

Estudo da Formação de Poros na Membrana Durante a Eletroporação de Células Biológicas

Lucenara S. Pereira^{1*}, Guilherme B. Pintarelli^{1**} e Daniela O. H. Suzuki^{1***}

1. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

*lucenarapereira@gmail.com, ** guipintarelli@gmail.com , *** suzuki@eel.ufsc.br

Resumo: Este artigo tem o intuito de estudar a formação de poros na membrana plasmática de uma célula biológica isolada durante o processo de eletroporação. Neste intuito, estão sendo estudados modelos matemáticos de eletroporação e características do pulso elétrico aplicado, a fim de analisar a influência das variações da amplitude e da duração do mesmo. Essa análise é feita a partir de simulações no software COMSOL Multiphysics®, que fornece resultados em termos de potencial transmembrana e condutividade elétrica. O potencial transmembrana serve como um indicador de eletroporação, pois as faixas de tensão em que ele se encontra apontam se ocorre ou não eletroporação, e se esse processo vai ser reversível ou irreversível.

Palavras-chave: eletroporação, célula biológica, potencial transmembrana, condutividade, pulso elétrico.

1. Introdução e Teoria

Este trabalho tem como objetivo o estudo do fenômeno da eletroporação, que é a aplicação de um campo elétrico em uma célula biológica, provocando alterações transitórias na permeabilidade e condutividade das membranas plasmática e das organelas. Dessa forma, tem-se a formação de poros, que permitem a troca de material entre os meios interno e externo da célula.

A eletroporação é composta por uma série de processos com fases distintas. Inicialmente, um pulso com um dado valor de tensão é aplicado na membrana por um determinado tempo, provocando um acúmulo de cargas devido à migração de íons. Quando essa carga atinge um ponto crítico, a membrana lipídica sofre um rearranjo em sua morfologia, formando pré-poros, e na sequência poros propriamente ditos. Alguns estudos sugerem que esses pré-poros são pequenas deformações, de cerca de 3Å (0,3 nanômetro) de diâmetro. Logo, a transição de um estado não condutor (pré-poros) para um condutor (poros) depende do rearranjo da extremidade do poro. Ao encerrar o pulso, os poros podem se fechar, e a estrutura retornar ao seu estado inicial, no caso da eletroporação ser reversível. Ou ainda, para

eletroporação irreversível, manterem-se abertos ou expandirem-se, levando eventualmente a ruptura da célula [1].

O que define o destino final do poro é a tensão transmembrana (V_m), que é a diferença de potencial induzida entre as camadas externa e interna da membrana. Quando esse potencial fica em torno de $0.2V < V_m < 1V$, os poros gerados se fecham ao final do estímulo, restabelecendo a membrana. Já para o caso de V_m ultrapassar $1V$, os poros permanecerão abertos, provocando desequilíbrio iônico, rompimento da membrana e morte celular [2].

A técnica da eletroporação pode ser utilizada em diversas aplicações em variadas áreas, como biotecnologia e medicina. Por se tratar de uma ferramenta não química e não tóxica, ela pode ser utilizada para inserir ou retirar moléculas de uma célula. E é uma forma promissora para tratamento de câncer.

O tratamento de câncer aliando eletroporação e quimioterapia (eletroquimioterapia) é uma das principais motivações dos estudos atuais em eletroporação, devido a melhora na eficiência das drogas utilizadas, por meio do aumento da permeabilidade celular e facilitação da entrada das drogas, devido à abertura de poros em uma região. Isso provoca a redução dos efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, fadiga e queda de cabelo.

A Figura 1 mostra possíveis respostas de uma célula entre dois eletrodos, exposta a um pulso elétrico, e sugere múltiplos aproveitamentos da eletroporação, como: a fusão celular, a inserção de moléculas grandes ou pequenas, que podem ser proteínas, íons, drogas, DNA ou substâncias impermeáveis e até mesmo a destruição da célula. No entanto, o sucesso das aplicações depende, sobretudo, das propriedades do pulso elétrico, esse deve ser controlado com precisão para a obtenção de um dado resultado. De modo geral, os parâmetros de controle de um pulso DC está na sua intensidade e duração, enquanto que de um pulso AC está na amplitude e frequência. Além desses fatores, também é possível controlar o número de pulsos aplicados e a distância entre eletrodos.

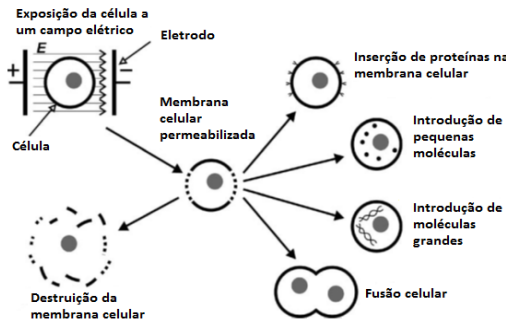


Figura 1. Aplicações da eletroporação.

Uma vez que a abertura dos poros durante a eletroporação ocorre em ordem nano métrica e em escala de nano segundos, torna-se fundamental o uso de modelos matemáticos e simulações como auxílio no estudo desse processo.

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo o estudo da formação de poros na membrana plasmática, a fim de identificar previamente a influência de cada variável ao longo do processo, buscando configurações que proporcionem melhores resultados.

2. Modelo Numérico e Equações Governantes

No estágio atual desta pesquisa, adotou-se um modelo matemático não-linear para o estudo dos parâmetros da eletroporação. Ele é baseado na equação diferencial parcial de Smoluchowski, que descreve a formação e expansão dos poros com diferentes raios, durante o processo de eletroporação. No entanto, para pulsos AC ou DC de curta duração (μs ou ns), esse modelo pode ser simplificado para uma equação diferencial ordinária, de menor custo computacional.

As simplificações do modelo são feitas considerando-se que os poros não se expandem significativamente após a sua criação. Essa consideração é válida quando os campos elétricos aplicados são de curta duração e alta intensidade. Os resultados obtidos em [3] e [4], usando a equação de Smoluchowski, demonstraram esse fato, pois os poros foram criados com tamanho mínimo de 0.8nm [3] e 0.5nm e expandiram-se lentamente até 0.83nm [3] e 0.75nm [4], equilibrando-se e assim permanecendo até a fase de fechamento.

De acordo com o modelo assintótico da eletroporação, a densidade de poros, $N(t)$, é dada por [5]:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha e^{\left(\frac{V_m(t)}{V_{ep}}\right)^2} \left(1 - \frac{N(t)}{N_0} e^{-q\left(\frac{V_m(t)}{V_{ep}}\right)^2}\right),$$

onde $V_m(t)$ é o potencial transmembrana, V_{ep} é a tensão característica da eletroporação, N_0 é a densidade de poros de equilíbrio quando $V_m = 0$, e α e q são constantes.

A condutividade média da membrana nas regiões onde os poros são formados é [6]:

$$\sigma_m(t) = \sigma_{m_0} + N(t)\sigma_p\pi r_p^2 K,$$

onde σ_{m_0} é a condutividade da membrana antes da eletroporação, σ_p é a condutividade do meio dentro do poro. O raio r_p do poro e K é:

$$K = \frac{e^{v_m-1}}{\frac{w_0 e^{w_0-\eta v_m}}{w_0-\eta v_m} e^{v_m} - \frac{w_0 e^{w_0+\eta v_m+\eta v_m}}{w_0+\eta v_m}},$$

em que w_0 é a barreira de energia dentro do poro, η é dado pela relação entre o raio do poro e a espessura da membrana e $v_m = \frac{q_e}{kT} V_m$ é o potencial transmembrana adimensional.

3. Métodos

Tendo como objetivo estudar a formação de poros na membrana plasmática, definiu-se uma geometria celular conforme Figura 2. A partir de um eixo 2D axissimétrico, uma célula esférica isolada recebe um campo elétrico uniforme aplicado por duas placas paralelas. Nesta configuração, o modelo matemático é aplicado na membrana plasmática, a fim de se obter o potencial transmembrana (V_m) e a condutividade (σ_c) nessa região.

Como definições de parâmetros, tem-se a condutividade inicial da membrana plasmática (σ_{c0}), condutividade do citoplasma (σ_{cp}) e condutividade do meio extra-celular (σ_{ec}). Além dos parâmetros de condutividade, têm-se os parâmetros geométricos, como raio da célula (R_c) e espessura da membrana plasmática (d_c). Os valores destes parâmetros e dos demais envolvidos no processo de modelagem estão descritos na Tabela 1.

As simulações estão sendo realizadas utilizando o módulo AC/DC do software COMSOL Multiphysics®. A interface física

empregada é a *Electric Currents (ec)*, que contém as equações relacionadas a campo elétrico e densidade de corrente. Os estudos estão sendo feitos no domínio do tempo.

Para a composição da malha, foi definido elementos extremamente finos para as membranas e finos para o restante da célula e meio extra celular. Um *Ground* e um *Terminal* foram adicionados a fim de descrever os eletrodos que aplicam o pulso elétrico, a uma dada amplitude e duração.

Com a geometria e o modelo implementados no COMSOL, fez-se o estudo da formação de poros na membrana plasmática, aplicando-se pulsos elétricos quadráticos com variações em termos de amplitude e duração. Os efeitos foram analisados através do potencial transmembrana e condutividade celular.

Além disso, foi verificada a distribuição de campo elétrico neste sistema, e encontra-se descrito na Figura 3.

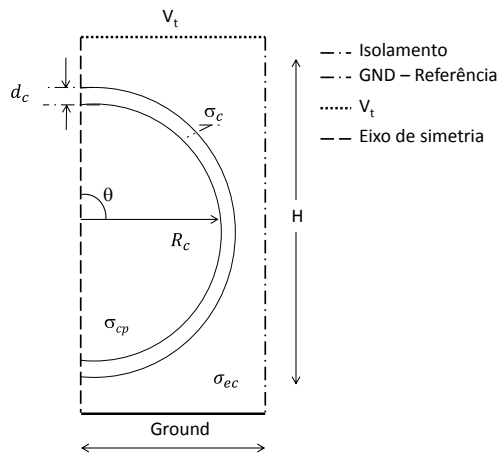


Figura 2. Geometria celular.

4. Resultados Experimentais

Foi realizada uma série de testes, com variações na amplitude e duração do pulso elétrico, mantendo-se a distância entre os eletrodos. Logo, o campo elétrico aplicado varia de acordo com a amplitude do pulso.

Tabela 1: Parâmetros utilizados.

Parâmetro	Símbolo	Valor
Condutividade do meio extra-celular	σ_{ec}	1.2 S/m
Raio celular	R_c	10 μm
Espessura da membrana plasmática	d_c	5nm
Condutividade do citoplasma	σ_{cp}	0.3 S/m
Condutividade inicial da membrana plasmática	σ_{c0}	$9.5 \times 10^{-9} \text{ S/m}$
Condutividade da solução dentro do poro	σ_p	1.2 S/m
Raio do poro	r_p	0.8nm
Densidade da taxa de criação dos poros	α	$1 \times 10^9 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Tensão característica da eletroporação	V_{ep}	224mV
Densidade dos poros de equilíbrio	N_0	$3.3 \times 10^6 \text{ m}^{-2}$
Constante de eletroporação	q	1
Barreira de energia do poro	w_0	3.2
Relação entre o raio do poro e a espessura da membrana	η	0.15
Carga elétrica de um elétron	q_e	$1.65 \times 10^{-19} \text{ C}$
Constante de Boltzmann	k	$1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$
Temperatura	T	295K

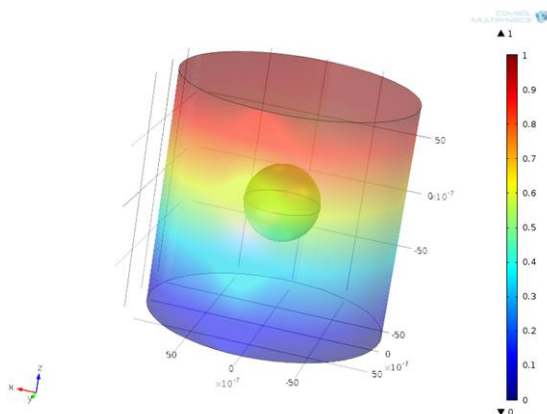


Figura 3. Distribuição de campo elétrico.

Inicialmente, mantendo-se a amplitude do pulso elétrico em 200V, variou-se a duração do pulso em 100 μ s, 100ns e 15ns. As curvas para o potencial transmembrana nos três casos encontram-se nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente. As condutividades correspondentes estão nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

Num segundo momento, tendo como foco a análise da influência da amplitude do pulso, manteve-se a duração do pulso em 100 μ s, e variou-se para amplitudes de 100V e 400V, valores abaixo e acima dos 200V analisados. O potencial transmembrana para ambos os casos encontra-se nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

Os gráficos que representam a tensão transmembrana foram plotados em relação ao ângulo θ de varredura da membrana celular, sendo que em cada figura estão as curvas para os tempos inicial e final do pulso elétrico. Por sua vez, os gráficos de condutividade foram plotados ao longo do tempo, a fim de demonstrar o aumento causado neste parâmetro, no intervalo de duração do pulso.

Analisando os resultados, observa-se o quanto o pulso elétrico perturba a membrana celular, em maior ou menor intensidade. No primeiro caso, para uma amplitude de 200V e durações de 100 μ s, 100ns e 15ns, observa-se três fenômenos distintos: para 100 μ s tem-se $V_m > 1V$, para 100ns tem-se $0.2V < V_m < 1V$ e para 15ns tem-se $V_m < 0.2V$. Logo, pode-se dizer que no primeiro caso ocorreria apoptose celular, no segundo caso eletroporação reversível e no último caso não ocorreria eletroporação.

No segundo experimento, mantendo-se a duração do pulso em 100 μ s, pode-se analisar as

amplitudes de 100V, 200V e 300V. Observa-se que para 100V, os valores de V_m atingiram um potencial máximo de 0.65V. Esse valor é suficiente para transformar poros hidrofóbicos em hidrofílicos, conforme a teoria da permeabilização da membrana, permitindo que determinadas substâncias ou plasmídeos do meio extra-celular penetrem no citoplasma. Porém, como V_m foi inferior a 1V, não ocorre apoptose da célula, como foi verificado no primeiro experimento com mesma duração porém amplitude superior. Por fim, tem-se um pulso com duração de 100 μ s e amplitude ainda mais elevada: 300V. Com isso, pode-se verificar que o potencial transmembrana eleva-se ainda mais, atingindo valores da ordem de 1.6V, que certamente romperiam a estrutura celular.

Além dessas observações, de modo geral pode-se verificar a queda do potencial transmembrana a medida que se afasta do ponto central da membrana plasmática ($\theta = 0^\circ$). Esse fato ocorre porque a predominância de abertura dos poros está na região dos polos da célula, que são os pontos onde a membrana celular está mais próxima dos eletrodos. Inclusive pode-se definir que existe uma linha do equador na célula, formada por uma linha imaginária traçada em torno da célula igualmente distante de ambos os polos, dividindo-a em hemisférios norte e sul. Assim, pode-se dizer que o número de nanoporos criados diminui a medida que o ângulo de análise se movimentava dos polos para o equador, ou seja, de 0° para 90° , no caso do intervalo das curvas analisadas neste trabalho.

Em relação a condutividade, nota-se que ela aumenta ao longo do tempo, atingindo máximos ao final do pulso que acompanham o potencial transmembrana. No primeiro experimento, para uma amplitude de 200V, no pulso de duração de 100 μ s, a condutividade máxima ficou em torno de 70×10^{-7} . Já para uma duração de 100ns, a condutividade foi reduzida para um máximo em torno de 22×10^{-10} . Quando o pulso aplicado foi configurado para 15ns, a condutividade ficou em torno de 32×10^{-10} . Observa-se que a curva para o terceiro caso difere das demais, uma vez que não ocorre eletroporação, e não há troca de íons através dos poros. No segundo experimento, para um pulso de 100 μ s, nos pulsos de 300V, 200V e 100V, as condutividades máximas ficaram em 45×10^{-6} , 70×10^{-7} e 12×10^{-7} , respectivamente, reduzindo-se de forma proporcional a V_m .

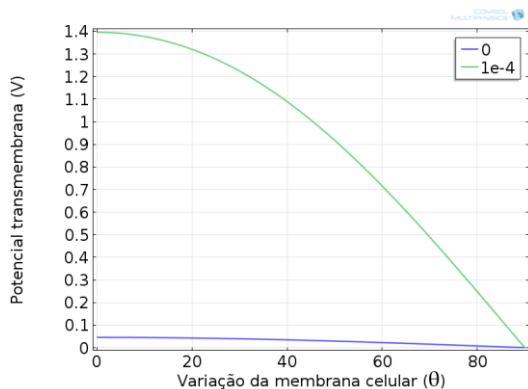


Figura 4. Potencial transmembrana para um pulso de 200V e 100 μ s.

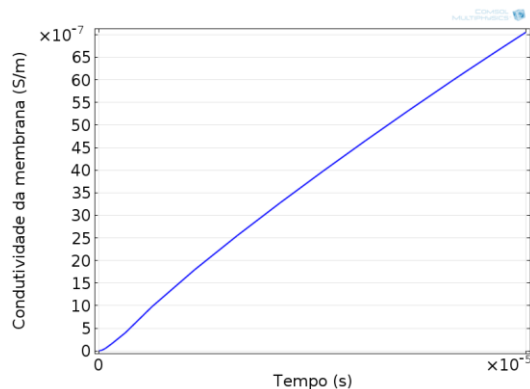


Figura 7. Condutividade da membrana para um pulso de 200V e 100 μ s.

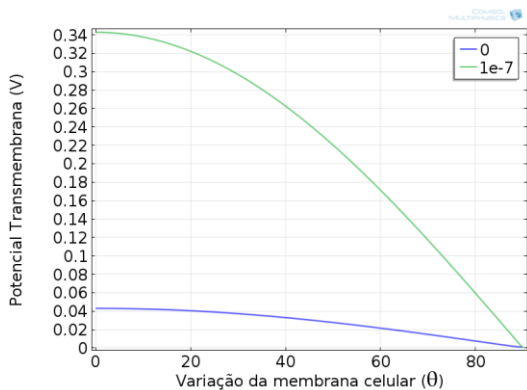


Figura 5. Potencial transmembrana para um pulso de 200V e 100ns.

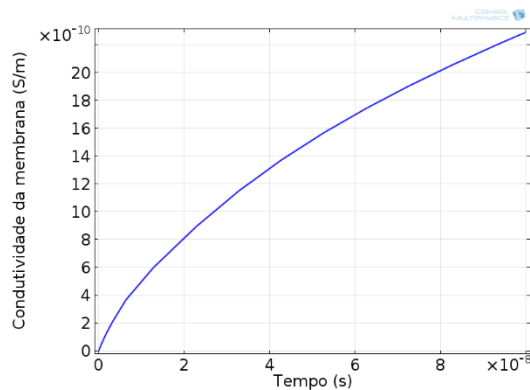


Figura 8. Condutividade da membrana para um pulso de 200V e 100ns.

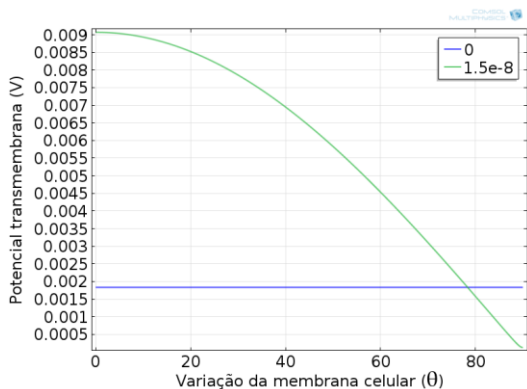


Figura 6. Potencial transmembrana para um pulso de 200V e 15ns.

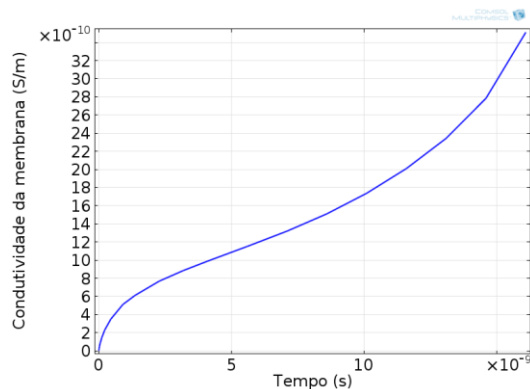


Figura 9. Condutividade da membrana para um pulso de 200V e 15ns.

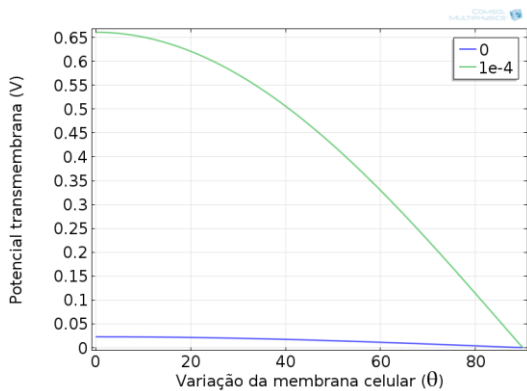


Figura 10. Potencial transmembrana para um pulso de 100V e 100 μ s.

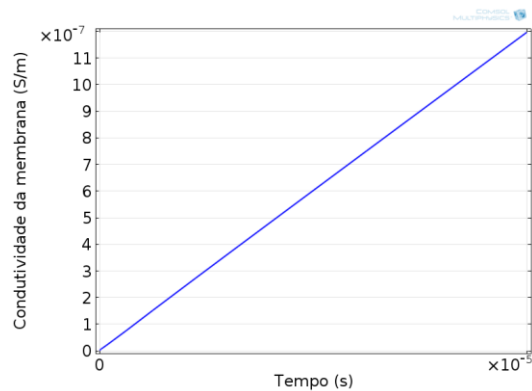


Figura 12. Condutividade da membrana para um pulso de 100V e 100 μ s.

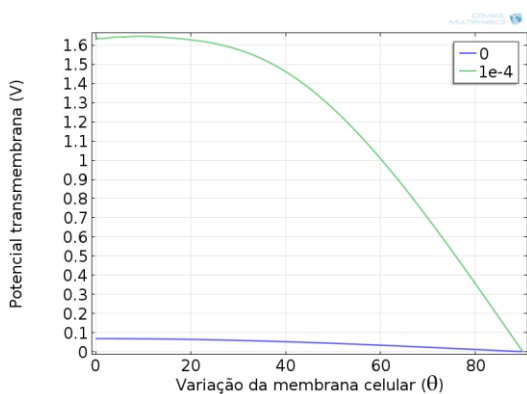


Figura 11. Potencial transmembrana para um pulso de 300V e 100 μ s.

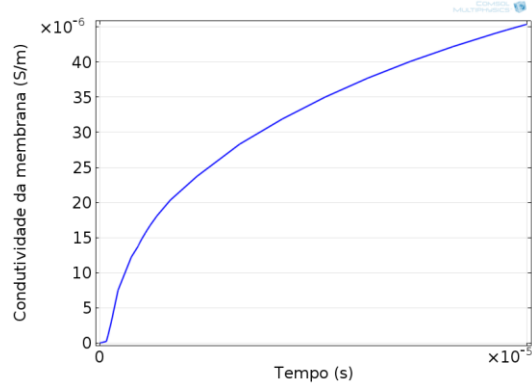


Figura 13. Condutividade da membrana para um pulso de 300V e 100 μ s.

5. Discussão

Os resultados demonstram que os pulsos podem ser configurados em uma determinada faixa de acordo com a aplicação do processo de eletroporação. Se o objetivo for a abertura dos poros de forma reversível, os pulsos devem ter durações maiores e amplitudes médias. Enquanto que para se obter a apoptose da célula os pulsos devem ser de amplitudes elevadas e durações na faixa de microssegundos.

Um fato que merece destaque é a ausência da eletroporação em pulsos de poucos nano segundos e amplitudes elevadas, onde não ocorre a eletroporação na membrana plasmática, pois o tempo de carregamento da membrana é superior a duração do pulso.

Essa característica será estudada em trabalhos futuros, a fim de analisar a viabilidade da aplicação de pulsos de nano segundos para eletroporar o núcleo e as organelas de uma célula, cujos tempos de carregamento são significativamente menores do que o da membrana plasmática. Uma aplicação interessante nesse caso é a transferência genética, onde é necessária a abertura de poros no núcleo celular.

6. Conclusões

A eletroporação é uma técnica que vem sendo estudada em inúmeras aplicações na área da saúde, tanto em nível celular quanto em suspensão em tecidos. Este trabalho aborda o nível celular, estudando a formação de poros na membrana

plasmática, a partir de modelos matemáticos que são resolvidos utilizando o software COMSOL.

Tendo em vista que essa dinâmica de abertura de poros é extremamente dependente das características do pulso elétrico aplicado, analisou-se a influência da duração e amplitude de um pulso DC, dado por uma onda quadrada com largura variante.

Assim sendo, inicialmente manteve-se a amplitude do pulso em 200V e variou-se a duração para 100 μ s, 100ns e 15ns, verificando-se que a medida que a duração do pulso era reduzida, o potencial transmembrana e a condutividade elétrica também eram reduzidos, desde o nível de apoptose até não ocorrência da eletroporação no último caso.

A seguir, analisou-se a influência da amplitude do pulso para uma mesma duração. Logo, mantendo-se o pulso em 100 μ s, que havia sido analisado para uma amplitude de 200V, fez-se duas novas análises: para 100V e para 300V. Os resultados demonstraram que à medida que a amplitude foi reduzida, o potencial transmembrana e a condutividade também se reduziram.

Esse estudo indica que o pulso pode ser controlado para qualquer tipo de aplicação, seja ela reversível ou irreversível. Além disso, de acordo com as características de potência e chaveamento do dispositivo eletrônico utilizado para a aplicação do pulso elétrico, esse controle pode ser tanto em nível de amplitude quanto de duração.

Como continuação deste trabalho, pretende-se analisar a viabilidade da aplicação de pulsos de nano segundos para eletroporar as organelas e o núcleo de uma célula biológica, com foco em aplicações de transferência genética.

7. Referências

1. Miklavčič and Towhidi, "Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells," *Radiology and Oncology*, vol. 1, pp. 34-41, 2010.
2. Suzuki, "Estudo da Condutividade Elétrica de Suspensões de Eritrócitos de Ratos Durante Aplicação de Campos Elétricos Intensos: Teoria, Modelagem e Experimentação". Tese

(Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

3. Vasilkoski, Esser, Gowrishankar, Weaver, "Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation," *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, vol. 74, p. 021904, 2006.
4. Joshi, Hu, Schoenbach, "Modeling studies of cell response to ultrashort, high-intensity electric fields-implications for intracellular manipulation," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 32, pp. 1677-1686, Aug 2004.
5. Neu and Krassowska, "Asymptotic model of electroporation," *Physical Review*, vol. 59, pp. 3471 - 3482, 1999.
6. Pucihar, Miklavcic, Kotnik, "A Time-Dependent Numerical Model of Transmembrane Voltage Inducement and Electroporation of Irregularly Shaped Cells," *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 56, pp. 1491 -1501, 2009.