, baseado no método de elementos finitos (MEF). Para suavizar os recursos computacionais, simulou-se apenas o capilar estirado em 2D axissimétrico, demonstrado na Figura 1.

Conforme Zudans *et al* [9] a queda de tensão no capilar não estirado, é dado pela Equação 3:

$$V_a = V_{total} + \frac{\partial V}{\partial z} (L_{total} - l) \quad (3)$$

<sup>1</sup> A distância “d” é variável, dependendo da simulação.

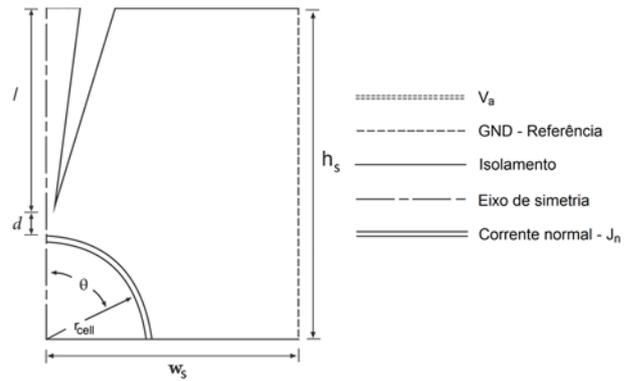


Figura. 1: Modelo 2D axissimétrico da célula única isolada inserida no campo elétrico não-uniforme. As geometrias não estão representadas na mesma escala.

onde  $\partial V / \partial z$  é a variação do potencial elétrico em relação a distância do capilar, definindo  $V_a$ ,  $V_{total}$  é o potencial elétrico aplicado em todo capilar  $L_{total}$ .

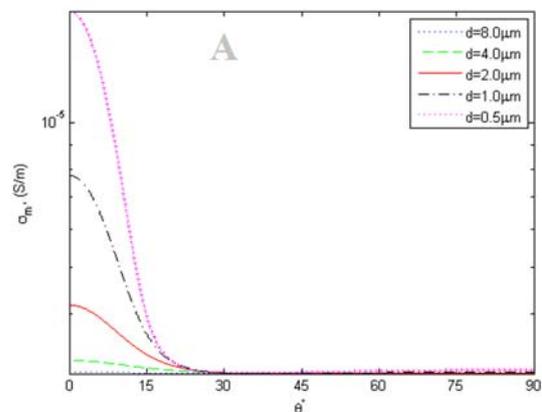
Utilizou-se uma malha de elementos finitos triangular extremamente fina na membrana celular e malha fina triangular nas demais geometrias. A malha completa é composta por 61.730 elementos de domínio e 4.414 elementos de contorno. A simulação do modelo foi realizada em um computador pessoal, AMD Athlon™ II X2 250 3,0 GHz com 4,0 GB de memória RAM e com sistema operacional Microsoft® Windows 8 de 64 bits.

## Resultados

A Figura 2 demonstra a variação da condutividade da membrana celular em relação ao ângulo, para uma variação de distância do microcapilar e membrana celular de 0,5  $\mu m$  a 8,0  $\mu m$ .

A Figura 3 representa o comportamento da condutividade da membrana com as variações do raio celular, de 10  $\mu m$  a 30  $\mu m$  de raio, com potencial elétrico de 500 V e distância de 0,5  $\mu m$  entre o microcapilar e a membrana.

A Figura 4 expressa a distribuição do campo elétrico celular e densidade de corrente nas componentes “r” e “z”, com potencial elétrico de 500 V e distância de 0,5  $\mu m$ .



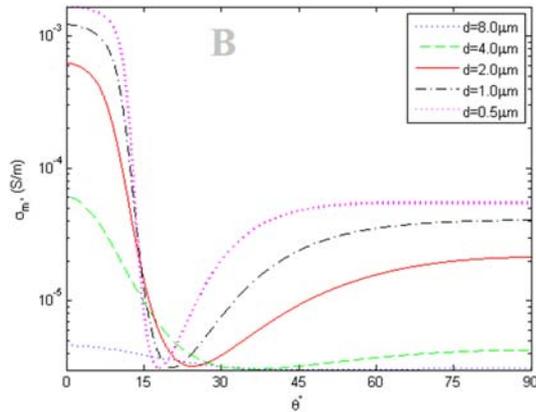


Figura. 2: Gráfico da condutividade da membrana. A) potencial elétrico de 500V; B) potencial elétrico de 4kV.

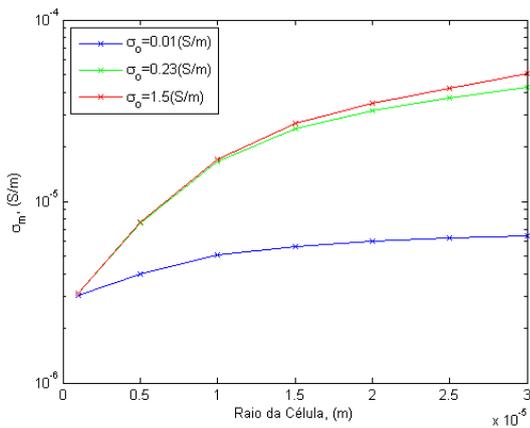


Figura. 3: Gráfico da condutividade da membrana celular pela variação do raio da célula.

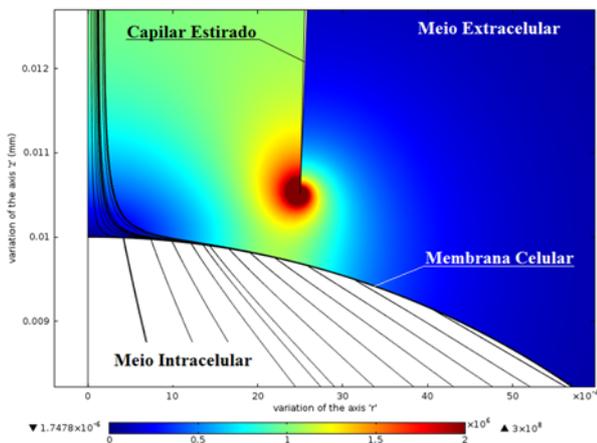


Figura. 4: Gráfico da distribuição do campo elétrico e densidade de corrente.

**Discussão**

Na proposta definida pelo modelo matemático, baseado em experimentos de Glaser *et al* [6], a

condutividade da membrana aumenta com taxa dependente do potencial transmembrana. Como descrito, o valor da constante "K" foi obtido de experimentos em suspensão celular. Encontra-se diferentes valores desta constante quando comparados com a literatura [6], [11], [12]. A dificuldade em comparar o valor de "K", é causada por diferentes parâmetros medidos entre experimentos. Suzuki *et al* [12] investigou a condutividade da suspensão de células, quando comparado com dois modelos de eletroporação. Glaser *et al* [6], ajustou os resultados atuais com o modelo matemático da Equação 1. Mesmo com a variação esperada de "K", a dinâmica do modelo é consistente com os diferentes experimentos mencionados.

A implementação do modelo matemático da condutividade da membrana celular mostrou-se condizente com valores encontrados nas bibliografias [4], sua ordem de grandeza foi de  $10^{-5} S/m$  para distâncias de aproximadamente  $1,0 \mu m$  e potenciais elétricos na ordem de centenas de volts. Estes resultados assemelham-se também com a condutância da membrana ( $G_m = \sigma_m/\delta$ ) [7] indicando que o modelo da eletroporação e a implementação geométrica estão em conformidade com esses estudos.

Pode-se verificar na Figura 2 as variações da condutividade da membrana celular para diferentes distâncias do microeletrodo. Na Figura 2A levando em consideração a ordem de grandeza supracitada, teremos aberturas de poros na membrana plasmática em distâncias inferiores a  $1,0 \mu m$  e aproximadamente nos primeiros  $22^\circ$  da célula. Esta faixa angular de condutividade vai de encontro com a metodologia aplicada, microcapilar próximo ao polo da célula.

A viabilidade das células em eletroporação está relacionada com os efluxos de íons da célula. Este desequilíbrio iônico pode levar a morte da célula [13]. A Figura 2B com a elevação do potencial elétrico aplicado ( $4 kV$ ) tem-se a presença da eletroporação em todas as distâncias simuladas. Nos primeiros  $22^\circ$  da membrana ocorrem a abertura de poros do meio extracelular para o intracelular. Após os  $22^\circ$  temos o processo inverso. Na prática tem-se um desequilíbrio iônicos, devido a intensidade do campo elétrico local. Este resultado está em conformidade com a literatura (eletroporação irreversível) [14], apresentando condutividades superiores à  $10^{-2} S/m$ . Uma aplicação prática onde busca-se esse procedimento é na esterilização de alimentos.

A Figura 3 nos mostra uma relação direta entre a condutividade da membrana e o raio da célula. Nota-se que com a aproximação do raio celular de  $30 \mu m$  a condutividade tende a estabilização. Outro ponto importante para ressaltar é o papel do meio extracelular na condutividade. Por exemplo, conforme Figura 3, uma célula de  $15 \mu m$  em um meio extracelular de condutividade de  $0,01 S/m$  apresenta uma condutividade da membrana de aproximadamente  $5,5 \times 10^{-6} S/m$ . Essa mesma célula alterando a condutividade extracelular tem-se uma condutividade na ordem de  $2,5 \times 10^{-5} S/m$ . Ou seja, pode-se contribuir com a abertura de poros (crescimento de  $V_m$ ) ao elevar-se a condutividade do meio

extracelular. Ambos os resultados se mostraram similares com os relatados por Suzuki *et al* [12].

Conforme demarcação, a Figura 4 ilustra a distribuição não-linear do campo elétrico no meio extracelular e na membrana. O que comprova a dificuldade em realizar uma definição analítica para o potencial transmembrana. Tal fator deve-se pelos acúmulos de cargas elétricas estáticas na extrema ponta do capilar estirado, o efeito corona (efeito das pontas) [15]. Como consequência, uma maior intensidade de campo elétrico local.

Com esta elevada intensidade, pode-se observar o fluxo de corrente entrante por completo no meio intracelular, através das linhas de densidade de corrente elétrica ( $J$ ). O que ratifica a existência de condutividade na ordem de  $10^{-4} S/m$ , expresso na Figura 2A (para uma distância de  $0,5 \mu m$ ). Na eletroquimioterapia pode-se usar a distribuição do campo elétrico em tecidos para definir regiões onde haverá necrose, durante o tratamento de tumores localizados [16].

### Conclusão

O modelo matemático apresentado limita-se em analisar a dinâmica da eletroporação, contemplando os momentos iniciais do surgimento dos poros. Além do conhecimento prévio dos pulsos aplicados (intensidade, duração e forma), os parâmetros investigados (raio da célula, condutividade externa e potenciais elétricos em diferentes distâncias) também demonstraram influência direta na condutividade da membrana celular. Conhecer tais parâmetros é de suma importância na correta efetivação da eletroporação.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

### Referências

- [1] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 41, no. 2, pp. 135–160, Dec. 1996.
- [2] J. Teissie, M. Golzio, and M. P. Rols, "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1724, no. 3, pp. 270–80, Aug. 2005.
- [3] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 60, no. 2, pp. 297–306, Aug. 1991.
- [4] D. Miklavcic and L. Towhidi, "Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells," *Radiol. Oncol.*, vol. 44, no. 1, pp. 34–41, Mar. 2010.
- [5] A. Ramos, "Effect of the electroporation in the field calculation in biological tissues," *Artif. Organs*, vol. 29, no. 6, pp. 510–3, Jun. 2005.
- [6] R. Glaser and S. Leikin, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores," ... *Biophys. Acta (BBA ...)*, vol. 940, pp. 275–287, 1988.
- [7] W. M. Arnold, R. K. Schmutzler, A. G. Schmutzler, H. van der Ven, S. Al-Hasani, D. Krebs, and U. Zimmermann, "Electro-rotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 905, pp. 454–464, 1987.
- [8] A. Ramos, A. L. S. Schneider, D. O. H. Suzuki, and J. L. B. Marques, "Sinusoidal signal analysis of electroporation in biological cells," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 59, no. 10, pp. 2965–73, Oct. 2012.
- [9] I. Zudans, A. Agarwal, O. Orwar, and S. G. Weber, "Numerical calculations of single-cell electroporation with an electrolyte-filled capillary," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 10, pp. 3696–705, May 2007.
- [10] S. I. Sukharev, L. V. Chernomordik, I. G. Abidor, and Y. A. Chizmadzhev, "466—Effects of UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> ions on the properties of bilayer lipid membranes," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 9, no. 2, pp. 133–140, May 1982.
- [11] A. Ramos, D. Ota, H. Suzuki, J. Luiz, and B. Marques, "Numerical Simulation of Electroporation in Spherical Cells," vol. 28, no. 4, pp. 357–361, 2004.
- [12] D. Suzuki and A. Ramos, "Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension," *Biomed. Eng. IEEE Trans.*, vol. 58, no. 12, pp. 3310–8, Dec. 2011.
- [13] S. Haberl, D. Miklavcic, G. Sersa, W. Frey, and B. Rubinsky, "Cell membrane electroporation-Part 2: the applications," *IEEE Electr. Insul. Mag.*, vol. 29, no. 1, pp. 29–37, Jan. 2013.
- [14] A. Golberg, M. Belkin, and B. Rubinsky, "Irreversible electroporation for microbial control of drugs in solution," *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 3, pp. 881–6, Jan. 2009.
- [15] J. P. A. Bastos, *Eletromagnetismo para engenharia: estática e quase-estática*, 1ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 396.
- [16] D. O. H. Suzuki, J. Anselmo, K. D. de Oliveira, J. O. Freytag, M. M. M. Rangel, J. L. B. Marques, and A. Ramos, "Numerical Model of Dog Mast Cell Tumor Treated by Electrochemotherapy," *Artif. Organs*, 2014.