

ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE SUSPENSÕES DE CÉLULAS BIOLÓGICAS

L. C. Ramos*, G. B. Pintarelli*, G. da Luz** e D. O. H. Suzuki*

* Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

** Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

e-mail: luciana.ramos@ieb.ufsc.br

Resumo: Medições da condutividade de suspensão de células biológicas têm sido usadas para avaliar o efeito da eletroporação em células. Pulsos de 900 μs com variações de campo elétrico foram aplicados em células em suspensão. Os eletrodos possuem distância em torno de 200 μm . No entanto, foi possível observar as variações da condutividade da suspensão à medida que o campo elétrico aumentou, inclusive no limiar do potencial transmembrana para que ocorra a eletroporação, a 200 mV

Palavras-chave: eletroporação, condutividade da membrana, células em suspensão, hemácias de ratos.

Abstract: Conductance measurements of biological cells in suspension have been used to evaluate the effect of the electroporation. Pulses with 900 microseconds and different electric field strengths were applied to suspended cells. Although the distance between electrodes was about 200 micrometer, it was possible to observe variations in conductivity cell suspension when the electric field was increased. At the electroporation threshold of 200 mV, alterations of the suspension's conductivity were observed.

Keywords: electroporation, membrane conductivity, cell suspension, erythrocytes of mice.

Introdução

A eletroporação é o aparecimento de poros em membranas celulares devido a um potencial transmembrana elevado (200 mV – 1 V) causado pela aplicação de um campo elétrico externo [1]. O fenômeno pode ser reversível ou irreversível, de acordo com as características do campo aplicado [2]. A abertura reversível de poros possibilita a transferência através da membrana de íons e moléculas solúveis em água, como uma série de drogas, DNA, anticorpos e plasmídeos [3].

A eletroporação em células biológicas em suspensão (*bulk electroporation*) é uma técnica que possibilita a eletroporação de uma grande quantidade de células com um único pulso. V_0 é a tensão transmembrana induzida em uma célula por um campo elétrico E_0 praticamente uniforme, Figura 1, dada pela Equação 1. Seu valor é máximo no pólo da célula, em $\theta = 0$ [4]:

$$V_0 = 1,5 \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos(\theta) \quad (1)$$

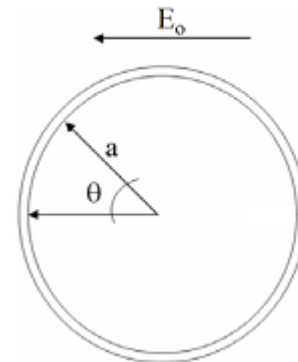


Figura 1: Célula esférica de raio a , campo elétrico E_0 e θ é o ângulo entre o vetor do campo aplicado e o vetor normal à superfície da membrana.

Em suspensão de células, o campo elétrico E_0 que incide na célula depende da fração volumétrica, conforme a Equação 2 descrita por Yurong *et al* [5]:

$$E_0 = \frac{1 + \frac{p}{2}}{1 + \sqrt[3]{\frac{3p}{4N\pi}}} E_a \quad (2)$$

onde, p é a fração volumétrica da suspensão de células, E_a é o campo elétrico aplicado e N é o número de células do arranjo unitário da suspensão.

Vários dispositivos desenvolvidos recentemente para eletroporação de suspensão de células utilizam a tecnologia de MEMS – *Micro Electro-Mechanical System*. As vantagens de se minimizar dimensões é alcançar campos elétricos de alta intensidade devido à distância pequena entre eletrodos e de se ter uma boa dispersão do calor proveniente do efeito Joule [6].

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de eletroporação com distância entre os eletrodos reduzida (<1 mm) para observar o efeito de campos elétricos intensos em suspensão de células. A distância reduzida permite intensos campos elétricos com pequenos potenciais elétricos.

Materiais e métodos

As células utilizadas nos experimentos foram hemácias de ratos. Todos os procedimentos executados foram de acordo com as orientações do Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de protocolo CEUA PP00398, e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UFSC. As hemácias são células anucleadas e possuem raio médio de $3,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ [3]. Após o sangue ser centrifugado por 1 minuto a 6.200 rpm e retirado o plasma, as células foram ressuspensas em PBS a uma fração volumétrica de $p=0,19$. O PBS é uma solução isotônica e não tóxica às células, pH de 7,2 e resultante de 7,65g de NaCl, 0,724g de Na_2HPO_4 e 0,21g de KH_2PO_4 em 1 litro de H_2O destilada.

Um sistema de micro eletroporação foi construído com eletrodos distanciados de $230 \pm 25 \mu\text{m}$, Figura 2.

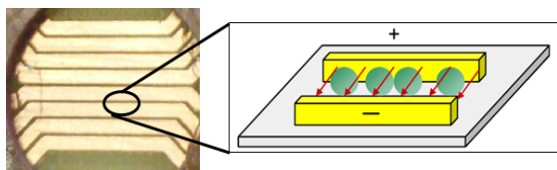


Figura 2: Visualização de detalhe do sistema de eletroporação destacando região da suspensão de células.

Este sistema de eletroporação foi acoplado a uma resistência de leitura de valor conhecido ($R_{leitura}$, de valor $10,1 \Omega$ medido com multímetro FLUKE 179) e a um dispositivo de *hardware* para o seu acionamento, Figura 3.

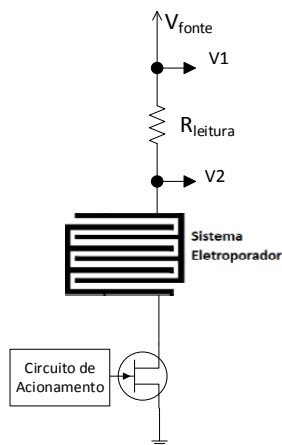


Figura 3: Diagrama que compreende o circuito de acionamento, resistência de leitura e o sistema de eletroporação.

A leitura das tensões $V1$ e $V2$ foi realizada com um osciloscópio Tektronix TDS2004C. Um conjunto de pulsos quadrados de duração de $900 \mu\text{s}$ foi aplicado no sistema de eletroporação para gerar campos elétricos entre 22 e 174 kV/m . Considerando a equação de Yurong, em suspensões de fração volumétrica de $p=0,19$ e utilizando $N=1$ (arranjo cúbico simples) tem-se que $E_0 = 0,94 \cdot E_a$. Logo, E_0 variou entre 20 e 164 kV/m .

Para cada valor de campo elétrico gerado, fez-se a média de três valores das tensões $V1$ e $V2$ e aplicou-se um filtro passa-baixa de 5º ordem com $f_c=60\text{kHz}$. Então calculou-se a resistência média do sistema de eletroporação. A condutividade da suspensão de células foi calculada através da relação com o inverso da resistência do sistema e com uma constante de proporcionalidade de dependência das dimensões dos eletrodos.

Na experimentação, os eletrodos são cobertos com a solução de células em suspensão, um volume maior do que o campo elétrico atinge. Para maior entendimento da intensidade do campo elétrico no substrato, simulações foram feitas utilizando o *software* COMSOL Multiphysics®.

Resultados

A Figura 4 apresenta a relação entre a condutividade relativa da suspensão de células e o campo elétrico. A condutividade inicial, σ_i , foi obtida em 22 kV/m . A condutividade a cada campo elétrico aplicado, σ_e , foi medida em $600 \mu\text{s}$. A condutividade relativa foi considerada como a diferença entre $\sigma_e - \sigma_i$.

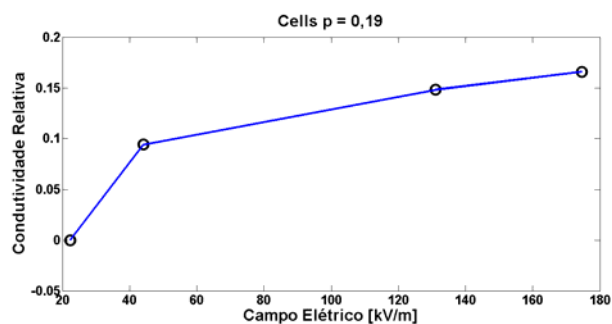


Figura 4: Curva da condutividade da suspensão de células de $p=0,19$ em relação ao campo elétrico aplicado. Dados analisados em $600 \mu\text{s}$.

Os valores da tensão transmembrana V_0 obtidos das Equações 1 e 2 estão entre 0,10 e 0,78 V. Este intervalo está próximo do que se estima a eletroporação [7].

A geometria e os parâmetros utilizados para a simulação em Comsol se encontram na Figura 5. Para facilitar o entendimento, foi destacado parte da área de dois eletrodos, com diferença de potencial de 40 V. Acima dos eletrodos foi configurado com substrato PBS e abaixo, um meio isolante. Observar a distância entre eletrodos de $230 \mu\text{m}$.

Na Figura 6 observa-se o gradiente do campo elétrico gerado pelos eletrodos atingindo 174 kV/m . Na experimentação, essas áreas próximas do eletrodo que apresentam campo elétrico intenso vão gerar uma tensão transmembrana maior nas células em suspensão. A eletroporação não ocorre uniformemente em todo o substrato. Ela é mais significativa até a distância de $50 \mu\text{m}$ acima dos eletrodos.

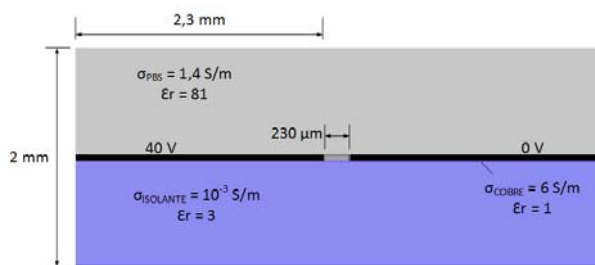


Figura 5: Geometria e parâmetros utilizados na simulação.

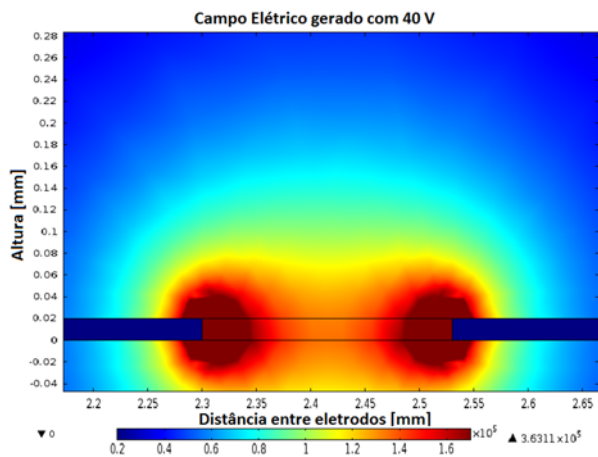


Figura 6: Campo elétrico [V/m] gerado entre eletrodos em PBS quando aplicado um campo elétrico de 174 kV/m.

Na Figura 7 observa-se a direção e a intensidade da densidade de corrente entre os eletrodos. O ângulo de incidência do campo determina em que região da membrana a eletroporação vai ocorrer com maior intensidade.

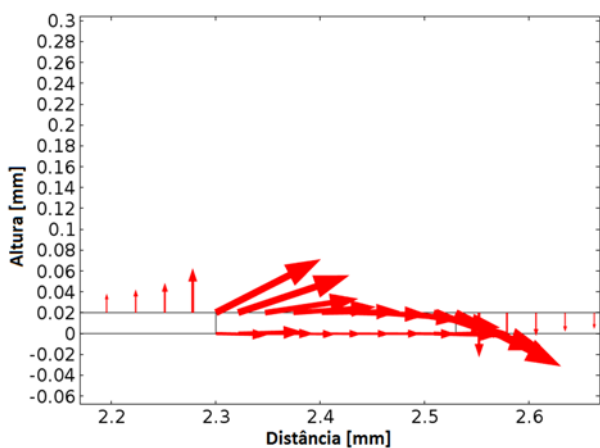


Figura 7: Densidade de corrente gerada entre eletrodos em PBS quando aplicado um campo elétrico de 174 kV/m.

Discussão

A proposta deste artigo é demonstrar que o sistema de eletroporação desenvolvido foi capaz de produzir e detectar alterações da condutividade na suspensão de células durante a eletroporação. O tempo dos pulsos e as tensões utilizadas foram definidos [4] para que o campo elétrico gerado seja capaz de induzir a eletroporação. Além do tempo e tensão do pulso, o sistema de eletroporação é sensível à alteração da concentração das suspensões e à mudança no tipo de células em suspensão.

Dado as dimensões de $230 \mu\text{m}$ entre os eletrodos do sistema de eletroporação, verificou-se através da simulação que os campos elétricos e a densidade de corrente foram significativos num volume de células pequeno, conforme as Figuras 6 e 7, respectivamente. Portanto, as células eletroporadas que contribuem para o aumento da condutividade da suspensão estão apenas nas regiões entre os eletrodos. Apesar da amostra de células eletroporadas ser reduzida, foi possível medir a alteração da corrente. Como a suspensão de células está diluída em PBS, que apresenta característica de alta condutividade ($1,4 \text{ S/m}$), os campos elétricos gerados propiciam uma maior condutividade da membrana celular [3].

Em uma concentração de $p=0,19$, o sistema apresentou uma variação da condutividade em campo elétrico próximo a 40 kV/m , onde a potencial transmembrana, dado pela Equação 1, é de $0,2 \text{ V}$, limiar de eletroporação. E o processo chegou a um valor máximo de potencial de transmembrana de $0,8 \text{ V}$. Esta leitura demonstra que o sistema apresentado neste trabalho apresenta resultados melhores que os de Suzuki *et al.* [3]. Neste trabalho, a alteração da condutividade da suspensão apresentou alterações em valor de limiar de $0,4 \text{ V}$ como iniciais da eletroporação [7].

Devido ao acionamento ser uma onda quadrada, várias frequências estão presentes no sistema. Um estudo da impedância do sistema de eletroporação deve ser feito de forma a compensar seus efeitos.

Conclusão

O sistema de eletroporação demonstrou uma variação de condutividade em suspensão de células devido à eletroporação. A distância reduzida entre eletrodos (em torno de $200 \mu\text{m}$) permitiu intensos campos elétricos com pequenos potenciais elétricos. Em trabalhos futuros, pretende-se definir melhor as limitações de leitura deste sistema de eletroporação. O intuito é desenvolver um sistema de estudo da eletroporação em suspensão de células para entendimento do fenômeno.

Agradecimentos

Agradecimentos à Capes pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA. Membrane electroporation theories: a review. *Med. Biol. Eng. Comput.*; 2006, v. 44, p. 5-14.
- [2] Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry*; 1996, v. 41, p. 135-160.
- [3] Suzuki DOH, Ramos A, Ribeiro MCM, Cazarolli LH, Silva FRMB, Leite LD, Marques JLB. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance on cell suspension. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*; 2011, v. 58, p. 3310-3318.
- [4] Krassowska W, Filev PD. Modeling electroporation in a single cell. *Biophys. J.*; 2007, v. 92, p. 404-417.
- [5] Yurong Q, Shengli L, Yuehua J, Taicheng Y, Jie W. Transmembrane voltage induced on a cell membrane in suspensions exposed to an alternating field: A theoretical analysis. In: *Bioelectrochemistry*; Volume 67, Sep. 2005, p. 57-65.
- [6] He H, Chang DC, Lee, YK. Micro pulsed radio-frequency electroporation chips. *Bioelectrochemistry*. Netherlands. 2006 68(1), 89-97.
- [7] Teissie J, Golzio M, Rols MP. Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2005. 1724(3), 270-280.