

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA**

Rafael Attili Chiea

**PREPARAÇÃO DE UM ARRANJO EXPERIMENTAL PARA A
ELETROPORAÇÃO DE CÉLULA ÚNICA**

Florianópolis(SC)

2013

Rafael Attili Chiea

**PREPARAÇÃO DE UM ARRANJO EXPERIMENTAL PARA A
ELETROPORAÇÃO DE CÉLULA ÚNICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Prof^ª. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.

Coorientador: Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.

Florianópolis (SC)

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chiea, Rafael Attili

Preparação de um arranjo experimental para a eletroporação de célula única / Rafael Attili Chiea ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki ; co-orientador, Jefferson Luiz Brum Marques. - Florianópolis, SC, 2013.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.

Inclui referências

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroporação. 3. Eletroporação de célula única (SCEP). 4. Modelos matemáticos da membrana celular. I. Suzuki, Daniela Ota Hisayasu. II. Marques, Jefferson Luiz Brum. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. IV. Título.

Rafael Attili Chiea

**PREPARAÇÃO DE UM ARRANJO EXPERIMENTAL PARA A
ELETROPORAÇÃO DE CÉLULA ÚNICA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Elétrica”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.

Florianópolis (SC), 26 de junho de 2013.

Prof. Patrick Kuo-Peng, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof.^a Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Fernando Azevedo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Walter Carpes Jr., Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Airton Ramos, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof.^a Claudia Mirian de Godoy Marques, Dr.^a
Universidade do Estado de Santa Catarina

A minha esposa, Myrtille, que fez deste trabalho de um homem

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças à participação de muitas pessoas. Talvez algumas delas não estejam citadas aqui e por isso peço que me desculpem e que se sintam mencionadas.

À professora Daniela O. H. Suzuki pela orientação, conselhos e conversas de corredor que sempre acabavam por abrir novos caminhos.

Ao professor Jefferson Luiz Brum Marques pelos conselhos, opiniões e material disponibilizado.

À professora Fátima Regina Mena Barreto Silva e, principalmente, suas alunas Marisa Frederico, Ana Paula Zanatta, Renata Gonçalves e Delci, que tiveram a paciência e a boa vontade de me ensinar os procedimentos de laboratório e fornecer material essencial para este trabalho.

À profa. Claudia Nedel e a sua aluna Karen Oliveira, que disponibilizaram culturas celulares para os experimentos.

Ao professor Vander Baptista, que permitiu o uso de equipamento de seu laboratório e contribuiu com conselhos pertinentes.

Ao professor José Marino Neto, que me apresentou os professores Vander Baptista e Claudia Nedel.

Ao colega Juan Guedes Pereira, por disponibilizar software de sua autoria para os experimentos.

Ao colega Jânio Anselmo, que participou da realização de experimentos.

A meus colegas do mestrado Oscar Julian Perdomo Charry, Júlia Vianna Gallinaro, Camila Sampaio dos Reis, Luiz Tauffer e Fernando Bruinje Cosentino, pelas horas de estudo, ideias e materiais compartilhados, companhia nas filas do RU, almoços de micro-ondas improvisados, cafés e sessões do Cine Guacamole.

A Yasser Mohsen, Guilherme Brasil Pintarelli, Willian Cruz Castañeda e toda a equipe do IEB, professores, funcionários e alunos, que, pelo simples fato de compartilhar o dia a dia de trabalho, influenciaram o resultado final desta dissertação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, e ao IEB-UFSC pela estrutura.

Aos meus pais que sempre me apoiaram.

No meio do caminho tinha uma pedra. Depois apareceram mais duas, três, cinco, sete... A um momento cansei de contá-las e me senti seguro por estar seguindo no caminho das pedras.

RESUMO

Este trabalho objetiva a preparação de um arranjo experimental para o estudo da eletroporação de célula única. Quando a membrana celular é submetida a um campo elétrico externo suficientemente intenso, poros de escala nanométrica se formam na membrana, aumentando sua permeabilidade. Esse fenômeno é chamado de *eletroporação*. Apesar da eletroporação ser usada em uma série de processos, a dinâmica da abertura e crescimento dos poros ainda não é totalmente conhecida, e não há um modelo matemático confiável que permita a simulação quantitativa do fenômeno. Experimentos da eletroporação podem ser feitos em células em suspensão (tradicional), aplicando-se campos elétricos com eletrodos de placas paralelas, ou em células únicas, com o auxílio de eletrodos capilares repletos com eletrólito (EFC). A última opção possui a vantagem de permitir a obtenção de dados mais consistentes para a modelagem do fenômeno, uma vez que as medições são referentes aos efeitos em uma única célula e não uma combinação dos eventos que ocorrem nas diversas células (de tamanhos diferentes). Além disso, possibilita a eletroporação de células ou regiões específicas de tecidos *in vivo*. Neste trabalho, um modelo matemático foi adaptado para arranjos experimentais de eletroporação de célula única com EFCs. O modelo adaptado permitiu a avaliação qualitativa do número de poros criados e suas dimensões em diferentes regiões da membrana celular. Quanto maior a intensidade do estímulo elétrico, maior é o número de poros, e menor é o raio destes poros. O aprimoramento do modelo depende da obtenção de dados experimentais. Também foi preparado um arranjo experimental físico para a realização de experimentos de eletroporação de célula única com eletrodos do tipo EFC, que inclui o desenvolvimento de um nanoamperímetro. O conjunto permitiu: a caracterização da impedância dos eletrodos EFC produzidos no laboratório como praticamente resistivos de 0 a 10kHz; e a identificação do posicionamento do eletrodo em relação à membrana ou tecido a partir de medições de variações da impedância. Aproximando-se de uma célula única, o eletrodo atinge o posicionamento adequado com um deslocamento de alguns micrômetros, enquanto quando o alvo é um tecido muscular, o deslocamento é de algumas centenas de micrômetros. Estes resultados indicam que com este arranjo experimental, será possível a eletroporação de células e tecidos em cultura, e assim, permitir a obtenção de dados relativos ao número e às dimensões dos poros formados.

Palavras-chave: Eletroporação. Eletropermeabilização. SCEP. Modelos matemáticos. Membrana celular

ABSTRACT

This work aims to develop an experimental set-up for the study of single-cell electroporation. Whenever cell membrane is submitted to a sufficiently intense electric field, nanoscale pores are formed, increasing membrane permeability. The phenomena is termed *electroporation*. In spite of being used in several processes, dynamics of pore creation and development is not yet known, and there is no trustful mathematical model that allows quantitative numerical simulations of electroporation. Electroporation experiments may be traditionally performed in cell suspensions (bulk electroporation), by applying electric fields through parallel plates, or in a single-cell set-up, with electrophysiology capillary electrodes (EFC). The latter set-up has the advantage to provide more consistent data to feed mathematical model development, once the measurements relate to the effects on a single-cell, while the results obtained by bulk electroporation are a combination of the effects of the events occurred on several cells of different size. Besides, it allows the electroporation of specific cells or tissue regions *textititn vivo*. In this work, a mathematical model was adapted to single-cell electroporation set-ups with an EFC. The model enabled qualitative analysis of pore creation and dimensions in different regions of cell membrane. The greater the intensity of the electrical stimulus, the greater the number of pores created, and smaller are the radii of the pores. Upgrading the model depends on the collection of experimental data. An experimental set-up was prepared for single-cell electroporation with EFC type electrodes, which include the development of a nanoampere ammeter. This set-up permitted: the characterization of the impedance of EFC electrodes made in the laboratory as practically resistive from 0 to 10kHz; the identification of the position of the electrode tip with respect to the cell membrane or tissue through impedance variations measurements. When approaching a single cell, the electrode reaches the appropriated proximity within a displacement of a few unities of micrometer, while when the target is muscular tissue, the displacement is of some hundreds of micrometers. These results indicate that, with this experimental set-up, it will be possible to electroporate cells grown in cultures and tissues, and thus to provide the gathering of information related to pore creation and pore dimensions.

Keywords: Electroporation. Electroporabilization. SCEP. Mathematical Models. Cell Membrane

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fosfolipídios e membrana celular	28
Figura 2	Poros hidrofóbicos e hidrofílicos	29
Figura 3	Energia associada a um poro	30
Figura 4	Arranjo experimental tradicional da eletroporação em suspenções de células	31
Figura 5	Arranjo experimental com EFC distante da membrana	33
Figura 6	Arranjo experimental com EFC tocando a membrana	34
Figura 7	Geometria do experimento de célula sob campo uniforme	42
Figura 8	Geometria do experimento com EFC distante da membrana	43
Figura 9	Geometria do experimento com EFC tocando a membrana	44
Figura 10	Simulação do arranjo experimental I	45
Figura 11	Simulação do arranjo experimental II	47
Figura 12	Simulação do arranjo experimental III	48
Figura 13	Circuito amplificador de transimpedância	52
Figura 14	Circuito do nanoamperímetro com <i>shunt</i>	53
Figura 15	Calibração do nanoamperímetro	55
Figura 16	Resposta em frequência do equipamento desenvolvido	56
Figura 17	Arranjo para a medição da impedância dos eletrodos	58
Figura 18	Impedância dos eletrodos microcapilares estirados	60
Figura 19	Arranjo para medição da posição do eletrodo	65
Figura 20	Aproximação entre a ponta do EFC e a membrana	67
Figura 21	Aproximação entre a ponta do EFC e o tecido	69
Figura 22	Fluxograma do programa desenvolvido para as simulações numéricas	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição e valores dos parâmetros	41
Tabela 2	Medições de condutividade do PBS	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCEP	<i>Single-cell electroporation</i>	24
EFC	<i>Electolyte Filled Capillary</i>	24
MEMS	<i>Microelectromechanical systems</i>	32
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	63
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	64
F12	Meio de cultura celular de Ham F12	64
SFB	Soro fetal bovino	64
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético	64

LISTA DE SÍMBOLOS

V_m	Potencial elétrico transmembrana (V)	23
V_0	Potencial elétrico transmembrana induzido (V)	23
r	Raio do poro (m)	27
W_p	Energia do poro (J)	28
W_{mec}	Energia mecânica do poro (J)	28
W_{el}	Energia eletrostática do poro (J)	28
W_{inter}	Energia de efeitos estéricos do poro (J)	28
E	Campo elétrico aplicado (V/m)	31
a	Raio da célula (m)	31
R_e	Impedância do eletrodo EFC (Ω)	33
d	Distância entre o eletrodo e a membrana (m)	33
R_f	Impedância da fenda entre o eletrodo e a membrana (Ω)	34
r^*	Raio crítico a partir do qual poros hidrofóbicos se tornam hifrofílicos (m)	37
N	Densidade de poros (m^{-2})	37
α	Coeficiente da taxa de criação de poros ($m^{-2} s^{-2}$)	37
N_{eq}	Densidade de poros de equilíbrio para um dado V_m (m^{-2})	37
N_0	Densidade de poros de equilíbrio @ $V_m = 0V$ (m^{-2})	37
r_m	Raio de mínima energia (m)	37
n	Número de poros	37
D_p	Coeficiente de difusão para o raio dos poros ($m^2 s^{-1}$)	37
k_B	Constante de Boltzmann (JK^{-1})	37
T	Temperatura (K)	37
r_j	Raio do j -ésimo poro (m)	37
W	Energia da bicamada lipídica	37
β	Constante de energia de repulsão estérica (J)	38
κ	Módulo de flexão da membrana (adimensional)	38
h	Espessura da membrana (m)	38
ψ	Fração molar de colesterol na membrana (adimensional)	38
c_0	Curvatura espontânea do colesterol (m^{-1})	38
σ_{eff}	Tensão efetiva da membrana	38
A_p	Área de todos os poros somadas (m^2)	38

F	Força elétrica sobre a membrana (N)	38
A_t	Área total da membrana (m^2)	38
σ'	Tensão da interface hidrocarboneto-água ($J m^{-2}$)	38
σ_0	Tensão da bicamada sem poros ($J m^{-2}$)	38
F_{max}	Máxima força elétrica @ $V_m = 1V$ (N)	38
r_h	Constante para a equação (3.7) (m)	38
r_t	Constante para a equação (3.7) (m)	38
G_m	Condutância da membrana ($S m^{-2}$)	38
C_m	Capacitância da membrana ($F m^{-1}$)	38
τ_0	Constante de tempo da membrana (s)	38
C_w	Variável auxiliar para a equação (3.8) ($F m^{-2}$)	38
ϵ_w	Permissividade elétrica relativa da água ($F m^{-1}$)	38
s_i	Condutividade intracelular ($S m^{-1}$)	38
s_o	Condutividade extracelular ($S m^{-1}$)	39
f	Constante relativa ao formato da célula	40
g	Constante relativa às características elétricas das soluções intra e extracelulares e da membrana	40
θ	Ângulo entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor na posição na membrana (rad)	40
V_{in}	Potencial aplicado no eletrodo EFC (V)	51
V_{ep}	Potencial crítico da eletroporação (mV)	51
V_{out}	Tensão na saída do amplificador (mV)	52
i_c	Corrente através do EFC (mV)	52
S_{PBS}	Condutividade do PBS	59
n_i	Número de poros formados na iteração i	87
t_f	Tempo final da simulação	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivos específicos	24
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	25
2 TEORIA DA ELETROPORAÇÃO	27
2.1 MEMBRANA CELULAR	27
2.2 FORMAÇÃO DE POROS	27
2.3 ARRANJOS EXPERIMENTAIS	30
2.3.1 Eletroporação em suspensões de células	30
2.3.2 Eletroporação de célula única (SCEP)	32
2.3.2.1 <i>Lab on a chip</i>	32
2.3.2.2 Capilar estirado distante da membrana	32
2.3.2.3 Capilar estirado tocando a membrana	34
2.4 MODELO MATEMÁTICO	35
3 SIMULAÇÕES NUMÉRICAS DA ELETROPORAÇÃO	37
3.1 METODOLOGIA	39
3.1.1 Adaptação da geometria	40
3.1.1.1 Arranjo I — Campo uniforme	40
3.1.1.2 Arranjo II — EFC distante	42
3.1.1.3 Arranjo III — EFC tocando a membrana	43
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4 DESENVOLVIMENTO DO NANOAMPERÍMETRO	51
4.1 METODOLOGIA	51
4.1.1 Projeto do circuito eletrônico	51
4.1.2 Calibração	52
4.1.3 Resposta em frequência	53
4.1.3.1 Experimental	53
4.1.3.2 Tratamento dos dados	54
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5 ESTUDO DA IMPEDÂNCIA DOS ELETRODOS	57
5.1 METODOLOGIA	57
5.1.1 Arranjo experimental	57
5.1.2 Fabricação dos eletrodos	57
5.1.3 Solução condutora	59
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6 POSICIONAMENTO DO ELETRODO EM RELAÇÃO À MEMBRANA	63

6.1	METODOLOGIA	63
6.1.1	Culturas de células	63
6.1.1.1	Lamínulas com polilisina	63
6.1.1.2	Hemácias	64
6.1.1.3	A172	64
6.1.2	Tecido muscular	65
6.1.3	Medida de impedância	65
6.1.4	Tratamento dos dados	66
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
7	DISCUSSÃO	71
7.1	DAS SIMULAÇÕES NUMÉRICAS	71
7.2	DOS EXPERIMENTOS	72
8	CONCLUSÕES	75
9	TRABALHOS FUTUROS	77
	Referências Bibliográficas	79
	APÊNDICE A – Fluxograma do programa desenvolvido para as simulações numéricas	87

1 INTRODUÇÃO

Quando a membrana celular é submetida a um campo elétrico externo, um potencial elétrico transmembrana (V_m) é induzido. Se este potencial é suficientemente elevado ($V_m > 0,2V$) (TEISSIÉ; ROLS, 1993), poros de escala nanométrica se formam na membrana, aumentando sua permeabilidade. Esse fenômeno é chamado de *eletroporação* ou *eletropermeabilização* e permite a transferência de íons e moléculas solúveis em água através da membrana (SUZUKI, 2009). De acordo com o potencial induzido, a eletroporação pode ser reversível ou irreversível, causando o rompimento da membrana, e consequentemente, a morte celular (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Quando reversível ($0,2V < V_m < 1V$), após a retirada do estímulo externo, os poros se fecham e a membrana se restabelece.

Nas últimas décadas, os mecanismos e aplicações práticas da eletroporação vêm recebendo cada vez mais atenção. A eletroporação irreversível pode ser usada na esterilização de alimentos e drogas (GOLBERG; BELKIN; RUBINSKY, 2009). Em tratamentos contra o câncer, a eletroporação é uma solução para a inserção de quimioterápicos em células tumorais cutâneas e subcutâneas, na eletroquimioterapia (SERSA; CEMAZAR; SNOJ, 2009) ou para o aumento da eficiência das vacinas de DNA (RICE; OTTENSMEIER; STEVENSON, 2008). É também usada para a transferência de plasmídeos no desenvolvimento de técnicas relacionadas a organismos geneticamente modificados (NICKOLOFF, 1995). A eletroporação possibilita, pela introdução de marcadores fluorescentes ou plasmídeos nas células, o estudo morfológico e funcional de células do sistema nervoso central (UESAKA *et al.*, 2005) (CAPPELLO *et al.*, 2012). Um efeito indesejado da eletroporação acontece na terapia de desfibrilação cardíaca, quando a aplicação de campos elétricos causa a abertura de poros nas membranas e, consequentemente, o desequilíbrio iônico nas células do coração (OLIVEIRA; BASSANI; BASSANI, 2008).

Apesar das suas diversas aplicações, ainda não há uma teoria consistente da eletroporação. Isso está ligado à dificuldade em se fazer medidas experimentais da eletroporação. Os poros têm raios da ordem de nanômetros e formam-se na escala de nano a microssegundos. Além disso, a dinâmica de abertura e fechamento dos poros, sua quantidade e sua distribuição na membrana dependem do campo elétrico aplicado (distribuição, amplitude, forma de onda), de características do meio (condutividades intra e extracelulares) e do formato das células (SUZUKI *et al.*, 2011). A complexidade estrutural e a composição dos tecidos e células dificultam o estudo do fenômeno (*apud* Suzuki, 2009) .

Medições da eletroporação são realizadas através de experimentos nos quais um campo elétrico é aplicado a células em suspensão (*bulk electroporation*), geralmente com o uso de eletrodos de placas paralelas. Esta é a técnica usada tradicionalmente, por sua execução relativamente simples. Outra abordagem, mais recente, é focalizar o campo elétrico em uma única célula (*Single-cell electroporation – SCEP*), utilizando-se eletrodos de eletrofisiologia do tipo microcapilar estirado repleto de eletrólito (EFC), por exemplo. Uma das principais vantagens dos experimentos com célula única é que os dados obtidos são referentes a uma única célula, e não uma combinação dos efeitos em diversas células com diferentes dimensões. Assim, experimentos com células únicas podem fornecer dados mais concretos para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto da eletroporação.

Compreender os mecanismos da eletroporação permitirá a sua utilização de forma segura e eficiente. Um caminho para alcançar este objetivo pode estar na experimentação em célula única, de forma a se obter dados do transiente do aparecimento e dinâmica dos poros, acompanhada do desenvolvimento de um modelo matemático adequado a geometria dos experimentos e em acordo com os dados obtidos.

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho visa preparar um arranjo experimental para a obtenção de dados sobre a abertura de poros em uma única célula. Pretende-se, assim, contribuir com ferramentas para o melhor entendimento da eletroporação através do estudo do fenômeno em célula única.

1.1.1 Objetivos específicos

Simulação numérica da eletroporação: Adaptar o modelo matemático de Smith, Neu e Krassowska (2004), originalmente concebido para uma célula imersa em um campo elétrico uniforme, aos arranjos experimentais nos quais o campo elétrico é aplicado através de um EFC. Em seguida, realizar simulações numéricas para obter informações sobre as características do pulso elétrico aplicado e identificar especificações técnicas dos equipamentos necessários para a realização da eletroporação com um EFC.

Projeto do nanoamperímetro: Projetar um equipamento que permita a medição da corrente que flui através do EFC para medir a impedância dos eletrodos fabricados no laboratório. A partir de medições da variação

dessa impedância é possível identificar se o eletrodo está adequadamente posicionado em relação à membrana celular para a aplicação dos pulsos de eletroporação.

Estudo da impedância dos eletrodos EFC: Caracterizar a impedância elétrica de eletrodos EFC estirados no laboratório em diferentes frequências. O pulso de eletroporação a ser aplicado na célula ou tecido deve ser projetado de acordo com as características elétricas do eletrodo. Além disso, é necessário identificar uma faixa de frequências adequada para se realizar medidas da aproximação entre o eletrodo e a amostra.

Estudo do posicionamento do EFC: Realizar medições da impedância do eletrodo enquanto este se aproxima da membrana celular ou tecido e identificar o ponto de posicionamento adequado em relação à membrana para a aplicação do estímulo de eletroporação.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este documento é composto de nove capítulos. Segue esta introdução uma descrição da teoria da eletroporação e dos arranjos experimentais usados para estudá-la. Na sequência constam quatro estudos descritos em capítulos independentes, contendo a metodologia utilizada, e os resultados comentados: simulações numéricas da eletroporação; desenvolvimento do nanoamperímetro; estudo da impedância dos eletrodos; estudo do posicionamento do eletrodo em relação à membrana. Finalmente, há uma discussão geral dos estudos realizados, a conclusão e a proposição de trabalhos futuros.

2 TEORIA DA ELETROPORAÇÃO

Neste capítulo encontram-se alguns fundamentos teóricos da eletroporação, assim como uma revisão das técnicas experimentais utilizadas em seu estudo.

2.1 MEMBRANA CELULAR

A membrana celular (plasmática) é a estrutura que separa os meios intra e extracelulares. Consiste basicamente em uma bicamada formada por fosfolipídios permeados por proteínas, glicolipídios e colesterol. Os fosfolipídios da membrana celular são moléculas anfifílicas, que possuem uma cabeça polar, hidrofílica, que contém fosfato, ligada a uma molécula de glicerol, também ligada a uma cauda apolar hidrofóbica (COOPER, 2000), ver Figura 1(a). Esta é composta por duas cadeias de ácidos graxos, sendo uma cadeia carbônica saturada e uma de cadeia carbônica insaturada, apresentando uma dupla ligação *cis*.

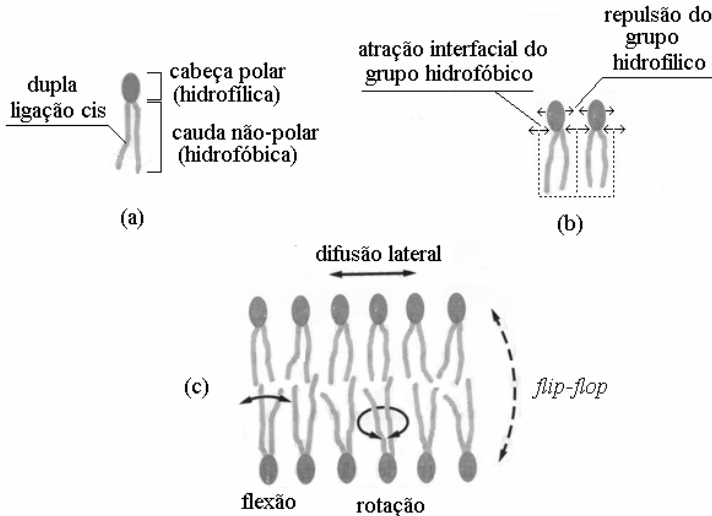
As caudas apolares se atraem na interface água e hidrocarboneto, enquanto as cabeças polares se repelem, formando uma membrana estável, mas dinâmica e fluida, permitindo que suas moléculas se movam no plano da membrana. Os fosfolipídeos movimentam-se na membrana por difusão lateral, rotação, flexão e inversão (*flip-flop*), como ilustrado na Figura 1(c).

2.2 FORMAÇÃO DE POROS

Os poros formados na membrana podem ser hidrofóbicos ou hidrofílicos, de acordo com a organização das moléculas fosfolipídicas, Figura 2. Poros hidrofóbicos são lacunas instáveis que se formam esporadicamente na membrana pela própria movimentação dos fosfolipídios. São pequenos, $r < 1nm$, e estão em constante flutuação na escala de picossegundos (TSONG, 1991). Os poros de interesse no estudo da eletroporação são os hidrofílicos. Estes têm dimensões e tempo de existência maiores, permitindo a passagem de moléculas solúveis em água através da membrana.

A idéia básica da teoria de formação de poros é baseada na energia do poro, W_p . Num primeiro momento, considera-se apenas a diferença de energia mecânica, W_{mec} , entre a membrana intacta, sem poros, e a mesma membrana tendo retirada uma região circular de raio r (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996)(CHEN *et al.*, 2006). Incluídas as influências da energia

Figura 1 – (a) Representação da molécula de fosfolipídio. (b) Forças repulsivas do grupo hidrofílico e forças atrativas do grupo hidrofóbico (interface água e hidrocarbono). (c) Mobilidade dos fosfolipídios.



Adaptado de Alberts, Johnson e Walter (1997 *apud* Suzuki, 2009) e Israelachvili (1985 *apud* Suzuki, 2009).

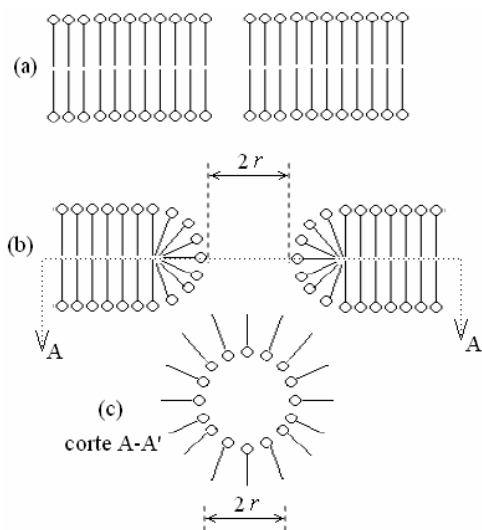
eletrostática (W_{el}), devida ao campo elétrico externo aplicado, tem-se a equação 2.1 que representa a energia para poros hidrofóbicos.

$$W_p(r, V_m) = W_{mec}(r) + W_{el}(r, V_m) \quad (2.1)$$

Para poros hidrofílicos, a organização espacial das moléculas provoca a sobreposição das nuvens eletrônicas das cabeças dos fosfolipídios, causando forças intermoleculares (repulsão estérica). Quanto menor o raio do poro, maior a significância deste efeito (NEU; KRASSOWSKA, 1999). Adicionando a energia relacionada a essas forças intermoleculares, W_{inter} , chega-se à equação 2.2 para poros hidrofílicos.

$$W_p(r, V_m) = W_{mec}(r) + W_{el}(r, V_m) + W_{inter}(r) \quad (2.2)$$

Figura 2 – (a) Poros hidrofóbicos são lacunas flutuantes na membrana. (b) Poro hidrofílico permite a passagem de moléculas polares, como a água. (c) Vista do poro hidrofílico no plano central da bicamada lipídica.



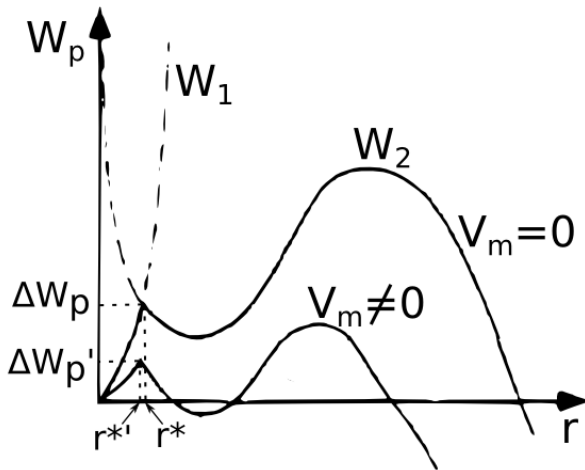
Adaptado de Abidor *et al.* (1979 *apud* Suzuki, 2009) e Weaver e Mintzer (1981 *apud* Suzuki, 2009)

A Figura 3 mostra a relação entre a energia do poro e seu raio. Quando um poro tem energia tal que ultrapassa a barreira ΔW_p , ou seja, quando o raio atinge um valor crítico, r^* , as moléculas de fosfolipídios se rearranjam e o poro passa a ser hidrofílico. em suma, o raio crítico r^* é o raio a partir do qual o poro passa do estado hidrofóbico para o estado hidrofílico, permitindo assim a passagem que moléculas solúveis em água.

Também é possível ver que tanto a barreira ΔW_p quanto o raio crítico r^* diminuem com o aumento de V_m (pela aplicação de um campo elétrico, por exemplo), aumentando a possibilidade da formação de poro hidrofílico (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). A partir deste ponto, qualquer menção à formação de poros se refere à formação de poros hidrofílicos.

Após a formação do poro, seu raio se estabiliza na dimensão de menor energia.

Figura 3 – Energia associada a um poro. W_1 se refere à energia do poro hidrofóbico, W_2 , à energia do poro hidrofílico. Quando a magnitude de V_m aumenta, a barreira de energia ΔW_p e o raio crítico r^* diminuem ($\Delta W_p'$ e $r^{*'}).$



Adaptado de Weaver e Chizmadzhev (1996).

2.3 ARRANJOS EXPERIMENTAIS

As abordagens experimentais da eletroporação podem ser divididas em duas grandes categorias, que serão detalhadas a seguir: eletroporação em suspensões de células (*Bulk electroporation*) e eletroporação de célula única (*Single-cell electroporation – SCEP*) (WANG *et al.*, 2010).

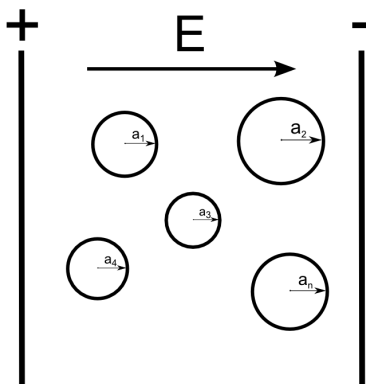
2.3.1 Eletroporação em suspensões de células

Nesta classe de experimentos é realizada a eletroporação de tecidos ou células em suspensão. Para a avaliação dos poros são realizadas medidas da variação da condutância elétrica da suspensão ou da inserção de moléculas fluorescentes ou plasmídeos (SUZUKI *et al.*, 2011) (HARRISON; BYRNE; TUNG, 1998). A montagem experimental mais difundida consiste na aplicação de pulsos de tensão através de eletrodos de placas paralelas, como pode ser visto na Figura 4. Neste tipo de montagem o campo elétrico que atravessa

a solução é praticamente uniforme e, para células esféricas, a tensão induzida na membrana, V_0 , tem solução analítica e é diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado, E , e ao raio da célula, a .

$$V_0 \propto E a$$

Figura 4 – Arranjo experimental tradicional da eletroporação com eletrodos de placas paralelas. O campo elétrico aplicado E é praticamente uniforme e seu efeito em células de dimensões diferentes entre si (a_1, a_2, \dots, a_n) não é o mesmo.



É um arranjo relativamente simples de ser implementado e permite a eletroporação de muitas células simultaneamente. As principais dificuldades encontradas são ligadas ao equipamento para a aplicação de estímulos. Para que o campo elétrico seja suficiente para a eletroporação, tensões da ordem de 50V a 1kV devem ser aplicadas em cuvetas padrão, de acordo com as dimensões da célula. A corrente que o gerador deve fornecer depende da condutividade da solução, e no caso de soluções fisiológicas, pode variar entre alguns mA até algumas dezenas A se aplicado um campo de 450V/cm (KOTNIK; BOBANOVIĆ; MIKLAVČIČ, 1997). Apesar de equipamentos comerciais destinados à eletroporação já existirem, eles dificilmente funcionam em faixas tão extensas de tensão e corrente.

A inconveniência em se utilizar este tipo de experimento no estudo da eletroporação é que, sendo as células na suspensão ou no tecido de tamanhos diferentes, e considerando a relação entre V_0 , E e a , para um mesmo campo elétrico aplicado, o potencial induzido será diferente em cada célula, prejudicando a relação entre a eficiência na realização da eletroporação reversível e

a viabilidade celular. Além disso, os resultados obtidos são uma combinação dos efeitos em cada célula (com suas dimensões e estado particulares) na solução ou no tecido, o que torna difícil a análise do que se passa efetivamente na membrana celular. Uma solução para esse inconveniente é a experimentação em célula única.

2.3.2 Eletroporação de célula única (SCEP)

Diferentemente da eletroporação em suspensões de células, na eletroporação de célula única, ou um campo elétrico não uniforme é focalizado na célula alvo, ou esta é isolada de sua população. A SCEP permite o estudo de uma única célula de tamanho, formato e estado específicos (AGARWAL *et al.*, 2007). Pode-se realizar a SCEP através de microsistemas elétrico-mecânicos (MEMS) ou com técnicas de eletrofisiologia modificadas.

2.3.2.1 *Lab on a chip*

Técnicas de fabricação de circuitos integrados permitem a construção de sistemas para a eletroporação de célula única. A SCEP de células aderentes pode ser realizada em *arrays* de microeletrodos. Cada eletrodo pode ser controlado independentemente, possibilitando a aplicação de estímulos diferenciados em células de uma mesma população. Também é possível realizar medições eletrofisiológicas durante a eletroporação (BRAEKEN *et al.*, 2010) (KOESTER *et al.*, 2010).

Sistemas microfluídicos permitem a SCEP de células em suspensão (ODORIZZI *et al.*, 2011), um diferencial em relação a outras técnicas. Estes dispositivos frequentemente possuem eletrodos construídos próximos a “microarmadilhas”(microporos) colocadas no canal por onde fluem as células em suspensão (VALERO *et al.*, 2007). Apenas uma célula fica presa em uma armadilha.

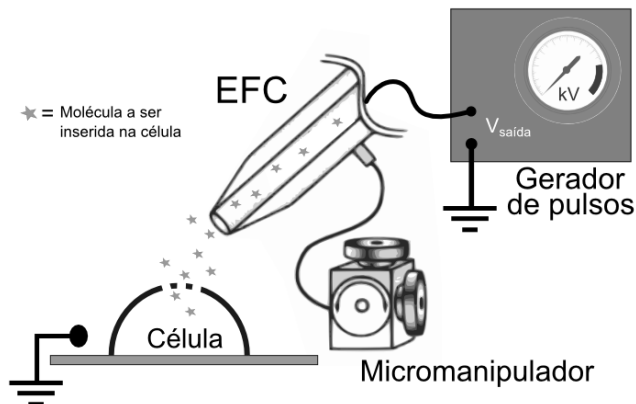
As principais desvantagens desta abordagem são o acesso a uma estrutura que permita a fabricação de dispositivos microeletrônicos e o tempo de produção.

2.3.2.2 Capilar estirado distante da membrana

Uma maneira de se focalizar o campo elétrico em uma célula de interesse é utilizar eletrodos do tipo microcapilares estirados repletos com eletró-

lito (EFC). Estes eletrodos são os mesmos usados na técnica de *patch clamp*, da eletrofisiologia. O arranjo experimental é representado na Figura 5

Figura 5 – Arranjo experimental da eletroporação com EFC posicionado distante da membrana. O gerador fornece pulsos da ordem de 1 kV. A imagem é ilustrativa, não representando as verdadeiras proporções.



Adaptado de Nolkranz *et al.* (2001).

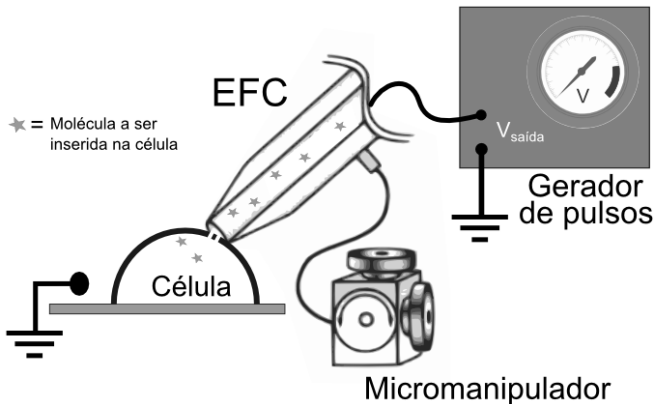
O eletrodo pode ser posicionado a alguns micrômetros da membrana quando o estímulo elétrico é aplicado (NOLKRANTZ *et al.*, 2001), (NOLKRANTZ *et al.*, 2002). Com esta técnica, Agarwal *et al.* (2007) estudaram a influência do tamanho e formato das células na eletroporação. Este tipo de experimento também permite a eletroporação de áreas determinadas em tecidos (OLOFSSON *et al.*, 2007). O pulso aplicado é de 100 a 1000 de volts, mas a corrente não ultrapassa algumas centenas de microamperes, devido à alta impedância dos eletrodos ($R_e \approx 10M\Omega$).

Uma das principais vantagens deste método é a possibilidade de se registrar informação referente ao transiente da formação de poros através de *patch-clamp* de célula inteira (WANG *et al.*, 2010). Entretanto, uma vez que o campo elétrico aplicado não é uniforme, o potencial transmembrana não pode ser calculado analiticamente. Apesar de se poder estimar V_m por métodos numéricos (ZUDANS *et al.*, 2007), como a distância entre o eletrodo e a membrana, d , não é precisamente obtida experimentalmente, torna-se difícil a comparação de dados experimentais com simulações numéricas.

2.3.2.3 Capilar estirado tocando a membrana

Outra opção de arranjo experimental é posicionar o EFC de maneira a que este levemente toque a superfície da membrana, como está ilustrado na Figura 6 (RAE; LEVIS, 2002) (RATHENBERG; NEVIAN; WITZEMANN, 2003). A eletroporação acontece somente na região sob a pipeta, o potencial transmembrana não depende do tamanho e do formato da célula, mas, sim, da impedância da fenda formada entre a ponta do EFC e a membrana, R_f .

Figura 6 – Arranjo experimental da eletroporação com EFC tocando a membrana. A tensão aplicada pelo gerador é da ordem de 10V. A imagem é ilustrativa, não representando as verdadeiras proporções.



Adaptado de Nolkrantz *et al.* (2001).

Esta técnica pode ser utilizada para a inserção de material genético (BOUDES *et al.*, 2008), e na eletroporação de uma única célula *in vivo*, por exemplo, para estudos de morfologia celular (HAAS *et al.*, 2001) (HAAS *et al.*, 2002). O mesmo eletrodo usado para a inserção de moléculas pode ser usado para registros eletrofisiológicos (GRAHAM *et al.*, 2007). O estudo de Barker, Billups e Hamann (2009) aponta que esta técnica associada a ejeção sob pressão com o auxílio de um capilar duplo aumenta a eficiência da inserção de moléculas.

O potencial aplicado no EFC necessário para a eletroporação é da ordem da dezena de Volts, significativamente menor em relação à técnica com o EFC distante. Por isso, os equipamentos para a aplicação do pulso e medição da corrente necessários são mais simples que nos casos anteriormente

descritos.

Posicionar o eletrodo é uma das principais dificuldades dessa técnica. É necessário monitorar a corrente através do eletrodo para colocá-lo corretamente no ponto em que toca levemente a membrana, sem perfurá-la. O posicionamento automático do eletrodo é possível através do controle de sua movimentação com um micromanipulador comandado por computador (BAE; BUTLER, 2006).

Uma limitação importante dos experimentos com EFCs é a necessidade de se trabalhar com células aderentes, ou aderir células no fundo do recipiente do banho.

2.4 MODELO MATEMÁTICO

Smith, Neu e Krassowska (2004) propõem um modelo matemático baseado na energia da membrana. Este modelo permite o cálculo dinâmico, em função de V_m , do número de poros gerados e a evolução dos seus raios, variáveis de interesse para o estudo da entrada de moléculas na membrana. As equações e considerações deste modelo são detalhadas e discutidas no capítulo 3 desta dissertação.

Simulações numéricas da SCEPT baseadas neste modelo foram reportadas (KRASSOWSKA; FILEV, 2007) (SHIL; BIDAYE; VIDYASAGAR, 2008) (TUCCI; SOUZA; PINO, 2010). Apesar de se tratarem de estudos de célula única, eles consideram a célula imersa em um campo elétrico uniforme, o que é mais apropriado a um arranjo experimental da eletroporação em suspensões de células. Isso pode ser um dos motivos pelos quais os cálculos do modelo não se acordam com resultados experimentais.

3 SIMULAÇÕES NUMÉRICAS DA ELETROPORAÇÃO

De acordo com a teoria da eletroporação, todos os poros são inicialmente hidrofóbicos e a maioria deles são rapidamente destruídos devido à flutuação dos lipídeos (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996)(CHEN *et al.*, 2006). Entretanto, caso poros com raio maior que o raio crítico r^* sejam criados, eles, espontaneamente, se tornam hidrofílicos, e existem por mais tempo. Neste trabalho, quando se falar em criação de poros, está-se referenciando à criação de poros hidrofílicos.

A taxa de criação de poros é dada pela equação 3.1 (NEU; KRASSOWSKA, 1999).

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}(V_m)} \right) \quad (3.1)$$

N é a densidade de poros, α é o coeficiente da taxa de criação de poros, V_m é o potencial transmembrana, V_{ep} é o potencial crítico a partir do qual há eletroporação. N_{eq} , dada pela equação 3.2, é a densidade de poros de equilíbrio para um dado V_m .

$$N_{eq} = N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2} \quad (3.2)$$

N_0 é a densidade de poros de equilíbrio para $V_m = 0$, $q = (r_m/r^*)^2$.

Quando poros hidrofílicos se formam, eles expandem imediatamente para o raio de mínima energia, r_m . Assim, considera-se que os poros são criados com raio inicial igual a r_m . A partir deste ponto, os raios dos poros se alteram no sentido de minimizar a energia da bicamada lipídica, W . A equação 3.3 descreve as mudanças de tamanho de cada poro j , de um total de n poros (SMITH; NEU; KRASSOWSKA, 2004). O número total de poros para uma dada região da membrana é dado por $n = N \times A$, onde A é a área analisada da membrana.

$$\frac{dr_j}{dt} = - \frac{D_p}{k_B T} \frac{\partial W}{\partial r_j} \quad j = 1, 2, \dots, n. \quad (3.3)$$

D_p é o coeficiente de difusão para o raio do poro, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

A equação 3.4 representa a energia da bicamada lipídica, W , composta por quatro termos.

$$W = \sum_{j=1}^n \left\{ \beta \left(\frac{r_0}{r_j} \right)^4 + 2\pi^2 r_j \kappa \left(\frac{1}{h} - \psi c_0 \right) - \pi \sigma_{eff} A_p r_j^2 + \int_0^{r_j} F(r_j, V_m) dr \right\} \quad (3.4)$$

A primeira parcela se refere à repulsão estérica das cabeças dos lipídios que formam a membrana, sendo β a constante de energia de repulsão estérica.

A segunda lida com a energia de borda do poro considerando a presença de colesterol na membrana (SHIL; BIDAYE; VIDYASAGAR, 2008). κ é o módulo de flexão da membrana, h , a espessura da membrana, ψ , a fração molar de colesterol na membrana e c_0 , a curvatura espontânea do colesterol.

O terceiro termo representa a tensão efetiva da membrana, σ_{eff} , considerando a influência da área de todos os poros, A_p . São calculadas pelas equações 3.5 e 3.6.

$$A_p = \sum_{j=1}^n \pi r_j^2 \quad (3.5)$$

$$\sigma_{eff} = 2\sigma' - \frac{\sigma' - \sigma_0}{\left(1 - \frac{A_p}{A_t}\right)^2} \quad (3.6)$$

A contribuição de V_m é representada no quarto e último termo, pela força elétrica F . Na equação 3.7, F_{max} é a máxima força elétrica quando $V_m = 1V$, r_h e r_t são constantes.

$$F = \frac{F_{max}}{1 + \frac{r_h}{r_j + r_t}} V_m^2 \quad (3.7)$$

A dinâmica de V_m é calculada a partir das equações 3.8 a 3.11 (SUZUKI *et al.*, 2011).

$$\frac{dV_m}{dt} + \frac{G_m + \frac{C_m}{\tau_0}}{C_m + C_w} V_m = - \frac{V_0}{\tau_0 + \frac{\epsilon_w}{s_i}} \quad (3.8)$$

$$G_m = \sum_{j=1}^n \left(\frac{h}{s_o \pi r_j^2} + \frac{1}{2s_o r_j} \right)^{-1} \quad (3.9)$$

$$C_w = \frac{\epsilon_w}{a \left(1 + \frac{s_i}{2s_o} \right)} \quad (3.10)$$

$$\tau_0 = a C_m \left(\frac{1}{s_i} + \frac{1}{2s_o} \right) \quad (3.11)$$

s_i e s_o são a condutividade das soluções intra e extracelular, respectivamente. G_m , C_m , τ_0 são, respectivamente, a condutância, a capacitância e a constante de tempo da membrana. C_w é uma variável auxiliar de dimensões capacitivas, ϵ_w é a permissividade elétrica da água. a é o raio da célula e h é a espessura da membrana. O valor de V_0 depende do campo aplicado, da geometria da célula e do arranjo experimental analisado.

As equações 3.8 a 3.11 são válidas para uma célula esférica isolada de raio a , com $a \gg h$, sob campo elétrico uniforme.

Nas situações estudadas neste trabalho nas quais o campo elétrico aplicado é não-uniforme (descritas na próxima seção como arranjos experimentais II e III), soluções analíticas não são viáveis, devido às geometrias dos problemas. Métodos numéricos seriam mais apropriados para a resolução destes casos. No entanto, programas atuais de resolução por métodos numéricos (COMSOL, por exemplo) apresentam limitações para o processamento da quantidade de dados necessária para o cálculo da dinâmica da distribuição do campo elétrico, número de poros e raio dos poros. Assim, optou-se pela utilização das equações 3.8 a 3.11, apesar das limitações impostas, de forma a realizar uma avaliação apenas qualitativa da dinâmica dos poros nestes casos.

3.1 METODOLOGIA

Um programa de computador em linguagem C++ foi desenvolvido para a resolução das equações do modelo descrito acima e a simulação dinâmica da formação de poros em uma célula. O modelo foi aplicado a três arranjos experimentais diferentes: campo uniforme (como na eletroporação em massa); campo aplicado por EFC distante; e campo aplicado por EFC tocando a membrana. A integração numérica das equações diferenciais 3.1, 3.3 e 3.8 foi realizada com o método Runge-Kutta de quarta ordem.

Para representar a célula foi adotada geometria esférica, devido a sua

simplicidade matemática e também com o objetivo de comparar os resultados obtidos com os reportados por Krassowska e Filev (2007) e Shil, Bidaye e Vidyasagar (2008). No caso dos experimentos com EFC, nos quais células aderentes são usadas, a célula é modelada como uma semiesfera.

Os valores dos parâmetros utilizados nas simulações e suas definições estão representados na Tabela 1.

Em todas as simulações, no instante de tempo inicial ($t = 0$), a célula é considerada em repouso e todas as variáveis calculadas têm valor zero. O fluxograma do programa desenvolvido se encontra no Apêndice A.

3.1.1 Adaptação da geometria

Adaptar o modelo à geometria consiste em calcular a distribuição do potencial transmembrana induzido para cada tipo de arranjo experimental. Três casos foram analisados: célula sob campo elétrico uniforme, célula sob campo não uniforme aplicado por EFC distante e campo aplicado por EFC tocando a membrana.

3.1.1.1 Arranjo I — Campo uniforme

Nas simulações onde se considera o campo uniforme, o potencial induzido é calculado a partir da equação 3.12, na qual θ é o ângulo entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor posição na membrana (Figura 7 A), f é uma constante dependente da forma esferoidal da célula e g depende das condutividades da membrana, do citoplasma e do meio extracelular e da espessura da membrana (WANG *et al.*, 2010).

$$V_0 = f g E a \cos \theta [1 - \exp(-t/\tau_0)] \quad (3.12)$$

Para uma célula esférica, $f = 1,5$ (WANG *et al.*, 2010), e considerando a membrana totalmente isolante, $g = 1$ (SUZUKI *et al.*, 2011). Como τ_0 é tipicamente menor que $1 \mu\text{s}$ (WANG *et al.*, 2010), significativamente menor que o tempo dos pulsos simulados, considerou-se apenas a solução em regime. Assim a expressão para o cálculo de V_0 é a equação 3.13

$$V_0 = \frac{3}{2} E a \cos \theta \quad (3.13)$$

Devido à simetria esférica, um hemisfério da área superficial foi dividido em quatro regiões, de acordo com a Figura 7 B. Esta divisão da su-

Tabela 1 – Descrição e valores dos parâmetros.

Símbolo	Valor	Descrição
a	$10 \mu\text{m}$	Raio da célula
r^*	$0,51 \text{ nm}$	Raio crítico [†]
r_m	$0,8 \text{ nm}$	Raio de mínima energia [†]
V_{ep}	200 mV	Voltagem limiar da eletroporação [†]
α	$10^9 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Coefficiente de criação de poros [†]
D_p	$5 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$	Coefficiente de difusão para o raio dos poros [†]
k_B	$1,38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$	Constante de Boltzmann
T	310 K	Temperatura
β	$1,4 \times 10^{-19} \text{ J}$	Energia de repulsão estérica [†]
h	7 nm	Espessura da membrana
c_0	$0,9 \times 10^9 \text{ m}^{-1}$	Curvatura espontânea do colesterol [‡]
κ	$2,7 \times 10^{-20}$	Módulo de flexão da membrana [‡]
ψ	$0,2$	Fração molar de colesterol na membrana [‡]
σ	$2 \times 10^{-2} \text{ J/m}^2$	Tensão da interface hidrocarboneto-água [†]
σ_0	10^{-6} J/m^2	Tensão da bicamada sem poros [†]
F_{max}	$7,0 \times 10^{-10} \text{ N/V}^2$	Máxima força elétrica @ $V_m = 1\text{V}$ [†]
r_h	$0,97 \text{ nm}$	Constante para a equação (3.7) [†]
r_t	$0,31 \text{ nm}$	Constante para a equação (3.7) [†]
C_m	10^{-2} Fm^{-2}	Capacitância da membrana [†]
N_0	$1,5 \times 10^9 \text{ m}^{-2}$	Densidade de poros de equilíbrio @ $V_m = 0\text{V}$ [†]
s_i	$0,6 \text{ Sm}^{-1}$	Condutividade intracelular [§]
s_o	$0,23 \text{ Sm}^{-1}$	Condutividade extracelular [§]
ϵ_w	$7,08 \times 10^{-10} \text{ F/m}$	Permissividade da água
d	$4 \mu\text{m}$	Distância entre o EFC e a membrana
R_e	$10 \text{ M}\Omega$	Impedância do eletrodo
R_f	$750 \text{ k}\Omega$	Impedância da fenda

† – (KRASSOWSKA; FILEV, 2007);

‡ – (SHIL; BIDAYE; VIDYASAGAR, 2008);

§ – (KOTNIK; BOBANOVIĆ; MIKLAVČIČ, 1997).

perfcie celular é a mesma utilizada por Shil, Bidaye e Vidyasagar (2008). Desta maneira, os resultados publicados no último puderam ser usados como referêcia para verificar o código implementado para esta dissertação.

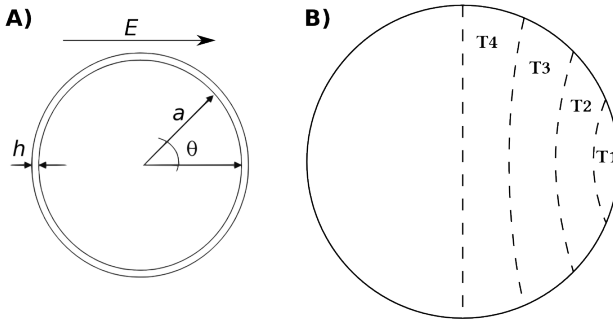
$$T1 — 0 \leq \theta < \frac{\pi}{8}$$

$$T2 — \frac{\pi}{8} \leq \theta < \frac{\pi}{4}$$

$$T3 — \frac{\pi}{4} \leq \theta < \frac{3\pi}{8}$$

$$T4 — \frac{3\pi}{8} \leq \theta < \frac{\pi}{2}$$

Figura 7 – Geometria do experimento de célula sob campo uniforme. Em **A**, a célula esférica de raio a . θ é o ângulo entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor posição na membrana, e h é a espessura da membrana. Em **B**, as quatro regiões do hemisfério celular analisadas nas simulações.



Adaptado de (SUZUKI *et al.*, 2011) e (SHIL; BIDAYE; VIDYASAGAR, 2008).

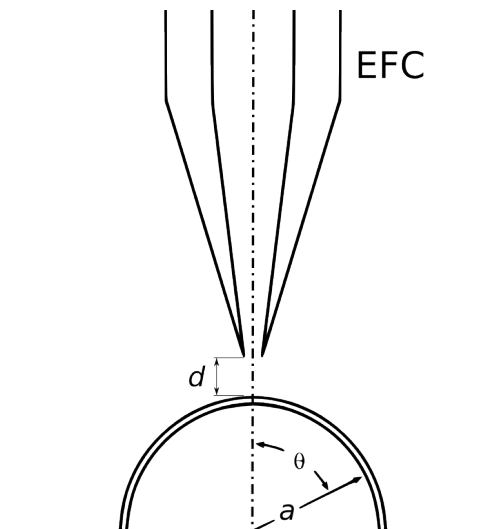
Foram calculados o número de poros criados, o raio médio dos poros, o raio máximo dos poros e a tensão transmembrana induzida em cada região.

3.1.1.2 Arranjo II — EFC distante

Para esta configuração experimental, o microcapilar posicionado a uma distância d da membrana celular é utilizado como eletrodo para a apli-

cação do pulso (Figura 8). O campo aplicado é não uniforme e uma solução analítica para o potencial transmembrana induzido não é evidente. Por método de elementos finitos, Zudans *et al.* (2007) calcularam a distribuição V_0 , e seus resultados foram utilizados na equação 3.8, como entrada no modelo desenvolvido neste trabalho.

Figura 8 – Geometria do experimento com EFC distante da membrana. θ é o ângulo entre o vetor posição na membrana e o eixo de simetria.



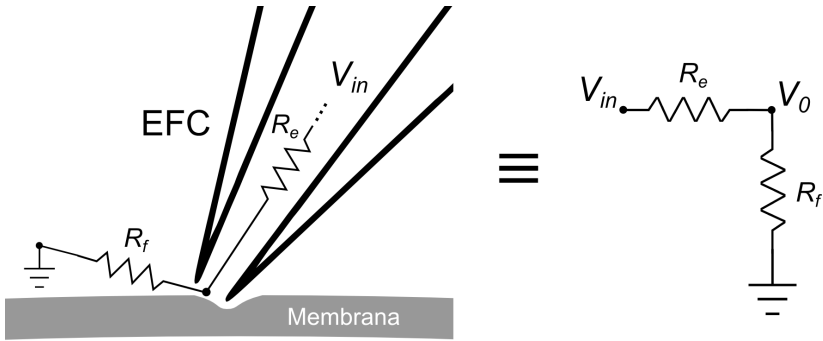
Adaptado de (ZUDANS *et al.*, 2007).

Considera-se que a célula aderida à placa toma uma forma de semi-esfera. Na região $\theta > \pi/4$ a tensão induzida não é suficiente para disparar a abertura de poros, para os pulsos simulados. A área referente à $\theta \leq \pi/4$ foi segmentada a cada 1° ($\pi/180$ rad) e os cálculos de número e tamanho dos poros foram realizados para cada uma das 45 regiões.

3.1.1.3 Arranjo III — EFC tocando a membrana

O terceiro caso é similar ao anterior, diferindo apenas no fato do eletrodo levemente tocar a membrana, deixando uma fenda entre a ponta e a superfície, Figura 9.

Figura 9 – Geometria do experimento com EFC tocando levemente a membrana. Entre a ponta do EFC e a membrana forma-se uma fenda e V_0 é calculado pelo divisor resistivo composto pelo eletrodo e a fenda.



Considerou-se que a abertura de poros somente fosse possível na área sob o EFC, pois em outras regiões da membrana a alteração no potencial transmembrana é desprezível. V_0 é calculado pelo divisor resistivo formado pela resistência do eletrodo, R_e , e a resistência da fenda, R_f , equação 3.14 (BAE; BUTLER, 2006).

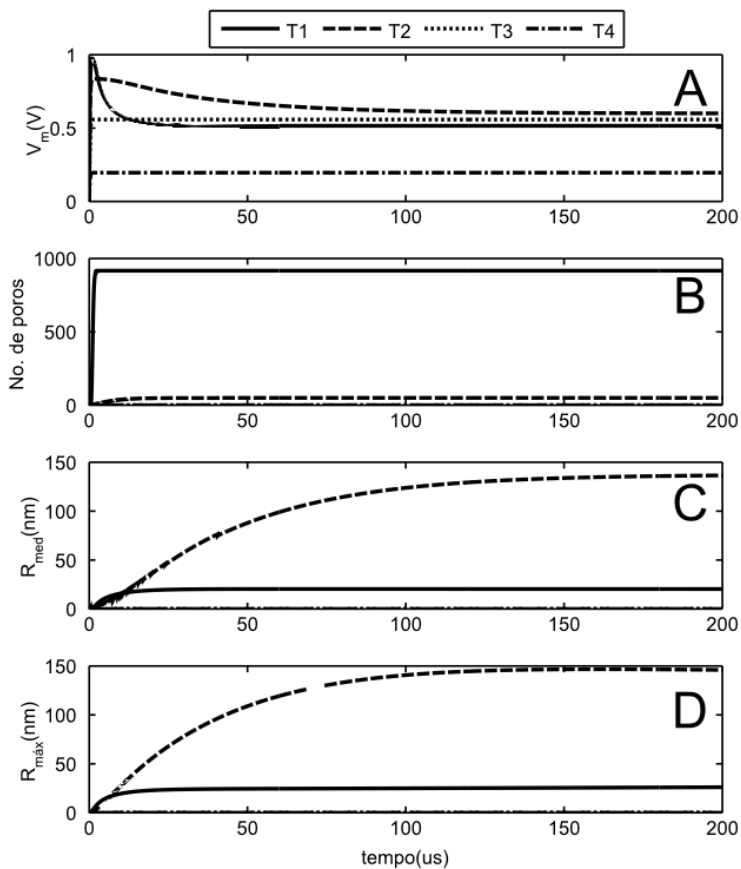
$$V_0 = \frac{R_f}{R_f + R_e} V_{in} \quad (3.14)$$

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 10 mostra os resultados da simulação numérica para o arranjo I. Os gráficos são mostrados até 200 ms, ponto a partir do qual os valores se estabilizam.

Estes resultados são satisfatoriamente similares aos apresentados por Shil, Bidaye e Vidyasagar (2008), o que permite concluir que o programa para cálculo do número de poros e sua dimensão foi corretamente realizado (SHIL; BIDAYE; VIDYASAGAR, 2008). De um modo geral, observa-se que quando V_m é maior que aproximadamente 1 V, o modelo prevê a abertura rápida de uma grande quantidade de poros, da ordem dos milhares, na região analisada. A corrente através da membrana faz diminuir V_m , o que limita o crescimento dos raios dos poros a algumas dezenas de nanômetros. Quando poucos poros

Figura 10 – Resultado da simulação da eletroporação de uma célula sob influência de um campo elétrico uniforme de 670Vcm^{-1} . A) Tensão transmembrana; B) Número de poros criados; C) Raio médio dos poros; D) Raio do maior poro.



são formados, os poros crescem até algumas centenas de nanômetros, Figura 10 B e C.

Os poros devem ser suficientemente grandes para o sucesso do transporte desejado, mas o menor possível para minimizar efeitos indesejáveis da eletroporação, como desequilíbrio iônico, que pode levar à morte celular. No caso da inserção genética, verifica-se que poros de cerca de 10nm possibilitam a passagem de plasmídeos através da membrana (ARKHANGELSKY *et al.*, 2011).

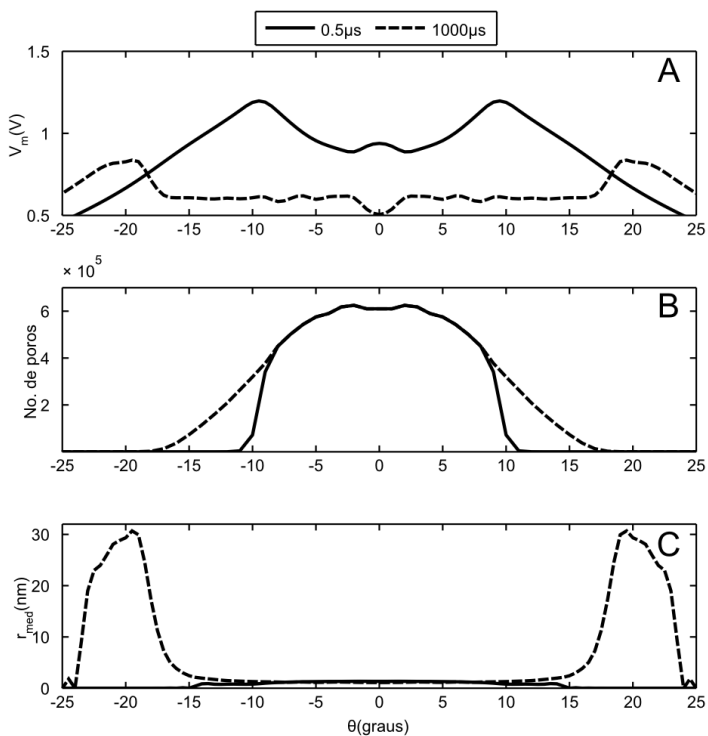
Para o arranjo experimental I, verifica-se a abertura de poros nas regiões T1 e T2, $0 \leq \theta < \pi/4$. Em T1, V_m é maior, e há mais poros em relação à T2. Para um campo elétrico de 670V cm^{-1} (Figura 10 A), em T1 seriam formados, segundo o modelo, 917 poros de cerca de 20nm de raio. Entretanto, em T2, 50 poros de aproximadamente 140nm. Quanto maior o campo aplicado, maior a região onde se observa o aparecimento de poros, mas nas extremidades desta região, sempre há poros maiores. Estes podem ser responsáveis por desequilíbrios iônicos significativos, pois possuem resistência ôhmica, enquanto poros menores apresentam interações entre os íons e as paredes dos poros que dificultam a passagem de corrente (SMITH; NEU; KRASSOWSKA, 2004).

As simulações do arranjo II mostram um comportamento similar, mas com poros sendo criados em uma região mais restrita da membrana. O perfil angular da resposta do número de poros criados e do valor médio dos seus raios para o arranjo é ilustrado na Figura 11. A tensão aplicada é de 2kV durante 1ms.

O arranjo experimental II leva a uma resolução espacial maior em relação ao caso anterior, como pode ser constatado na Figura 11. A criação de poros é observada na região $0 \leq \theta < 23^\circ$. Isso acontece porque o campo elétrico aplicado é não uniforme e focalizado em $\theta = 0$. A característica de uma grande quantidade de poros pequenos e uma pequena quantidade de poros grandes permanece. Para um pulso de 2kV, na área central formam-se centenas de milhares de poros com raio de 1nm rapidamente — em $0,5\mu\text{s}$ o número de poros e suas dimensões já se estabiliza (Figura 11 B e C). Por sua vez, na região de $|\theta| \approx 20^\circ$, ao final do pulso aplicado, são encontrados centenas de poros de 20nm.

Pode-se ver que em $0,5\mu\text{s}$, os poros centrais já atingiram dimensões de regime, e os poros exteriores que atingem raios dez vezes maiores ainda não foram formados. Estes, por serem tão maiores, podem ser responsáveis por desequilíbrios iônicos. Assim, trabalhar com pulsos de duração menor, da ordem de nanossegundos, por exemplo, pode levar a um maior índice de viabilidade celular. Entretanto, equipamentos que possam gerar pulsos de amplitude na ordem dos quilovolts e com duração de nanossegundos são

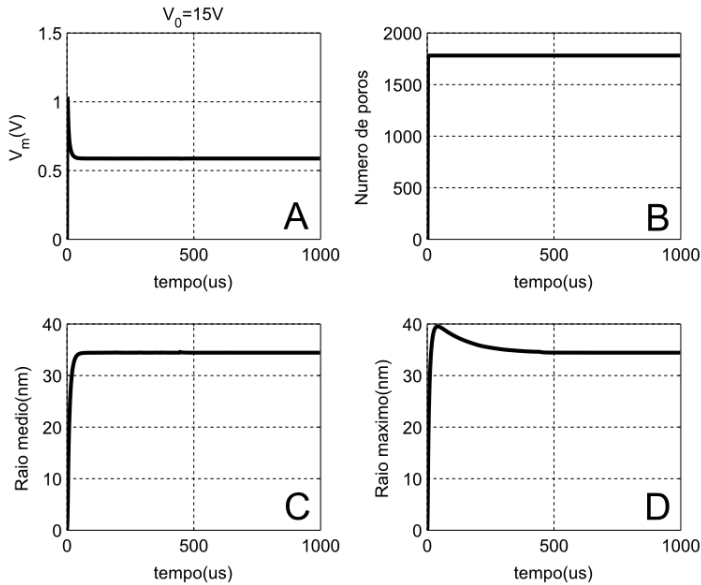
Figura 11 – Perfil angular dos resultados da simulação do arranjo experimental II, com o EFC a $4\ \mu\text{m}$, e para um pulso de 2 kV. A) tensão transmembrana; B) número de poros criados; C) raio médio dos poros. A tensão aplicada no EFC é de 2 kV e são mostradas as curvas nos instantes de tempo de $0,5\ \mu\text{s}$ e 1 ms.



complexos, dificultando a realização desse tipo de experimento.

Resultados da simulação numérica de um experimento com o arranjo III são mostrados na Figura 12. O pulso aplicado tem duração de 1 ms e amplitude igual a 15 V.

Figura 12 – Simulação numérica do arranjo III aplicando-se um pulso de 1ms de duração e amplitude igual a 15 V na extremidade não estirada do EFC. A) tensão transmembrana; B) número de poros criados; C) média dos raios dos poros; D) raio do maior poro. Poros são abertos com a aplicação de um pulso de intensidade duas ordens de grandeza menor que no caso do arranjo experimental II.



O potencial induzido na membrana ultrapassa 1 V e são formados rapidamente milhares de poros de cerca de 35 nm. Verifica-se pelas simulações que, para o arranjo experimental III, pulsos de algumas dezenas de volts são suficientes para que ocorra a abertura de poros. Isso quer dizer que os equipamentos necessários para se ter sucesso na eletroporação de células únicas com o arranjo III são de baixa tensão e conseqüentemente, menos complexos que no caso do arranjo II, que exige um gerador de pulsos de centenas a milhares de volts.

Quanto à adaptação do modelo para este arranjo experimental, faz-se necessário medir fisicamente as impedâncias do EFC e da fenda entre este e a membrana — R_e e R_f , respectivamente — para verificar se podem efetivamente ser consideradas como puramente resistivas. A existência de componentes reativas nestas impedâncias interferiria na dinâmica de formação dos poros.

Alguns resultados indicam que o modelo não responde adequadamente na região limiar da eletroporação, $V_m < 0,7$ V. Para o arranjo I, o modelo não prevê a criação de poros para campos elétricos menores que 450 V cm^{-1} em 1 ms. Isso corresponde a uma tensão transmembrana induzida de 0,67 V em uma célula esférica de raio $10 \mu\text{m}$. Entretanto, Teissié e Rols (1993) relatam uma tensão transmembrana limiar para a eletroporação menor que 0,25 V para uma célula animal.

As quantidades expressas para os arranjos experimentais II e III não são confiáveis, devido a utilização das equações 3.8 a 3.11. Contudo, o modelo não se mostra quantitativamente aceitável mesmo para caso do arranjo experimental I, com campo elétrico uniforme. Isso indica que o modelo ainda deve ser aprimorado para que possa fornecer resultados em acordo com a realidade. A obtenção de dados experimentais da eletroporação de célula única traria informações pertinentes para o desenvolvimento do modelo.

De acordo com as simulações e com a revisão bibliográfica foram definidos pontos importantes quanto à continuidade do trabalho. Verificou-se que a distância entre o eletrodo e a membrana tem importância significativa, uma vez que a abertura de poros seria possível com a aplicação de pulsos da ordem de dezenas de V quando utilizado o arranjo experimental III e da ordem de 100 a 1000 V com o arranjo II. Assim, os equipamentos envolvidos na realização de experimentos com o arranjo III são menos complexos e menos custosos.

Em tal arranjo experimental, para se posicionar adequadamente o eletrodo em relação à membrana, faz-se necessária a medição da impedância da interação entre o eletrodo EFC e a membrana celular. Isto pode ser alcançado com um equipamento que possibilite a leitura da corrente através do eletrodo.

4 DESENVOLVIMENTO DO NANOAMPERÍMETRO

Para avaliar a impedância dos eletrodos e a sua posição em relação à membrana foi desenvolvido um amperímetro. Medir a corrente também permite verificar se o eletrodo está com bolhas, entupido ou quebrado.

Os eletrodos de tipo microcapilar estirado utilizados nos experimentos têm impedância, R_e , da ordem de $10\text{M}\Omega$. O posicionamento ideal do eletrodo é quando a impedância da fenda entre a ponta do eletrodo e a membrana, R_f , é de $750\text{k}\Omega$ (BAE; BUTLER, 2006).

A tensão aplicada no eletrodo (V_{in}) durante a avaliação de sua posição em relação à membrana deve ser tal que não cause a abertura de poros durante a aproximação. Seja o potencial induzido na membrana V_0 dado pelo divisor resistivo formado por R_e e R_f , V_{in} não pode ter amplitude maior que $2,85\text{V}$. Desta forma, garante-se que o potencial transmembrana não atinja o limiar eletroporação, $V_{ep} \simeq 200\text{mV}$ (TEISSIÉ; ROLS, 1993), evitando-se a formação de poros durante o posicionamento do eletrodo.

Assim sendo, enquanto o EFC se aproxima da membrana, a corrente máxima a ser monitorada é de aproximadamente 280nA , e a alteração na corrente relativa à formação da fenda é de cerca de 20nA .

O protocolo mais usado para a inserção de moléculas consiste na aplicação de pulsos de 1ms e de 10V de amplitude. Isso implica medir uma corrente $1\mu\text{A}$ com frequências de pelo menos $\sim 10\text{kHz}$.

O equipamento deve, portanto, medir uma corrente de microamperes e uma variação de dezenas de nanoamperes, exigindo um ganho da ordem de 10^6V/A . Além disso, como o objetivo era medir a impedância da amostra, o circuito não pode introduzir nenhuma distorção de fase, o que impede o uso de filtros analógicos, o que comprometeria a relação sinal/ruído.

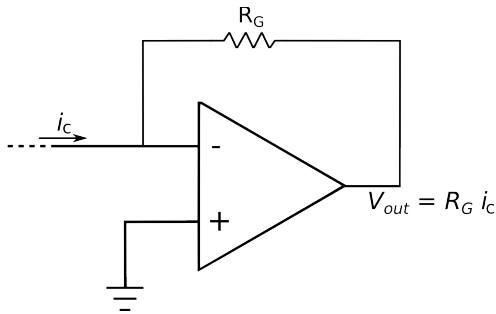
4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Projeto do circuito eletrônico

A primeira abordagem foi projetar um circuito do tipo amplificador de transimpedância. A tensão aplicada (V_{in}) na entrada não inversora de um amplificador operacional é espelhada no terminal inversor e aplicada à carga. A corrente que passa pela carga, i_c , forçosamente também passa pelo resistor de ganho, R_G . Assim, a tensão na saída é dada por $V_{out} = V_{in} + R_G i_c$. Entretanto, com o circuito aberto ($i_c = 0$) media-se uma corrente capacitiva,

provavelmente devido a capacitâncias parasitas nas entradas do amplificador. Com cargas de $10\text{M}\Omega$ este ruído era muito significativo, o que fez com que esse tipo de circuito fosse descartado.

Figura 13 – Esquemático do circuito amplificador de transimpedância com ganho dado pelo resistor de realimentação, R_G . Devido à presença de capacitâncias parasitas, este circuito foi descartado.

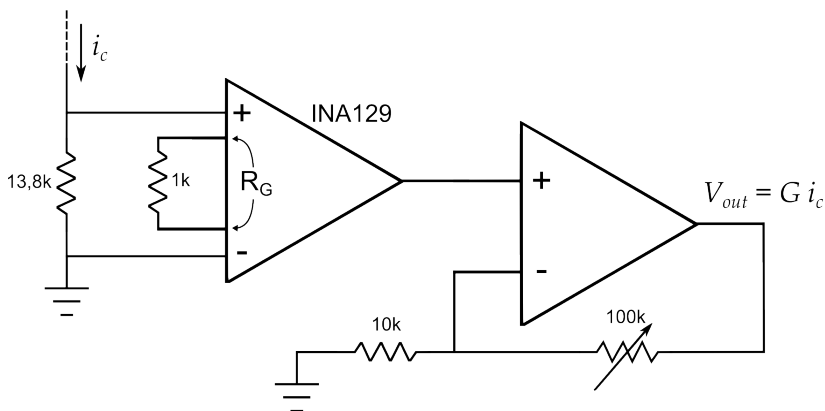


Assim, desenvolveu-se um circuito baseado na medição de corrente através de uma resistência *shunt*. O esquemático pode ser visto na Figura 14. A corrente i_c que passa através do eletrodo EFC também circula pelo *shunt*, dois resistores de $6,9\text{k}\Omega$ de precisão $0,1\%$ em série, totalizando $13,8\text{k}\Omega$. A queda de tensão sobre estes é amplificada por um amplificador de instrumentação INA129 (Texas Instruments, Texas, EUA) com um ganho de $50,4\text{V/V}$. O segundo estágio consiste de um amplificador não inversor com ganho variável entre 1V/V e 11V/V , que permite regular o circuito. O ganho de transimpedância, G , que pode variar entre $0,695\text{V}/\mu\text{A}$ a $7,65\text{V}/\mu\text{A}$ foi ajustado para $G = 5\text{V}/\mu\text{A}$.

4.1.2 Calibração

Para calibrar o equipamento, aplicou-se, com o auxílio de uma fonte de corrente (Hewlett-Packard HP3245A, California, EUA), correntes contínuas (CC) de valores conhecidos, varrendo-se de $-3\mu\text{A}$ a $3\mu\text{A}$, com passo de 50nA . Com um multímetro digital (Fluke 179, Washington, EUA), foi medida a tensão de saída do circuito. Cada medida foi repetida cinco vezes. A curva de calibração foi obtida a partir da regressão linear dos dados obtidos pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 14 – Esquemático do circuito do nanoamperímetro desenvolvido. A corrente a ser medida passa por um resistor de precisão ($13,8\text{k}\Omega$) e a queda de tensão sobre este é amplificada por um amplificador de instrumentação. O segundo estágio permite aumentar e ajustar o ganho total do circuito. Os valores das resistências é dado em Ω .



4.1.3 Resposta em frequência

4.1.3.1 Experimental

A resposta em frequência do equipamento foi avaliada com um gerador de sinais (Minipa MFG-4210A, São Paulo, Brasil), que aplicava um sinal de tensão alternada através de uma resistência de carga de valor nominal de $10\text{M}\Omega$, para limitar a corrente. O sistema foi avaliado com três resistores de carga diferentes, $9,28 \pm 0,12\text{M}\Omega$, $9,41 \pm 0,14\text{M}\Omega$, $9,70 \pm 0,14\text{M}\Omega$, medidos com um multímetro digital (Fluke 179, Washington, EUA). Foram registrados em arquivo os sinais de entrada e saída para frequências de 3Hz a 1MHz com um osciloscópio digital (Tektronix TDS2004C, Oregon, EUA). Para cada frequência, foram realizadas três medidas com cada um dos três resistores de carga, totalizando nove medidas.

4.1.3.2 Tratamento dos dados

Cada arquivo foi processado um *script* escrito em linguagem Matlab (Mathworks, Massachussets, EUA). Este identificava a frequência, a defasagem e as amplitudes dos sinais registrados, e em seguida calculava o ganho de transimpedância de acordo com o valor da resistência de teste.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 15 mostra a curva de calibração obtida e sua equação. O maior desvio de um ponto medido em relação à curva é 0,09%. A regressão linear dos dados leva à curva de calibração, equação 4.1, na qual V_{out} é dado em Volts e i_{in} , em μA .

$$V_{out} = 4,905 i_{in} + 0,097 \quad (4.1)$$

O ganho de transimpedância do sistema em corrente contínua, $G_0 = V_{out}/i_{in}$, é de 4,905 V/ μA e é linear até a saturação do amplificador.

A resposta em frequência do sistema é mostrada na Figura 16. O valor de ganho mostrado é relativo ao ganho de transimpedância em corrente contínua. De CC até 10kHz, o ganho é praticamente constante e não há distorção fase. Para frequências mais altas, não é recomendado o uso do equipamento para a aferição de impedâncias. Dentro da faixa de operação, o maior desvio medido de ganho foi 0,06% em 7Hz, e de fase, 5° em 10kHz.

A limitação no domínio da frequência é devida às características de ganho-frequência dos circuitos integrados amplificadores utilizados. A substituição destes por outros de melhor performance é uma solução caso se deseje aumentar o faixa espectral de funcionamento do circuito.

Com o nanoamperímetro pronto para uso, já é possível montar o arranjo experimental, fabricar os eletrodos EFC e avaliar sua impedância.

Figura 15 – Calibração do nanoamperímetro. Mediana (\times) com valores máximo e mínimo para cada intensidade de corrente medida. O traço contínuo representa a função de calibração do nanoamperímetro obtida pela regressão linear de todos os pontos medidos. Cada ponto foi medido 5 vezes e o maior desvio em relação à curva contínua foi de 0,09%. Na equação, V_{out} é dado em Volts e i_{in} , em μA .

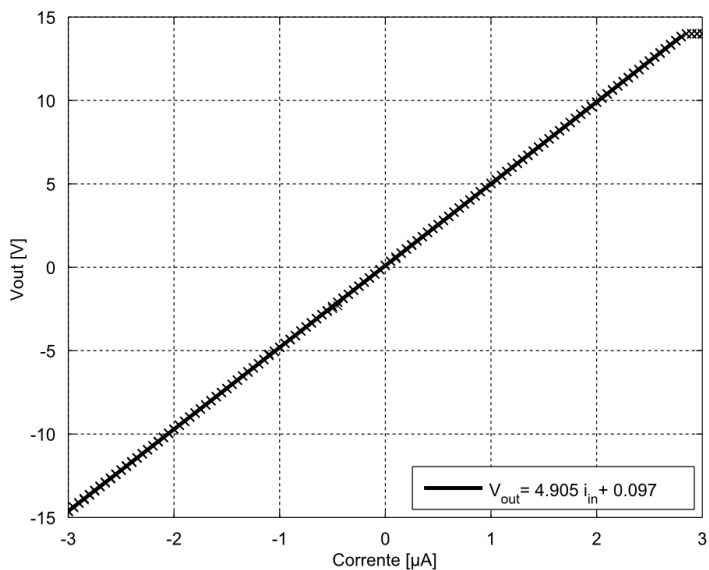
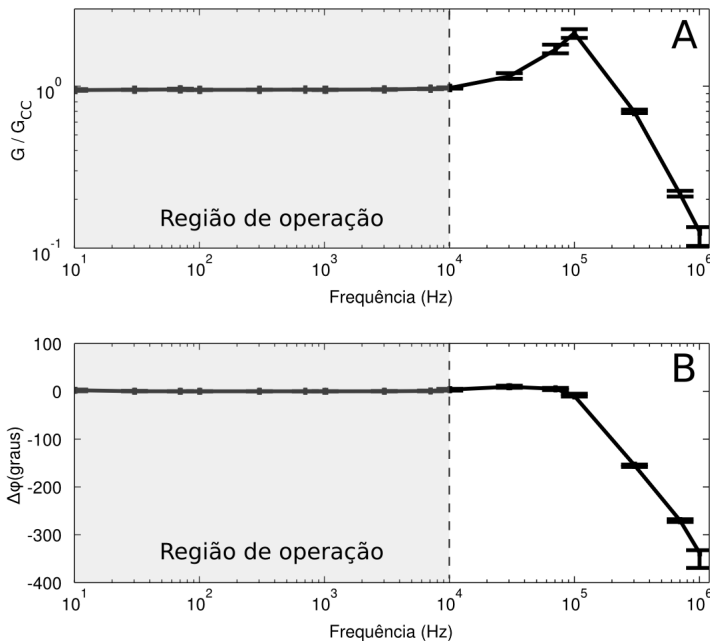


Figura 16 – Resposta em frequência do equipamento desenvolvido. Em **A**, o ganho relativo ao ganho em corrente contínua. Em **B**, a diferença de fase entre os sinais de entrada e saída, $\Delta\phi$. Foram feitas nove medidas para cada frequência. A curva passa pela mediana das medidas de cada frequência e as barras indicam os maiores desvios medidos em relação à mediana. A linha pontilhada em 10kHz demarca o limite de operação do equipamento em frequência. Dentro da faixa de operação, o maior desvio medido de ganho foi 0,06% em 7Hz, e de fase, 5° em 10kHz.



5 ESTUDO DA IMPEDÂNCIA DOS ELETRODOS

A estimação do posicionamento do eletrodo em relação à membrana pode ser feita a partir da medida de impedância da fenda entre os dois. Para se medir esta impedância com o nanoamperímetro desenvolvido, faz-se necessário caracterizar a impedância dos eletrodos utilizados, capilares de vidro estirados repletos com solução condutora. Conhecer as características elétricas dos eletrodos é essencial tanto no desenvolvimento do modelo matemático da eletroporação, como no planejamento dos pulsos de tensão a serem aplicados em experimentos que usam este tipo de arranjo experimental.

5.1 METODOLOGIA

5.1.1 Arranjo experimental

Os sinais senoidais de tensão, gerados por software desenvolvido em LabView (National Instruments, EUA), foram aplicados na extremidade não estirada do capilar, enquanto a outra extremidade foi mergulhada em um banho condutor. Também mergulhado no banho se encontrava outro eletrodo, de retorno, que era conectado à entrada do nanoamperímetro. Os sinais de tensão aplicada e corrente medida foram registrados em um osciloscópio digital (Tektronix TDS2004C, Oregon, EUA). O arranjo experimental está representado na Figura 17.

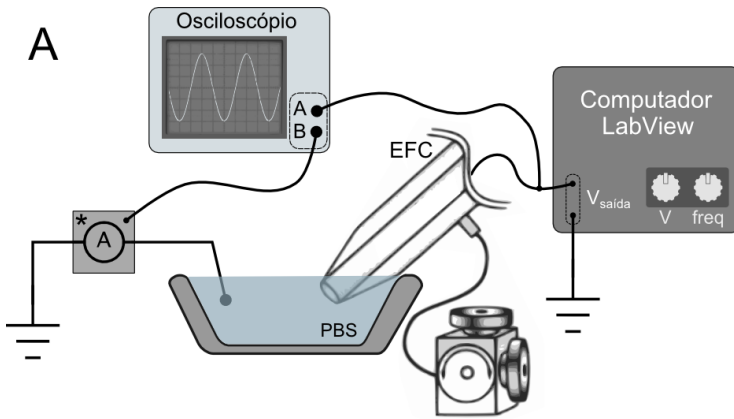
A impedância de quatro eletrodos diferentes foi medida fazendo-se uma varredura em frequências de 10Hz a 10kHz. Para cada frequência a medida foi repetida três vezes. Todas as medições foram realizadas a 24°C.

5.1.2 Fabricação dos eletrodos

Capilares de borossilicato com filamento interno (World Precision Instruments BF120, Florida, EUA) com diâmetro externo de 1,2 mm e diâmetro interno de 0,6 mm foram estirados em um estirador vertical de capilares (Narishige Scientific Instrument Lab. PC-10, Japão).

O eletrodo de retorno consistia em um fio de prata cloretado (Ag/AgCl) por imersão em hipocloreto de sódio por algumas horas. O cloreto de prata (AgCl) funciona como reserva de íons de cloreto em forma sólida na reação reversível $Ag + Cl^- \rightleftharpoons AgCl + e^-$, caso ela persista para a esquerda (LEITE,

Figura 17 – Arranjo experimental para a medição da impedância dos eletrodos. Em **A**, o desenho esquemático do arranjo. O amperímetro representa o circuito desenvolvido descrito na seção 4. Em **B**, uma fotografia do arranjo real montado no laboratório com ampliação da região onde se encontram o EFC, a placa de Petri e o eletrodo de retorno.



1998).

5.1.3 Solução condutora

Tanto no preenchimento do EFC quanto no banho foi usado um tampão fosfato-salino (PBS): 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,4 mM de KH_2PO_4 e 6,7 mM de NaH_2PO_4 . O PBS é usado pois é isotônico e não é tóxico às células, características desejáveis quando tecidos e células forem usados nos experimentos. A condutividade da solução, S_{PBS} , foi medida quatro vezes à temperatura de 24° C com um condutivímetro (Hanna Instruments, HI8733N, Romênia).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As medições da condutividade do PBS utilizado a 24° C podem ser vistas na Tabela 2, acompanhadas de sua média, \bar{S}_{PBS} , e do máximo desvio de medida, ΔS_{PBSmax} . Estes valores devem ser usados no modelo quando da comparação de dados experimentais com simulações numéricas no futuro. Além disso, permitem calcular quanto a impedância do EFC mudaria no caso de se utilizar uma substância diferente para preenchê-lo.

Tabela 2 – Medições de condutividade do PBS, dada em [mS cm^{-1}], média e máximo desvio em relação à média.

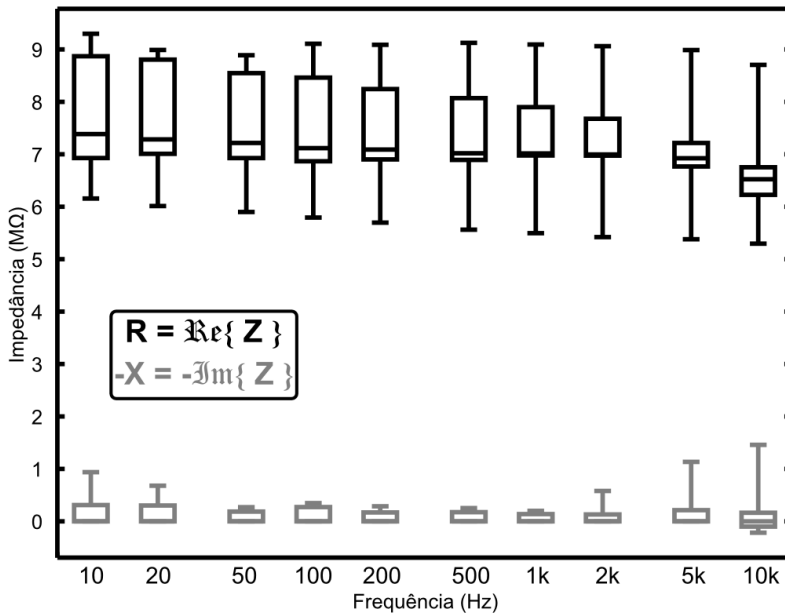
	1	2	3	4	\bar{S}_{PBS}	ΔS_{PBSmax}
S_{PBS}	14,46	14,28	14,36	14,35	14,36	0,68%

A medida da impedância permite avaliar se os eletrodos são apropriados para o uso. Quando no preenchimento do EFC se formaram bolhas, a impedância registrada foi maior, da ordem de 20 a 90 M Ω e efeitos capacitivos começam a ser significativos a partir de aproximadamente 100 Hz. Nos casos em que ocorreu a quebra da ponta, a corrente através do EFC aumentou imediatamente, na maioria das vezes de forma a saturar a leitura de corrente.

Na Figura 18, o diagrama de caixa (*boxplot*) das medidas da impedância (resistência e reatância) de eletrodos intactos e perfeitamente repletos, apropriados para a aplicação de pulsos de eletroporação. Foram realizadas 15 medições usando 5 EFCs diferentes para cada frequência analisada.

Observa-se que, até a frequência limite de operação do nanoamperímetro, 10 kHz, a impedância dos eletrodos EFC produzidos pode ser considerada

Figura 18 – Diagrama de caixa (*boxplot*) da impedância dos eletrodos microcapilares estirados. Em preto, a resistência R , parte real da impedância dos eletrodos; em cinza, o oposto da reatância $-X$, parte imaginária da impedância. Foram realizadas 15 medições usando 5 EFCs diferentes. Para cada frequência medida, a linha dentro da caixa indica a mediana da impedância; os limites verticais da caixa, os primeiro e terceiro quartis; e as barras as medições máxima e mínima. Nota-se que a impedância é praticamente resistiva, entretanto, a partir da frequência 2 kHz, algumas medições da componente reativa foram significantes.



puramente resistiva, com valor médio aproximado de $8\text{ M}\Omega$. Essa constatação está de acordo com as considerações feitas no modelo matemático exposto no capítulo anterior.

É interessante notar que a concentração das medidas da resistência começa a decrescer com o aumento da frequência a partir de 2 kHz . É neste ponto também em que o número de medições que indicam a existência de uma reatância capacitiva começa a aumentar. Isso indica que, para frequências mais elevadas, da ordem de centenas de kHz ou MHz , o modelo do EFC como puramente resistivo possivelmente deva ser revisto. É possível que, nesta faixa de frequências mais elevadas, a reatância devida à capacitância entre os líquidos dentro e fora do eletrodo comece a ser significativa. Caso isso seja comprovado, estudos da eletroporação com pulsos da ordem de nanossegundos deverão levar em consideração essa alteração da impedância com a frequência no projeto dos pulsos a serem aplicados. Medir a impedância dos EFCs diretamente com um analisador de impedâncias com faixa de operação até a ordem de MHz trará respostas quanto ao comportamento reativo dos eletrodos e as possíveis considerações ao se trabalhar com pulsos de nanossegundos.

Uma vez conhecidas as características elétricas dos eletrodos, antes de efetivamente aplicar pulsos de eletroporação faz-se necessário identificar o bom posicionamento do eletrodo em relação à membrana da célula alvo.

6 POSICIONAMENTO DO ELETRODO EM RELAÇÃO À MEMBRANA

Conhecidas as impedâncias dos capilares estirados, para a realização da eletroporação com EFC tocando a célula, faz-se necessário verificar se, com o arranjo experimental implementado, é possível identificar quando o posicionamento do eletrodo em relação à membrana celular é apropriado para a aplicação dos estímulos de eletroporação.

Os ensaios foram realizados com hemácias aderidas a lamínulas tratadas com polilisina (HATEGAN *et al.*, 2003) (SEN; SUBRAMANIAN; DISCHER, 2005); amostras de tecido muscular de ratos; e células da linhagem A172, células tumorais da glia.

Células da glia constituem cerca de 50% do cérebro humano. Têm participação na regulação da conectividade sináptica durante o desenvolvimento pós-natal (GE *et al.*, 2012) e na migração de neurônios (YOKOTA *et al.*, 2010). Alterações em células gliais são suficientes para causar defeitos migratórios e malformações encefálicas (CAPPELLO *et al.*, 2012), e defeitos na geração de células da glia estão associadas a doenças neurológicas severas, como tumores cerebrais.

A inserção de moléculas em células da glia e neurônios é uma ferramenta útil para a compreensão dos mecanismos da migração dos neurônios na formação do córtex, permitindo a análise da morfologia dessas células e da expressão de genes introduzidos. Além disso, a terapia genética é uma estratégia promissora para o tratamento de tumores da glia (glioblastomas) (KIM *et al.*, 2011). Nesse tipo de terapia, genes são introduzidos nas células para o tratamento de doenças e uma maneira eficiente de realizar essa transferência é através da eletroporação.

Os animais usados nos experimentos são referenciados ao protocolo **0398** na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA–UFSC).

6.1 METODOLOGIA

6.1.1 Culturas de células

6.1.1.1 Lamínulas com polilisina

Em lamínulas de microscópio foram colocados 10 μ l de solução de polilisina a concentração de 0,06 g l^{-1} . A região onde foi depositada polili-

sina foi marcada com tinta insolúvel em água. As lamínulas foram colocadas em estufa a 37° C para secagem por uma hora. Em seguida foram lavadas com água deionizada durante 5 minutos em agitador orbital por três vezes e secaram à temperatura ambiente.

6.1.1.2 Hemácias

Sangue de ratos Wistar adultos (50 – 55 dias de idade) foi coletado em *eppendorfs* contendo heparina. Os recipientes foram centrifugados por oito minutos a uma força de 4722g. As hemácias se depositavam no fundo, e o soro, que se encontrava na superfície, foi retirado com uma pipeta e descartado. Então, por três vezes foi repetido o procedimento a seguir. Adicionou-se 1 ml de PBS ao sangue e homogeneizou-se suavemente. O solução foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Por fim, PBS em volume igual ao de hemácias no *eppendorf* foi adicionado, resultando em uma solução de hemácias a 50%. Enquanto não era usada, a solução foi deixada no agitador a baixa rotação, para evitar a coagulação do sangue.

10 μ l da solução de hemácias foram colocados sobre a região com polilisina de uma das lamínulas preparadas anteriormente. Após repouso de cinco minutos, as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS (cada lavagem com duração de cinco minutos).

6.1.1.3 A172

Células da linhagem A172 (glioblastoma) foram centrifugadas e suspensas novamente em um meio DMEM–F12 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), pH 7,4, colocadas em garrafas de cultura de 25 cm² e mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37° C. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular (~ 90%). Então as células foram passadas para placas de Petri. Para isso, as culturas foram lavadas com PBS-EDTA (PBS acrescido de 2 mM de EDTA) com pH 7,4 e destacadas dos frascos de cultura com solução 0,2% de tripsina, lavadas novamente com PBS, centrifugadas e recolocadas em placas com 1×10^4 células por placa.

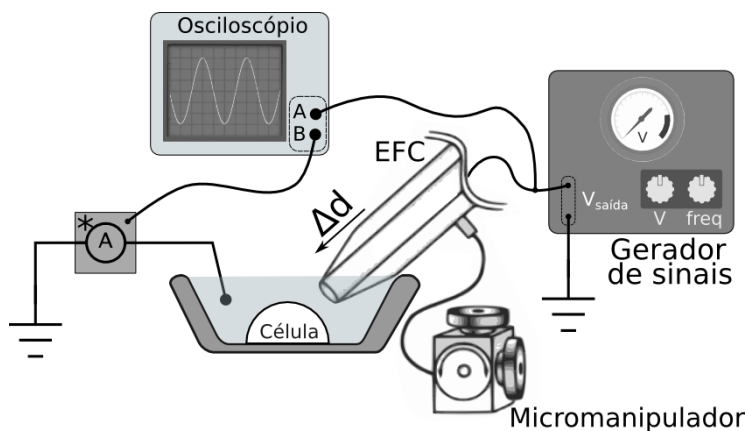
6.1.2 Tecido muscular

O músculo do sólio de ratos Wistar adultos (50 – 55 dias de idade) recém-sacrificados foi retirado e imediatamente colocado em PBS. O tecido foi fixado em uma placa de Petri e permaneceu em banho de PBS durante as medições. A aproximação do eletrodo se deu em orientação perpendicular às fibras.

6.1.3 Medida de impedância

As medidas de impedância foram realizadas de maneira similar à descrita na seção 5.1.1. Um sinal senoidal de tensão ($3V_{pp}$, 1 kHz) era constantemente aplicado por um gerador de sinais (Goldstar, FG-2002C, Coréia do Sul) ao EFC, que era deslocado progressivamente em direção à membrana ou ao tecido com o auxílio de um micromanipulador manual (Narishige, WR-6, Japão), Figura 19. A cada passo de deslocamento do eletrodo, registrava-se a tensão aplicada e a corrente através do eletrodo e a posição indicada pela escala da unidade de controle do manipulador. As medições de impedância foram realizadas a temperatura ambiente ($\sim 24^{\circ}C$).

Figura 19 – Arranjo experimental para a medição da medição da posição do eletrodo em relação à membrana.



6.1.4 Tratamento dos dados

A partir das medições de tensão e corrente, calculou-se a impedância total do sistema Z_{total} . A primeira medição, realizada com o eletrodo visivelmente distante da membrana, se refere à impedância do eletrodo, Z_e . Esta, subtraída da impedância das medidas seguintes resulta na impedância da fenda $Z_f = Z_{total} - Z_e$. Δd é a distância do eletrodo em relação a sua posição inicial e as curvas de aproximação são Z_f por Δd .

As diferentes curvas de aproximação não possuem referência absoluta, e a amostragem não é regular. Para compará-las, os dados foram interpolados à “taxa de amostragem” constante. As curvas interpoladas foram alinhadas pelo deslocamento entre si na direção do eixo Δd . Para permitir um alinhamento fino entre as curvas, elas foram interpoladas a 100 pontos por μm nos experimentos com culturas de células, e a 1 ponto por μm nos experimentos com tecidos, o que faz com que os resultados pareçam contínuos quando mostrados em gráficos. Considerou-se que o comportamento da alteração da impedância seria similar em diferentes aproximações independentes. Portanto, as curvas estariam alinhadas quando o erro a soma dos erros quadráticos ponto a ponto fosse mínimo. Uma vez alinhadas as curvas, elas são extrapoladas, para que todos os pontos tenham correspondência e então são calculados a média e o desvio padrão ponto a ponto.

Para o processamento de dados foi utilizado o programa *Matlab* (Mathworks, Massachussets, EUA).

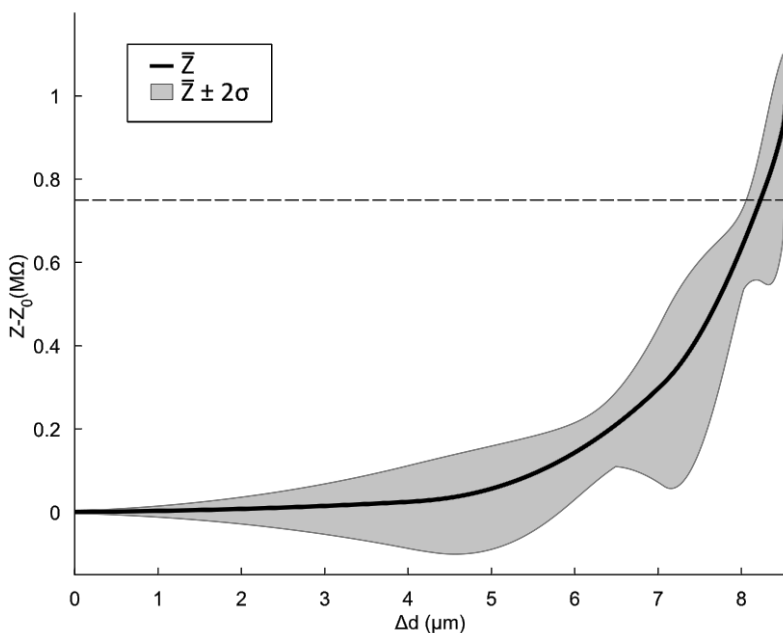
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As hemácias aderiram às lamínulas e, mesmo mergulhadas em PBS e transportadas, permaneceram coladas por pelo menos 24 horas. Isso mostra que o tratamento das lamínulas com a polilisina foi realizado com sucesso. Entretanto, durante os experimentos, quando o EFC se aproximava da membrana, as células se desviavam deste. Com a retirada do eletrodo, as células retornavam à sua posição original. Assim, não foi possível medir alteração na impedância quando da aproximação entre o eletrodo e a membrana.

As células da linhagem A172 têm dimensões na ordem de dezenas de micrômetros, consideravelmente maiores que as hemácias. Além disso, são células aderentes, ou seja, a cultura cresce aderida ao fundo da placa de Petri, tornando desnecessária a preparação da superfície com polilisina. A Figura 20 mostra a alteração na impedância da fenda medida de acordo com a aproximação entre a pipeta e a membrana. Foram registradas medidas da impedância relativas a três movimentos de aproximação independentes. A

impedância dos eletrodos variou entre 6 e 10 M Ω .

Figura 20 – Variação da impedância da fenda ($Z - Z_0$) com a aproximação entre a ponta do EFC e a membrana de célula da linhagem A172. Z_0 é a impedância do EFC, medida quando a ponta deste se encontrava distante da célula. Δd é a distância percorrida pelo EFC em direção à célula. Foram registradas 3 curvas de aproximação. O traço é a média das medidas e a área colorida em cinza corresponde a duas vezes o desvio padrão, $\pm 2\sigma$. A linha pontilhada indica o limiar de 750 k Ω , segundo Bae e Butler (2006), o ponto ideal para a aplicação dos pulsos de eletroporação.



A impedância medida praticamente não sofre alterações até que a ponta do eletrodo toque a membrana. Neste ponto, forma-se a fenda entre a ponta do EFC e a membrana, e a impedância medida cresce exponencialmente. Como descrito no capítulo 3, para este arranjo experimental, considera-se que o eletrodo está adequadamente posicionado tocando a membrana quando a impedância da fenda atinge o valor de 750 k Ω (BAE; BUTLER, 2006). Nota-se que o deslocamento do eletrodo é de apenas algumas unidades de micrômetro ($\sim 4 \mu\text{m}$) para passar de um ponto onde não se

mede alteração de impedância ao posicionamento adequado. O deslocamento deve ser realizado com cuidado, para evitar a perfuração da membrana.

Os experimentos da eletroporação de células isoladas têm como principal objetivo obter informações sobre os poros na membrana, para o desenvolvimento de modelos matemáticos, por exemplo. Nas aplicações práticas do fenômeno, em tratamentos médicos ou pesquisas, o interesse está voltado para a eletroporação de tecidos *in vivo*.

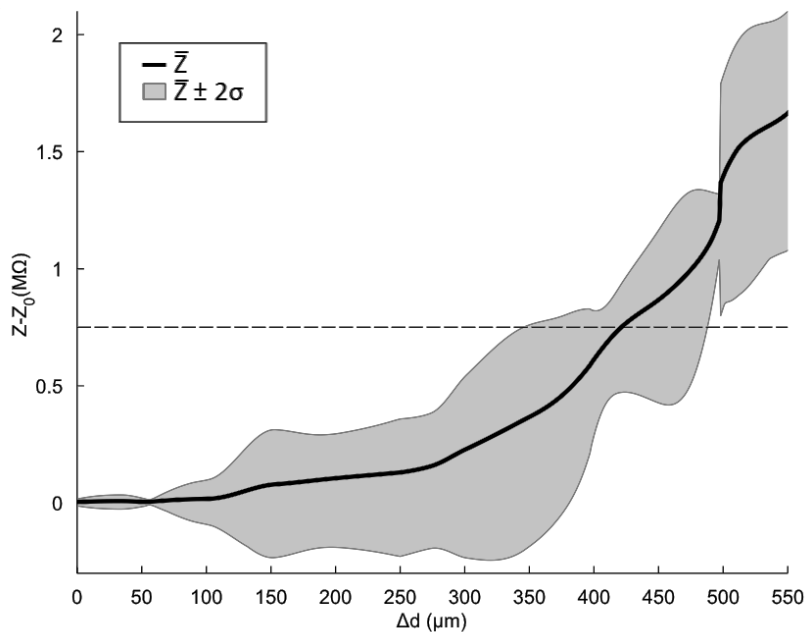
Para verificar a aproximação entre EFC e tecido, foram realizados ensaios com tecido muscular. A amostra de músculo foi posicionada com as fibras na horizontal, enquanto o eletrodo se aproximava perpendicularmente às fibras. As mudanças de impedância medidas em três aproximações independentes são mostradas na Figura 21.

O aumento da impedância com a aproximação do eletrodo também apresenta uma forma exponencial, contudo de maneira menos sensível que no caso anterior. Nos experimentos com culturas de células, a impedância da fenda atinge o limiar de 750 k Ω com um movimento de algumas unidades de micrômetros. Por sua vez, quando a amostra é um tecido muscular, o limiar para a aplicação de pulsos de eletroporação é atingido após um deslocamento do EFC da ordem de centenas de micrômetros.

As células no tecido que entram em contato com o eletrodo estão fixadas em outras células e na matriz celular, o que faz com que o EFC encontre uma amostra mais complacente que uma célula aderida a um substrato rígido. Isso está de acordo com o fato do deslocamento do eletrodo para se atingir o posicionamento adequado ser maior quando a amostra é um tecido, mas talvez não explique por que essa diferença é de cerca de duas ordens de grandeza.

A distância percorrida pelo eletrodo até que a impedância da fenda atinja o limiar é algumas dezenas de vezes maior que as dimensões de uma célula muscular. Assim, não se pode afirmar que este seja o ponto em que o eletrodo toca levemente a membrana de uma célula superficial da amostra. Isso indica que este critério de posicionamento do eletrodo em relação à amostra deve ser revisto. Uma maneira de fazê-lo seria comparar a eficiência na introdução de moléculas e a viabilidade celular para diferentes distâncias entre o eletrodo e a célula ou tecido.

Figura 21 – Variação da impedância da fenda ($Z - Z_0$) com a aproximação entre a ponta do EFC e o tecido muscular. Z_0 é a impedância do EFC, medida quando a ponta deste se encontrava distante da célula. Δd é a distância percorrida pelo EFC em direção à célula. Foram registradas 3 curvas de aproximação. O traço é a média das medidas e a área colorida em cinza corresponde a duas vezes o desvio padrão, $\pm 2\sigma$. A linha pontilhada indica o limiar de $750\text{k}\Omega$, segundo Bae e Butler (2006), o ponto ideal para a aplicação dos pulsos de eletroporação.



7 DISCUSSÃO

7.1 DAS SIMULAÇÕES NUMÉRICAS

Os resultados das simulações numéricas mostram que o modelo estudado não representa quantitativamente a realidade para que possa ser usado como referência para estudos da dinâmica dos poros na membrana celular. Ter como base um sistema de energia da membrana parece ser um caminho concreto para descrever o fenômeno matematicamente, uma vez que o modelo tem bases físicas bem definidas, além de permitir a estimação do número e raio dos poros criados. Estas são as grandezas de interesse direto quando o objetivo é inserir moléculas de tamanho conhecido nas células. Contudo, esta abordagem ainda deve ser investigada mais profundamente de forma a fornecer resultados confiáveis no cálculo desses parâmetros.

As medições de impedância descritas no capítulo 5 mostram que, pelo menos até a frequência de 10kHz, os eletrodos podem ser considerados puramente resistivos, de acordo com a suposição feita nos modelos matemáticos. Entretanto, as curvas indicam que a resistência elétrica dos eletrodos diminui com o aumento da frequência. No caso de se trabalhar com pulsos de mili ou microssegundos, este decréscimo pode ser ignorado. Porém, em estudos da eletroporação com pulsos de nanossegundos, a redução da impedância do EFC em altas frequências pode ser significativa para o cálculo da tensão transmembrana induzida e, conseqüentemente, na estimação do número e dimensão dos poros.

O melhoramento do modelo está intimamente ligado à obtenção de dados experimentais da eletroporação de célula única em geometria rigidamente definida e condições elétricas controladas. Isso pode ser alcançado com microsistemas construídos com técnicas de microeletrônica, como MEMS, sistemas microfluídicos, sistemas do tipo *Lab-on-a-chip*, ou com experimentos com EFCs.

Além disso, para se realizar simulações que permitam análises quantitativas da eletroporação para os casos nos quais a membrana é submetida o campo elétrico não-uniforme, é preciso encontrar uma solução para o cálculo dinâmico do potencial transmembrana. O método do circuito equivalente proposto por Ramos (2003) pode ser uma alternativa para solucionar este problema.

7.2 DOS EXPERIMENTOS

As hemácias são células cuja obtenção é relativamente simples para trabalhos frequentes, motivo pelo qual foram escolhidas para ensaios iniciais. O fato de não serem aderentes foi resolvido com a utilização de lamínulas tratadas com polilisina. Algumas dificuldades encontradas fizeram com que a utilização de hemácias fosse abandonada: hemácias são células pequenas ($a \simeq 3\mu\text{m}$), o que dificulta o posicionamento do EFC; e, principalmente, o fato de a célula ser repelida pela ponta do microeletrodo. Primeiramente, como as medidas de impedância estavam sendo realizadas com um sinal de tensão contínua (CC), suspeitou-se que as membranas eram repelidas por força eletrostática. Contudo, o efeito se repetiu mesmo com a aplicação de sinais de tensão contínua de polaridade inversa e de tensão alternada senoidal, ou mesmo sem aplicação de sinal algum, derrubando essa hipótese.

A causa da repulsão não foi encontrada, mas pode estar relacionada a forças devidas a cargas estáticas nas paredes no microcapilar, ou à pressão hidrostática do eletrólito dentro do capilar que forçaria líquido para fora. Caso este último inconveniente consiga ser contornado — o que é possível, uma vez que se pratica *patch clamp* em hemácias (DESAI; BEZRUKOV; ZIMMERBERG, 2000) —, hemácias poderão ser utilizadas em experimentos futuros. A repulsão também foi observada quando trabalhando com células da linhagem A172. Mas, como elas são maiores que as hemácias e são naturalmente aderentes, o efeito não impediu o posicionamento adequado do eletrodo.

No caso dos experimentos com tecidos, a maior dificuldade encontrada era a visualização. A espessura da amostra impedia a visualização do eletrodo pelo microscópio. Como o eletrodo não deve se deslocar mais que alguns micrômetros por segundo, para evitar o rompimento da membrana, o registro manual da impedância durante a aproximação do EFC se torna uma tarefa fatigante. A visibilidade é um problema evidente na eletroporação *in vivo* usando EFCs. A utilização de um estereomicroscópio pode ser uma solução para o problema de visualização da amostra e do eletrodo, mas exige a adaptação de suportes para o micromanipulador.

Outra opção é fazer o posicionamento do eletrodo de maneira automatizada, como proposto por Bae e Butler (2006) ou Sakaki *et al.* (2009). Deste modo, o posicionamento do eletrodo é feito mais precisa, eficiente e rapidamente quando comparado com o método manual, tanto em experimentos com tecidos como em experimentos com culturas celulares. Contudo, o desenvolvimento de sistemas desse tipo depende de um micromanipulador motorizado, que possa ser controlado por computador.

Independentemente das melhorias que ainda podem ser implementadas, o sistema tal como ele está já propicia um ambiente adequado para a apli-

cação de pulsos de eletroporação em culturas celulares e conseqüentemente a realização de uma série de estudos. Algumas proposições estão descritas no capítulo 9, o último desta dissertação.

8 CONCLUSÕES

O modelo de Smith, Neu e Krassowska (2004) foi adaptado para arranjos experimentais de eletroporação de célula isolada onde EFCs são utilizados como eletrodos. Os resultados das simulações numéricas indicam que o modelo pode servir como estimar qualitativamente a abertura de poros. Foi verificado que, ao contrário do que se espera à primeira vista, pulsos de maior amplitude resultam em poros menores, mas em grande quantidade. Para algumas situações, os resultados da simulação não são condizentes com relatos de experimentos reais, sobretudo na faixa de $V_m < 0,7V$. Uma melhor avaliação da confiabilidade das quantidades calculadas por este modelo deve ser feita através da comparação com resultados experimentais. Os resultados das simulações numéricas e a revisão bibliográfica ajudaram a delinear os experimentos.

Foi preparado um arranjo físico para a realização de experimentos de eletroporação de célula única com eletrodos do tipo EFC, que inclui o desenvolvimento de um nanoamperímetro. Este arranjo permitiu a obtenção de informação sobre as características elétricas dos eletrodos de tipo EFC produzidos no laboratório, como praticamente resistivos até uma frequência de 10kHz. Possibilitou também a identificação do posicionamento da ponta do capilar em relação à membrana celular a partir de medidas da variação de impedância. Verificou-se que, em experimentos com células isoladas, um deslocamento de alguns micrômetros (a partir do ponto em que o EFC toca a membrana) faz com que a impedância da fenda entre o eletrodo e a membrana atinja o limiar sugerido por Bae e Butler (2006) como o posicionamento ideal para a aplicação de pulsos de eletroporação. Em tecidos, esse limiar é atingido após um deslocamento de centenas de micrômetros, sugerindo uma revisão do critério de posicionamento ideal do eletrodo.

O arranjo está preparado para a eletroporação de culturas celulares aderidas em placas ou lamínulas, mas também permite a experimentação em tecidos mediante algumas adaptações. Os resultados obtidos preparam o terreno para estudos sobre o transporte de moléculas através da membrana. Algumas sugestões para trabalhos a serem desenvolvidos futuramente estão descritos no capítulo seguinte.

Este trabalho gerou a publicação de dois artigos em anais de congressos (CHIEA; SUZUKI; MARQUES, 2012a) (CHIEA; SUZUKI; MARQUES, 2012b).

9 TRABALHOS FUTUROS

Uma série de estudos podem ser realizados a partir do que foi desenvolvido neste trabalho. Algumas propostas estão brevemente descritas abaixo.

- Verificar a inserção de diferentes moléculas fluorescentes de dimensões conhecidas para se estimar o tamanho dos poros criados, acompanhado de propostas de ajustes nos modelos baseadas nos resultados experimentais;
- Avaliar a eficiência na introdução de marcadores ou genes e a viabilidade celular de acordo com o tipo de estímulo elétrico aplicado e o arranjo experimental utilizado, de forma a se estabelecer um comparação formal entre as diferentes técnicas e encontrar um protocolo (forma de onda, duração, intensidade, entre outros parâmetros) ótimo para alcançar determinado objetivo – por exemplo, a inserção da molécula X de diâmetro \varnothing_x , evitando a entrada na célula da molécula Y, de diâmetro \varnothing_y . Esses estudos de eficiência também serviriam para o estabelecimento de critérios mais concretos para o posicionamento adequado dos eletrodos para a aplicação dos pulsos de eletroporação;
- Realizar estudos sobre a terapia genética no tratamento de glioblastomas através de inserção genética em células da linhagem A172.
- Estudar a influência de efeitos dispersivos em arranjos experimentais com EFCs. Recentemente foi mostrado por Ramos *et al.* (2012) que esses efeitos são significativos em experimentos com suspensões de células, e que segundo a forma de onda do estímulo elétrico aplicado os resultados obtidos podem não representar exatamente a eletroporação;
- Projetar um experimento para a medição da corrente de eletroporação em célula única, utilizando-se de *patch-clamp* de célula inteira, por exemplo, que traria informações sobre o transiente dos poros em célula única, realimentando o desenvolvimento de modelos matemáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; ZUDANS, I.; WEBER, E.; OLOFSSON, J.; ORWAR, O.; WEBER, S. Effect of cell size and shape on single-cell electroporation. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 79, n. 10, p. 3589–3596, 2007.

ARKHANGELSKY, E.; SEFI, Y.; HAJAJ, B.; ROTHENBERG, G.; GITIS, V. Kinetics and mechanism of plasmid dna penetration through nanopores. *Journal of Membrane Science*, Elsevier, v. 371, n. 1, p. 45–51, 2011.

BAE, C.; BUTLER, P. Automated single-cell electroporation. *BioTechniques*, NIH Public Access, v. 41, n. 4, p. 399 – 402, 2006.

BARKER, M.; BILLUPS, B.; HAMANN, M. Focal macromolecule delivery in neuronal tissue using simultaneous pressure ejection and local electroporation. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 177, n. 2, p. 273–284, 2009.

BOUDES, M.; PIERAUT, S.; VALMIER, J.; CARROLL, P.; SCAMPS, F. Single-cell electroporation of adult sensory neurons for gene screening with rna interference mechanism. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 170, n. 2, p. 204–211, 2008.

BRAEKEN, D.; HUYS, R.; LOO, J.; BARTIC, C.; BORGHS, G.; CALLEWAERT, G.; EBERLE, W. Localized electrical stimulation of in vitro neurons using an array of sub-cellular sized electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 1474–1477, 2010.

CAPPELLO, S.; BÖHRINGER, C. R.; BERGAMI, M.; CONZELMANN, K.-K.; GHANEM, A.; TOMASSY, G. S.; ARLOTTA, P.; MAINARDI, M.; ALLEGRA, M.; CALEO, M. *et al.* A radial glia-specific role of rhoa in double cortex formation. *Neuron*, Elsevier, v. 73, n. 5, p. 911–924, 2012.

CHEN, C.; SMYE, S.; ROBINSON, M.; EVANS, J. Membrane electroporation theories: a review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, Springer, v. 44, n. 1, p. 5–14, 2006.

CHIEA, R.; SUZUKI, D.; MARQUES, J. Numerical simulation of single-cell electroporation with an electrolyte filled capillary experimental set-up. *34th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, p. 207–210, 2012.

CHIEA, R.; SUZUKI, D.; MARQUES, J. Simulações numéricas de arranjos experimentais da eletroporação em células biológicas. *XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – Porto de Galinhas/PE*, p. 351–354, 2012.

COOPER, G. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, 2000.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9928/>>.

DESAI, S. A.; BEZRUKOV, S. M.; ZIMMERBERG, J. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 406, n. 6799, p. 1001–1005, 2000.

GE, W.-P.; MIYAWAKI, A.; GAGE, F. H.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 484, n. 7394, p. 376–380, 2012.

GOLBERG, A.; BELKIN, M.; RUBINSKY, B. Irreversible electroporation for microbial control of drugs in solution. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 3, 2009.

GRAHAM, L.; ABAJO, R. D.; GENER, T.; FERNANDEZ, E. A method of combined single-cell electrophysiology and electroporation. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 160, n. 1, p. 69–74, 2007.

HAAS, K.; JENSEN, K.; SIN, W.; FOA, L.; CLINE, H. Targeted electroporation in xenopus tadpoles in vivo—from single cells to the entire brain. *Differentiation*, Wiley Online Library, v. 70, n. 4-5, p. 148–154, 2002.

HAAS, K.; SIN, W.; JAVAHERIAN, A.; LI, Z.; CLINE, H. Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron*, Elsevier, v. 29, n. 3, p. 583–591, 2001.

HARRISON, R.; BYRNE, B.; TUNG, L. Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS letters*, Elsevier, v. 435, n. 1, p. 1–5, 1998.

HATEGAN, A.; LAW, R.; KAHN, S.; DISCHER, D. Adhesively-tensed cell membranes: lysis kinetics and atomic force microscopy probing. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 85, n. 4, p. 2746–2759, 2003.

KIM, H. A.; PARK, J. H.; CHO, S. H.; LEE, J.; LEE, M. Glia/ischemia tissue dual specific gene expression vector for glioblastoma gene therapy. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, v. 152, p. e146–e148, 2011.

KOESTER, P.; TAUTORAT, C.; BEIKIRCH, H.; GIMSA, J.; BAUMANN, W. Recording electric potentials from single adherent cells with 3d microelectrode arrays after local electroporation. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 1731–1735, 2010.

KOTNIK, T.; BOBANOVIĆ, F.; MIKLAVČIČ, D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields — a theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, Elsevier, v. 43, n. 2, p. 285–291, 1997.

KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 92, n. 2, p. 404–417, 2007.

LEITE, L. *Modulação hormonal do potencial de membrana da célula de Sertoli*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

NEU, J.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. *Physical review E*, APS, v. 59, n. 3, p. 3471, 1999.

NICKOLOFF, J. *Animal cell electroporation and electrofusion protocols*. [S.l.]: Springer, 1995.

NOLKRANTZ, K.; FARRE, C.; BREDELAU, A.; KARLSSON, R.; BRENNAN, C.; ERIKSSON, P.; WEBER, S.; SANDBERG, M.; ORWAR, O. Electroporation of single cells and tissues with an electrolyte-filled capillary. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 73, n. 18, p. 4469–4477, 2001.

NOLKRANTZ, K.; FARRE, C.; HURTIG, K.; RYLANDER, P.; ORWAR, O. Functional screening of intracellular proteins in single cells and in patterned cell arrays using electroporation. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 74, n. 16, p. 4300–4305, 2002.

ODORIZZI, L.; RESS, C.; COLLINI, C.; MORGANTI, E.; LORENZELLI, L.; COPPEDÈ, N.; ALABI, A.; IANNOTTA, S.; CAZZANELLI, E.; VIDALINO, L. *et al.* An integrated platform for in vitro single-site cell electroporation: Controlled delivery and electrodes functionalization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, 2011.

OLIVEIRA, P. de; BASSANI, R.; BASSANI, J. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, IEEE, v. 55, n. 11, p. 2635–2642, 2008.

OLOFSSON, J.; LEVIN, M.; STRÖMBERG, A.; WEBER, S.; RYTTSÉN, F.; ORWAR, O. Scanning electroporation of selected areas of adherent cell cultures. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 79, n. 12, p. 4410–4418, 2007.

RAE, J.; LEVIS, R. Single-cell electroporation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Springer, v. 443, n. 4, p. 664–670, 2002.

RAMOS, A. *Desenvolvimento do método do circuito equivalente para análise numérica de processos elétricos em tecidos biológicos*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

RAMOS, A.; SCHNEIDER, A.; SUZUKI, D.; MARQUES, L. Sinusoidal signal analysis of electroporation in biological cells. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, IEEE, v. 59, n. 10, p. 2965–2973, 2012.

RATHENBERG, J.; NEVIAN, T.; WITZEMANN, V. High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 126, n. 1, p. 91–98, 2003.

RICE, J.; OTTENSMEIER, C.; STEVENSON, F. Dna vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 2, p. 108–120, 2008.

SAKAKI, K.; DECHEV, N.; BURKE, R. D.; PARK, E. J. Development of an autonomous biological cell manipulator with single-cell electroporation and visual servoing capabilities. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, IEEE, v. 56, n. 8, p. 2064–2074, 2009.

SEN, S.; SUBRAMANIAN, S.; DISCHER, D. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with afm: theoretical model and experiments. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 89, n. 5, p. 3203–3213, 2005.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; SNOJ, M. Electrochemotherapy of tumours. *Curr Oncol*, v. 16, n. 2, p. 34–35, 2009.

SHIL, P.; BIDAYE, S.; VIDYASAGAR, P. Analysing the effects of surface distribution of pores in cell electroporation for a cell membrane containing cholesterol. *Journal of Physics D: Applied Physics*, IOP Publishing, v. 41, n. 5, p. 055502, 2008.

SMITH, K.; NEU, J.; KRASSOWSKA, W. Model of creation and evolution of stable electropores for dna delivery. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 86, n. 5, p. 2813–2826, 2004.

SUZUKI, D. *Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SUZUKI, D.; RAMOS, A.; RIBEIRO, M.; CAZAROLLI, L.; SILVA, F.; LEITE, L.; MARQUES, J. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, IEEE, v. 58, n. 12, p. 3310–3318, 2011.

TEISSIÉ, J.; ROLS, M. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporabilization. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 65, n. 1, p. 409–413, 1993.

TSONG, T. Electroporation of cell membranes. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 60, n. 2, p. 297–306, 1991.

TUCCI, G.; SOUZA, M.; PINO, A. Modelagem da eletroporação para o controle do raio dos poros na membrana celular. *XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – Tiradentes/MG*, 2010.

UESAKA, N.; HIRAI, S.; MARUYAMA, T.; RUTHAZER, E.; YAMAMOTO, N. Activity dependence of cortical axon branch formation: a morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. *The Journal of neuroscience*, Soc Neuroscience, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2005.

VALERO, A.; POST, J.; NIEUWKASTEELE, J. V.; BRAAK, P. T.; KRUIJER, W.; BERG, A. van den. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. *Lab Chip*, The Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 1, p. 62–67, 2007.

WANG, M.; ORWAR, O.; OLOFSSON, J.; WEBER, S. Single-cell electroporation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Springer, v. 397, n. 8, p. 3235–3248, 2010.

WEAVER, J.; CHIZMADZHEV, Y. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Elsevier, v. 41, n. 2, p. 135–160, 1996.

YOKOTA, Y.; EOM, T.-Y.; STANCO, A.; KIM, W.-Y.; RAO, S.; SNIDER, W. D.; ANTON, E. Cdc42 and gsk3 modulate the dynamics of radial glial growth, inter-radial glial interactions and polarity in the developing cerebral cortex. *Development*, The Company of Biologists Limited, v. 137, n. 23, p. 4101–4110, 2010.

ZUDANS, I.; AGARWAL, A.; ORWAR, O.; WEBER, S. Numerical calculations of single-cell electroporation with an electrolyte-filled capillary. *Biophysical journal*, The Biophysical Society, v. 92, n. 10, p. 3696, 2007.

**APÊNDICE A – Fluxograma do programa desenvolvido para as
simulações numéricas**

Figura 22 – Fluxograma do programa desenvolvido para as simulações numéricas. n é o número total de poros formados nas iterações anteriores; A , a área da superfície da região da membrana sob análise; n_i , o número de poros formados na iteração i ; e t_f tempo final da simulação.

