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

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

Tesis presentada para optar al título de
Licenciado en Ciencias de la Computación

Mauricio Alfonso

Director: Alejandro Soba
Codirector: Guillermo Marshall
Buenos Aires, 2015

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS BÁSICOS DE ELECTROPORACIÓN A TRAVÉS DE LA MODELACIÓN NUMÉRICA

La electroporación consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad y corta duración con el objetivo de crear poros en la membrana celular, logrando así un aumento de la permeabilización que permite el ingreso de drogas o iones a su interior. La utilización de la electroporación en combinación con drogas antitumorales ha demostrado tener una mayor eficacia que la terapia quimioterapéutica convencional, de allí la relevancia de estudios básicos de la interacción campos eléctricos-célula. En esta tesis se presenta un nuevo modelo numérico que describe la respuesta eléctrica de la célula, en particular la membrana celular y el transporte iónico a través de la misma, a la aplicación de pulsos eléctricos. Se asume una célula esférica sometida a pulsos eléctricos por medio de dos electrodos, constituida por cuatro especies iónicas: el ión hidrógeno (H^+), el hidróxido (OH^-), el catión sodio (Na^+) y el cloruro (Cl^-). Para resolver las ecuaciones diferenciales que describen el potencial electrostático y el transporte iónico se usó el método de los elementos finitos en dos dimensiones espaciales en coordenadas cilíndricas. Las ecuaciones diferenciales que describen la evolución de la población de poros se resuelven por diferencias finitas utilizando el método de Euler. Se utilizó programación distribuida basada en OpenMP para aprovechar al máximo los procesadores multithreading actuales. El nuevo modelo teórico introducido permite por primera vez predecir realísticamente la respuesta eléctrica de la célula, en particular el campo eléctrico transmembranal y el transporte iónico (uptake), lo que se evidencia por la excelente correlación entre predicción y mediciones.

Palabras claves: membrana celular, electroporación, transporte, elementos finitos

STUDY OF THE BASIC MECHANISMS OF ELECTROPORATION THROUGH NUMERIC MODELLING

Electroporation involves the application of electric pulses of high intensity and short duration in order to create pores in the cell membrane, thus achieving increased permeabilization that allows the entry of drugs or ions. The use of electroporation in combination with antitumor drugs has been shown to have a higher efficiency than conventional chemotherapeutic therapy, hence the relevance of basic studies of the electric field-cell interaction. In this thesis a new numerical model is presented, describing the electrical response of the cell, particularly the cell membrane and ion transport through it, to the application of electrical pulses. A spherical cell is assumed, subjected to electrical pulses by means of two electrodes and consisting of four ionic species: hydrogen ion (H^+), hydroxide (OH^-), sodium cation (Na^+) and chloride (Cl^-). To solve the differential equations describing the electrostatic potential and ion transport, the finite element method in two spatial dimensions with cylindrical coordinates is used. The differential equations describing the evolution of the population of pores are solved by finite differences using Euler's method. Distributed programming based on OpenMP was used to maximize the usage of current multithreading processors. The new theoretical model presented realistically predicts for the first time the electrical response of the cell, particularly the electric field and ion transport (uptake), as evidenced by the excellent correlation between predictions and measurements.

Keywords: cell membrane, electroporation, transport, finite elements

Índice general

1.. Introducción 1

2.. Descripción del Modelo 5
2.1. Modelo Matemático 5
2.2. Métodos Computacionales 10
2.3. Implementación 14

3.. Potencial Eléctrico 19
3.1. Implementación 19
3.2. Resultados 20

4.. Generación y Evolución de Poros 25
4.1. Implementación 25
4.2. Resultados 26

5.. Transporte de Especies 33
5.1. Implementación 33
5.2. Resultados 34

6.. Modelo Acoplado 39
6.1. Implementación 39
6.2. Resultados 41

7.. Conclusiones 47

8.. Apéndices 49

1. INTRODUCCIÓN

La exposición de membranas biológicas a campos eléctricos pulsados incrementa, en forma transitoria o permanente su permeabilidad. Este proceso se denomina electropermeabilización o electroporación (EP). La electroporación se optimiza para valores apropiados de intensidad de pulso, duración y frecuencia de los mismos [1, 2] y es un fenómeno utilizado en electroquimioterapia (ECT) [3–5], en electrotransferencia génica (GET) [6–8] y en electroporación irreversible (IRE) [9], entre otros. Las tecnologías basadas en EP se utilizan hoy en día en un amplio espectro de campos biológicos, que incluyen no sólo las aplicaciones médicas, sino también el procesamiento de alimentos y la gestión ambiental [10–12]. La ECT consiste en la permeabilización transitoria de la membrana celular, para permitir el ingreso de drogas específicas (usualmente bleomicina o cisplatino).

La membrana celular está compuesta por una bicapa lipídica con su interior hidrofóbico, que actúa como una barrera altamente impermeable a la mayoría de moléculas polares, impidiendo que el contenido hidrosoluble de la célula salga de ella.

A tiempo infinito cualquier molécula difundirá a través de una bicapa lipídica libre de proteínas, a favor de su gradiente de concentración. Sin embargo la velocidad a la que una molécula difunde a través de una bicapa lipídica varía enormemente, dependiendo en gran parte del tamaño de la molécula y de su solubilidad relativa al aceite (es decir, cuanto más hidrofóbica o no polar), tanto más rápidamente difundirá a través de una bicapa [21, p. 470-471]. Una de las funciones más importantes de la membrana es controlar la comunicación entre el medio intracelular y el exterior a través del transporte. Dentro de la célula tienen lugar dos tipos de transporte que se llevan a cabo a través de la membrana: el transporte pasivo y el activo.

El transporte pasivo consiste en un proceso de difusión de sustancias a través de la membrana dado por la diferencia de concentración de las mismas. Estos procesos son naturales y no requieren de energía externa. El transporte activo, en cambio, es un proceso que necesita de energía para transportar las moléculas de uno a otro lado de la membrana a través de una permeabilización natural o artificial de la misma.

La electroporación de la membrana se inicia con la aplicación de un campo eléctrico que sobre la célula modifica el llamado potencial transmembranal (PTM), una diferencia de voltaje inducida sobre la membrana celular que aísla a la célula del medio exterior [13] debido a que la conductividad eléctrica de la membrana es seis órdenes de magnitud más pequeña que la de los medios intra y extra celular. Este potencial inducido tiene estrecha relación con la formación de poros acuosos que conducen a través de la membrana y poseen una dinámica relacionada con el PTM [16]. Sin potencial aplicado dichos poros poseen un radio relativamente pequeño, (del orden de medio nanómetro) que sólo permiten el paso de sustancias específicas de un medio al otro producto de reacciones electroquímicas en su proximidad. La mayor o menor facilidad de las moléculas para atravesar la membrana celular dependen de la carga eléctrica y la masa molar. Moléculas pequeñas o con carga eléctrica neutra pasan la membrana más fácilmente que elementos cargados eléctricamente y moléculas grandes. Además, la membrana es selectiva, lo que significa que permite la entrada de unas moléculas y restringe la de otras.

Las moléculas pequeñas no polares se disuelven fácilmente en las bicapas lipídicas y por lo tanto difunden con rapidez a través de ellas. Las moléculas polares sin carga si

su tamaño es suficientemente reducido también difunden rápidamente a través de una bicapa. Ejemplos de estas sustancias no polares son los solventes orgánicos, que presentan una polaridad alta o baja. Por ejemplo: el metanol, la acetona, el etanol, la urea, etc.

La permeabilidad depende de los siguientes factores:

- Solubilidad en los lípidos: Las sustancias que se disuelven en los lípidos (moléculas hidrófobas, no polares) penetran con facilidad en la membrana dado que está compuesta en su mayor parte por fosfolípidos.

- Tamaño: la mayoría de las moléculas de gran tamaño no pasan a través de la membrana. Solo un pequeño número de moléculas polares de pequeño tamaño pueden atravesar la capa de fosfolípidos.

- Carga: las moléculas cargadas y los iones no pueden pasar, en condiciones normales, a través de la membrana. Sin embargo, algunas sustancias cargadas pueden pasar por los canales proteicos o con la ayuda de una proteína transportadora.

Sin embargo cuando se aplica un campo eléctrico al medio, la población de poros de la membrana responde al PTM en forma dinámica, abriéndose a medida que este potencial aumenta, para después cerrarse en muchos casos o alcanzar un tamaño estable en otros siguiendo una compleja estadística analizada en [15]. En respuesta a esta apertura se modifica el coeficiente de conductividad eléctrica y el de difusión de la membrana facilitando el transporte a través de la misma [14]. Básicamente en este caso por mecanismos guiados por la difusión y la movilidad de las especies iónicas. Estos fenómenos también se relacionan con la tensión elástica sobre la membrana. Un campo eléctrico aplicado sobre la misma genera mediante el tensor de Maxwell una tensión local que produce una deformación en la célula, que genera que la misma tome una forma oblada o prolada, según sean los campos aplicados [22,23]. Una vez abiertos los poros y deformada la membrana en la zona de los polos de la célula, se produce una condición adecuada para que las especies iónicas de concentración distinta en cada medio (intra y extra celular) comiencen a ingresar o egresar de la célula por diferencia de concentración.

Es necesario destacar que el modelo propuesto en esta tesis y que sigue el trabajo de diferentes autores [15,16] es un mecanismo aún no establecido con firmeza y sobre el que persisten algunos puntos que se deben analizar y continuar estudiando. Es por ese motivo que investigaciones de este tipo resultan valiosas ya que permiten confirmar predicciones y poner en duda suposiciones analíticas que no son tenidas en cuenta en la teoría y deben ser estudiadas en detalle.

Este conjunto de simulaciones debe encararse mediante una compleja batería de modelos acoplados unos con otros y mutuamente dependientes. En esta tesis se propone por primera vez un mecanismo de funcionamiento en conjunto de todos estos fenómenos. Cada uno de estos modelos debe ser abordado por una técnica numérica adecuada. En primer lugar nos proponemos simular la distribución de potencial y campo eléctrico sobre el dominio conformado por el líquido intracelular, el liquido extracelular y la membrana mediante el método de los elementos finitos [17,18], discretizando explícitamente la membrana celular [16]. Es necesario destacar que la membrana celular posee un espesor aproximado de entre 5 y 10 nanómetros representando un desafío numérico novedoso al intentar discretizar la misma mediante elementos finitos. En la literatura la membrana es tratada mediante una condición de contorno que separa los medios extra e intra celular [21].

La modelización de la dinámica de creación y evolución de la población de poros sobre la membrana y el tamaño de los mismos es resuelta mediante una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias, que se evolucionan en el tiempo mediante un algoritmo de un paso temporal [24]. Con la información provista por ambos modelos, calculamos la nueva conductividad eléctrica y el coeficiente de difusión de la membrana permeabilizada, así como la distribución de tensiones sobre la misma. Tensión que retroalimenta el modelo de creación de poros y el de conductividad de membrana [22].

Con estos resultados se resuelve el problema del transporte en todo el dominio proponiendo que, a través de la membrana, el mismo ocurre por el área de poros abiertos. Analizaremos la movilidad de cuatro especies iónicas presentes en el medio extra e intracelular: hidrógeno (H^+), hidróxido (OH^-), sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) resolviendo las ecuaciones de Nernst–Planck para cada especie sobre todo el dominio. Para este cálculo volveremos a utilizar el método de elementos finitos sobre el mismo mallado utilizado para recalcular la distribución de potencial eléctrico.

Son numerosos los parámetros relevantes a tener en cuenta cuando se realiza una simulación tan compleja. En primer lugar debemos analizar los parámetros geométricos. Es necesario explorar el dominio de resolución adecuado, teniendo en cuenta que el tamaño de la célula puede variar en un rango que va de los 5 micrones a los 50 micrones de diámetro. El dominio general puede abarcar un espacio circundante amplio o restringir el estudio a unos pocos micrones fuera de la membrana y también resulta crucial el ancho de membrana utilizado. Como ya dijimos el espesor de la membrana vive entre los 5 y los 20 nanómetros dependiendo de la célula. Esta exploración geométrica es fundamental y a ella dedicamos una buena parte del tiempo involucrado en este trabajo. Algunos de los resultados se presentaran en el capítulo 3 y 4 del mismo.

Otro parámetro fundamental, dada la diferencia de escalas involucradas, es el tiempo. El paso temporal de cada uno de los modelos es diferente, ya que el campo eléctrico sobre el dominio varía poco en función del tiempo, mientras que el tiempo de creación y destrucción de poros es muy pequeño, sobre todo en los procesos iniciales de desarrollo del PTM. Por último el transporte de especies posee un tiempo característico intermedio entre ambos problemas mencionados. Determinar estas escalas y ajustarlas al modelo llevó una buena parte de las tareas preliminares a la obtención de resultados.

Para optimizar estos parámetros se realizó un análisis paramétrico de cada uno de los modelos por separado, algunos de los cuales, los más relevantes, son presentados en cada una de las secciones dedicadas a los mismos. Un punto a destacar es el relativo al tratamiento de las mallas de elementos finitos utilizadas. Hemos seleccionado un mallador externo [20] que se adapta adecuadamente a nuestro problema pero que hemos tenido que testear y comparar con otros similares. Algunos resultados de este análisis se presentan en el capítulo 2 dedicado a los modelos numéricos utilizados.

Los resultados obtenidos del modelo general son comparados con datos experimentales existentes en la literatura. Cada uno de los modelos por separado se comparan con experimentos o resultados numéricos provistos por otros códigos. En general hemos obtenido muy buenos acuerdos con los experimentos, como se mostrará en el capítulo 6 de esta tesis [14–16].

Problemas complejos proveen una gran cantidad de resultados que es necesario manipular adecuadamente para poder entender el modelo, esté funcionando bien o mal. Para ello hemos perfeccionado el uso de un software de visualización abierto [25]. Se mencionarán más detalles del mismo en la capítulo 2.

2. DESCRIPCIÓN DEL MODELO

En este capítulo se explica en detalle el modelo matemático estudiado y los métodos numéricos utilizados para resolverlo.

2.1. Modelo Matemático

Se estudia una única célula idealizada de forma esférica y compuesta por dos materiales: el líquido intracelular (citoplasma) y una fina membrana celular. La célula se encuentra sumergida en un líquido conductor extracelular, y se aplican pulsos eléctricos por medio de dos electrodos equidistantes a ella, con una diferencia de potencial constante. Los electrodos se encuentran en los bordes superior e inferior del dominio. A lo largo del trabajo se utiliza la letra E para representar el campo eléctrico, α para el radio de la célula y θ para el ángulo polar.

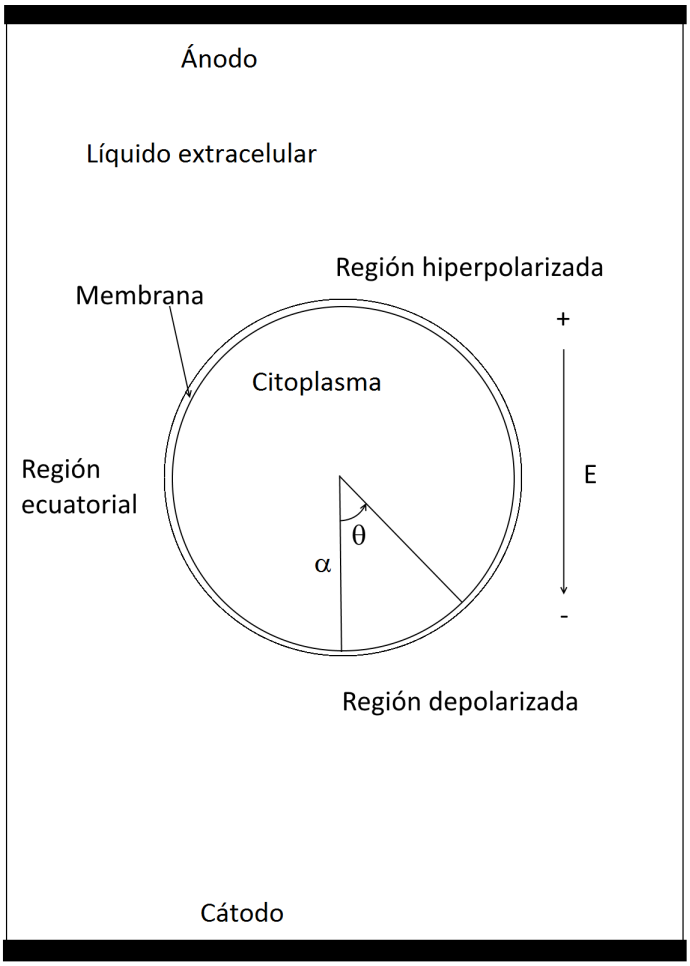
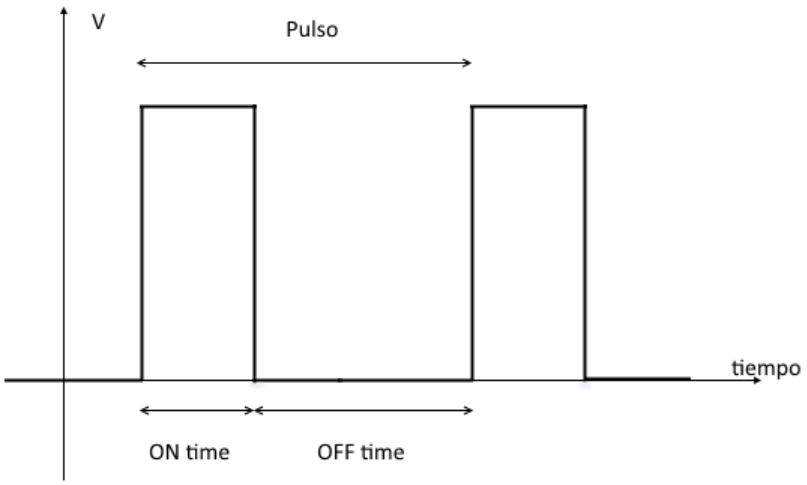


Fig. 2.1: Dominio del problema

Los pulsos se dividen en dos partes con un tiempo de encendido (`ON TIME`) en el que la diferencia de potencial es constante y un tiempo de apagado (`OFF TIME`) sin diferencia de potencial entre los electrodos.



Potencial Eléctrico

El potencial eléctrico generado por los electrodos se calcula en todo el dominio según la ecuación de Laplace [17]

$$\nabla(\sigma_{elem} \cdot \nabla\phi) = 0 \tag{2.1}$$

donde ϕ representa el potencial eléctrico y σ_{elem} la conductividad del material, para $elem = o, i$ ó m para el líquido extracelular, el citoplasma o la membrana celular respectivamente. Los valores de las conductividades son muy diferentes para los tres tipos de material, siendo en particular la conductividad de la membrana celular mucho menor que la del resto del dominio.

La diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula en un punto de su superficie se conoce como potencial transmembrana (PTM). Si la célula es esférica este potencial se puede aproximar con la fórmula cerrada [27]

$$PTM^{\theta} = f_s \, E \, \alpha \, \cos(\theta) \tag{2.2}$$

con

$$f_s = \frac{3\sigma_o \left(3d\alpha^2\sigma_i + \left(3d^2\alpha - d^3\right)(\sigma_m - \sigma_i)\right)}{2\alpha^3 (\sigma_m + 2\sigma_o)\left(\sigma_m + \frac{1}{2}\sigma_i\right) - 2(\alpha - d)^3 (\sigma_o - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)} \tag{2.3}$$

donde E es el campo eléctrico, θ el ángulo polar respecto del campo eléctrico, α el radio de la célula, d el espesor de la membrana y σ_o, σ_i y σ_m las conductividades del líquido extracelular, intracelular y de la membrana respectivamente. Cuando el valor de σ_m es al menos cinco órdenes de magnitud menor que σ_o y σ_i, el valor de f_s se puede aproximar como 3/2 [13]. La fórmula 2.2 no tiene en cuenta que el PTM puede variar en el tiempo por la creación de poros, por eso en este trabajo no se la usa directamente, si no que usa la ecuación 2.1.

Generación y evolución de poros

El PTM genera en la membrana celular la aparición de poros hidrofílicos, cuya variación de la densidad de poros en el tiempo se puede describir según la ecuación diferencial ordinaria [28]

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \alpha_c e^{(PTM/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_0 e^{q(PTM/V_{ep})^2}}\right) \tag{2.4}$$

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, PTM es el potencial transmembrana, V_{ep} es el voltaje característico de electroporación, N_0 es la densidad de poros en equilibrio (cuando $PTM = 0$) y q es una constante igual a $(r_m/r*)^2$, donde r_m es el radio de mínima energía para $PTM = 0$ y $r*$ es el radio mínimo de los poros. Esta ecuación se usa para cada región de la membrana por separado, ya que depende del PTM, que no es constante en la superficie.

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 ordinaria [15]

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \frac{D}{kT}\left(\frac{PTM^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_a)} + \frac{4\beta}{r}\left(\frac{r_*}{r}\right)^4 - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{\text{eff}} r\right) \tag{2.5}$$

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, PTM el potencial transmembrana, F_{max} la máxima fuerza eléctrica para PTM 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

$$\sigma_{\text{eff}} = 2\sigma' - \frac{2\sigma' - \sigma_0}{(1 - A_p/A)^2} \tag{2.6}$$

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 2.5, 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. Se debe analizar el radio de cada poro individualmente y no en conjunto.

Por otra parte se supone 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 [39]

$$\begin{aligned} PTM &= V_p\,(1 - e^{-t/\tau}), \\ \text{con } \tau &= \alpha\, C_m \left(\frac{1}{\sigma_i} + \frac{1}{2\sigma_o}\right) \end{aligned} \tag{2.7}$$

donde PTM 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.

Transporte de especies

Se estudia el transporte de cuatro especies iónicas: H^+, OH^-, Na^+ y Cl^- en el dominio. Para conocer las concentraciones en las diferentes regiones e instantes de tiempo se utiliza la ecuación de conservación de masa de Nernst-Planck [14]

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left(D_i \nabla C_i + D_i z_i \frac{F}{RT} C_i \nabla \phi \right) \tag{2.8}$$

donde C_i, D_i y z_i representan la concentración, el coeficiente de difusión y la valencia respectivamente de la especie i, para $i = H^+$, OH^-, Na^+ ó Cl^-. F es la constante de Faraday, R la constante de los gases y T la temperatura. Esta ecuación tiene en cuenta la difusión de las partículas (con el término $D_i \nabla C_i$) pero también el efecto de migración producto del campo eléctrico (con el término $D_i z_i \frac{F}{RT} C_i \nabla \phi$).

Condiciones de borde e iniciales

Para la ecuación 2.1 se usan condiciones de borde de Dirichlet con potenciales fijos en los electrodos:

$$\begin{aligned} \phi &= \phi_a \text{ para el ánodo} \\ \phi &= \phi_c = 0 \text{ para el cátodo} \end{aligned} \tag{2.9}$$

mientras que para el borde no ocupado por electrodos se usan condiciones de borde de Neumann:

$$\frac{\partial \phi}{\partial \mathbf{n}} = 0 \tag{2.10}$$

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

Para la ecuación de generación de poros 2.4 se usa como condición inicial que la membrana no contiene poros, mientras que para la ecuación 2.5 se supone que los poros se crean con un radio inicial r^*.

Para la ecuación de transporte de especies 2.8 se usan como condiciones iniciales las concentraciones descritas en la tabla 2.1: $C^0_{m,e}$ siendo $m = i$ ó o si se refiere a los nodos del interior o del exterior de la célula respectivamente y $e = H^+$, OH^-, Na^+ ó Cl^- para la concentración de cada especie.

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

$$\frac{\partial C_i}{\partial \mathbf{n}} = 0 \tag{2.11}$$

Constantes

A continuación se presenta la definición y valores de las constantes usadas. La unidad de las conductividades eléctricas es el siemens por metro (S/m).

Símbolo	Definición	Valor
σ_o	Conductividad de la zona extracelular	0.20 S/m
σ_i	Conductividad de la zona intracelular	0.15 S/m
σ_m	Conductividad de la membrana celular	5×10^{-6} S/m
σ_p	Conductividad del líquido que llena el poro	2 S/m
E	Campo eléctrico aplicado	1000 V/cm - 2000 V/cm
α	Radio de la célula	10 µm - 50 µm
d	Ancho de la membrana	5 nm
D_{H^+}	Coeficiente de difusión para H^+	12 500 µm/m^2
D_{OH^-}	Coeficiente de difusión para OH^-	7050 µm/m^2
D_{Na^+}	Coeficiente de difusión para Na^+	1780 µm/m^2
D_{Cl^-}	Coeficiente de difusión para Cl^-	3830 µm/m^2
C^0_{i,H^+}	Concentración inicial de H^+ en citoplasma	0.3978×10^{-7} M
C^0_{i,OH^-}	Concentración inicial de OH^- en citoplasma	0.3978×10^{-7} M
C^0_{i,Na^+}	Concentración inicial de Na^+ en citoplasma	142 mM
C^0_{i,Cl^-}	Concentración inicial de Cl^- en citoplasma	108 mM
C^0_{o,H^+}	Concentración inicial externa de H^+	1×10^{-7} M
C^0_{o,OH^-}	Concentración inicial externa de OH^-	1×10^{-7} M
C^0_{o,Na^+}	Concentración inicial externa de Na^+	14×10^{-7} mM
C^0_{o,Cl^-}	Concentración inicial externa de Cl^-	4×10^{-7} mM
$r*$	Radio mínimo de los poros	0.51 nm
r_m	Radio del poro de mínima energía	0.80 nm
α_c	Coeficiente de creación de poros	1×10^9 m^{-2}S^{-1}
V_{ep}	Voltaje característico	0.258 V
N_0	Densidad de poros en equilibrio	1.5×10^9 m^{-2}
D	Coeficiente de difusión para poros	5×10^{-14} m^{-2}S^{-1}
F_{max}	Máxima fuerza eléctrica	0.7×10^{-3} NV^{-2}
r_h	Constante usada para la velocidad de advección	0.97×10^{-9} m
r_a	Constante usada para la velocidad de advección	0.31×10^{-9} m
β	Repulsión estérica	1.4×10^{19} J
γ	Energía del perímetro de los poros	1.8×10^{11} J/m
σ'	Tensión de la interfase hidrocarburo-agua	2×10^{-2} Jm^{-2}
σ_0	Tensión de la bicapa sin poros	1×10^{-6} Jm^{-2}
C_m	Capacitancia superficial de la célula	1×10^{-14} Fm^{-2}
F	Constante de Faraday	9.648 534 C/mol
R	Constante de los gases	8.314 462 1 J/(C mol)
T	Temperatura	310 K
k	Constante de Boltzmann	$1.380\,648\,8 \times 10^{-23}$ J/K

Tab. 2.1: Valores constantes usados.Valores obtenidos de [2], [13] y [15]

2.2. Métodos Computacionales

La complejidad de las ecuaciones descritas en la sección anterior obliga a resolverlas con métodos numéricos. Se eligieron los métodos de elementos finitos y diferencias finitas, que fueron totalmente desarrollados en este trabajo. El método de elementos finitos requiere además resolver sistemas de ecuaciones lineales, los cuales se resolvieron utilizando la biblioteca Eigen [34].

Método de Elementos Finitos

El método de elementos finitos (FEM, *Finite Element Method*) es una herramienta computacional que se utiliza para resolver ecuaciones diferenciales discretizando el dominio en zonas pequeñas llamadas elementos y resolviendo un sistema de ecuaciones lineales con el que se obtiene la solución de las ecuaciones diferenciales en un conjunto de puntos del dominio. Una ventaja del método es que permite modelar con facilidad dominios con formas complejas, y que permite enfocar la atención en zonas del dominio que sean de particular interés, o que contengan cambios bruscos en la solución del problema, modelando sin problemas con elementos de tamaño variable. La aplicación del método de elementos finitos consiste en [18, 19]:

- 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 si el dominio es bidimensional). 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.

- Definir funciones de forma. Una función de forma de un nodo de un elemento es una función tal que vale 1 cuando se evalúa en el nodo que la define, 0 cuando se evalúa en los demás nodos del elemento, y tiene valores intermedios para los demás puntos del interior.

- Plantear la ecuación $R(e) = \int_v N \cdot (L(u) + f_v)\, dv$ para cada elemento, donde la ecuación diferencial a resolver tiene la forma $L(u) + f_v = 0$, N es un vector con las funciones de forma definidas anteriormente, y $R(e)$ es el residuo del elemento, que se intentará minimizar. Luego igualar el residuo a 0 y obtener un sistema de ecuaciones lineales de la forma $Ku = f$ donde K es una matriz de $n_e \times n_e$, con n_e la cantidad de nodos por elemento, u es el vector con los valores nodales de la ecuación a resolver y f es un vector de longitud n_e. La matriz K del sistema generado se denomina matriz de rigidez, y el vector f vector de fuerza. Para llegar al sistema de ecuaciones lineales suele ser necesario usar integración por partes para reducir el orden de las ecuaciones diferenciales y puede ser necesario resolver integrales con métodos aproximados de integración numérica. La manera de llegar al sistema de ecuaciones lineales depende de la ecuación diferencial a resolver, del tipo de los elementos usados y de las funciones de forma elegidas.

- Ensamblar todos los sistemas de ecuaciones elementales en un sistema grande, con tantas ecuaciones e incógnitas como nodos en la malla. El valor en cada nodo debe ser igual para los diferentes elementos a los que pertenece. El proceso de ensamblaje se realiza reescribiendo cada sistema elemental obtenido en el punto anterior por un sistema global, de $n \times n$, donde cada elemento de la matriz de rigidez K se coloca en la posición correspondiente al nodo que representa según la numeración global de los nodos en todo el dominio, y el resto de los elementos se dejan en 0. Luego se suman todas las matrices globales de cada elemento para obtener una única matriz global de rigidez del sistema. Lo mismo se debe realizar con el vector de fuerza f. La cantidad de elementos distintos de cero en cada fila i de la matriz de rigidez depende de la cantidad de elementos a los que pertenece el nodo i en la malla que representa el dominio y de la cantidad de nodos por elemento.

- Agregar las condiciones de borde al sistema global. En algunos casos es posible realizar este paso al generar las ecuaciones elementales, es decir antes de ensamblar el sistema. Diferentes condiciones de borde se agregan de diferentes maneras. Por ejemplo la condición de borde de Dirichlet en un nodo i se puede agregar al sistema reemplazando la fila i de la matriz de rigidez por una fila con 1 en la posición i y ceros en las demás posiciones, y reemplazando el valor en la posición i del vector de fuerza por el valor indicado por la condición de borde.

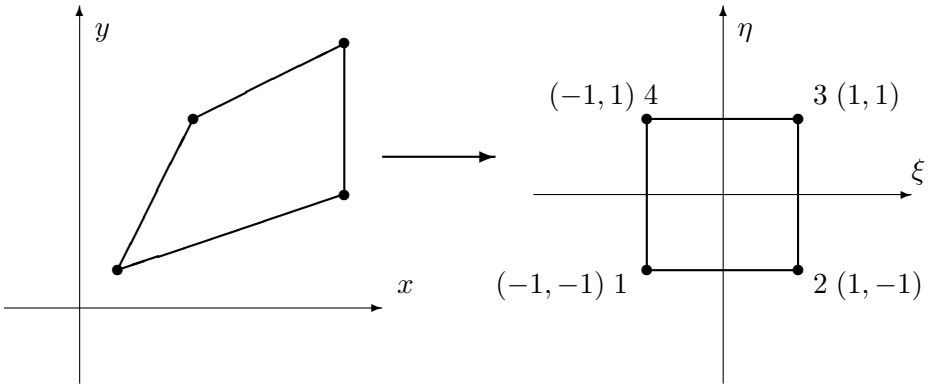
- Resolver el sistema ensamblado con algún método de resolución de ecuaciones lineales. El vector u global obtenido contiene las soluciones en los nodos de la ecuación diferencial. Dado que la matriz ensamblada es muy poco densa (muy pocos elementos distintos de cero), se suele representar con estructuras especiales para matrices dispersas. Si la matriz de rigidez global K es simétrica definida positiva[1] se pueden utilizar métodos especiales como descomposición de Cholesky, LDL o gradientes conjugados, que pueden reducir sustancialmente los tiempos de cómputo. También se pueden reducir los tiempos de resolución si se tiene una matriz banda[2] de rigidez. Para lograr esto último es necesario haber asignado números a los nodos de la malla de manera tal que se minimice la máxima distancia entre los números de dos nodos en un mismo elemento en todo el dominio.

[1] K es simétrica definida positiva si $K = K^\intercal$ y $x^\intercal K x > 0$ para todo vector $x \neq 0$

[2] K es una matriz con banda p si $K_{ij} = 0 \; \forall j < i - p$ ó $j > i + p$, es decir todos los valores distintos de cero están dentro de una banda diagonal con un ancho conocido

Función de forma bilineal lagrangiana

En particular en este trabajo se usan elementos cuadrilaterales y funciones de forma lagrangianas bilineales. Para trabajar con facilidad se realiza un cambio de variables que transforma cualquier elemento cuadrilateral en un cuadrado estándar. Esto permite trabajar con las mismas funciones de forma para todos los elementos, aunque estos tengan formas o tamaños muy variados. Esta proyección se conoce como transformación isoparamétrica.



La proyección tranforma puntos de las coordenadas reales (x, y) a coordenadas locales (ξ, η) en el rango $[-1, 1]$. Las funciones de forma bilineales lagrangianas son:

$$N_i(\xi, \eta) = \frac{1}{4}(1 + \xi_i\,\xi)(1 + \eta_i\,\eta) \tag{2.12}$$

para $i = 1, \ldots, 4$, donde ξ_i y η_i son las coordenadas locales del punto i (que valen -1 o 1). Es fácil ver que la función de interpolación i vale 1 en el punto (ξ_i, η_i), 0 en (ξ_j, η_j) para $j \neq i$ y valores intermedios para cualquier otro punto del cuadrado estándar. Esta función de forma es una función de interpolación de primer orden y usa únicamente los 4 elementos de las esquinas del cuadrilátero, mientras que otras funciones de forma son polinomios de mayor grado que usan también puntos intermedios del elemento.

Integración por cuadratura de Gauss

Para resolver las integrales necesarias en el método de elementos finitos, se recurrió a la integración numérica. El método de cuadratura de Gauss permite obtener una aproximación de la integral definida de una función en un intervalo evaluando la función a en una serie de puntos y realizando una suma pesada de los valores. En forma general se puede integrar en dos dimensiones en el cuadrado estándar como

$$\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1} f(\xi, \eta)\,\mathrm{d}\eta\,\mathrm{d}\xi \approx \sum_{j=1}^{n}\sum_{i=1}^{n} w_j\,w_i\,f(r_i, r_j) \tag{2.13}$$

donde n es la cantidad de puntos elegidos para realizar la cuadratura, w_i es el peso del iésimo punto y r_i es el iésimo punto. Tanto los w_i como los r_i corresponden a las raíces de los polinomios de Legendre. En el caso particular de esta tesis se trabajó con $n = 2$ puntos, por lo tanto corresponden los siguientes valores: $r_1 = -\sqrt{1/3}, r_2 = \sqrt{1/3}, w_1 = w_2 = 1$.

Descomposición LDL

La factorización LDL permite descomponer una matriz A simétrica en $A = LDL^\intercal$ donde L es triangular inferior con unos en la diagonal, D es diagonal y $L^\intercal$ es la matriz traspuesta de L. De esta manera es posible resolver sistemas de ecuaciones lineales de la forma $Ax = b$ con aproximadamente la mitad de las operaciones que se necesitarían por el método de eliminación gaussiana o LU. Este método puede utilizarse para cualquier matriz A cuadrada simétrica que tenga una descomposición LU sin intercambios de filas. En particular puede aplicarse para todas las matrices simétricas definidas positivas.

El algoritmo para obtener las matrices L y D a partir de una matriz A de $n \times n$ es:

for all $i \in \{1 \dots n\}$ **do**
  for all $j \in \{1 \dots i-1\}$ **do**
    $v_j = L_{ij} D_{jj}$
  end for
  $D_{jj} = A_{ii} - \Sigma_{j=1}^{i-1} L_{ij} v_j$
  for all $j \in \{i+1 \dots n\}$ **do**
    $L_{ij} = \left(A_{ji} - \Sigma_{k=1}^{j-1} L_{jk} v_k\right) / D_{ii}$
  end for
end for
return L, D

El algoritmo requiere aproximadamente $\frac{1}{6}n^3 + \frac{1}{2}n^2 - \frac{7}{6}n$ multiplicaciones o divisiones de punto flotante [35]. La factorización LDL es similar a la descomposición de Cholesky, la cual calcula una descomposición de la forma $A = L'L'^\intercal$, donde $L' = L\sqrt{D}$. Sin embargo el método de Cholesky requiere calcular la raíz cuadrada de la matriz diagonal D, lo cual tiene un costo computacional y un error de cálculo adicional. LDL tiene además como ventaja que funciona en algunos casos en los que A no es una matriz definida positiva, lo cual no sucede con la descomposición de Cholesky.

Descomposición de gradiente biconjugado estabilizado

El método del gradiente biconjugado estabilizado (BiCGSTAB por *biconjugate gradient stabilized method*) es un algoritmo iterativo que sirve para resolver sistemas de ecuaciones lineales de la forma $Ax = b$. BiCGSTAB es una modificación del método del bigradiente conjugado (BCG) que logra una mayor estabilidad numérica y velocidad de convergencia. A su vez BCG es una generalización del método de gradientes conjugados, modificado para funcionar también con matrices no simétricas pero con baja estabilidad numérica. El pseudocódigo del algoritmo es [36, 37]:

Elegir valores iniciales de x_0 y $\widetilde{r}_0$
$r_0 = b - Ax_0$
$u_{-1} = w_{-1} = s_{-1} = 0$
$\alpha_{-1} = \sigma_{-1} = \widetilde{\alpha}_{-1} = \widetilde{\sigma}_{-1} = 1$
$k = 0$
repeat
  $\rho_k = (r_k, \widetilde{r}_0)$
  $\beta_k = (-1/\widetilde{\alpha}_{k-1})(\rho_k/\sigma_{k-1})$
  $w_k = r_k - \beta_k(w_{k-1} - \widetilde{\alpha}_k c_{k-1})$
  $c_k = Aw_k$
  $\sigma_k = (c_k, \widetilde{r}_0)$
  $\alpha_k = \rho_k/\sigma_k$
  $s_k = r_k - \alpha_k c_k$
  $t_k = As_k$
  $\widetilde{\alpha}_k = (s_k, t_k)/(t_k, t_k)$
  $x_{k+1} = x_k + \alpha_k w_k + \widetilde{\alpha}_k s_k$
  $r_{k+1} = s_k - \widetilde{\alpha}_k t_k$
  $k = k + 1$
until x_k no sea lo suficientemente preciso
return x_k

BiCGSTAB funciona particularmente bien comparado con métodos directos cuando se trabaja con sistemas de ecuaciones muy grandes y esparsos, algo que suele suceder a menudo al aplicar el método de elementos finitos. Dado que es un algoritmo iterativo, necesita un criterio de parada que puede estar dado como una medida de la diferencia entre b y Ax_k. El valor de x_0 usado en la primera iteración se puede elegir de manera arbitraria, y el algoritmo puede converger en muy pocas iteraciones si se elije un valor de x_0 muy cercano a la solución del sistema. Por esta razón si se resuelven muchos sistemas de ecuaciones similares, se puede usar la solución final de uno como solución inicial del siguiente.

2.3. Implementación

El problema fue dividido en tres partes, según los tres fenómenos físicos principales considerados: el potencial eléctrico en el dominio, la evolución de los poros en la membrana celular y el transporte de las especies iónicas.

El trabajo fue implementado en `C++`. Se hizo uso de varias funcionalidades nuevas incorporadas al lenguaje en `C++11`, y de la biblioteca de álgebra lineal Eigen para resolver sistemas de ecuaciones. Las simulaciones fueron realizadas en un equipo con procesador Intel i3 2100 corriendo a 3.10 GHz y 8GB de memoria RAM con sistema operativo Microsoft Windows 7. El código es portable y fue compilado con Microsoft Visual C++ bajo la interfaz Microsoft Visual Studio 2013, pero también fue probado con los compiladores Intel C Compiler para Windows y GCC para Linux.

Para realizar las simulaciones de los problemas de potencial eléctrico y transporte de especies se utilizó el método de elementos finitos, que requiere resolver sistemas de ecuaciones lineales. Las resoluciones de los sistemas de ecuaciones se hicieron con la biblioteca Eigen, usando matrices esparsas y los métodos LDL y gradiente biconjugado estabilizado. Las ecuaciones de densidad y radio de poros se resolvieron por el método de diferencias

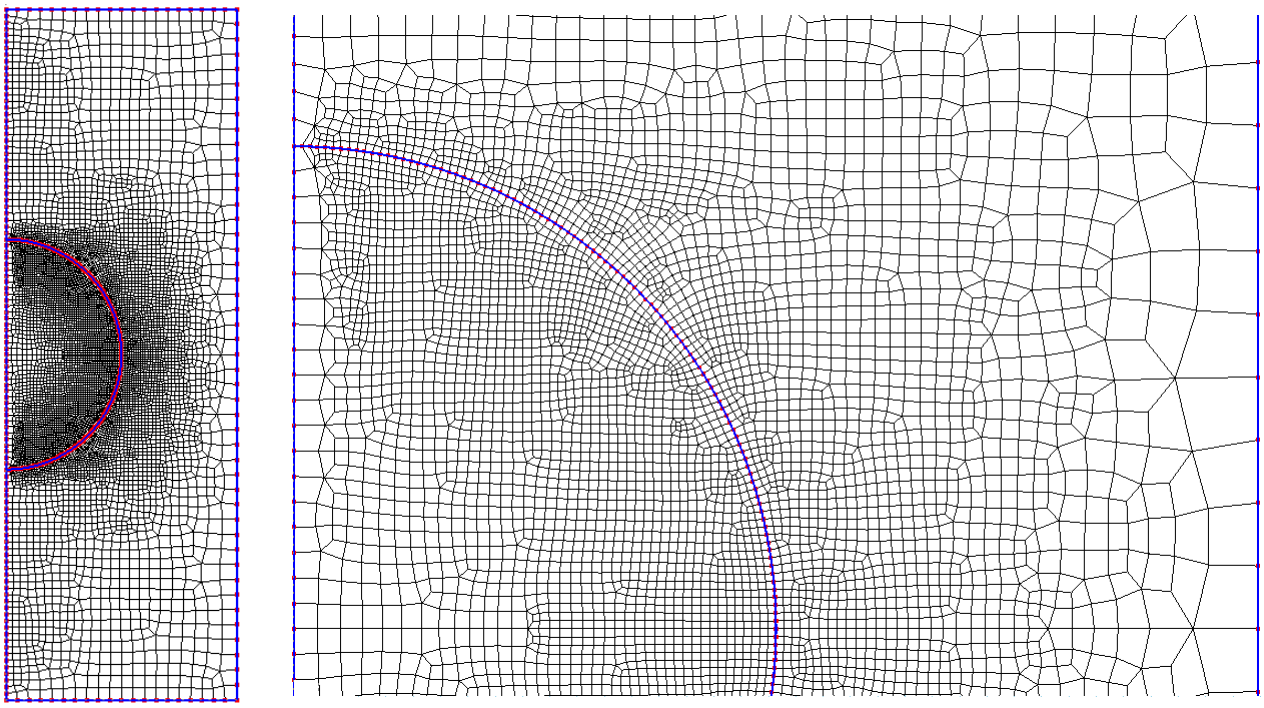


Fig. 2.2: Ejemplo de malla. Dominio completo (izquierda) y detalle (derecha). La célula tiene forma de semicírculo dado que se usan coordenadas cilíndricas. Los elementos de la membrana son los más pequeños y no se alcanzan a ver.

finitas.

Se usó un sistema de coordenadas cilíndricas idealizando la célula y los electrodos como sólidos de revolución. Se generaron mallas bidimensionales con elementos cuadrilaterales de tamaño variable usando el programa Auto-Mesh 2D [20]. Las zonas cercanas a la membrana celular son de mucho interés y contienen cambios bruscos de potencial y concentraciones. Por esta razón se usaron elementos muy pequeños en estas regiones. Se distinguen en la malla tres regiones: el líquido extracelular, el citoplasma (en el interior de la célula) y la membrana celular. A diferencia de otros trabajos anteriores la membrana celular se modela en la malla con elementos propios del tamaño real en vez de considerarse con un ancho superior al real o directamente una condición de borde. El método de elementos finitos fue elegido en lugar del método de diferencias finitas porque permite crear mallas con elementos de tamaños irregulares y realizar cambios en las mallas empleadas sin modificar el programa que realiza la simulación.

Las mallas utilizadas tienen entre 7500 y 8900 elementos y representan un dominio de hasta 150 µm de alto y hasta 50 µm de ancho con una célula cuyo radio varía entre 10 y 50 µm y con una membrana de 5 nm de espesor. Para modelar la membrana se crearon tres arcos separados a 2.5 nm de distancia, que fueron divididos en 192 partes en la dirección del ángulo polar. De esta manera se obtiene una membrana con dos elementos en la dirección radial, como puede observarse en la figura 2.3. Los electrodos se modelaron dentro del dominio, en los bordes superior e inferior.

También se usó Python como lenguaje secundario, para ayudar en la generación de mallas, la interpretación de los datos de salida obtenidos en las simulaciones y la generación de gráficos, haciendo uso de la biblioteca matplotlib [26]. El programa lee los parámetros

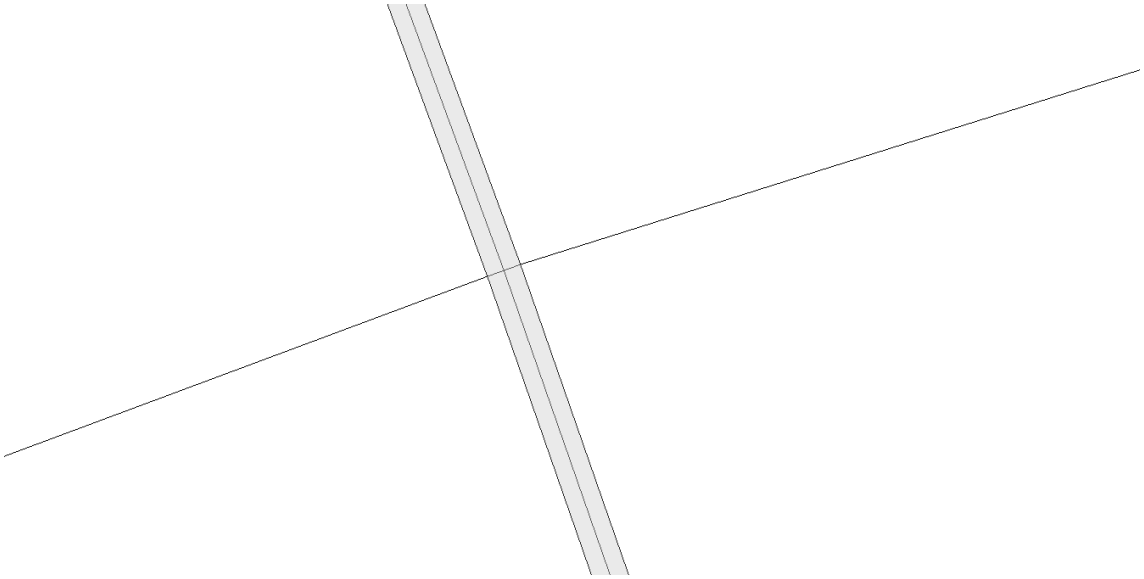


Fig. 2.3: Detalle de la malla cerca de la membrana. Los elementos coloreados en gris corresponden a la membrana celular, mientras que los de la izquierda corresponden al interior de la célula y los de la derecha al exterior.

de ejecución de un archivo `input.in` y graba periódicamente resultados de potencial y campo eléctrico, potencial transmembrana, densidad y radios de poros en la membrana celular, concentraciones de las especies y valores de pH en diferentes archivos de salida.

Escalabilidad

El código implementado contiene partes que corren en paralelo implementadas con OpenMP para mejorar así los tiempos de ejecución.

OpenMP es una API (interfaz de programación de aplicaciones) que permite implementar con facilidad código paralelo con múltiples hilos de ejecución y memoria compartida [41]. Consta de un conjunto de directivas para el compilador llamadas *pragmas* y se puede utilizar en programas de Fortran, `C` y `C++`. Una de las principales ventajas de OpenMP contra otros paradigmas de paralelización como el pasaje de mensajes, es que con OpenMP es muy fácil convertir código serial a paralelo. Por ejemplo para convertir un ciclo serial que consume mucho tiempo de ejecución a uno paralelo suele bastar con agregar unos pocos *pragmas* al código. Con el modelo de pasaje de mensajes, en cambio, sería necesario reescribir gran parte de la lógica del programa, ya que los diferentes procesos no compartirían memoria y necesitarían enviarse mensajes explícitamente. Como desventaja se tiene que es necesario que todos los núcleos involucrados en el cómputo compartan la misma memoria, lo cual impide utilizar clústers de computadoras limitando la paralelización que es posible obtener. Esto no es un problema en este trabajo, ya que se utilizan mallas bidimensionales relativamente pequeñas y que gran parte del código es serial, y por lo tanto no se obtendría una mejora significativa con una cantidad muy grande de procesos ejecutando en paralelo.

Para medir la mejora obtenida al utilizar varios hilos de ejecución se utilizan las medi-

	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 %

Tab. 2.2: Tiempos de ejecución para un pulso de 5 ms y una malla de 8899 nodos corriendo en un CPU intel i3 2100 a 3.10 GHz con capacidad para 4 threads

das de *speedup* y *eficiencia*. Se define speedup como $S = T_s/T_p$ donde T_s es el tiempo de ejecución serial (con un solo proceso o hilo) y T_p el tiempo de ejecución paralelo [40]. La eficiencia en cambio es $E = S/p$ donde S es el speedup y p la cantidad de procesos o hilos [40].

En la tabla 2.2 se encuentran medidas de los tiempos de ejecución, speedup y eficiencia de una simulación similar a las realizadas en el capítulo 6, usando entre 1 y 4 hilos de ejecución. Se puede ver que los mejores tiempos se obtuvieron con 4 threads, pero sin embargo el speedup es apenas mayor al obtenido con 2 threads, y la eficiencia es mucho menor. Se puede concluir que el programa escala correctamente para 2 threads, pero no mejora notablemente al agregar más hilos de ejecución, e incluso empeora los tiempos de ejecución al pasar de 2 a 3 hilos. La baja escalabilidad puede deberse a que solo una fracción del código corre en paralelo (el armado de matrices del cálculo del potencial eléctrico y el cálculo de las concentraciones de especies), mientras que la mayor parte es serial (los cálculos relacionados a los poros y la factorización de matrices para el potencial eléctrico).

3. POTENCIAL ELÉCTRICO

En este capítulo se estudiará el potencial transmembrana generado en una célula por efecto de un pulso eléctrico, usando la ecuación 2.1 descrita en el capítulo anterior. Para eso se presentará el modelo computacional y se analizarán los resultados. Se estudiará únicamente el potencial eléctrico en el dominio con su campo eléctrico, pero no se tendrá en cuenta la creación de poros en la membrana, los cuales pueden afectar la conductividad de la misma y modificar de esta manera el potencial eléctrico a través del tiempo.

3.1. Implementación

Para resolver la ecuación 2.1 se utilizó el método de elementos finitos, llenando la matriz de rigidez según las conductividades y coordenadas de los elementos y el vector de masa según las condiciones de borde. La matriz de rigidez generada es simétrica definida positiva y con muy pocos elementos distintos de cero. Por estas razones es representada con una matriz esparsa y el sistema de ecuaciones se resuelve con el método LDL. Una vez resuelto el sistema se obtiene el potencial eléctrico en cada nodo de la malla que representa el dominio. Dado que la creación de la matriz es uno de los pasos con mayor costo computacional, se utiliza `OpenMP` para llenar la matriz en paralelo, usando tantos threads como sean indicados en el archivo de entrada `input.in`.

Con los resultados obtenidos por el método de elementos finitos del potencial eléctrico se calcula también el PTM en cada ángulo polar de la célula, comparando los potenciales externos con los internos, habiendo previamente identificado los nodos correspondientes al exterior e interior de cada ángulo discreto. También se calcula el campo eléctrico en el dominio como el gradiente del potencial eléctrico. Los resultados de potencial en el dominio, PTM y campo eléctrico se graban en archivos separados en formato `.csv`[1].

[1] *Comma-separated values*, valores separados por coma en texto plano.

3.2. Resultados

A continuación se presentan los resultados del potencial, potencial transmembranal y campo eléctrico de una célula de 25 µm de radio con dos electrodos, sujeta a distintos campos eléctricos.

Se observa en la figura 3.1 que el potencial en el interior de la célula es constante y que la diferencia de potencial entre el exterior y el interior varía según la región de la superficie: en las regiones cercanas al ecuador de la célula la diferencia entre el interior y le exterior es casi nula, pero en los polos la diferencia se hace mayor.

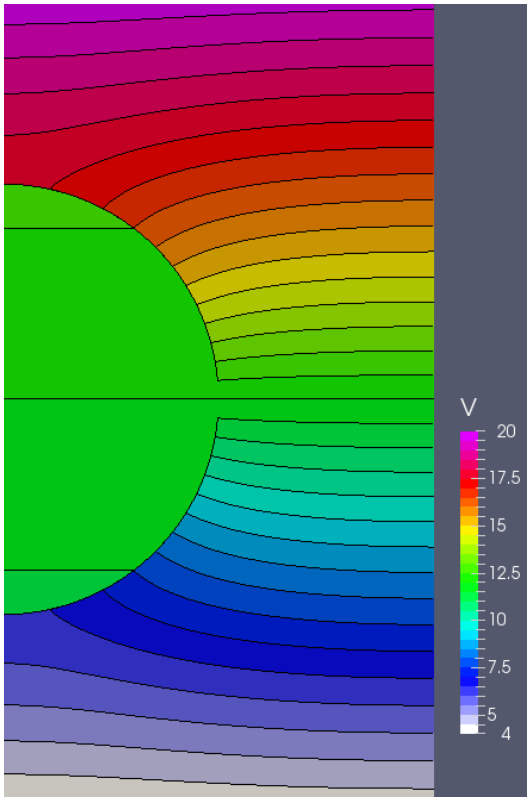


Fig. 3.1: Potencial eléctrico en el dominio para E = 1600 V/cm

Las figuras 3.2 y 3.3 representan la componente horizontal del campo eléctrico en el dominio, fuera y dentro de la célula, con escalas diferentes. Los valores más altos se encuentran en exterior de la célula, con un campo en dirección positiva (hacia afuera de la célula) en el hemisferio hiperpolarizado, y negativa (hacia la célula) en el hemisferio depolarizado. Los valores en el interior de la célula son mucho menores, pero de signo opuesto al del exterior; con dirección hacia el exterior en el hemisferio depolarizado y hacia el interior en el hemisferio hiperpolarizado. Por último se nota que los valores extremos se encuentran en la membrana, con signo opuesto al del exterior, es decir con el campo en dirección al interior de la célula en el hemisferio hiperpolarizado y con dirección opuesta en el hemisferio depolarizado.

En las figuras 3.4 y 3.5 se representa en cambio la componente vertical del campo eléctrico para el exterior e interior. En todos los casos el signo es negativo, por ser la dirección del campo hacia abajo. Los valores más altos se encuentran en toda la membrana y en la zona extracelular, cerca del ecuador de la célula, mientras que ambos polos tienen los valores más cercanos a cero. En el interior de la célula el campo tiene intensidades con valor absoluto mucho menor, y al igual que en el exterior valores extremos cerca del ecuador y cercanos a cero en los polos.

Por último en las figuras 3.6 y 3.7 se observa el módulo del campo eléctrico, teniendo en cuenta sus dos componentes, y se observan nuevamente los valores más extremos en la membrana y en zona del exterior cercana al ecuador.

En la figura 3.8 se pueden comparar los resultados de PTM en función del ángulo polar obtenidos con la simulación de los indicados por la fórmula cerrada 2.2. Como puede observarse, los valores obtenidos con el método de elementos finitos son muy similares a los obtenidos con la fórmula cerrada, lo cual confirma el correcto funcionamiento de la simulación.

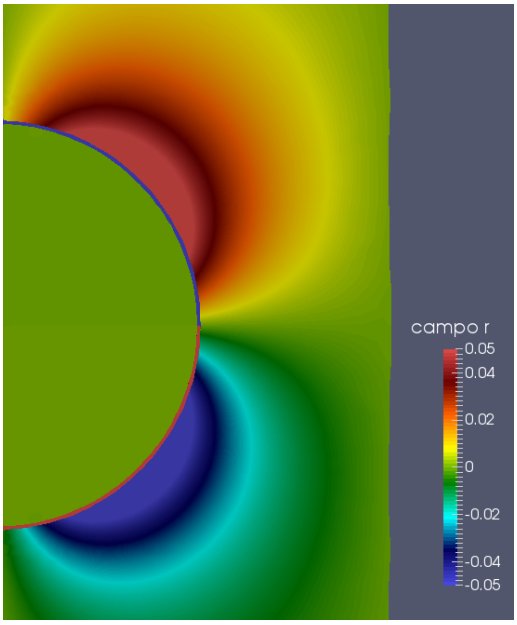


Fig. 3.2: Componente horizontal del campo eléctrico con E = 1200 V/cm

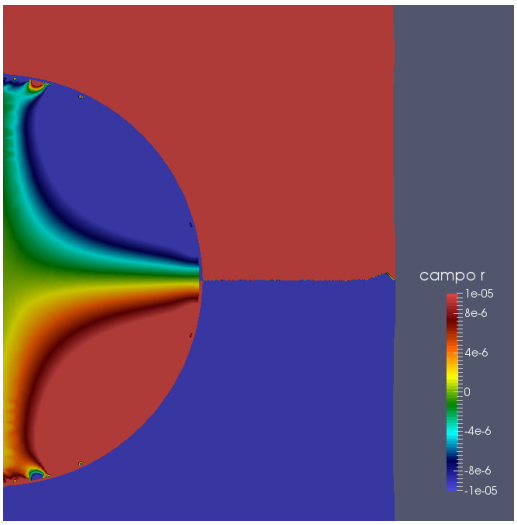


Fig. 3.3: Componente horizontal del campo eléctrico en el interior de la célula con E = 1200 V/cm

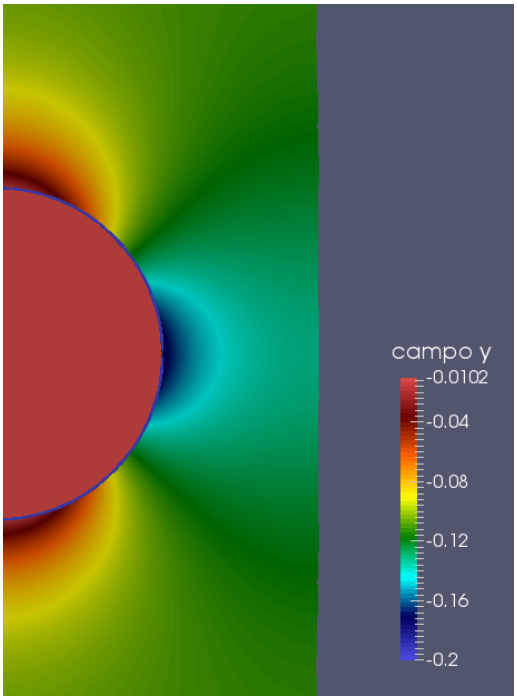


Fig. 3.4: Componente vertical del campo eléctrico con E = 1200 V/cm

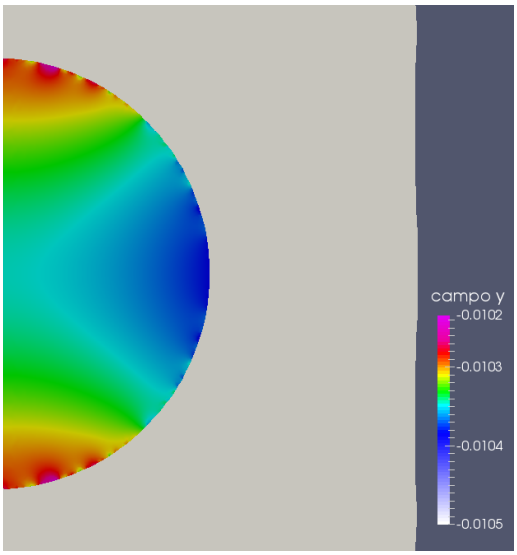


Fig. 3.5: Componente vertical del campo eléctrico en el interior de la célula con E = 1200 V/cm

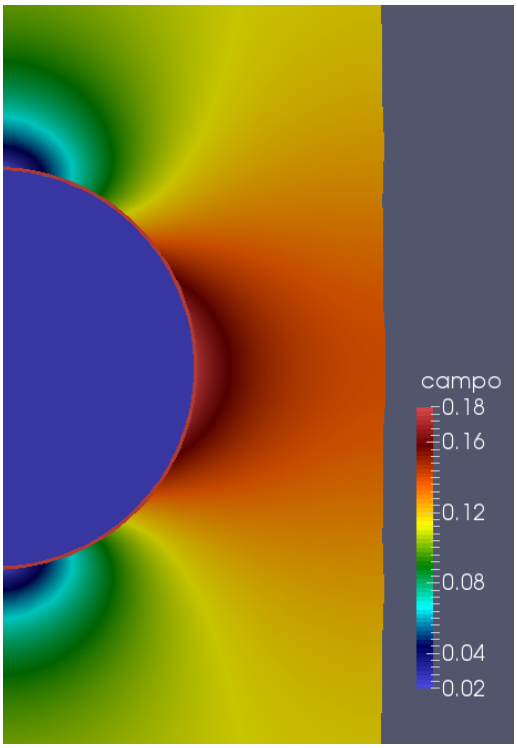


Fig. 3.6: Módulo del campo eléctrico con E = 1200 V/cm

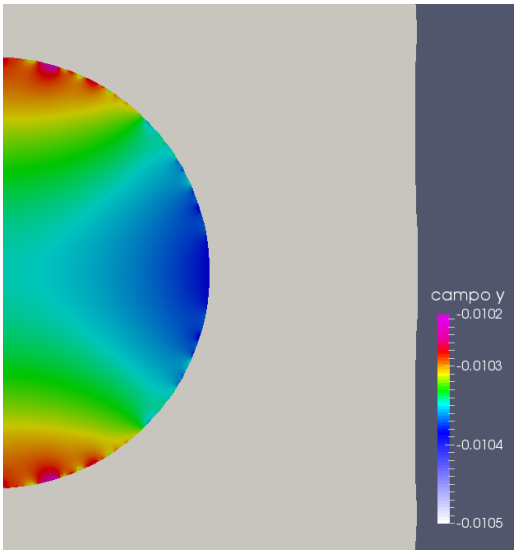


Fig. 3.7: Módulo del campo eléctrico en el interior de la célula con E = 1200 V/cm

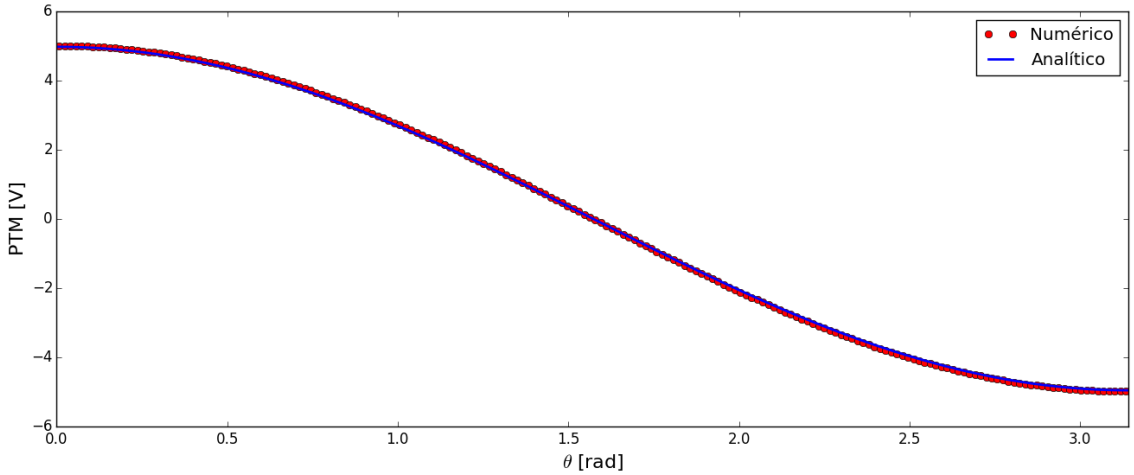


Fig. 3.8: PTM en función del ángulo polar θ para E = 1600 V/cm y $\alpha = 25\mu$m. Resultados de la simulación y de la fórmula cerrada.

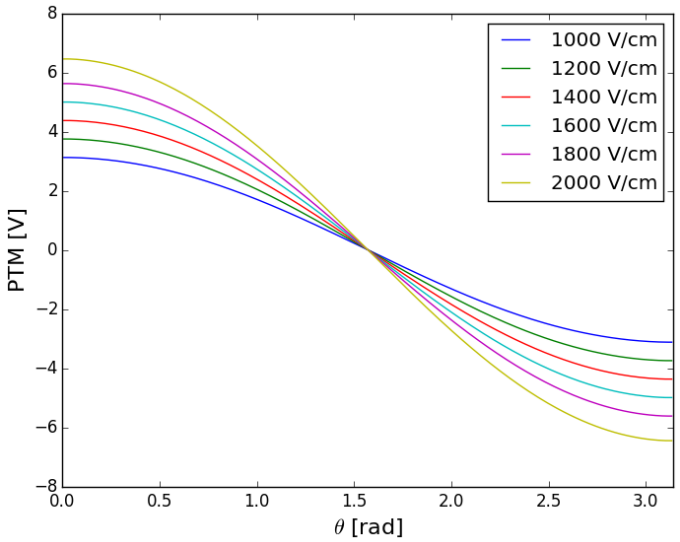


Fig. 3.9: PTM en función del ángulo polar θ para diferentes campos eléctricos aplicados

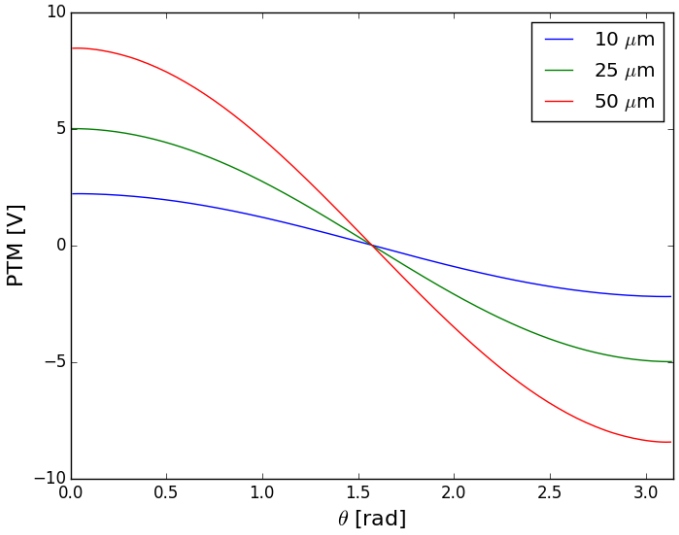


Fig. 3.10: PTM en función del ángulo polar θ para células de diferentes radios con E = 1600 V/cm

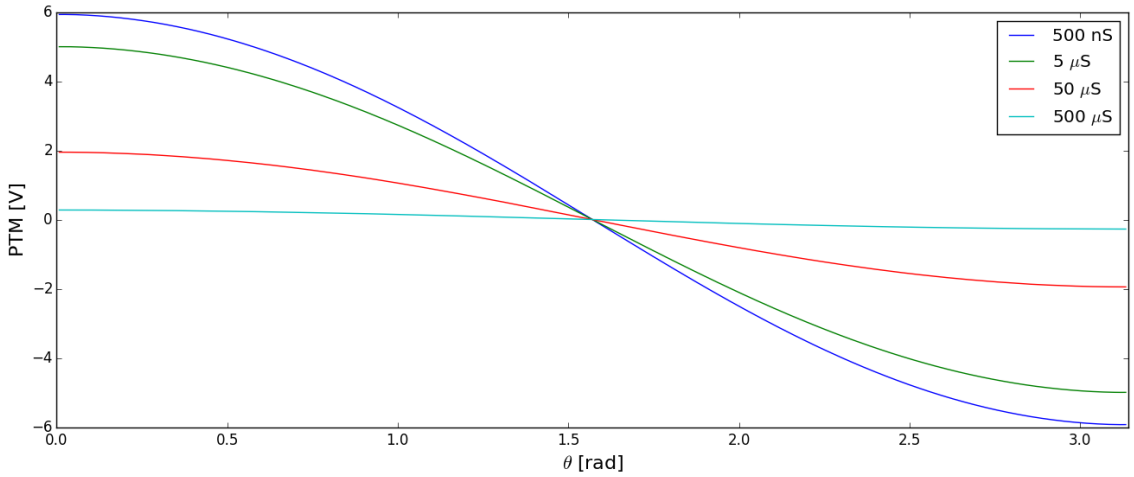


Fig. 3.11: PTM en función del ángulo polar θ para membranas con diferentes conductividades, para un campo eléctrico aplicado de 1600 V/cm y una célula de 25 µm de radio.

También se realizaron simulaciones aplicando diferentes potenciales eléctricos y con células de diferentes radios. En la figura 3.9 se observa que el PTM aumenta linealmente al aumentar el campo eléctrico aplicado. También sucede lo mismo con el radio de la célula, como puede verse en la figura 3.10. Nuevamente coinciden los resultados de las simulaciones con los de la fórmula cerrada 2.2, la cual indica que los valores de PTM son directamente proporcionales al campo eléctrico y el radio de la célula, y por lo tanto se necesitarán mayores valores de campo eléctrico para lograr un mismo potencial transmembrana cuanto más chica sea la célula. Por último se estudió el efecto de la conductividad de la membrana celular (σ_m) en el PTM. En la figura 3.11 se observa como el PTM aumenta dramáticamente al disminuir el valor de la conductividad de la membrana. El valor de 5 µS (línea verde en el gráfico) fue el utilizado en todo el resto del trabajo.

4. GENERACIÓN Y EVOLUCIÓN DE POROS

En este capítulo se simula la creación de poros en la membrana celular según las ecuaciones 2.4 y 2.5. Para eso se utiliza el cálculo del potencial eléctrico realizado en el capítulo anterior, pero se le agrega la ecuación 2.7, que tiene en cuenta la capacitancia de la célula al momento de calcular el potencial transmembrana y se actualizan los valores de conductividad en la membrana según la permeabilización lograda por los poros.

4.1. Implementación

Como las ecuaciones que gobiernan la creación de poros en la membrana son dependientes del tiempo, fue necesario crear un ciclo que realice iteraciones de las ecuaciones de poros y de potencial eléctrico. La ecuación 2.1 debe correrse periódicamente a pesar de que no depende del tiempo, ya que los valores de conductancias en la membrana (σ_m) son afectados por la aparición de poros que evolucionan en el espacio y el tiempo. Las ecuaciones 2.4 y 2.5 fueron discretizadas con el método de Euler[1].

La ecuación 2.4 que calcula la densidad de poros en cada región de la membrana fue discretizada como

$$\frac{N_{t+1} - N_t}{\Delta t} = \alpha e^{(PTM/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N_t}{N_0 e^{q(PTM/V_{ep})^2}}\right) \tag{4.1}$$

Para obtener el valor de PTM en cada punto de la membrana celular se tienen en cuenta los potenciales obtenidos con el método de elementos finitos y la capacitancia de la célula. Primero se calcula la diferencia de potencial entre los nodos externos e internos de la membrana y luego se aplica la ecuación 2.7 para obtener el PTM real según el tiempo transcurrido desde el comienzo del pulso.

La cantidad de poros en cada región de la membrana se calcula multiplicando la densidad obtenida con la ecuación 4.1 por el área de cada región discreta y tomando la parte entera del valor obtenido. El área de cada zona esférica discreta se calcula como

$$A = 2\pi\alpha^2(\cos(\theta_1) - \cos(\theta_2)) \tag{4.2}$$

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

Se mantiene para cada zona esférica discreta un vector con cada uno de los poros y sus radios. Si en una iteración la cantidad de poros estimada para una región es mayor a cantidad de poros estimada en la iteración anterior, entonces se agregan poros al vector de la región esférica con radio inicial r_*.

Para cada uno de los poros se calcula por separado la variación de su radio en el tiempo aplicando la ecuación 2.5 discretizada como

$$\frac{r_{t+1} - r_t}{\Delta t} = \frac{D}{kT}\left(\frac{PTM^2 F_{max}}{1 + r_h/(r_t + r_a)} + \frac{4\beta}{r_t}\left(\frac{r_*}{r_t}\right)^4 - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{\text{eff}} r_t\right) \tag{4.3}$$

[1] Si se tiene una ecuación diferencial ordinaria tal que $Y'(x) = f(x, Y(x))$ y $Y(x_0) = Y_0$, el método de Euler con un paso h aproxima la función Y como $y_0 = Y_0$ y $y_{n+1} = y_n + h\, f(x_n, y_n)$ [42]

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 4.3 a cada uno, técnica utilizada en [15].

Los valores de conductividad de la membrana son afectados por la aparición de poros. Por esta razón se calcula primero la permeablización de cada región de la membrana como la proporción del área ocupada por poros con la fórmula

$$p = \frac{\sum_{r \in R} \pi r^2}{A_z} \tag{4.4}$$

donde p es la permeabilización de una zona esférica de la membrana, 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 4.2. Luego se actualizan los valores de conductividad de cada zona de la membrana como

$$\sigma_{\text{elem}} = \sigma_m(1-p) + \sigma_p p \tag{4.5}$$

con σ_{elem} la nueva conductividad del elemento finito, σ_m la conductividad de la membrana cuando no tiene poros y σ_p la conductividad del líquido que llena los poros.

De la misma manera se actualizan los valores de difusión para los elementos de la membrana

$$D_{\text{elem}} = D_m(1-p) + D_p p \tag{4.6}$$

con D_m la difusión de la membrana celular sin poros y D_p la difusión del líquido que llena los poros. Este cambio en la difusión no tiene por el momento ningún efecto pero lo tendrá en el capítulo 6 cuando se calcule el transporte de especies.

4.2. Resultados

Se corrieron simulaciones con células de 25 µm de radio y pulsos de entre 1200 V/cm y 1600 V/cm y 5 ms de duración.

En las figuras 4.1 y 4.2 se presentan histogramas con los radios de los poros grandes creados en diferentes instantes para pulsos de 1200 V/cm. También hay una gran población de poros pequeños (con radio menor a 1 nm) que no fueron graficados por ser de poco interés. Se puede observar que la población de poros alcanza valores altos en un primer instante, pero se reduce dramáticamente en los instantes posteriores. En las figuras 4.3 y 4.4 se observa distribución de radios para la misma célula pero con un pulso de 1600 V/cm. Tanto la cantidad como el radio de los poros creados es mayor en el segundo caso, y se observa también una disminución en la población pasados los primeros instantes del pulso. Es importante notar que si bien la cantidad de poros disminuye con el tiempo, los poros que quedan tienen un radio promedio notablemente mayor al de los primeros instantes.

Se puede observar en la figura 4.5 el potencial transmembrana en función del tiempo al comienzo del pulso para diferentes ángulos polares θ, con dos campos eléctricos diferentes. El PTM se incrementa durante los primeros instantes hasta alcanzar un pico de tensión a partir del cual comienza a disminuir hasta alcanzar un valor de equilibrio. La subida paulatina de tensión durante los primeros instantes del pulso se debe a la capacitancia de la célula, mientras que la caída en los instantes posteriores se debe a la aparición de poros, que incrementan la conductividad de la membrana, disminuyendo de esta manera la caída

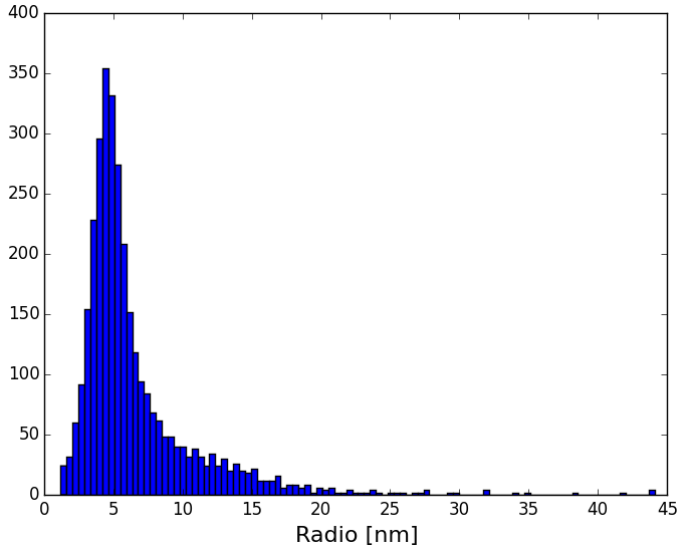


Fig. 4.1: Distribución de radios de los poros grandes para $E = 1200\,\mathrm{V/cm}$ en $t = 20\,\mu\mathrm{s}$

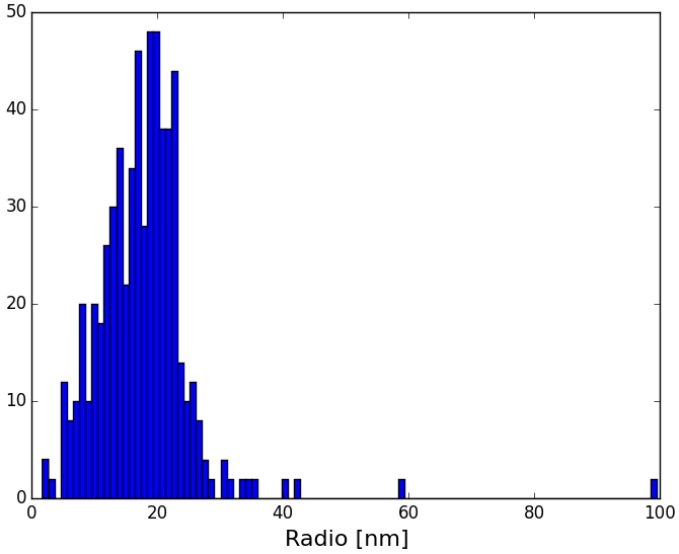


Fig. 4.2: Distribución de radios de los poros grandes para $E = 1200\,\mathrm{V/cm}$ en $t = 500\,\mu\mathrm{s}$

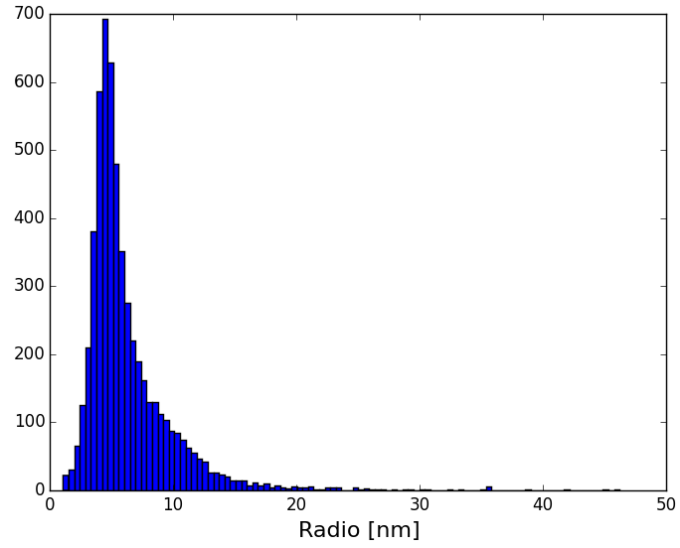


Fig. 4.3: Distribución de radios de los poros grandes para $E = 1600\,\mathrm{V/cm}$ en $t = 20\,\mu\mathrm{s}$

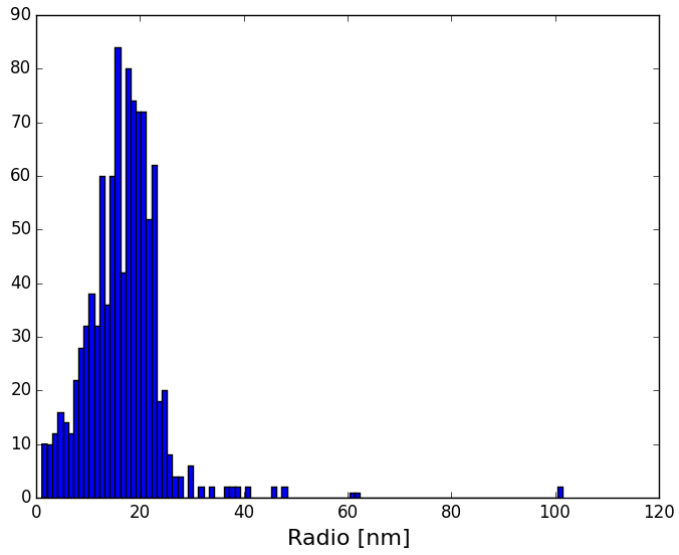


Fig. 4.4: Distribución de radios de los poros grandes para $E = 1600\,\mathrm{V/cm}$ en $t = 500\,\mu\mathrm{s}$

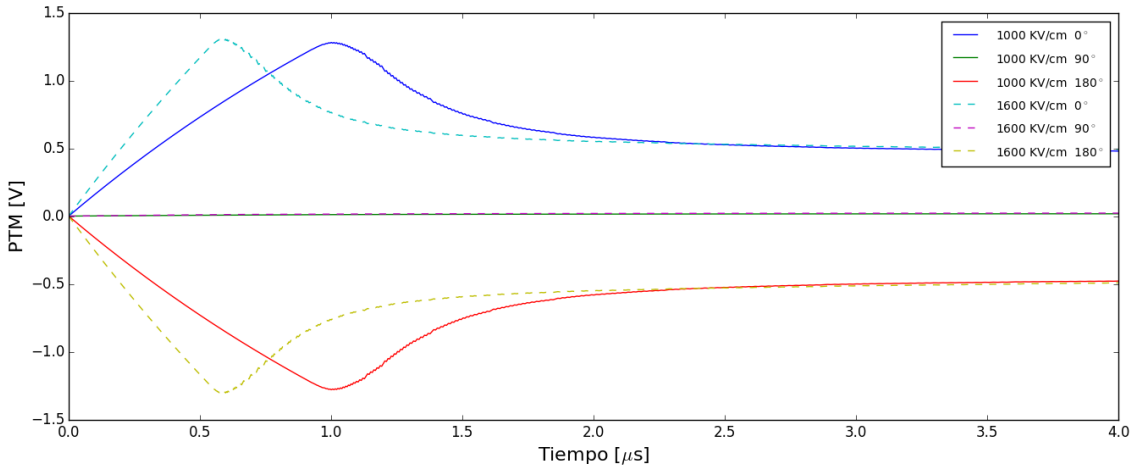


Fig. 4.5: PTM en función del tiempo en distintos ángulos polares para dos potenciales aplicados diferentes

de tensión entre el interior y exterior de la célula. Se nota que el PTM obtenido depende notablemente del ángulo polar: en la región polar cercana al electrodo positivo el PTM es positivo y alcanza valores altos, mientras que en el polo cercano al cátodo el potencial es negativo y en el ecuador es cercano a cero. Es llamativo que los valores de campo eléctrico aplicado no influyen en el valor de pico de PTM obtenido, pero si en el tiempo en que éste se alcanza; al aumentar el campo de 1000 V/cm a 1600 V/cm se acelera el proceso de subida y bajada de PTM hasta alcanzar un equilibrio, pero no se logran aumentar los potenciales obtenidos.

En las figuras 4.6 y 4.7 se graficaron los potenciales transmembrana en función del ángulo polar para diferentes instantes de tiempo con pulsos de potenciales diferentes en los dos gráficos. Se observa en los primeros instantes que el PTM obtenido es similar al obtenido en el capítulo anterior y al que se puede estimar con la fórmula cerrada 2.2. Esto se debe a que la población de poros es nula o muy pequeña como para afectar aún la conductividad de la membrana. Sin embargo en los instantes posteriores la aparición de poros aumenta notablemente la conductividad de la membrana en las regiones cercanas a los polos, bajando así la diferencia de potencial. En instantes posteriores se observa el mismo fenómeno con regiones más lejanas a los poros, alejándose más el PTM obtenido del que se puede calcular con la fórmula cerrada 2.2.

Se estudió también el efecto de aplicar varios pulsos en lugar de uno solo. En la figura 4.8 se graficó la cantidad de poros en función del tiempo para 4 pulsos de 5 ms de `ON TIME` y 5 ms de `OFF TIME` con varios potenciales diferentes. Se puede ver que la cantidad de poros crece únicamente al principio de cada pulso, y se mantiene casi constante durante el resto del pulso, disminuyendo muy levemente durante el tiempo de apagado. Por cada pulso nuevo se crean poros nuevos, aunque la cantidad de poros nuevos disminuye con cada pulso consecutivo. Se puede ver también que el efecto del campo eléctrico sobre la densidad es enorme, obteniéndose poblaciones de casi el doble de poros al aumentar el potencial aplicado de 1200 V/cm a 1600 V/cm. El valor de 500 V/cm podría tomarse como el valor mínimo necesario para obtener una cantidad considerable de poros, mientras que para 400 V/cm y otros valores menores la densidad es despreciable, es decir casi no se produce

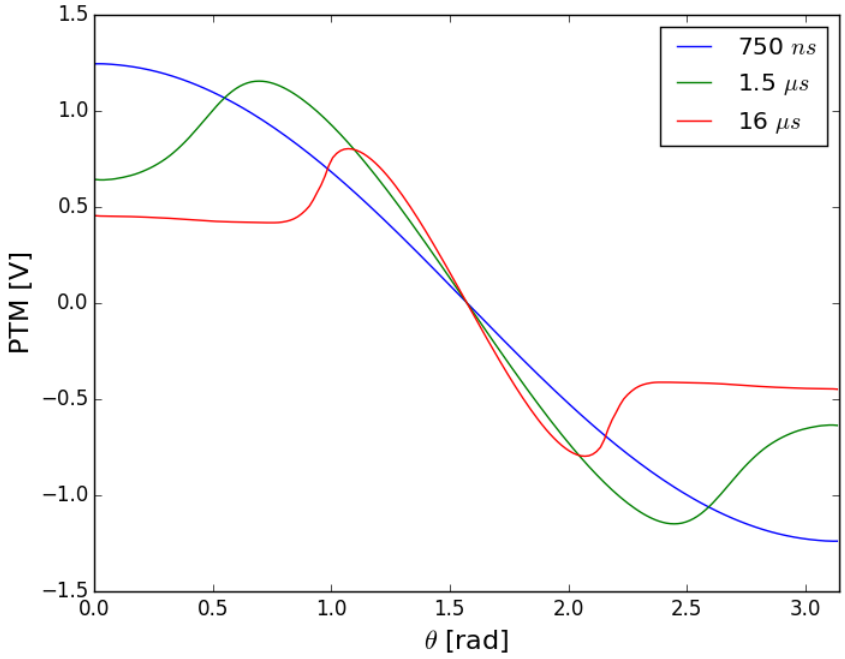


Fig. 4.6: PTM en función del ángulo polar
con $E = 1200\,\mathrm{V/cm}$ en diferentes instantes de tiempo

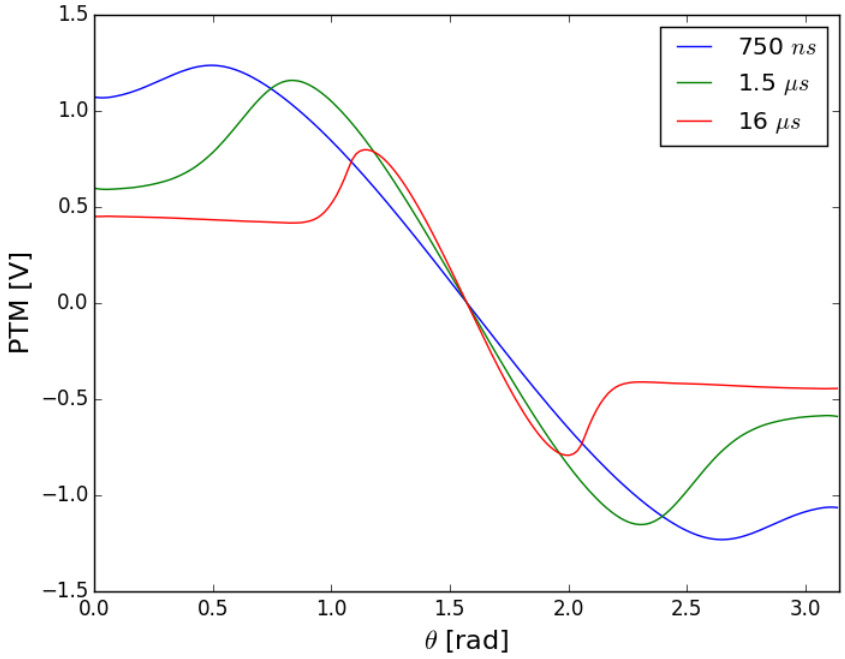


Fig. 4.7: PTM en función del ángulo polar
con $E = 1600\,\mathrm{V/cm}$ en diferentes instantes de tiempo

electroporación.

En la figura 4.9 se graficó el promedio de los radios de los poros en función del tiempo. Se nota que los radios altos se obtienen por un instante muy corto de tiempo al principio de cada pulso, y que rápidamente se achican llegando a un valor de equilibrio en aproximadamente la mitad del tiempo del `ON TIME`. Cuando el pulso se apaga, los radios se hacen rápidamente mínimos, y se mantienen en un valor muy chico hasta el inicio del próximo pulso. A diferencia de la cantidad de poros, el radio promedio disminuye al aumentar el potencial eléctrico. Esto puede deberse a que un mayor campo eléctrico produce muchos poros de radio mínimo, afectando el promedio de manera negativa. En cada pulso consecutivo parecen aumentar ligeramente los radios obtenidos, notándose la mayor diferencia entre los radios del primer y el segundo pulso.

En las figuras 4.10 a 4.13 se observan las distribuciones de radios de poros para 1600 V/cm a los 100 µs del comienzo de cada pulso. Las diferencias entre radios se observan sobre todo entre el primer y segundo pulso, mientras que los siguientes parecen tener distribuciones muy similares. La mayor concentración se encuentra siempre en los radios muy pequeños (de aproximadamente 1 nm), que afectan poco al proceso de permeabilización de la membrana.

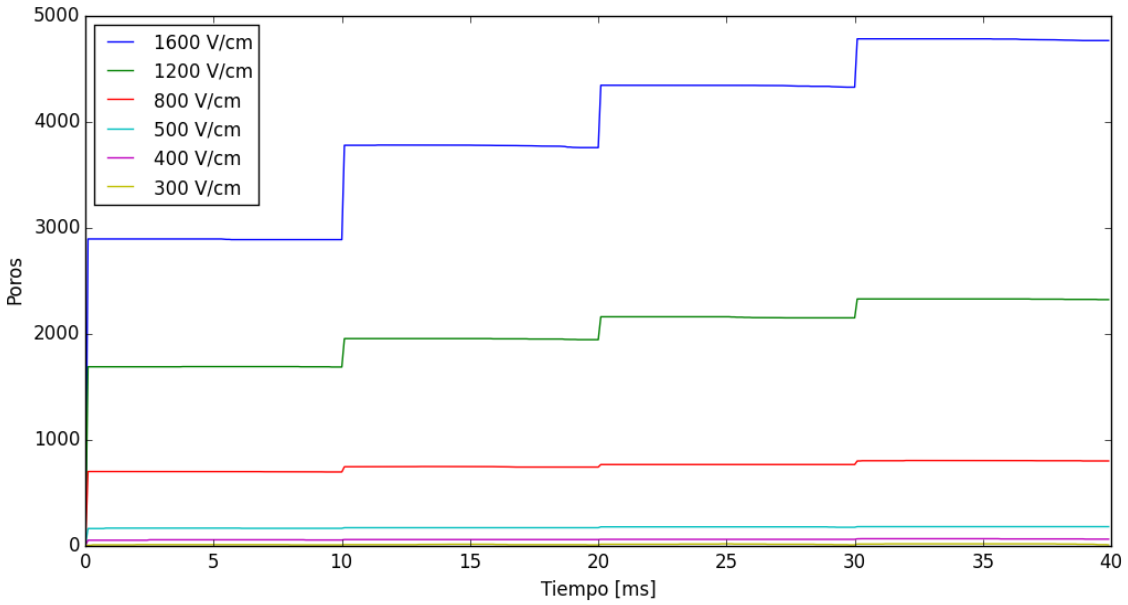


Fig. 4.8: Cantidad de poros en función del tiempo para cuatro pulsos con diferentes campos eléctricos

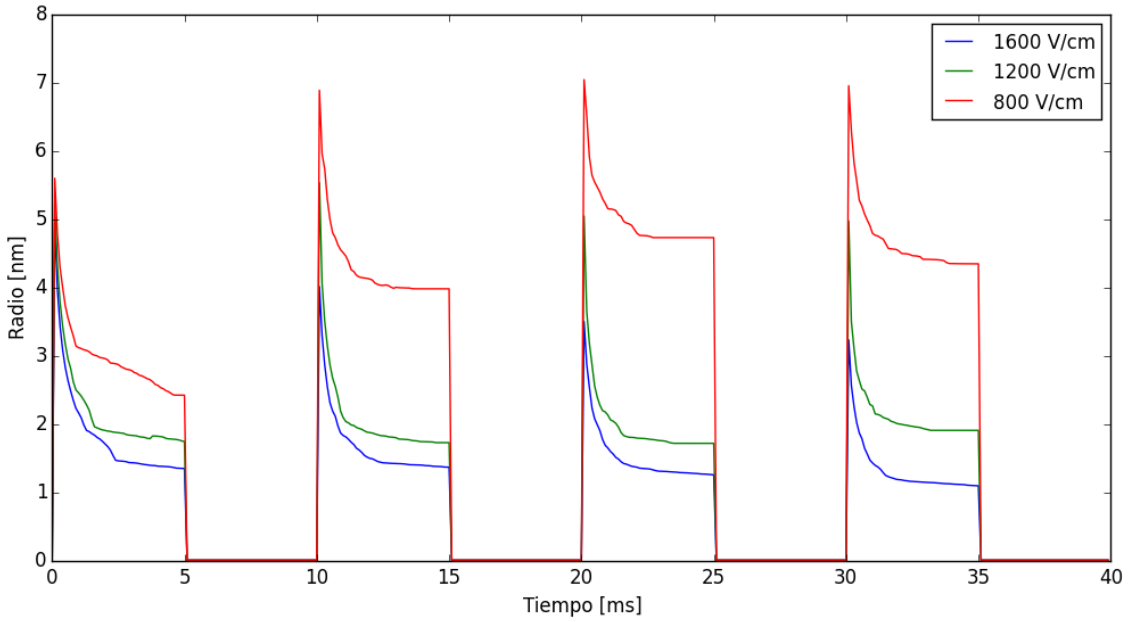


Fig. 4.9: Radio promedio de los poros en función del tiempo para cuatro pulsos con diferentes campos eléctricos

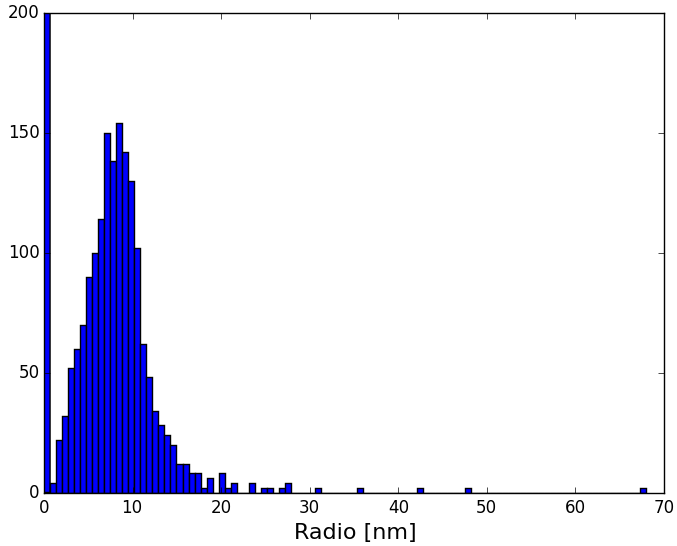


Fig. 4.10: Primer pulso

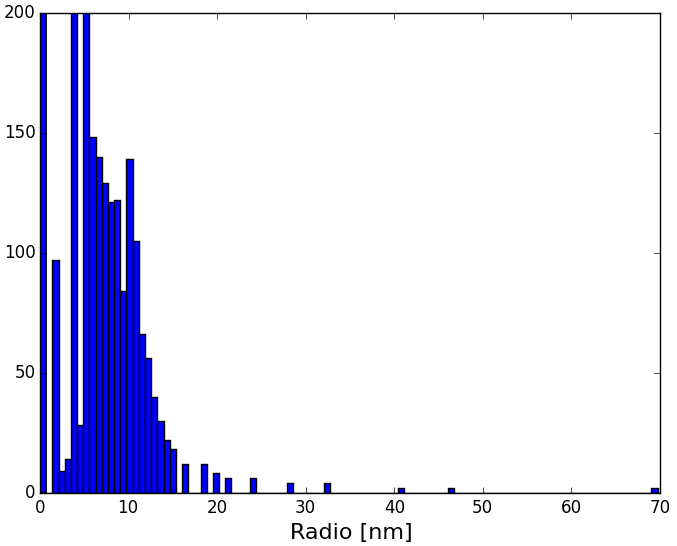


Fig. 4.11: Segundo pulso

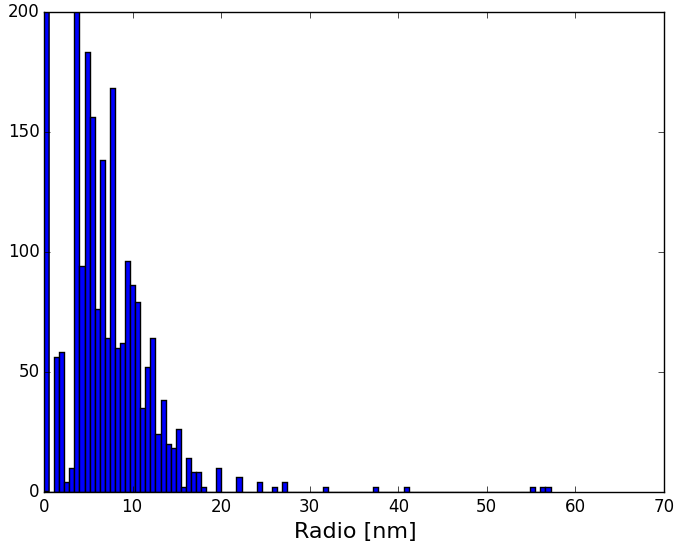


Fig. 4.12: Tercer pulso

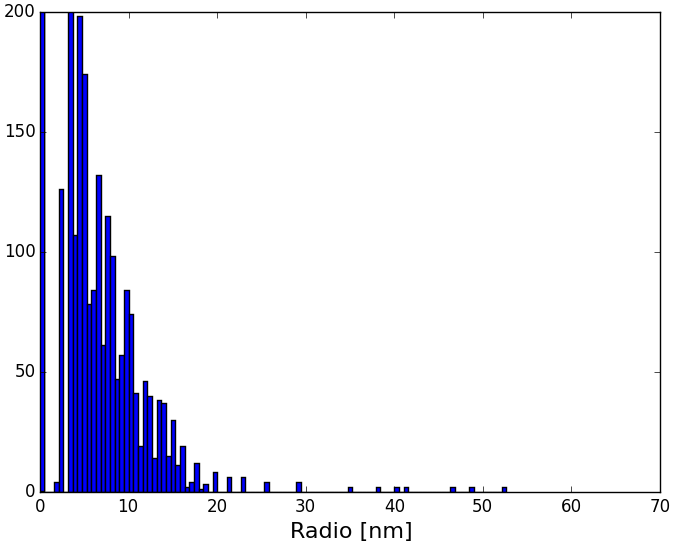


Fig. 4.13: Cuarto pulso

5. TRANSPORTE DE ESPECIES

En este capítulo se analiza la concentración y movimiento de distintas especies iónicas en el dominio de la figura 2.1.

Se asumen electrodos de platino, material suficientemente inerte ya que su potencial de reducción es alto. De esta manera es posible despreciar la disolución del metal, siendo así las principales reacciones que se observan en el ánodo: la descomposición del agua y la oxidación de las sustancias ya disueltas en ésta. En el caso de tejidos biológicos, estas reacciones involucran la evolución del oxígeno y cloro, junto a una acidificación, a través de las siguientes reacciones:

$$2\,H_2O \rightleftharpoons O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \tag{5.1}$$

$$2\,Cl^- \rightleftharpoons Cl_2 + 2\,e^- \tag{5.2}$$

La principal reacción catódica es la descomposición del agua en hidrógeno molecular e iones hidroxilo:

$$2\,H_2O + 2\,e^- \rightleftharpoons H_2 + 2\,OH^- \tag{5.3}$$

El tejido será considerado como una solución acuosa de cloruro de sodio. Se consideran 4 especies iónicas en el análisis: el hidrógeno (H^+), el hidroxilo (OH^-), el sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-). No se considera la capacidad de regulación del tejido. Se realizaron simulaciones en las que se aplicaron pulsos eléctricos y se analizó el transporte de las cuatro especies producto del gradiente de concentración y del campo eléctrico según la ley de Nernst-Planck. No se considera en este capítulo la creación de poros en la membrana celular y su efecto sobre el transporte iónico. Este capítulo está fuertemente basado en la experiencia previa del Laboratorio de Sistemas Complejos en la solución numérica de las ecuaciones de Nernst-Planck [29–33].

5.1. Implementación

Se utiliza el método de elementos finitos para resolver la ecuación 2.8 y obtener las concentraciones de las cuatro especies iónicas en el espacio y el tiempo. Se resuelve primero el potencial eléctrico en el dominio con los métodos usados en el capítulo 3 y luego se resuelven las concentraciones de masa en diferentes instantes de tiempo.

Las concentraciones de las cuatro especies iónicas se resuelven por separado en un método que genera la matriz de rigidez y el vector de masa para una especie según los resultados de potencial eléctrico, difusión y concentraciones existentes en cada elemento. El sistema de ecuaciones generado se resuelve con el método iterativo de bi-gradientes conjugados estabilizado, dado que la matriz no es simétrica definida positiva. La matriz de masa se representa con una estructura de datos esparsa aprovechando que la mayoría de sus celdas son ceros. Se usa como solución inicial el vector de concentraciones obtenido en la iteración anterior; esto sirve para reducir significativamente la cantidad de iteraciones necesarias para la convergencia del sistema y así reducir los tiempos de ejecución, dado

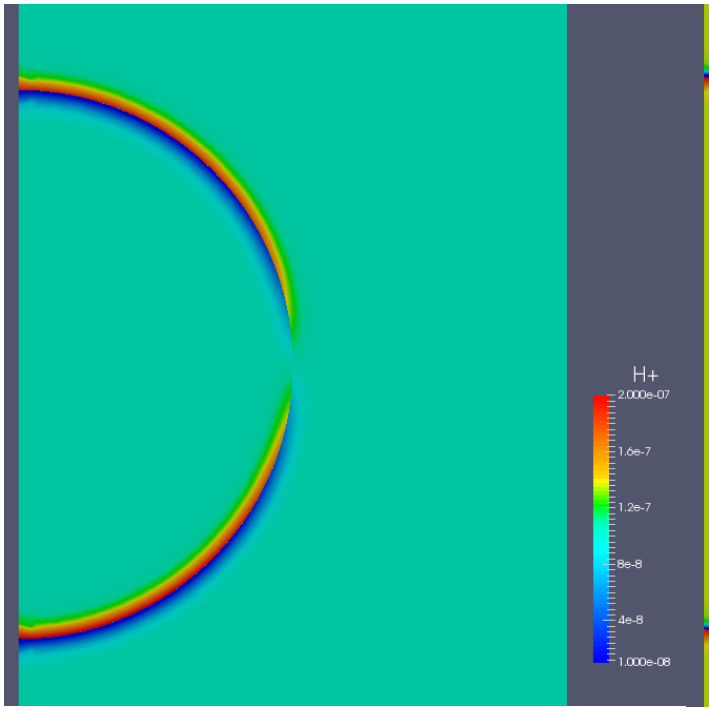


Fig. 5.1: Concentración molar de H^+

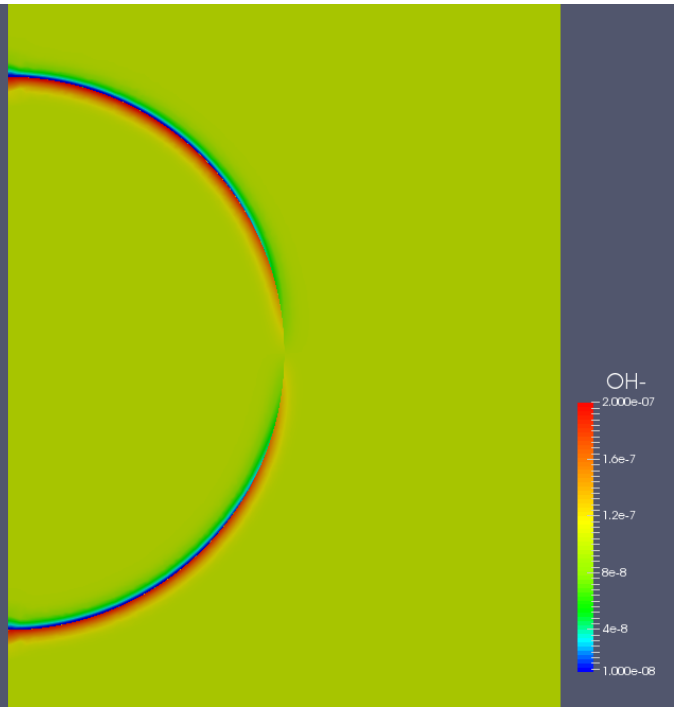


Fig. 5.2: Concentración molar de OH^-

que se espera que en las concentraciones varíen levemente en cada iteración. Las concentraciones de las cuatro especies iónicas se pueden calcular en paralelo en cada iteración, ya que están acopladas entre sí por el campo eléctrico, pero no dependen directamente una de otra. Por esta razón se hace uso de la interfaz `OpenMP` para realizar las iteraciones de elementos finitos en paralelo usando hasta 4 threads, acelerando así los tiempos de ejecución.

Las concentraciones obtenidas se graban en archivos de salida individuales en intervalos de tiempo fijos usando un formato `.csv`. Se graban las densidades como cantidad de partículas en unidad de volumen y como concentraciones molares, y también se graban los valores de pH y pOH según las concentraciones de H^+ y OH^-.

5.2. Resultados

Se corrió una simulación de un pulso de 100 V/cm aplicado sobre una célula de 25 µm de radio y se observaron las concentraciones de las cuatro especies iónicas estudiadas. A continuación se presentan los resultados. Debido a que en este capítulo no se tuvo en cuenta la creación de poros en la membrana como en el capítulo anterior, se eligió una diferencia de potencial baja, ya que los valores de potencial transmembrana se vuelven de otra manera muy altos al no haber poros, lo cual originaría concentraciones extremas cerca de la membrana celular en caso de simular campos eléctricos más grandes.

Las cuatro imágenes de las figuras 5.1 a 5.4 corresponden a concentraciones molares de las cuatro especies estudiadas en el instante $t = 380\,\mu s$ del comienzo del pulso. Se observa en todos los casos extremos altos y bajos de concentraciones en las regiones cercanas a la membrana celular, tanto del lado interno como externo, y valores prácticamente iguales a los iniciales en el resto del dominio, tanto interno como externo a la célula. También

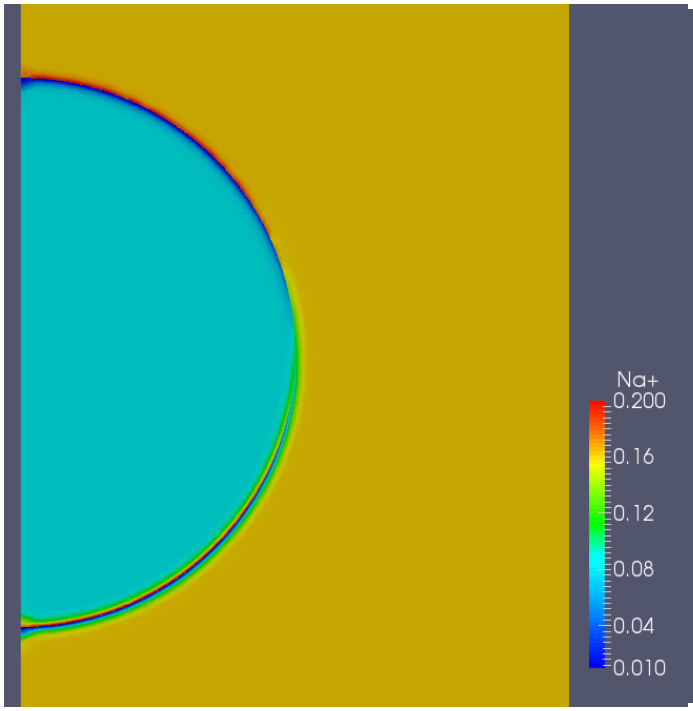


Fig. 5.3: Concentración molar de Na^+

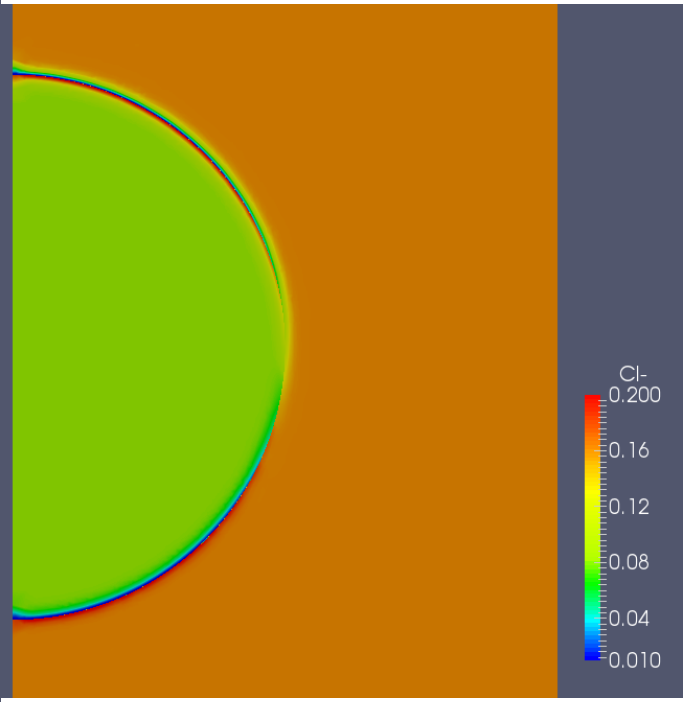


Fig. 5.4: Concentración molar de Cl^-

se nota que las regiones cercanas al ecuador de la membrana no poseen valores altos ni bajos de concentración, a diferencia del resto de la membrana. Tanto el H^+ como el Na^+, ambos de carga positiva, logran concentraciones altas en las zonas cercanas al interior de la membrana en el hemisferio depolarizado, y en las zonas cercanas al exterior de la membrana en el hemisferio hiperpolarizado, mientras que alcanzan extremos bajos de concentración cerca del exterior de la membrana en el hemisferio depolarizado y cerca del interior en el hemisferio hiperpolarizado. Las concentraciones de OH^- y Cl^- –de carga negativa– se comportan en cambio de manera opuesta, con extremos altos en el interior de la membrana en la región hiperpolarizada y el exterior de la depolarizada y extremos bajos en los otros casos.

Los cambios en concentración cercanos a la membrana celular se pueden ver en más detalle en las imágenes 5.5 a 5.8, en las que se analizaron las concentraciones en un corte paralelo al eje de rotación (z), que atraviesa la célula por los polos. El ánodo se encuentra en el extremo derecho y el cátodo en el izquierdo, y las líneas punteadas representan la membrana celular. Se ve claramente que los extremos bajos o altos de concentración se dan únicamente en las zonas muy cercanas a la membrana del lado interior o exterior según la carga de la especie y el polo de la célula.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican únicamente valores extremos de concentración cerca de la membrana, con diferencias de potencial en los electrodos muy bajas, y muy pocos cambios en el resto del dominio. Este comportamiento se debe a que los valores altos de potencial transmembrana se mantienen en el tiempo, en lugar de disminuir rápidamente como sucedería en la realidad por efecto de la permeabilización de la membrana. En el próximos capítulo se tendrá en cuenta este efecto, y por lo tanto se obtendrán resultados que se acercan mucho más a la realidad.

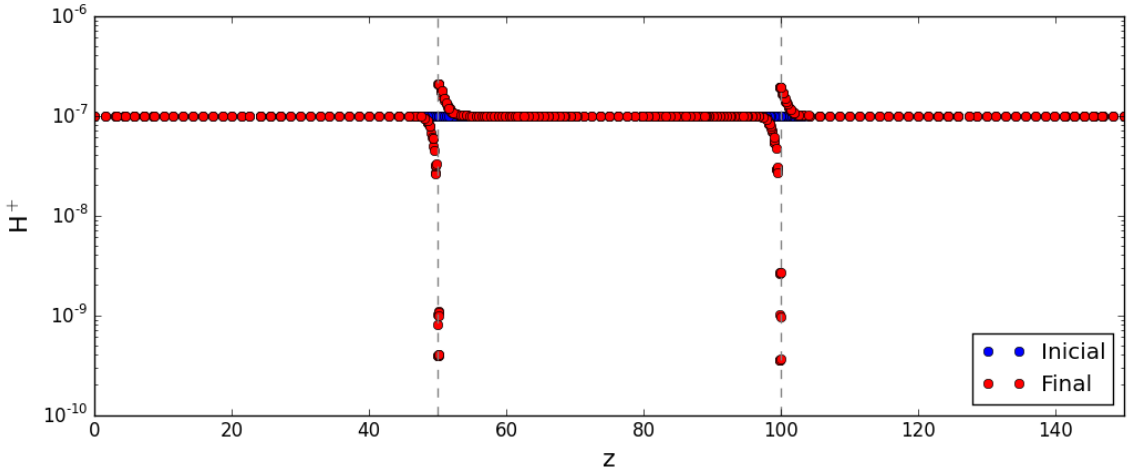


Fig. 5.5: Concentración molar de H^+ en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

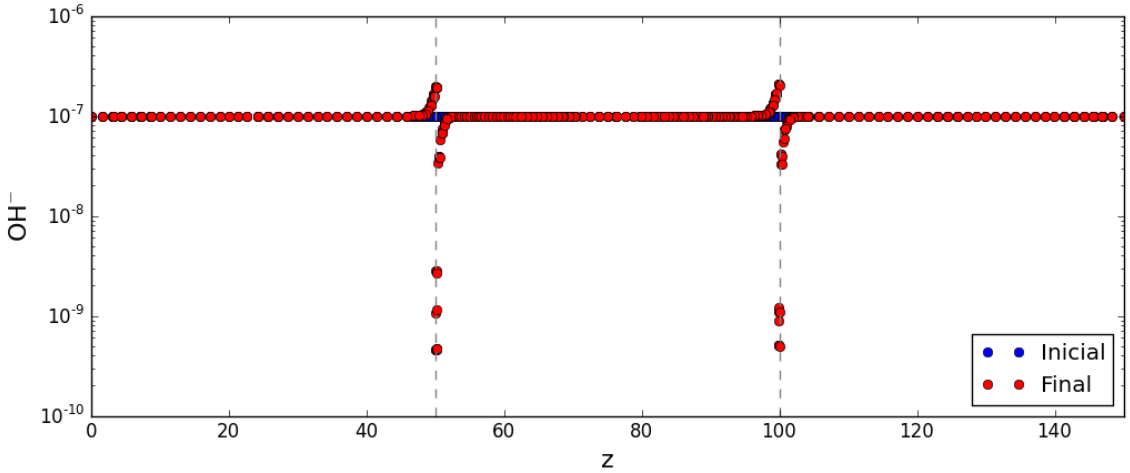


Fig. 5.6: Concentración molar de OH^- en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

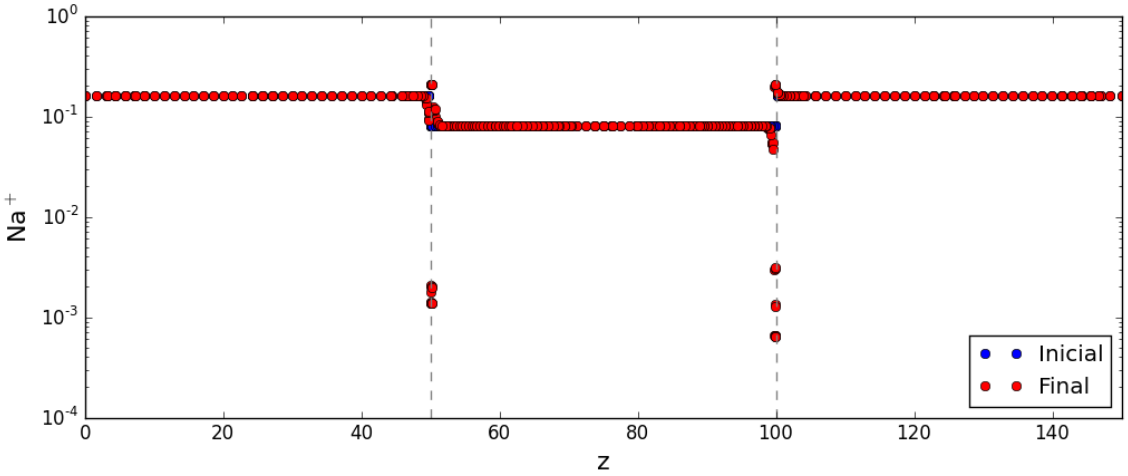


Fig. 5.7: Concentración molar de Na^+ en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

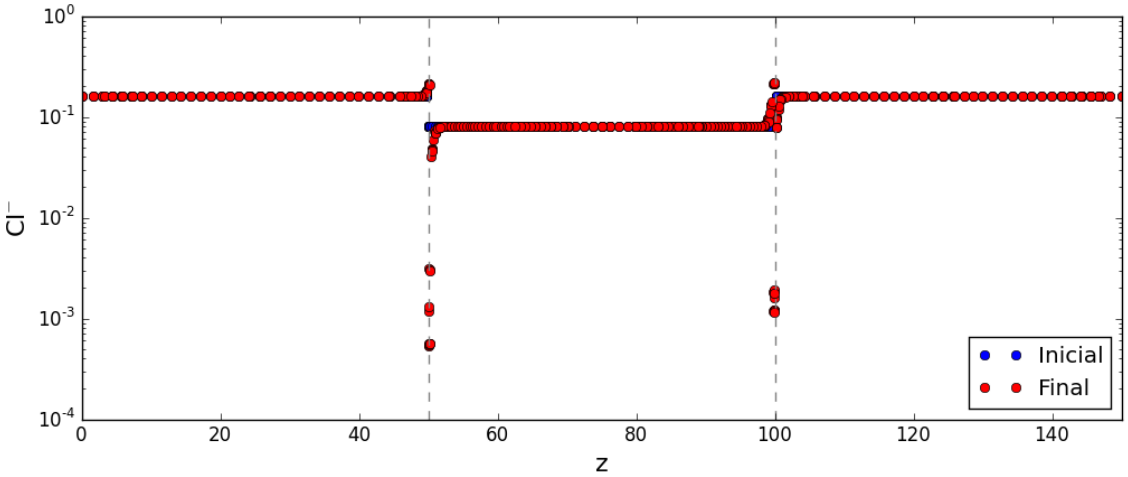


Fig. 5.8: Concentración molar de Cl^- en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

6. MODELO ACOPLADO

En este capítulo se realizan simulaciones en conjunto de todos los fenómenos físicos analizados separadamente en los capítulos anteriores, es decir el potencial eléctrico, la creación de poros en la membrana y la posterior variación en el radio de los mismos, las variaciones en la conductividad y difusión de la membrana producto de la aparición de poros y el transporte de especies iónicas en el dominio. Además se estudió el efecto de aplicar varios pulsos consecutivos a través de los electrodos, en lugar de un único pulso.

6.1. Implementación

Para realizar la simulación completa se creó un ciclo principal que realiza llamados a las diferentes rutinas implementadas en los capítulos anteriores.

Para acelerar los tiempos de ejecución se usaron intervalos temporales diferentes para los distintos fenómenos físicos simulados. Para el cálculo de la densidad y radio de los poros en la membrana celular se utilizó un intervalo temporal fijo de 1 ns, ya que se notó que al aumentarlo se producen errores de discretización muy grandes que derivan en la divergencia del sistema. El cálculo del potencial eléctrico fue realizado periódicamente, a diferencia del capítulo anterior, ya que la aparición de poros afecta los valores de conductividad en la membrana y por consiguiente los potenciales eléctricos en todo el dominio. El intervalo temporal para el potencial eléctrico se eligió dinámico, con valores muy chicos al comienzo del pulso, que se hacen cada ves mayores con el paso del tiempo. Esto es porque se notó que al comienzo de los pulsos se producen cambios muy bruscos en las conductividades de la membrana celular y por lo tanto cambios en el potencial eléctrico que se deben calcular con precisión, pero que luego de un tiempo se alcanzan valores de equilibrio que no requieren intervalos temporales tan pequeños. Exactamente el intervalo temporal para el potencial eléctrico se calcula como

$$\Delta_t = \mathrm{m_p}\left(1 - e^{t/k}\right) \tag{6.1}$$

donde $\mathrm{m_p}$ es el máximo valor de intervalo temporal posible, t es el tiempo desde el inicio del último pulso y k es una constante que controla la velocidad con la que aumenta el intervalo temporal. En particular se utilizaron los valores de $\mathrm{m_p} = 2$ µs y $k = \frac{500\mu s}{\ln(1-0{,}9)}$ para que el intervalo temporal aumente hacia 2 µs de manera asintótica y alcance el 90 % de este valor en el instante de 500 µs de comenzado el pulso. En la figura 6.1 se muestra el intervalo temporal en el inicio del pulso. Es importante aclarar que al comenzar y terminar cada pulso se reinicia el cálculo del intervalo temporal.

Por último se utiliza para el cálculo del transporte de especies un intervalo temporal fijo de 200 ns.

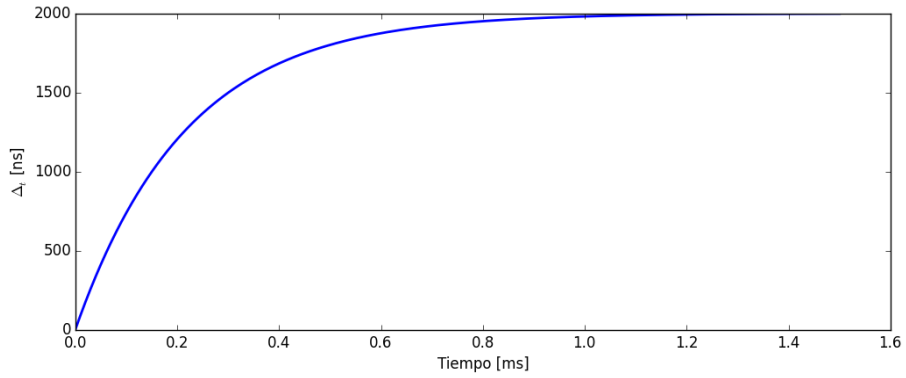


Fig. 6.1: Intervalo temporal para cálculo del potencial eléctrico en función del tiempo desde el comienzo del pulso

A continuación se presenta el pseudo-código del loop principal del programa. `nPulsos` es la cantidad de pulsos a simular y $\mathrm{m_p}$, $\mathrm{m_t}$ y $\mathrm{m_d}$ son constantes usadas para determinar los intervalos temporales para el cálculo de potencial eléctrico, el transporte de especies y para grabar los resultados a disco respectivamente.

for all `pulso` $\in \{1, \ldots,$ `nPulsos`$\}$ **do**
  for all `estado` $\in \{$`ON`, `OFF`$\}$ **do**
    $t = 0$
    $\texttt{next}_\mathrm{p} = \texttt{next}_\mathrm{t} = \texttt{next}_\mathrm{d} = 0$
    while $t <$ `duracion`[`estado`] **do**
      if $t \geq \texttt{next}_\mathrm{p}$ **then**
        calcular potencial eléctrico con `estado`
        $\texttt{next}_\mathrm{p} = t + \Delta_t \, \mathrm{m_p} \left(1 - e^{t/k}\right)$
      end if
      calcular densidad de poros
      calcular radios de poros
      actualizar valores de conductividad y difusión
      if $t \geq \texttt{next}_\mathrm{t}$ **then**
        for all $e \in \{\mathrm{H^+}, \mathrm{OH^-}, \mathrm{Na^+}, \mathrm{Cl^-}\}$ **do**
          calcular concentraciones de especie e
        end for
        $\texttt{next}_\mathrm{t} = t + \Delta_t \, \mathrm{m_t}$
      end if
      if $t \geq \texttt{next}_\mathrm{d}$ **then**
        grabar estado en disco
        $\texttt{next}_\mathrm{d} = t + \Delta_t \, \mathrm{m_d}$
      end if
      $t = t + \Delta_t$
    end while
  end for
end for

6.2. Resultados

Un pulso

Se presentan en la figura 6.2 las concentraciones de las diferentes especies iónicas estudiadas para diferentes instantes de tiempo. Los resultados corresponden a simulaciones de una célula de 25 µs de radio bajo un pulso eléctrico de 1600 V/cm y una duración de 5 ms. Las imágenes de la figura 6.2 corresponden a las concentraciones molares de las cuatro especies en diferentes instantes del pulso. Los colores azules corresponden a los extremos bajos de concentración y los rojos a los extremos altos.

Se observan en todos los casos cambios en el interior de la célula mucho mayores a los obtenidos en las simulaciones del capítulo 5. Esto se debe a que la simulación de la generación de poros posibilitó la permeabilización de la membrana y el ingreso o egreso con mayor facilidad de las especies iónicas.

En el caso del H^+ se observa una gran actividad de las concentraciones, obteniéndose valores muy altos de concentración en la región hiperpolarizada del interior de la célula, que se representan con una franja roja cercana a la membrana. En cuanto a la región depolarizada del interior, la concentración de H^+ disminuyó notablemente, lo que se manifiesta con una mancha de color verde que avanza hacia el ecuador de la célula con el paso del tiempo. El líquido extracelular también presentó grandes cambios, con concentraciones altas en la región depolarizada y bajas en la región hiperpolarizada (al contrario del interior).

Las concentraciones de OH^- presentan un comportamiento opuesto al observado en el H^+, es decir en el interior de la célula se producen extremos altos de concentración en el polo depolarizado y una disminución de materia en el polo hiperpolarizado, mientras que en el exterior se alcanzan extremos altos cerca de la región de la membrana cercana al polo positivo y extremos bajos en el polo negativo.

En cuanto a las concentraciones de Na^+ y Cl^-, se observa menor actividad, dado que sus constantes de difusión son mucho menores que las del H^+ y OH^-. Al igual que en los casos anteriores se tienen concentraciones extremas cerca de la membrana, con el mismo patrón de comportamiento según el signo de la especia iónica (el Na^+ se comporta como el H^+ por ser de carga positiva y el Cl^- como el OH^- por ser de carga negativa). No se observa, sin embargo, una zona de concentraciones bajas que avance hacia el centro de la célula, como en los casos anteriores, pero se alcanza a notar que las zonas con valores extremos son de mayor tamaño que las obtenidas en el capítulo 5, en el que no se tenía en cuenta la permeabilización de la membrana.

Si bien se observan cambios significativos en las concentraciones de las especies en el interior de la célula, estos cambios se dan principalmente en las regiones cercanas a la membrana. Sin embargo se observa que con el paso del tiempo las regiones con valores extremos se vuelven mayores, lo cuál indica que se podrían obtener mayores cambios en las concentraciones internas con pulsos de mayor duración o con varios pulsos.

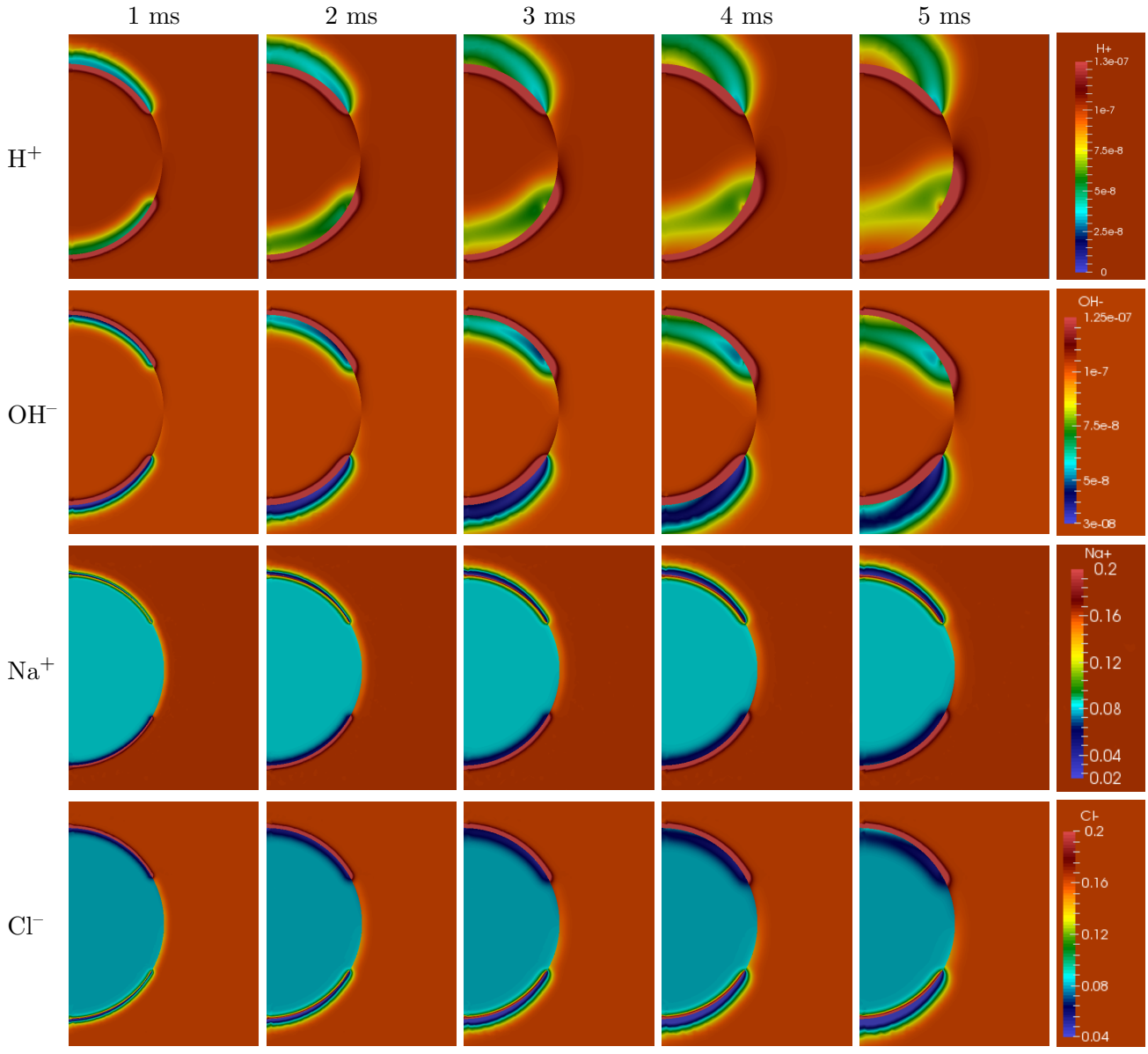


Fig. 6.2: Concentraciones molares en diferentes instantes de tiempo

Varios pulsos

En la figura 6.3 se presentan resultados de una simulación similar a la anterior pero con 4 pulsos de 5 ms cada uno, con un tiempo de apagado de 5 ms luego de cada pulso, en lugar de uno solo. Se utilizó la misma célula (de 25 µm de radio) y la misma intensidad de pulso (1600 V/cm). En todos los casos se lograron actividades de las especies mucho mayores a los obtenidos con un solo pulso.

En las cuatro especies estudiadas se obtuvo lo siguiente:

- En el interior de la célula: en todos los casos en los momentos en los que el pulso está encendido se concentran extremos altos de densidad de las especies cerca de la membrana en el hemisferio del mismo signo que la especie (es decir H^+ y OH^- se concentran en el hemisferio hiperpolarizado y Na^+ y Cl^- en el depolarizado), mientras que en el polo de signo opuesto se crea una zona con concentraciones bajas que avanzan hacia el ecuador. En cambio cuando el pulso está apagado los valores altos de concentración se dispersan desde la zona cercana a la membrana hacia el interior de la célula, aumentando así la región ocupada por concentraciones altas, mientras que la zona con concentraciones bajas deja de avanzar.
- En el exterior de la célula: se crea una zona de concentración alta que rodea la célula empezando en el polo de signo opuesto al signo de la especie y avanzando hacia el ecuador cuando el pulso está encendido y dispersándose y alejándose de la célula cuando el pulso está apagado. En el polo del mismo signo que la especie se observó la aparición de zonas de concentración baja que no avanzan hacia el ecuador, sino que se alejan de la célula cuando el pulso está encendido.

En el caso del H^+ y el OH^- también se notó la aparición de zonas con concentraciones altas en el polo del mismo signo que la especie a partir del segundo pulso, provenientes del interior de la célula, mezclándose con las zonas de concentración baja, y con dirección hacia el electrodo del signo de la especie cuando el pulso está encendido. Los movimientos del Na^+ y el Cl^- fueron menores que los del H^+ y el OH^-, dada su menores constantes de difusión.

En la figura 6.4 se comparan valores experimentales de pH en diferentes instantes con fotografías de valores experimentales obtenidos de [38]. Los instantes de tiempo de las imágenes simuladas se eligieron para coincidir con los experimentales. En las imágenes de los experimentos se fotografiaron concentraciones de especies iónicas diferentes a las estudiadas en este trabajo. Sin embargo alcanza para observar que el proceso de ingreso de especies a la célula es similar al obtenido en las simulaciones.

Por último se puede ver en las imágenes 6.5 a 6.8 cortes paralelos al eje de rotación con concentraciones molares iniciales y finales de las cuatro especies (con el ánodo en el extremo derecho y el cátodo en el izquierdo). Se nota que los valores de concentración se encuentran más dispersos sobre el dominio, a diferencia de los resultados obtenidos en el capítulo 5, en el que las especies se concentraban únicamente en los valores muy cercanos a la membrana y permanecían casi sin cambios en cualquier otra zona.

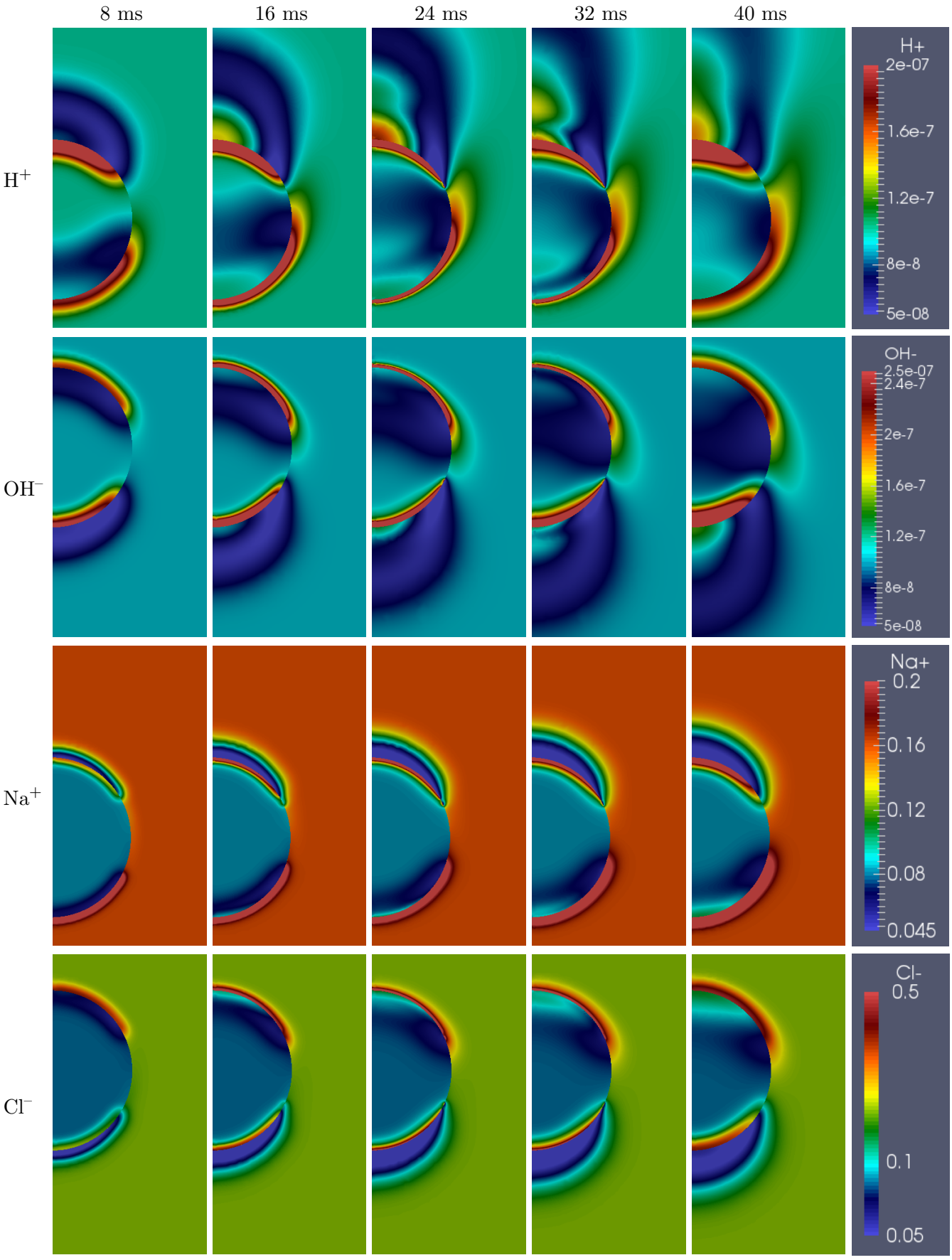


Fig. 6.3: Concentraciones molares en diferentes instantes de tiempo

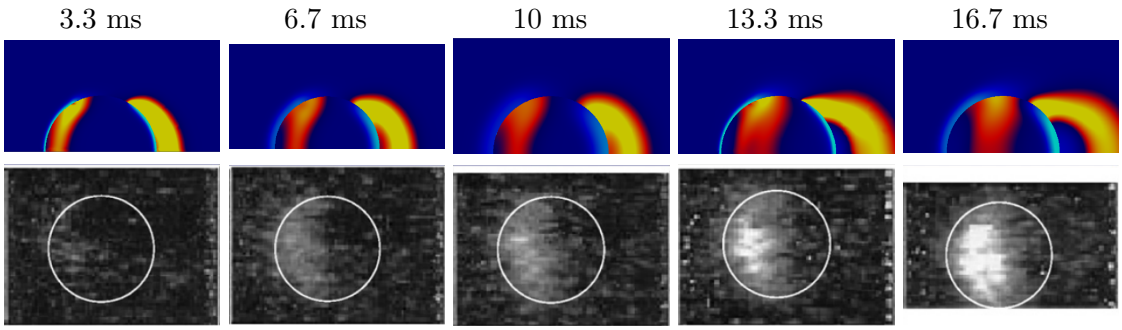


Fig. 6.4: Concentraciones de pH en la simulación (arriba) y valores experimentales de [38] (abajo).

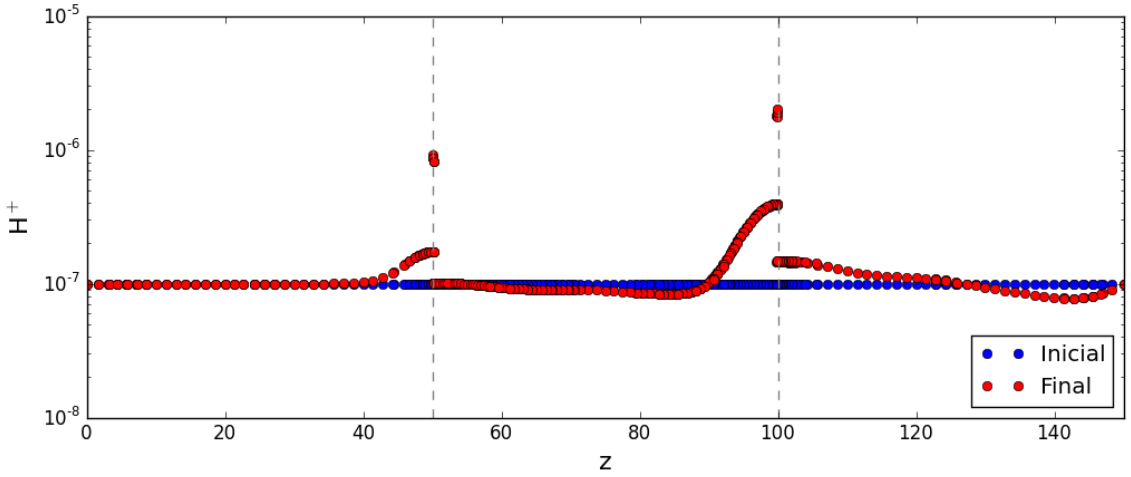


Fig. 6.5: Concentración molar de H^+ en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

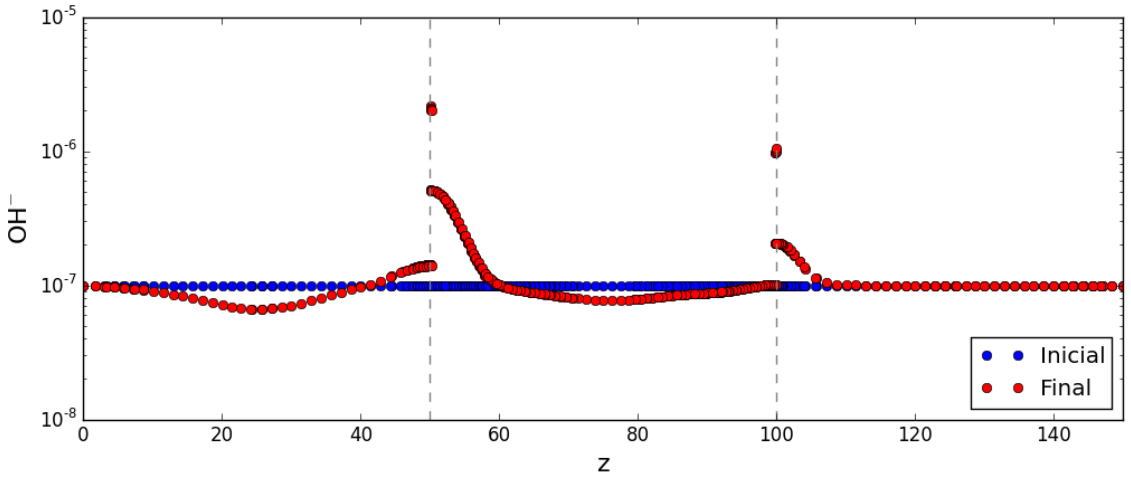


Fig. 6.6: Concentración molar de OH^- en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

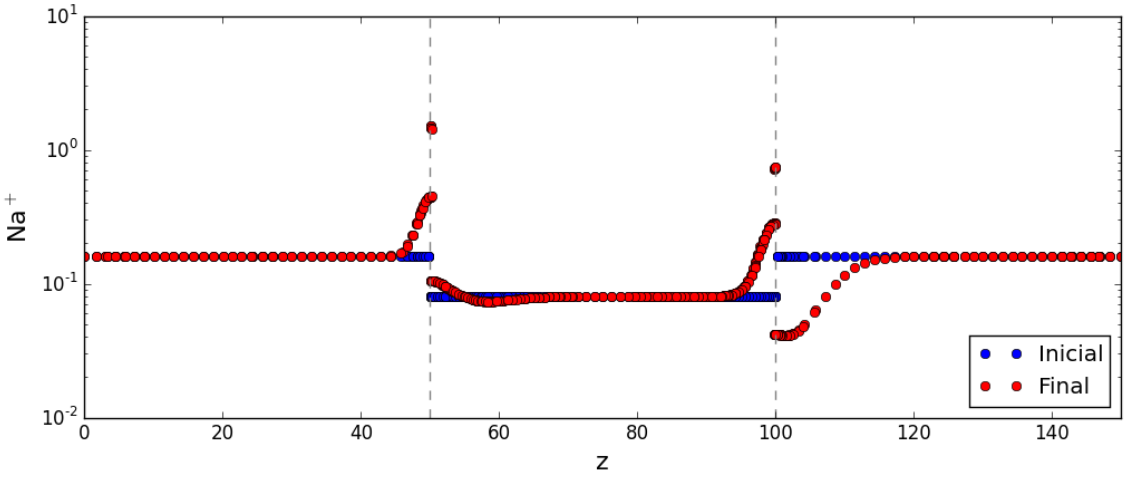


Fig. 6.7: Concentración molar de Na^+ en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

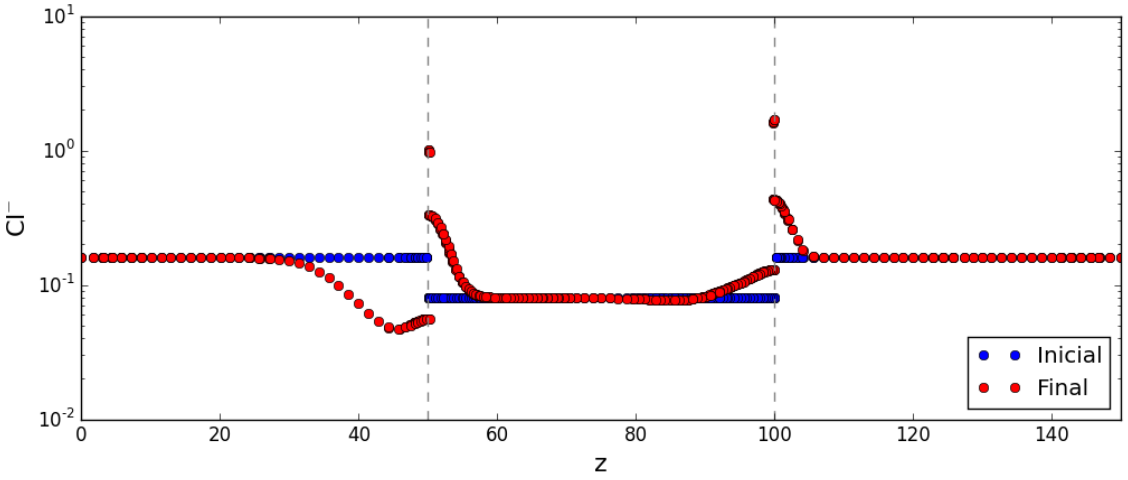


Fig. 6.8: Concentración molar de Cl^- en un corte sobre la coordenada $r = 2{,}5$ µm

7. CONCLUSIONES

En su estado actual, el código desarrollado permite resolver sobre un dominio bidimensional que contempla simetría de revolución sobre el potencial en la membrana celular y el líquido intra y extracelular. Así mismo provee la respuesta dinámica de la creación y evolución de la población de poros de la membrana a dicho potencial aplicado. Por último analiza el transporte de cuatro especie iónicas a través de la membrana.

El modelo discretiza la membrana explícitamente, utilizando un mallado adaptativo. Debemos destacar que este modo de simular el problema es inédito ya que hasta el momento es usual en la literatura utilizar dos medios (que corresponden al líquido intra y extracelular) y considerar a la membrana como una condición de contorno sobre la que se supone un potencial PTM. Al discretizar explícitamente la membrana con elementos finitos en lugar de condiciones de contorno se obtuvieron resultados que se acercan más a la realidad. Nuestro modelo, a partir de la distribución de potencial y campo eléctrico sobre el dominio, reproduce adecuadamente tanto la forma como la magnitud del PTM. También predice correctamente el valor umbral de intensidad de pulso, más allá del cual no varía apreciablemente el PTM.

El mallado de elementos finitos seleccionado para realizar los cálculos es óptimo, pues combina un grado de precisión adecuado con estabilidad numérica. Siempre es posible extender el numero de elementos y nodos con lo cual se aumentaría el tamaño de los sistema lineales a resolver, y con ello el tiempo de cómputo. Sin embargo no obtendríamos con ello en nuestra configuración de parámetros un aumento significativo en la calidad de los resultados.

En cuanto al modelado de la dinámica y creación de la población de poros, se comprobó que la evolución de la densidad de poros es la adecuada para explicar la existencia de este umbral y que el potencial aplicado influye en la velocidad de la evolución tanto de la densidad como del radio de los poros. Es necesario observar que la mayoría de los poros creados se sellan muy rápidamente por lo que no influyen en el ingreso o egreso de iones dentro de la célula, por lo que si se pretende permeabilizar la membrana para las especies estudiadas, se vuelve esencial repetir el pulso periódicamente.

El transporte de especies a través de la membrana dado por mecanismos guiados por la difusión y la movilidad de las especies iónicas responde adecuadamente a la aplicación de pulsos equi-espaciados temporalmente, observándose que la reapertura de los poros permite el reingreso de material dentro de la célula. Estos resultados responden cualitativamente a los medidos experimentalmente.

Se observaron resultados de movilidad de las especies iónicas muy diferentes entre las simulaciones que no consideraron la generación de poros en la membrana y las que sí la consideraron. Esto sirve para confirmar el efecto positivo que tiene la electroporación en el ingreso y egreso de especies a la célula.

Hay muchos tipos de análisis que quedaron pendientes y que podrían ser realizados en trabajos futuros. Entre ellos se destaca una mayor parametrización de las múltiples variables involucradas; sobre todo los pulsos eléctricos. Es posible analizar diferentes tipos de pulsos, de mayor o menor frecuencia, con potenciales más variados, con diferentes relaciones entre los tiempos de apagado y prendido y diferentes tipos de ondas. También se podría analizar de qué manera una célula puede bloquear el ingreso de especies a otra

célula, o reducir el efecto de electroporación. Para esto sería necesario simular un dominio con más de una célula, lo cuál se puede realizar con facilidad con el código implementado. Al acoplar los distintos fenómenos físicos estudiados se consideró el efecto del campo eléctrico sobre la permeabilización de la membrana y sobre las concentraciones de especies, y el efecto de la permeabilización sobre las concentraciones. Un estudio más profundo de este problema debería considerar la no linealidad de la conductividad eléctrica de los tres medios considerados; esta conductividad puede depender de la concentración de especies iónicas, especialmente del pH del medio.

Otros tipos de análisis pendientes requerirían en cambio un mayor trabajo. Uno de estos tipos de análisis es el modelado de células con formas irregulares, como es comúnmente el caso en los tejidos. Esto obligaría a trabajar con un sistema de coordenadas tridimensional, dado que las células irregulares no son sólidos de revolución y no se podría aprovechar el sistema de coordenadas cilíndricas. De esta manera sería necesario reescribir gran parte del código implementado y optimizar los métodos numéricos, ya que la cantidad de elementos en la malla se incrementaría al trabajar en tres dimensiones. Por último se podría analizar también la deformación celular producida por la diferencia de potencial y se podrían modelar las organelas internas de la célula para obtener un modelo más realista.

8. APÉNDICES

Instrucciones de uso del código

El código entregado se puede compilar en Visual Studio importando la solución con el archivo `celula.sln`, que usa el compilador Visual C++. Se puede compilar y correr en Linux con el compilador GCC usando el archivo `Makefile`. Para compilar con Intel C Compiler es necesario modificar el `Makefile` o el proyecto de Visual Studio. Adicionalmente también se incluyen varios scripts en lenguaje Python para ayudar al proceso de generar de mallas, procesar las salidas obtenidas y generar gráficos.

Parámetros de entrada

El programa recibe los parámetros de entrada a través de un archivo `input.in`, que consta de varias líneas con información de la corrida en la forma `parámetro: valor` donde los parámetros son los siguientes:

`malla` ruta del archivo con la malla que representa el dominio.

`nodpel` cantidad de nodos por elemento. La mayor parte del código solo puede correr con elementos de 4 nodos, pero el sub-problema del potencial eléctrico también puede ser ejecutado con elementos de 3 nodos.

`problema` tipo de problema a correr. Puede ser `potencial` si solo se desean obtener los resultados de potencial eléctrico (capítulo 3), `poros` si se desea resolver el potencial y el crecimiento de poros (capítulo 4), `transporte` si se desea resolver el potencial y transporte de especies sin poros (capítulo 5) y `acoplado` si se desean correr el modelo acoplado con todos los subproblemas (capítulo 6).

`salida` ruta al directorio de salida. El programa no ejecuta si el directorio de salida no está vacío (para evitar sobrescribir resultados).

`threads` cantidad de hilos de procesamiento a utilizar. Se recomienda usar tantos como tenga el procesador.

`delta_t` intervalo temporal usado para el cálculo de densidad y radio de poros. Las demás ecuaciones se resuelven con intervalos temporales mayores, que son múltiplos del intervalo de poros. Si sólo se calcula el potencial eléctrico este valor se ignora. Para los resultados de este trabajo se utilizó un valor de 1 ns.

`sigint` valor de conductividad eléctrica en el interior de la célula, expresado en S/µm.

`sigext` valor de conductividad eléctrica del líquido extracelular, expresado en S/µm.

`sigmem` valor de conductividad eléctrica en el la membrana celular, expresado en S/µm.

`potencial` diferencia de potencial entre los electrodos, medida en V. Se asume que se encuentra el electrodo positivo en el borde superior de la malla y el negativo en el borde inferior.

radio radio de la célula, medido en µm.

ancho ancho de la membrana celular, medido en µm.

pulsos cantidad de pulsos a simular.

on_time tiempo que estará prendido cada uno de los pulsos, medido en segundos.

off_time tiempo que estará apagado cada uno de los pulsos, medido en segundos.

Los parámetros pueden estar en cualquier orden y puede haber en el archivo `input.in` comentarios que comiencen con `#`. La malla del dominio debe ser un archivo de texto con el siguiente formato:

- Una línea con la cantidad de nodos.
- Una línea con cada nodo indicando el número de nodo y las posiciones en x e y separados por espacios.
- Una línea con la cantidad de zonas del dominio.
- Una línea por cada zona del dominio, con un número de zona y la cantidad de elementos de la zona, separados por espacios.
- Una línea por cada elemento de cada zona, con un número de elemento dentro de la zona y los números de los nodos que componen el elemento, separados por espacios.

Formatos de salida

El programa genera varias carpetas y archivos en el directorio de salida indicado:

- En el directorio `tension` genera cada 100 µs de la simulación archivos con el nombre `tension.csv.xxx` con `xxx` números consecutivos. Los archivos tienen valores de potencial eléctrico para cada nodo, indicado con coordenadas x e y.
- En el directorio `campo` genera cada 100 µs archivos con nombre `campo.csv.xxx` con valores de las componentes horizontal y vertical y módulo del campo eléctrico y valores de corriente de cada elemento, indicado con coordenadas x e y.
- En el directorio `poros` genera archivos con nombre `poros.csv.xxx` cada 100 µs con el ángulo polar y el radio en µm de cada poro de la membrana.
- En el directorio `concentracion` genera archivos `concentracion.csv.xxx` cada 100 µs con los valores de concentración de H^+, OH^-, Na^+ y Cl^- en cada nodo expresados en átomos por μm^3.
- En el directorio `concentracion` genera archivos `molar.csv.xxx` con los mismos valores de concentración pero expresados como concentraciones molares.
- En el directorio `concentracion` genera archivos con los valores de pH y pOH de cada nodo.
- En un único archivo `itv.csv` graba periódicamente valores de potencial transmembrana indicados con columnas de tiempo, ángulo polar y PTM.
- Genera una copia del archivo `input.in` utilizado.

Bibliografía

[1] Netti, P. A., Berk, D. A., Swartz, M. A., Grodzinsky, A. J., and Jain, R. K. (2000). *Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors.* Cancer research, 60(9), 2497-2503.

[2] Marino, M., (2013). *Electroporación en el tratamiento de tumores: modelos teóricos y experimentales.* Tesis de licenciatura, Departamento de Computación, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

[3] Mir, L. M. (2006). *Bases and rationale of the electrochemotherapy.* European Journal of Cancer Supplements, 4(11), 38-44.

[4] Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R., and Serša, G. (2014). *Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice.* Biomedical engineering online, 13(1), 29.

[5] Yarmush, M. L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T., and Miklavčič, D. (2014). *Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges.* Biomedical Engineering, 16(1), 295.

[6] Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. (1982). *Gene transfer into mouse glioma cells by electroporation in high electric fields.* EMBO Journal 1: 841–845.

[7] Escoffre, J. M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M. P. (2009). *What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues.* Molecular biotechnology, 41(3), 286-295.

[8] Mir, L. M. (2009). *Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future.* Molecular biotechnology, 43(2), 167-176.

[9] Arena, C. B., Sano, M. B., Rossmeisl, J. H., Caldwell, J. L., Garcia, P. A., Rylander, M. N., and Davalos, R. V. (2011). *High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction.* Biomedical engineering online, 10(1), 102.

[10] Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O., and Heinz, V. (2002). *Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing.* Proceedings of the nutrition society, 61(02), 311-318.

[11] Rajkovic A., Smigic N., Devlieghere F. (2010) *Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain.* International Journal of Food Microbiology 141: S29–42.

[12] Poyatos, J. M., Almecija, M. C., Garcia-Mesa, J. J., Munio, M. M., Hontoria, E., Torres, J. C., and Osorio, F. (2011). *Advanced methods for the elimination of microorganisms in industrial treatments: potential applicability to wastewater reuse.* Water Environment Research, 83(3), 233-246.

[13] Pucihar, G., Kotnik, T., Valič, B., and Miklavčič, D. (2006). *Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells.* Annals of biomedical engineering, 34(4), 642-652.

[14] Zheng, Qiong, Duan Chen, and Guo-Wei Wei (2011). *Second-order Poisson–Nernst–Planck solver for ion transport.* Journal of computational physics, 230(13), 5239-5262.

[15] Krassowska, Wanda, and Petar D. Filev (2007). *Modeling electroporation in a single cell.* Biophysical journal, 92(2), 404-417.

[16] Li, J., and Lin, H. (2011). *Numerical simulation of molecular uptake via electroporation.* Bioelectrochemistry, 82(1), 10-21.

[17] Humphries, Stanley (2010). *Finite-element Methods for Electromagnetics.*

[18] Zienkiewicz, Olgierd Cecil and Taylor, Robert Leroy (2000). *The finite element method (Volume I: The Basis).* Butterworth-Heinemann, 5th edition.

[19] Dhatt, Gouri, Emmanuel Lefrançois, and Gilbert Touzot (2012). *Finite element method.* John Wiley & Sons.

[20] Ma, X. W., Zhao, G. Q., and Sun, L. (2011). *Automesh-2D/3D: robust automatic mesh generator for metal forming simulation.* Materials Research Innovations, 15(s1), s482-s486.

[21] Cooper, Geoffrey M., and Robert E. Hausman (2000). *La Célula.* 2° edición, Marbán.

[22] Mott, P. H., Dorgan, J. R., and Roland, C. M. (2008). *The bulk modulus and Poisson's ratio of "incompressible" materials.* Journal of Sound and Vibration, 312(4), 572-575.

[23] Jackson, John David (1962). *Classical electrodynamics (Vol. 3).* 3° edición, John Wiley & Sons Inc.

[24] Nieves Hurtado, Antonio (2007). *Métodos numéricos aplicados a la ingeniería.* Grupo editorial Patria.

[25] *Paraview.* `http://www.paraview.org/` Sandia National Laboratory, Kitware Inc, Los Alamos National Laboratory.

[26] Hunter, John D. (2007). *Matplotlib: A 2D graphics environment.* Computing in science and engineering, 9(3), 90-95.

[27] Tsong, Tian Y. (1991). *Electroporation of cell membranes.* Biophysical journal, 60(2), 297.

[28] DeBruin, Katherine A. and Wanda Krassowska (1999). *Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential.* Biophysical journal, 77(3), 1213-1224.

[29] Colombo, L., González, G., Marshall, G., Molina, F. V., Soba, A., Suarez, C., y Turjanski, P. (2007). *Ion transport in tumors under electrochemical treatment: in vivo, in vitro and in silico modeling.* Bioelectrochemistry, 71(2), 223-232.

[30] Turjanski, P., Olaiz, N., Abou-Adal, P., Suarez, C., Risk, M., y Marshall, G. (2009). *pH front tracking in the electrochemical treatment (EChT) of tumors: Experiments and simulations.* Electrochimica Acta, 54(26), 6199-6206.

[31] Turjanski, P., Olaiz, N., Maglietti, F., Michinski, S., Suarez, C., Molina, F. V., y Marshall, G. (2011). *The role of pH fronts in reversible electroporation.* PLoS One, 6(4), e17303.

[32] Olaiz, N., Signori, E., Maglietti, F., Soba, A., Suárez, C., Turjanski, P., y Marshall, G. (2014). *Tissue damage modeling in gene electrotransfer: The role of pH.* Bioelectrochemistry, 100, 105-111.

[33] Suárez, C., Soba, A., Maglietti, F., Olaiz, N., and Marshall, G. (2014). *The Role of Additional Pulses in Electropermeabilization Protocols.* PloS one, 9(12), e113413.

[34] Guennebaud, G., Jacob, B., Niesen, J., Heibel, H., Nuentsa, D., Hertzberg, C., and Capricelli, T. (2014). *Eigen v3.* `http://eigen.tuxfamily.org`.

[35] Burden, Richard L., J. Douglas Faires, and Simon Mochon (2001). *Análisis numérico.* Séptima edición, I.T.P. Latin America.

[36] Yousef Saad (2003). *Iterative Methods for Sparse Linear Systems.* Segunda edición, Society for Industrial and Applied Mathematics.

[37] Fokkema, Diederik R., Gerard Sleijpen, and Henk A. Van der Vorst (1996). *Generalized conjugate gradient squared.* Journal of Computational and Applied Mathematics, 71(1), 125-146.

[38] Gabriel, Bruno, and Justin Teissie (1999). *Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse.* Biophysical journal, 76(4), 2158-2165.

[39] Hibino, M., H. Itoh and K. Kinosita (1993) *Time courses of cell electroporation as revealed by submicroscopic imaging of transmembrane potential.* Biophysical Journal 64:1789–1800.

[40] Pacheco, Peter (2011). *An introduction to parallel programming.* Morgan Kaufmann.

[41] Michael J. Quinn (2003). *Parallel Programming in C with MPI and OpenMP.* McGraw-Hill.

[42] Atkinson, Kendall E. (1989). *An introduction to numerical analysis.* John Wiley & Sons, Second edition.