



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade

**AVALIAÇÃO DA ELETROQUIMIOTERAPIA PELA DEFLEXÃO DAS AGULHAS DO
ELETRODO DE MATRIZ LINEAR: ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* E AVALIAÇÃO
DO MODELO DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA ELETROPORAÇÃO**

Florianópolis
2020

Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade

**AVALIAÇÃO DA ELETROQUIMIOTERAPIA PELA DEFLEXÃO DAS AGULHAS DO
ELETRODO DE MATRIZ LINEAR: ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* E AVALIAÇÃO
DO MODELO DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA ELETROPORAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de mestre
em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.

Florianópolis
2020

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

Andrade, Daniella de Lourdes Luna Santana de
Avaliação da eletroquimioterapia pela deflexão das
agulhas do eletrodo de matriz linear : Estudo in silico e
in vitro e avaliação do modelo de condutividade elétrica
para eletroporação / Daniella de Lourdes Luna Santana de
Andrade ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2020.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroquimioterapia. 3.
Campos elétricos pulsados. 4. Análise de falha. 5.
Modelagem de sistemas biológicos. I. Suzuki, Daniela Ota
Hisayasu . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade

**AVALIAÇÃO DA ELETROQUIMIOTERAPIA PELA DEFLEXÃO DAS
AGULHAS DO ELETRODO DE MATRIZ LINEAR: ESTUDO *IN SILICO* E *IN*
VITRO E AVALIAÇÃO DO MODELO DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA
ELETROPORAÇÃO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Cleumar da Silva Moreira, Dr.
Instituto Federal da Paraíba

Marcelo Monte Mor Rangel, Dr.
Hospital Vet Câncer, São Paulo

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de
conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em
Engenharia Elétrica.

Coordenação do Programa de
Pós-Graduação

Profa. Daniella Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2021

À memória de minha avó Eudézia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte inesgotável de amor e justiça. Obrigada pela força e resiliência diária a mim concedidas. Agradeço também pela dádiva de ter uma família tão especial e pelas pessoas que são colocadas no meu caminho.

Aos meus amados pais, Nair e David, e querida irmã, Nathália, pelo amor, apoio e incentivo aos meus sonhos e aspirações. Obrigada por compreenderem minha ausência em tantos momentos, e por me inspirarem a acreditar na educação como forma de transformação pessoal e profissional.

Ao amor da minha vida, melhor amigo e colega de profissão, Gabriel, agradeço por todo o incentivo, pelo companheirismo em todas as horas e pelos conselhos acadêmicos e de vida, todos transmitidos com carinho e respeito.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, pela oportunidade e confiança desde o primeiro contato. Obrigada pela disposição e generosidade em compartilhar diversos conhecimentos da Engenharia Biomédica, em especial aos estudos da Eletroporação.

Ao Prof. Dr. Cleumar da Silva Moreira, do Instituto Federal da Paraíba, onde iniciei minha trajetória pelo mundo acadêmico. O professor Cleumar me orientou durante a graduação, sempre mostrando apoio e compreensão, indispensáveis para minha formação e continuidade na pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Jefferson Luiz Brum Marques, do Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC (IEB-UFSC), pelas valiosas contribuições durante o meu mestrado. A disseminação do conhecimento e câmbio de ideias nas aulas foram motivadoras durante este processo.

Ao *Electroporation Research Group* do IEB-UFSC. Obrigada, queridos companheiros, ao longo desses dois anos esta pesquisa recebeu contribuições imensuráveis. Com vocês, compartilho das alegrias do trabalho e do sucesso em equipe.

Finalmente, sou grata a Universidade Federal de Santa Catarina por fornecer a estrutura necessária para a realização desta pesquisa, e a agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

*“We ourselves feel that what
we are doing is just a drop in the
ocean. But the ocean would be less
because of that missing drop.”*

(Mother Teresa of Calcutta, 1910 - 1997)

RESUMO

A exposição de células biológicas à campos elétricos pulsados de alta magnitude e curto período para aumentar sua permeabilidade e condutividade é um fenômeno conhecido como eletroporação (EP). Este aumento de permeabilidade resulta do aparecimento de nanoporos na membrana, permitindo o transporte de íons e moléculas não possíveis em estado homeostático da célula. Na eletroquimioterapia (EQT), uma modalidade mista para tratamento de tumores superficiais, os pulsos elétricos potencializam a captação dos quimioterápicos nas células tumorais. A EQT aparece amplamente no tratamento de cânceres cutâneos e subcutâneos em seres humanos e animais domésticos e selvagens, aumentando a expectativa e qualidade de vida. Uma EQT eficiente só é possível se uma quantidade aceitável do fármaco for administrada no local e se o campo elétrico possuir intensidade e duração suficientes para permeabilizar toda a região do tratamento. Um problema que afeta a distribuição de campo no tecido decorre do mal posicionamento do eletrodo no local, resultante da resistência mecânica que os tecidos exercem, e especialmente da geometria da ponta das agulhas. Este trabalho teve como objetivo analisar e quantificar os efeitos causados pela deflexão das agulhas do eletrodo de matriz linear (tipo II) para eletroquimioterapia. Para este fim, foram realizadas simulações, baseadas no Método de Elementos Finitos (FEM), das deflexões por aproximação e afastamento de agulhas de polaridades opostas, utilizando os modelos de condutividade dos tecidos vegetal e tumoral. Os testes foram realizados com eletrodos de 3 e 4 pares, e campos elétricos mínimos para EP reversível (60 kV/m - tubérculo de batata, 80 kV/m - tumor) além do campo indicado pelo *ESOPE* para aplicação com o eletrodo (100 kV/m). Os experimentos *in vitro* foram realizados no tecido vegetal e os efeitos resultantes mimetizados para o tecido tumoral. Os resultados da deflexão por aproximação para o tecido tumoral indicaram elevada densidade de corrente no tecido para distâncias menores que 3 mm. Além disso, o limite de corrente suportado pelo equipamento eletroporador foi excedido de diversas maneiras devido aproximação entre as agulhas. Já os resultados da deflexão por afastamento expuseram uma indentação do campo elétrico na porção mais profunda do tecido para distâncias superiores à 4 mm para 80 kV/m e 6 mm para 100 kV/m entre as pontas das agulhas, indicando que o tratamento perde sua efetividade nesses casos. Ainda, pela análise de significância estatística, foi possível verificar que o modelo vegetal não foi capaz de validar os casos extremos de deflexão (aproximação e afastamento), sugerindo sua limitação em validar testes de pré-tratamento para eletrodos não padronizados.

Palavras-chave: Eletroquimioterapia. Propriedades dielétricas de tecidos. Deflexão de agulhas. Modelos vegetais de Eletroporação. Mimetização de tecidos.

ABSTRACT

Electroporation (EP) is a phenomenon known to increase the permeability and conductivity of biological cells due to its exposition to pulsed electric fields of high magnitude and short periods. The increase in permeability makes nanopores appear in the cell's membrane and allows the transport of ions and molecules from the outside medium to the inside of the cell. Something which would not be possible in its homeostatic state. Electrochemotherapy (ECT) is a concept that makes use of the EP phenomenon and can be described as a mixed modality for the treatment of superficial tumours. It uses electric pulses intending to enhance the uptake of chemotherapeutic drugs in tumour cells. The ECT technique is widely used in the treatment of cutaneous and subcutaneous cancers in humans and as well as in domestic and wild animals, increasing patients life expectancy and quality of life. ECT efficiency is directly related to the amount of the drug that is administered to the cells on the cancerous region. Taking that into account, the electric field must be of sufficient intensity and duration to permeate the entire treatment region. A problem that affects the field distribution in the tissue arises from the poor positioning of the electrode at the location, caused by the needle's deflection during the ECT session. Deflection is caused by the insertion of the electrode in biological tissues, which in turn exert a mechanical resistance. In addition, needle tip geometry especially cooperate with deflection. This work aims to analyze and quantify the effects caused by the deflection of the needles of the linear matrix electrode (type II) for ECT. By the Finite Element Method in Comsol Multiphysics, the plant and tumour conductivity models were utilized to simulate the approaching and spacing out needle tips of opposite polarities. Tests were performed with 3 and 4-pair electrodes, applying the minimum electric field for reversible EP (60 kV/m - potato tuber, 80 kV/m - tumour), in addition to the electric field established for ESOPE to be used in ECT treatments (100 kV/m). The *in vitro* experiments were carried out on potato tissue and the effects mimicked to the tumour tissue. Results showed that the needle approximation generates high current density in the tumour tissue for needle tips distancing less than 3 mm. Also, the current limit supported by the commercial ECT equipment has been exceeded in several different ways in these cases that needles were forced to approximate. The needle deflection by spacing their tips exposed an electric field indentation in the deepest portion of the tissue for distances greater than 4 mm for 80 kV/m and 6 mm for 100 kV/m, implying that the treatment loses its effectiveness in these cases. Still, by analyzing the statistical significance of the results, it was possible to verify that the potato tissue model was not able to validate the extreme cases of deflection, suggesting its limitation in validating pre-treatment tests with non-standardized electrodes.

Keywords: Electrochemotherapy. Tissue dielectric properties. Needle deflection. Electroporation vegetal models. Tissue-mimicking phantom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do câncer. (A) região com células saudáveis, (B) surgimento de células anormais e rápida divisão celular, e (C) formação de neoplasia local com alta vascularização e invasão das células cancerígenas para os sistemas circulatório e linfático.	22
Figura 2 – Processo fisiológico da eletroporação. (A) Membrana em repouso (-70 mV), (B) Abertura da bicamada pela ação de potencial elétrico externo (>200 mV), (C) Estruturação dos poros hidrofílicos.	25
Figura 3 – Limiares de Eletroporação segundo intensidade e duração do pulso elétrico.	26
Figura 4 – Imagem microscópica de tecido cerebral com limiares bem definidos de regiões saudáveis e de necrose, decorrente de aplicação da NTIRE.	28
Figura 5 – Eletrodos do <i>ESOPE</i> (A) matriz linear, (B) matriz hexagonal, (C) placas paralelas, (D) eletrodo <i>finger</i>	31
Figura 6 – Eletrodo de matriz linear com agulhas defletidas após sessão de eletroquimioterapia em animal.	34
Figura 7 – Vista superior do eletrodo tipo II com a margem de segurança para a EQT, representada pela região retangular interior aos eletrodos (amarelo escuro).	37
Figura 8 – Curvas de condutividade σ em função do campo elétrico E geradas pelo <i>software</i> , e descritas pelos modelos vegetal (curva em verde) e tumoral (curva em azul). As curvas representam a dinâmica de condutividade elétrica nos tecidos decorrente da aplicação de um campo elétrico pulsado, e seus valores absolutos são dependentes das características elétricas intrínsecas aos tecidos.	39
Figura 9 – Geometria da simulação numérica. (A) Eletrodo com disposição padrão inserido no tecido. A região ampliada mostra as possíveis direções da deflexão das agulhas anodo (o passo de deflexão simulado foi 0.5°) (B) Malha gerada pelo <i>COMSOL</i>	40
Figura 10 – Arranjo experimental para o eletrodo de matriz linear (A) Configuração padrão (sem deflexão), (B) Configuração com $d_p = 2$ mm. Nem todos os arranjos são mostrados.	42
Figura 11 – Vista superior da superfície da batata com a localização dos cortes representados pelas linhas vermelhas.	43
Figura 12 – Representação da indentação h causada pelo afastamento não intencional das agulhas do eletrodo.	43

Figura 13 – Distribuição de campo elétrico para as os testes <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> no tecido vegetal. As imagens das simulações exibem as linhas de campo elétrico (de azul a vermelho, 20 - 40 kV/m). Grupo B (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz).	46
Figura 14 – Distribuição de campo elétrico para as os testes <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> no tecido vegetal. As imagens das simulações exibem as linhas de campo elétrico (de azul a vermelho, 20 - 60 kV/m). Grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz).	47
Figura 15 – Correntes elétricas resultantes dos testes para aproximação d_p das agulhas em tecido vegetal. O <i>inset</i> apresenta o aumento percentual <i>in silico</i> . O gráfico ampliado contém os resultados <i>in vitro</i> (<i>boxplots</i> e dados individuais) e <i>in silico</i> (linha contínua) da quantidade máxima de pares sendo aproximados. (A) Grupo A (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo B (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	52
Figura 16 – Correntes elétricas resultantes dos testes para aproximação d_p das agulhas em tecido vegetal. O <i>inset</i> apresenta o aumento percentual <i>in silico</i> . O gráfico ampliado contém os resultados <i>in vitro</i> (<i>boxplots</i> e dados individuais) e <i>in silico</i> (linha contínua) da quantidade máxima de pares sendo aproximados. (A) Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo D (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	53
Figura 17 – Aumento percentual de corrente elétrica resultante da aproximação dos eletrodos para tecido tumoral <i>in silico</i> . Os 'pontos 0' dos gráficos correspondem aos valores de corrente para os casos sem deflexão. Destacam-se, em vermelho, as situações nas quais a corrente excedeu 20 A. (A) Grupo E (3 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (B) Grupo F (4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (C) Grupo G (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (D) Grupo H (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	54
Figura 18 – Densidade de corrente e intensidades de campo elétrico (linhas cinza) <i>in silico</i> do tecido tumoral. (A) Grupos E/F (3/4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupos G/H (3/4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz).	55

Figura 19 – Indentação h nas fatias do tecido vegetal dado afastamento das agulhas. (A) Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	56
Figura 20 – Faixas de indentação h das fatias amostrais do tecido vegetal devido distanciamento das pontas das agulhas. (A) Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	57
Figura 21 – Distribuição de campo elétrico <i>in silico</i> no tecido tumoral acusando indentação h na porção inferior de inserção das agulhas para os d_p 7 e 8 mm. A linha de campo em amarelo (50 kV/m), representa o limiar mínimo de segurança (permeabilização permanente) em procedimentos com EQT. As setas em preto indicam as indentações de campo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limiares de eletroporação irreversível baseados em análise histopatológica e/ou ressonância magnética dos tecidos após aplicação dos pulsos.	28
Tabela 2 – Grupos das configurações da metodologia do trabalho.	37
Tabela 3 – Parâmetros elétricos de tecido tumoral utilizados nas simulações do trabalho.	39
Tabela 4 – Resultados experimentais de corrente resultante da aplicação dos pulsos de EP em batatas não orgânicas e orgânicas. A significância representa o resultado do teste <i>t</i> para diferença estatística entre os grupos. $n = 7$	45
Tabela 5 – Indentação <i>h in silico</i> resultante do afastamento dos pares das agulhas no tecido vegetal. Grupo A (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo B (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), d_p (distância entre as pontas do pares de agulha). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	48
Tabela 6 – Teste <i>post-hoc</i> para as configurações experimentais de afastamento das agulhas. Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	49
Tabela 7 – Teste <i>post-hoc</i> para as configurações experimentais de afastamento das agulhas. Grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	49
Tabela 8 – Indentação <i>h in silico</i> resultante do afastamento dos pares das agulhas no tecido tumoral. Grupo E (3 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo F (4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo G (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo H (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), d_p (distância entre as pontas do pares de agulha). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	50
Tabela 9 – Correntes elétricas resultantes dos testes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do modelo vegetal. Grupo A (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	50

Tabela 10 – Correntes elétricas resultantes dos testes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do modelo vegetal. Grupo B (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	51
Tabela 11 – Correntes elétricas resultantes dos testes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do modelo vegetal. Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	51
Tabela 12 – Correntes elétricas resultantes dos testes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do modelo vegetal. Grupo D (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.	59
Tabela 13 – APÊNDICE A - Especificações dos equipamentos comerciais utilizados para Eletroporação.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
EQT	Eletroquimioterapia
EP	Eletroporação
ESOPE	<i>European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
IEB-UFSC	Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ERE	Eletroporação Reversível
EIRE	Eletroporação Irreversível
EGT	Eletrotransferência Genética (<i>Gene Electrotransfer</i>)
PEF	Campos Elétricos Pulsados (<i>Pulsed Electric Fields</i>)
NTIRE	Eletroporação Irreversível Não Térmica (<i>Nonthermal Irreversible Electroporation</i>)
FEM	Método de Elementos Finitos (<i>Finite Element Method</i>)
d_p	Distância entre as pontas dos pares anodo-catodo do eletrodo
h	Altura de indentação de campo elétrico

LISTA DE SÍMBOLOS

V	Potencial Eléctrico [V]
I	Corrente Eléctrica [A]
\vec{E}	Campo Eléctrico [V/m]
\vec{J}	Densidade de Corrente Eléctrica [A/m ²]
σ	Condutividade Eléctrica [S/m]
σ_0	Condutividade inicial [S/m]
σ_{max}	Condutividade máxima [S/m]
∇	Operador Gradiente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA	18
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO	19
1.3	OBJETIVOS	19
1.3.1	Objetivo Geral	19
1.3.2	Objetivos Específicos	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	O CÂNCER	21
2.1.1	Definição	21
2.1.2	Tratamentos	23
2.2	O FENÔMENO DA ELETROPORAÇÃO	23
2.2.1	Definição	23
2.2.2	Aplicações	25
2.2.3	Eletroquimioterapia	29
2.3	MODELAGEM NUMÉRICA DA ELETROPORAÇÃO	31
2.3.1	Desafios e Limitações	33
3	METODOLOGIA	36
3.1	MODELAGEM NUMÉRICA	37
3.2	PROCEDIMENTOS <i>IN VITRO</i>	40
3.2.1	Análise do <i>phantom</i>	40
3.2.2	Deflexão das agulhas	41
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	42
4	RESULTADOS	45
4.1	EFEITOS DE APROXIMAÇÃO	46
4.2	EFEITOS DE AFASTAMENTO	47
4.3	AVALIAÇÃO DO MODELO VEGETAL	49
5	DISCUSSÃO	60
5.1	EFEITOS DE APROXIMAÇÃO	61
5.2	EFEITOS DE AFASTAMENTO	62
5.3	AVALIAÇÃO DO MODELO VEGETAL	63
6	CONCLUSÃO	65
6.1	TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO	65
6.2	TRABALHOS FUTUROS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – ESPECIFICAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS COMERCIAIS DE ELETROPORAÇÃO	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos líderes mundiais de mortalidade e morbidade entre as doenças não transmissíveis. No Brasil, estima-se que entre 2020 e 2022, 1,9 milhões de novos casos apareçam, sendo o melanoma o que apresentará maior incidência (INCA, 2020). Os tratamentos são mais eficazes em estágios iniciais do câncer, visto que sua principal causa de morte dá-se pela invasão das células anormais para outros tecidos e órgãos (metástase), tornando as opções de cura mais complexas. As modalidades atuais incluem cirurgias de remoção e terapia radioativa (BASKAR *et al.*, 2012), além de tratamentos, que incluem a quimioterapia (WAGNER *et al.*, 2017), terapia-alvo (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007) (GUO *et al.*, 2012), hormonioterapia (JAMES *et al.*, 2016), imunoterapia (DINE *et al.*, 2017) e eletroquimioterapia (EQT) (SUZUKI *et al.*, 2018).

A EQT, uma técnica implementada pelo Professor Mir e colaboradores em 1991 (MIR *et al.*, 1991), surgiu como alternativa aos tratamentos mais convencionais. Baseada no princípio da eletroporação, ou eletropermeabilização (EP), a EQT consiste na aplicação de pulsos elétricos de elevada amplitude e curta duração em células biológicas para aumentar sua permeabilidade de forma não natural, em conjunto com a administração de drogas quimioterapêuticas por meio da abertura de poros hidrofílicos na membrana plasmática. Bleomicina e cisplatina são os fármacos efetivamente utilizados nos tratamentos (MIR *et al.*, 2006). Ainda, novos estudos sugerem o cálcio como uma molécula antitumoral promissora (FALK *et al.*, 2017). Essas drogas se destacam pela sua sensibilidade às células tumorais. Não é possível o transporte destes agentes pela membrana de forma espontânea.

A EQT é amplamente utilizada como um tratamento anticâncer nas áreas clínica e veterinária. No Brasil, ainda não existe regulamentação para tratamento com EQT em humanos. Todavia, é utilizada de forma abrangente para tratar tumores cutâneos e subcutâneos em animais de pequeno à grande porte no país (SUZUKI *et al.*, 2017) (SUZUKI *et al.*, 2018) (RANGEL *et al.*, 2019). Suas principais vantagens sobre as outras técnicas estão na redução da quantidade de drogas quimioterápicas administrada ao paciente e a possibilidade de aplicação dos pulsos em regiões adjacentes aos tumores, eliminando a necessidade das cirurgias de remoção, as quais retiram uma margem de segurança ampla além da localização das neoplasias, tornando a intervenção severa, especialmente para tumores localizados em região facial.

Ferramentas computacionais tais como simulações numéricas auxiliam na descrição e compreensão de fenômenos como o modelo dinâmico de condutividade nos tecidos em função da EP (processo gradual e não linear). O desenvolvimento destes modelos geralmente envolve experimentos *in silico*, *in vivo* ou *ex vivo* para análise de alteração de corrente quando aplicada uma série de diferentes amplitudes dos pulsos

elétricos (SUZUKI *et al.*, 2018). Estes resultados podem ser representados por equações sigmóides e implementados em *softwares* que calculam, por meio de processo de iteração numérica, as soluções da distribuição de campo elétrico de acordo com as características dos tecidos biológicos e dos eletrodos simulados. A dinâmica da condutividade é diretamente ligada ao alcance do campo elétrico no tecido, e a partir da medição destes dados é possível definir os limites da eletroporação, que são a base nos tratamentos com eletroquimioterapia (MIKLAVČIČ; PUC, 2006).

Alguns tecidos vegetais, em especial o do tubérculo da batata, são uma alternativa para o estudo dos aspectos elétricos dos tecidos animais. Sua utilização contribui para o conceito de abordagem 3Rs para testes com animais (redução do número de animais, refinamento dos procedimentos para redução do sofrimento animal e reposição de técnicas animais com as não animais) (COUNCIL *et al.*, 2010). Este tecido vegetal possui algumas similaridades com os tecidos animais (heterogeneidade, anisotropia e dispersão dielétrica) que o fazem um interessante instrumento de estudo da EP. Resultados experimentais da batata são relevantes pois a região eletroporada apresenta um escurecimento enzimático algumas horas após a aplicação (IVORRA *et al.*, 2010) (SUÁREZ *et al.*, 2014) (OEY *et al.*, 2016) (BERKENBROCK *et al.*, 2019). A marcação é uma medida indireta da EP, utilizada principalmente na validação de novos modelos de condutividade e testes com eletrodos e equipamentos.

1.1 JUSTIFICATIVA

Uma EQT bem-sucedida depende, predominantemente, de dois aspectos: que uma quantidade aceitável do fármaco seja aplicada na região tumoral; e que o campo elétrico possua intensidade e duração suficientes para induzir a eletroporação reversível nas células (MIKLAVČIČ *et al.*, 1998).

Na utilização prática da EQT são utilizados equipamentos chamados eletroporadores, responsáveis pela geração de campo elétrico pulsado que chega ao tumor através de eletrodos, utilizando um guia de regulação para procedimentos de eletroquimioterapia, o *European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy* (ESOPE). Este guia define, entre diversos procedimentos para EQT, quatro tipos de eletrodos para aplicação dos pulsos: placas paralelas, agulhas de matriz linear, agulhas de matriz hexagonal e o eletrodo *finger* (MIR *et al.*, 2006) (GEHL *et al.*, 2018).

Um problema que afeta a eficácia do tratamento é o surgimento de deflexões nas agulhas dos eletrodos, fator responsável pela distribuição de campo elétrico não desejada. A principal complicação nesses procedimentos deve-se à deformação dos tecidos, que causam deslocamento do alvo e reduzem a eficácia da terapia. O grau de deflexão das agulhas é causado principalmente pelo seu material e geometria da ponta, força e velocidade de inserção, enquanto que a deformação do tecido é devida à sua resistência mecânica. A deflexão não só pode causar o posicionamento

incorreto da ponta da agulha no alvo (porções mais internas do tumor), como também pode fazer com que a agulha se desvie do caminho planejado e o tratamento atinja regiões que não necessitem de aplicação da EQT. Outro problema decorrente do mal posicionamento do eletrodo consiste na distribuição da densidade de corrente elétrica no tecido, o que pode causar uma eletroporação irreversível não desejada, danos térmicos e necrose local, além do risco de curto-circuitos, levando à outros efeitos prejudiciais ao paciente e/ou ao equipamento quando a capacidade máxima de corrente suportada é atingida. Na aplicação clínica ou veterinária da EQT, esse tipo de problema que ocorre no interior do tecido nem sempre é conhecido pelos profissionais, acreditando-se na totalidade da cobertura do tumor pelo campos elétricos. Detectar esse problema e minimizar essas limitações podem aumentar as chances de uma EQT bem-sucedida.

Ainda, os modelos atuais de EP são desenvolvidos a partir de experimentação utilizando eletrodos padronizados, muitas vezes com os de placas paralelas, na qual a distribuição de campo elétrico é homogênea. Neste sentido, a validação dos parâmetros elétricos dos modelos com os testes experimentais feitos com eletrodos personalizados pode não se feita de forma correta, uma vez que os modelos podem não abranger situações extremas da dinâmica de condutividade que esses eletrodos despadronizados podem gerar no tecido.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

O capítulo 2 aborda os princípios e definições dos temas relacionados ao trabalho, tais como surgimento e tratamentos do câncer, formação de poros hidrofílicos na membrana plasmática, aplicação de campos elétricos para tratamento de tumores e desenvolvimento de modelos biológicos de eletroporação e suas limitações.

No capítulo 3 são definidos os métodos e materiais, disponíveis em laboratório, utilizados para alcançar os objetivos deste trabalho, tais como *softwares* de simulações e análise dos dados, bem como equipamentos físicos laboratoriais.

Os resultados são mostrados no capítulo 4, e apresentados em divisão tal qual estabelecida na metodologia. As discussões sobre os resultados obtidos são descritas no capítulo 5. Por fim, no capítulo 6 são expostas as conclusões obtidas a partir da realização desta pesquisa, além da sumarização de trabalhos em andamento e futuros.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos causados em tecidos biológicos pela deflexão das agulhas do eletrodo de matriz linear para eletroquimioterapia, bem como uma análise da vi-

abilidade do modelo de condutividade de tecido vegetal para eletroporação quando associados ao uso de eletrodos despadronizados.

1.3.2 Objetivos Específicos

Para que os objetivos gerais sejam alcançados, destacam-se os objetivos específicos deste trabalho.

- Realizar simulações numéricas pelo método de elementos finitos dos tecidos vegetal e tumoral com diferentes configurações de deflexão das agulhas;
- Realizar experimentos do protocolo de EP no tecido vegetal para as configurações de deflexão;
- Implementar análise estatística compatível com os dados resultantes dos experimentos *in vitro* do tecido vegetal com seus pares *in silico*;
- Quantificar as deflexões que afetam efetivamente os tratamentos de EQT pelos resultados de tecido vegetal e tumoral;
- Detectar as limitações do modelo de condutividade vegetal para EP a partir dos resultados obtidos de corrente elétrica das configurações de deflexão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta seção apresenta conceitos e definições pertinentes ao desenvolvimento deste trabalho. São abordadas as bases da formação do câncer, as estatísticas da doença, além dos tipos de tratamento disponíveis. Os fenômenos físicos relacionados à aplicação de campos elétricos em meios biológicos, ou eletroporação, bem como sua associação ao tratamento de cânceres, ou eletroquimioterapia também são explicados. Por fim são apresentados aspectos relacionados à modelagem numérica para caracterização de propriedades dielétricas de materiais biológicos e suas limitações computacionais e práticas.

2.1 O CÂNCER

O câncer é um problema de saúde pública desafiador, sendo uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em todo o globo, liderando tal estatística em 2018 e totalizando 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil é projetado que entre 2020 e 2022 surgirão 625 mil novos casos a cada ano, sendo o câncer de pele não melanoma o de maior incidência (INCA, 2020).

Outros estudos estatísticos e de projeções do câncer (GO; GUNDRUM, 2011) (MADDAMS *et al.*, 2012) (MENARD *et al.*, 2014) (SIEGEL *et al.*, 2016) (MILLER *et al.*, 2019) fazem indicações importantes para avaliação do combate efetivo a doença. Por exemplo, as taxas de incidência de câncer de pulmão tiveram declínio em meados dos anos 80 nos homens e em meados dos anos 2000 nas mulheres, ocorrendo como resultado de reduções na prevalência de tabagismo que começaram décadas antes. Diferenças contemporâneas dos padrões de incidência entre homens e mulheres refletem diferenças históricas no uso do tabaco. Entretanto, o câncer de pulmão continua sendo o mais comum atualmente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica em três os agentes externos que podem desencadear o câncer: físicos (radiação ultravioleta e ionizante), químicos (amianto, arsênicos, fumaça do tabaco) e biológicos (vírus, parasitas e bactérias) (IARC, 1995).

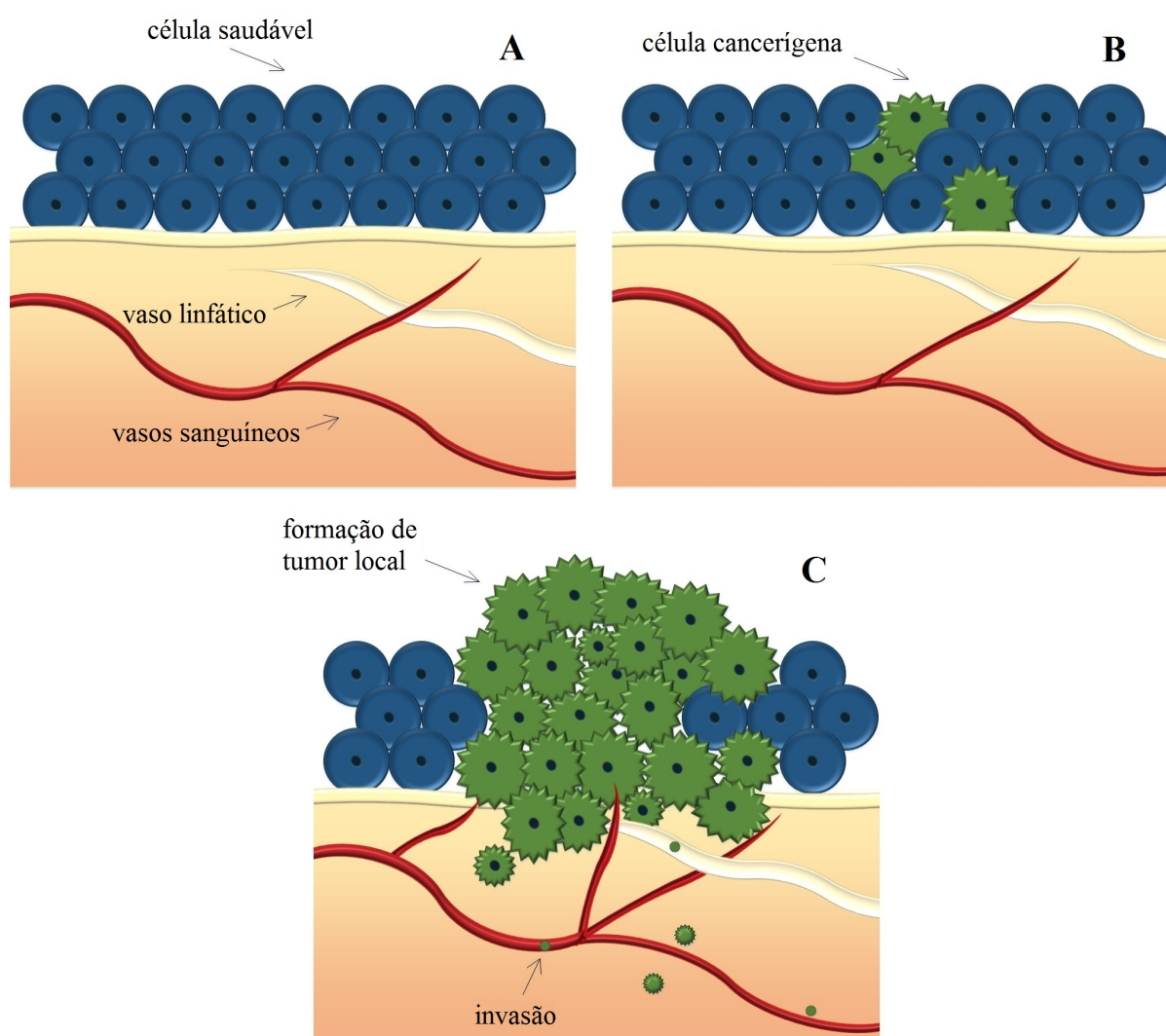
2.1.1 Definição

O câncer é um grupo complexo de doenças genéticas e epigenéticas diferentes mas com características em comum (KLEINSMITH, 2006). Normalmente, as células nos tecidos saudáveis se dividem a partir da recepção de sinais estimuladores externos. Em contrapartida, as células tumorais, por algum defeito em seu ácido desoxirribonucleico (em inglês, *Deoxyribonucleic Acid, DNA*), passam a não depender dessa sinalização, produzindo seu próprio sinal mitogênico e dividindo-se descontroladamente em uma determinada parte do organismo. Essas células anormais posteriormente ex-

travessam para diversos órgãos e tecidos periféricos através dos sistemas circulatório e linfático, fluxo esse facilitado pela intensa vascularização que ali se forma (GRESS *et al.*, 2017). A Figura 1 demonstra como esta anomalia se forma em um tecido.

Basicamente todos os tecidos e órgãos do corpo são suscetíveis do aparecimento do câncer. Ele pode ser encontrado em mais de 100 variações, quantidade esta de células distintas no corpo humano, em média (BUNZ, 2008). A morte por câncer muitas vezes está associada não à neoplasia primária, mas aos tumores secundários que surgem em outras localidades (metástase) (LEBER; EFFERTH, 2009).

Figura 1 – Formação do câncer. (A) região com células saudáveis, (B) surgimento de células anormais e rápida divisão celular, e (C) formação de neoplasia local com alta vascularização e invasão das células cancerígenas para os sistemas circulatório e linfático.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

2.1.2 Tratamentos

Nas últimas décadas houve um progresso científico no entendimento das características genéticas do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (CHEETHAM *et al.*, 2013) (WELTI *et al.*, 2013) (LIU *et al.*, 2017). A partir destes estudos, e juntamente com os avanços na detecção precoce e nas emergentes modalidades de tratamento, muitos cânceres se tornaram curáveis. O tratamento que o portador pode receber depende do tipo e em qual estágio a doença se encontra. Alguns tipos de cânceres tem apenas um tratamento. Todavia, a maioria deles pode ser tratado a partir de combinações de técnicas existentes. As opções incluem cirurgias de remoção e terapia radioativa (BASKAR *et al.*, 2012), além de tratamentos sistêmicos, que incluem a quimioterapia (WAGNER *et al.*, 2017), terapia-alvo (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007) (GUO *et al.*, 2012), hormonioterapia (JAMES *et al.*, 2016) e imunioterapia (MIN *et al.*, 2017) (DINE *et al.*, 2017).

Outra técnica, em especial, baseada em permeabilização celular, conhecida como eletroporação (seção 2.2), pode ser usada tanto em combinação, para potencializar os efeitos dos fármacos citotóxicos no tratamento de tumores cancerosos cutâneos e subcutâneos (MIR *et al.*, 1991), ou eletroquimioterapia (seção 2.2.3); quanto isolada para ablação¹ não térmica de tecidos tumorais (DAVALOS *et al.*, 2005).

2.2 O FENÔMENO DA ELETROPORAÇÃO

2.2.1 Definição

Eletroporação, ou eletropermeabilização (EP), consiste no aumento transitório de permeabilidade e condutividade na membrana celular quando esta é exposta à campos elétricos de elevada magnitude (dezenas de kV/m) e curta duração (ns- μ s) (KINOSITA; TSONG, 1977) (CHEN *et al.*, 2006) (COROVIC *et al.*, 2013).

A membrana plasmática, presente em toda célula biológica, é uma barreira envoltória altamente seletiva que tem como principais funções a comunicação celular e a troca seletiva de nutrientes (ALBERTS *et al.*, 2013). Em células vegetais, existe ainda uma segunda camada constituída pela parede celular (TAIZ *et al.*, 2015). A membrana é composta predominantemente por fosfolipídios, estruturas compostas por uma parte polar compacta (cabeça) e um segmento apolar alongado (cauda). Em soluções aquosas, tais como em meios celulares, essas estruturas formam bicamadas estáveis, de forma que apenas as regiões polares têm contato com a água (KOTNIK *et al.*, 2012).

Em decorrência da eletropermeabilização, ou seja, quando o potencial trans-

¹ Técnicas de ablação são utilizadas na destruição de células tumorais por intermédio de agentes químicos, físicos, térmicos e não térmicos.

membrana² atinge um valor crítico - normalmente entre 200 mV e 1 V (CHEN *et al.*, 2006), induzido por um campo elétrico externo, ocorre um rearranjo transitório de sua estrutura molecular uma vez que a membrana não consegue resistir às forças eletrocompressivas devido a essa diferença de potencial. A eletropermeabilização é, portanto, um fenômeno limiar, imposto pela necessidade de ultrapassar um valor limiar da diferença de potencial transmembranar (ANDRE; MIR, 2004).

A permeabilização leva à formação de canais aquosos, ou poros. Esses poros, de escala nanométrica, permitem o transporte de íons e macromoléculas não possíveis em estado homeostático³ (TIELEMAN, 2004) (PAKHOMOV *et al.*, 2010) (NAPOTNIK; MIKLAVCIC, 2018). Com a interrupção dos pulsos, os poros se fecham de forma gradual e espontânea, processo que leva alguns minutos e que não depende da amplitude do potencial elétrico aplicado, mas sim dos mecanismos de reparação de cada célula (SAULIS, 1997) (GISSEL *et al.*, 2011). Até os dias atuais, a natureza da eletropermeabilização de materiais celulares complexos ainda não é totalmente compreendida. A Figura 2 ilustra o processo de abertura dos poros em uma membrana celular como consequência da aplicação de potencial elétrico.

Como uma função do potencial transmembrana resultante - geralmente acima de 200 mV, podendo alcançar até 1,5 V em células eucariontes (ZIMMERMANN; NEIL, 1996) (IVORRA, 2010), a eletroporação pode:

- não ter efeito sobre a membrana plasmática, indicando que o campo elétrico aplicado não foi intenso o suficiente para permeabilizar a célula;
- gerar uma permeabilização temporária, na qual a membrana retorna ao seu estado original após aplicação do campo elétrico; ou
- permeabilizar a célula de forma permanente, aqui ela torna-se incapaz de se reestruturar, decorrendo da morte celular.

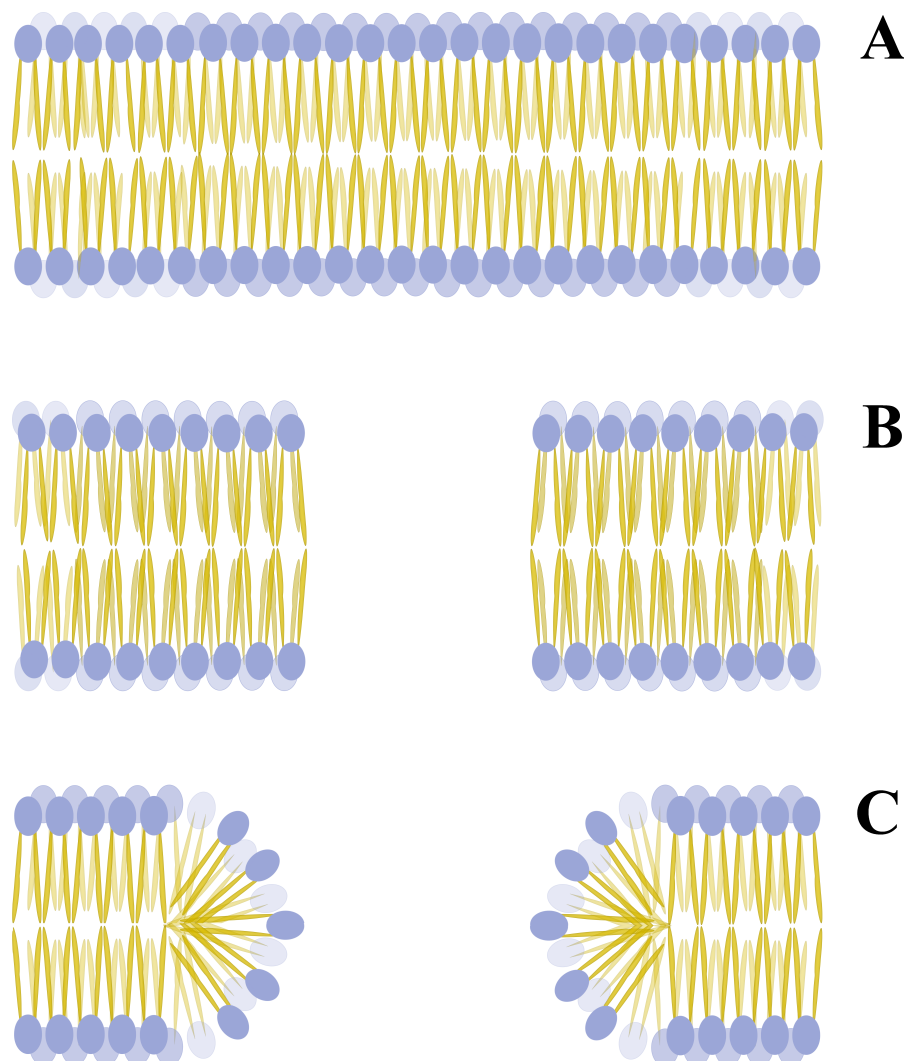
Os dois últimos casos são conhecidos, respectivamente, como eletroporação reversível (E_{RE}) e eletroporação irreversível (E_{IRE}) (MIKLAVCIC; PUC, 2006) (IVORRA *et al.*, 2010) (KOTNIK *et al.*, 2012).

A classificação da eletroporação é relacionada pela combinação de período e amplitude do pulso. Destaca-se, ainda, um efeito térmico causado pela exposição prolongada da membrana - acima de centenas de microssegundos - aos campos elétricos. Esse fenômeno é conhecido como efeito Joule (THOMSEN; PEARCE, 2010) (KOTNIK *et al.*, 2012) (KRANJC; MIKLAVCIC, 2016). A Figura 3 apresenta os limiares

² Potencial transmembrana refere-se à diferença de potencial interno e externo da célula. Quando em repouso, a célula apresenta um potencial aproximado de -70 mV.

³ Homeostase refere-se à capacidade de um organismo de se manter em equilíbrio interno constante (MARIEB; HOEHN, 2007).

Figura 2 – Processo fisiológico da eletroporação. (A) Membrana em repouso (-70 mV), (B) Abertura da bicamada pela ação de potencial elétrico externo (>200 mV), (C) Estruturação dos poros hidrofílicos.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

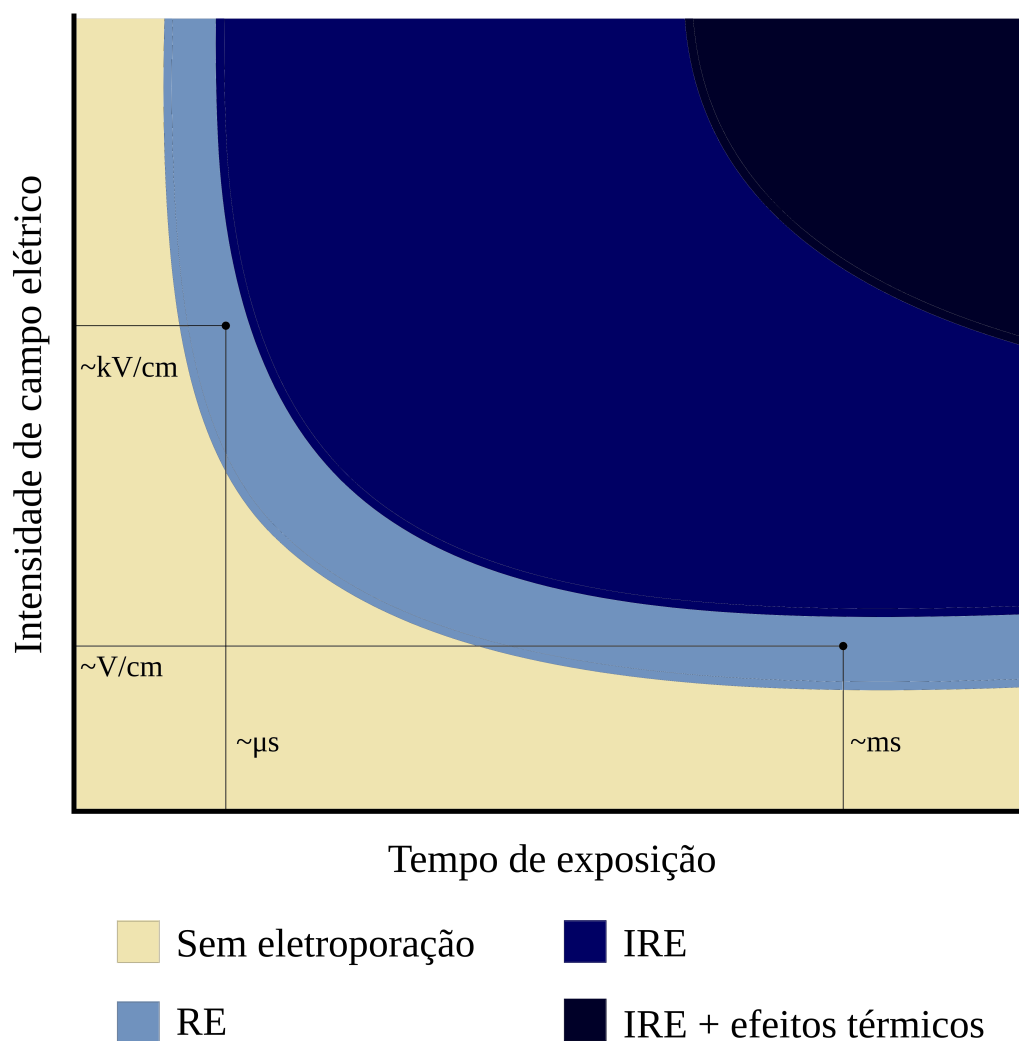
de eletroporação em função da intensidade e do tempo de exposição de um material à um campo elétrico.

2.2.2 Aplicações

É conhecido que a eletroporação facilita a entrada de genes, drogas, DNA, corantes e proteínas que normalmente não penetram na membrana. Ainda, dependendo do protocolo aplicado, a permeabilização se torna permanente, matando as células. Este processo dinâmico possui numerosas aplicações na biologia molecular, biotecnologia e medicina (YARMUSH *et al.*, 2014) (KOTNIK *et al.*, 2015).

A eletroporação para transferência de genes e eletrotransferência genética (em

Figura 3 – Limiares de Eletroporação segundo intensidade e duração do pulso elétrico.



Fonte – Adaptado de (KRANJIC; MIKLAVCIC, 2016).

inglês, EGT - *Electrogene Therapy*) é uma das aplicações da biologia molecular. A primeira demonstração do uso da EP reversível para eletrotransferência local de DNA foi reportada em 1982 (NEUMANN *et al.*, 1982). Esta modalidade constitui uma alternativa de abordagens virais para transferência de genes *in vivo* (ANDRE; MIR, 2004). Os estudos de manipulação e transferência genética são mais abrangentes em células animais, tais como as do músculo esquelético com aplicações em controle de diabetes (BOSMA *et al.*, 2013), e manipulação de genes em células-tronco embrionárias (VALERO *et al.*, 2008) e células do intestino (FUJII *et al.*, 2015). Entretanto, há uma alta demanda para soluções de manipulação genética em células vegetais, na qual a EP surge como uma técnica pertinente. Muitas soluções são limitadas devido à dificuldade de entrega de substâncias através da parede celular, a qual reforça a proteção contra

estresse mecânico e entrada de substâncias exógenas (TAIZ *et al.*, 2015). Alguns métodos de manipulação genética existentes são apenas possíveis com a retirada prévia da parede celular, entre eles os de remoção por enzimas e/ou pectinase (SILVA *et al.*, 2010) (WOO *et al.*, 2015). Todavia, a restauração da parede celular para a célula torna-se impossível ou ineficiente (EECKHAUT *et al.*, 2013). Outros métodos incluem o uso de *agrobacterium* para introdução de material genético nas células, entretanto fragmentos desta bactéria são geralmente incorporados ao DNA, acarretando um cenário não ideal (GELVIN, 2003). Um método de entrega eficiente de proteína diretamente no interior celular vegetal, e mantendo a integridade da parede celular, foi demonstrado por (FURUHATA *et al.*, 2019) utilizando a eletroporação.

A inativação de microorganismos pela EP irreversível, um importante ramo da biotecnologia, tem como principais vantagens a desinfecção bacteriana dos resíduos líquidos hospitalares para redução de aditivos químicos lançados ao meio ambiente, filtragem de água contaminada e conservação de alimentos (LIU *et al.*, 2013). O uso da EP para inativação microbiana é denominada *Pulsed Electric Fields (PEF)*.

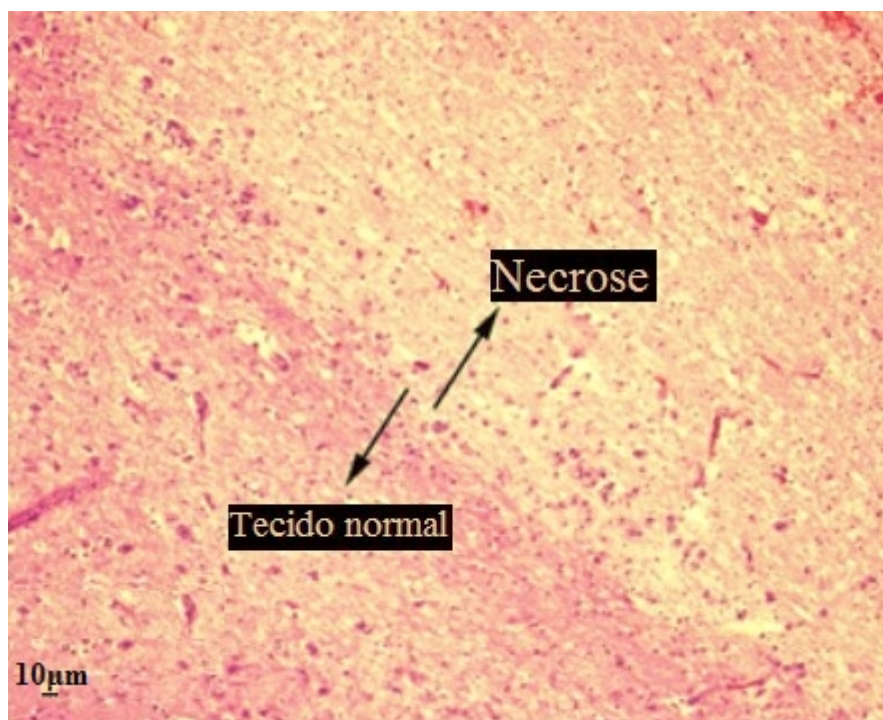
Na área alimentícia, os PEF atuam na inativação enzimática para preservação à longo prazo dos alimentos e podem ser empregados em combinação com outros processos tais como térmicos, de pressão, luz ultravioleta e conservante nisina (SAULIS, 2010) (KOTNIK *et al.*, 2015) (REBERŠEK *et al.*, 2015) (HUO *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, esta modalidade de preservação vem sendo utilizada não apenas em alimentos líquidos, tais como sucos, vinhos, cerveja, leite e sopas, como também em alimentos semi-sólidos e sólidos (TOEPFL, 2011) (MAHNIČ-KALAMIZA *et al.*, 2014).

O uso da eletroporação em medicina objetiva o tratamento de neoplasias por meio da eletroquimioterapia (abordado em mais detalhes na seção 2.2.3) e da ablação de tecidos (em inglês, *NTIRE - Nonthermal Irreversible Electroporation*). Enquanto a primeira utiliza protocolos para desencadear EP reversível e impulsionar a captação das drogas nas células tumorais, a NTIRE, uma modalidade minimamente invasiva e recente (DAVALOS *et al.*, 2005), aplica campos elétricos extremos para destruição dos tecidos, preservando vasos sanguíneos e outras estruturas próximas e contribuindo na redução de cicatrizes (MAOR *et al.*, 2007) (PHILLIPS *et al.*, 2012). A desvantagem associada à NTIRE encontra-se nas contrações musculares decorrentes dos campos elevados, exigindo, nesses casos, anestesia especial (BALL *et al.*, 2010).

Estudos mostram eficiência no tratamento dos cânceres de pâncreas, próstata, pulmão, fígado e rins, com casos clínicos e veterinários (GARCIA *et al.*, 2010) (THOMSON *et al.*, 2011) (MARTIN II *et al.*, 2012) (NEAL II *et al.*, 2012) (VROOMEN *et al.*, 2017) (KOUKOUNARAS *et al.*, 2018). O sucesso da NTIRE é diretamente ligado à necrose das regiões submetidas ao campo, como mostra a Figura 4. As análises histopatológica e de ressonância magnética, nesses casos, auxiliam na detecção do limiar de campo elétrico para permeabilização permanente (E_{IRE}) (LEE *et al.*, 2010) (ELLIS

et al., 2011) (BAGLA; PAPADOURIS, 2012) (GARCIA *et al.*, 2012b) (LÓPEZ-ALONSO *et al.*, 2019). A Tabela 1 mostra esses limiares para alguns tecidos.

Figura 4 – Imagem microscópica de tecido cerebral com limiares bem definidos de regiões saudáveis e de necrose, decorrente de aplicação da NTIRE.



Fonte – Adaptado de (ELLIS *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Limiares de eletroporação irreversível baseados em análise histopatológica e/ou ressonância magnética dos tecidos após aplicação dos pulsos.

Tecido	Limiar E_{IRE}	Referência
Pâncreas (tumor)	50 kV/m	(ARENA <i>et al.</i> , 2012)
Cérebro (saudável)	50 kV/m	(GARCIA <i>et al.</i> , 2010)
Rim (saudável)	60 kV/m	(NEAL II <i>et al.</i> , 2012)
Fígado (saudável)	40 - 70 kV/m	(SEL <i>et al.</i> , 2005), (DAVALOS <i>et al.</i> , 2005), (RUBINSKY <i>et al.</i> , 2007), (SANO <i>et al.</i> , 2010), (GOLBERG <i>et al.</i> , 2015)
Fígado (tumor)	80 kV/m	(KOS <i>et al.</i> , 2015)

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

2.2.3 Eletroquimioterapia

Diferentemente da NTIRE, a eletroquimioterapia utiliza a permeabilização temporária para tratamento de neoplasias. Neste processo, as drogas quimioterápicas são administradas de forma local ou intravenosa, atuando na quebra das fitas de DNA das células por mecanismos catalíticos (MEAKING *et al.*, 1995). Esta combinação tem como vantagem sobre a quimioterapia tradicional a potencialização do efeito das drogas sobre as células tumorais (MIR *et al.*, 2006).

O emprego da EQT permite que o tratamento seja uma alternativa às cirurgias de remoção de tumor, uma vez que estas necessitam de uma margem de segurança considerável, o que torna o tratamento severo quando tumores ocorrem em regiões facial e oral, por exemplo. Ainda, ela pode ser associada à outros procedimentos tradicionais, tais como ressecção cirúrgica (SPUGNINI *et al.*, 2008).

O primeiro estudo foi divulgado em 1991, pelo Professor Mir e colaboradores, demonstrando eficácia antitumoral em metástases cutâneas de cabeça e pescoço (MIR *et al.*, 1991). Desde então, foram iniciados vários estudos clínicos sobre o tema (BELEHRADEK *et al.*, 1993) (MIR *et al.*, 1998) (GOTHELF *et al.*, 2003). Uma vez que o resultado da EQT decorre de fatores específicos dependentes das características tumorais, houve a necessidade de uma padronização nos protocolos de tratamento, surgindo, em 2006, um guia para procedimentos de eletroquimioterapia, o ESOPE (em inglês, *European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy*). Este guia define os procedimentos relacionados ao tratamento tais como anestésias, concentrações dos fármacos e protocolos elétricos para distintos volumes e localização dos tumores. Em conjunto, também foi lançado o primeiro eletroporador comercial, o *Cliniporator*, com eletrodos específicos para aplicação da EQT: placas paralelas, agulhas de matriz linear, agulhas de matriz hexagonal (MIR *et al.*, 2006) e o eletrodo *finger*, incorporado em 2018 com a atualização do ESOPE (GEHL *et al.*, 2018).

Os principais fármacos anticâncer, bleomicina e cisplatina, se mostram altamente eficazes para o tratamento com EQT dadas suas propriedades químicas (i.e. as células tumorais possuem sensibilidade à essas drogas). A bleomicina é uma droga hidrofílica não permanente e de elevada citotoxicidade⁴ intracelular (MIR *et al.*, 2006). Em 1993, foi publicado o primeiro estudo clínico para tratamento de carcinomas de células escamosas, localizados na cabeça e pescoço, utilizando este fármaco (BELEHRADEK *et al.*, 1993). A potencialidade da bleomicina justifica-se também pelo fato desta droga poder ser administrada de forma intravenosa (SIKIC *et al.*, 2016). Já a cisplatina, uma droga de baixa absorção sistêmica, também conhecida por sua eficiência antitumoral, é administrada apenas localmente (MICHEL *et al.*, 2018).

Uma outra modalidade de tratamento de câncer em associação com a EP utiliza

⁴ Citotoxicidade é a capacidade intrínseca de uma substância em promover alteração metabólica celular, podendo culminar ou não em morte celular.

elevadas concentrações de cálcio para indução de morte nas células tumorais, ou *Calcium Electroporation* (FRANSEN *et al.*, 2013). Ensaios clínicos mostram que o cálcio também possui efeito citotóxico em células cancerígenas (FRANSEN *et al.*, 2015) (FALK *et al.*, 2017) (SZEWCZYK *et al.*, 2018). Por ser uma substância mais facilmente acessível em relação aos quimioterápicos convencionais, o tratamento é simplificado e tem seu custo reduzido (FRANSEN *et al.*, 2017).

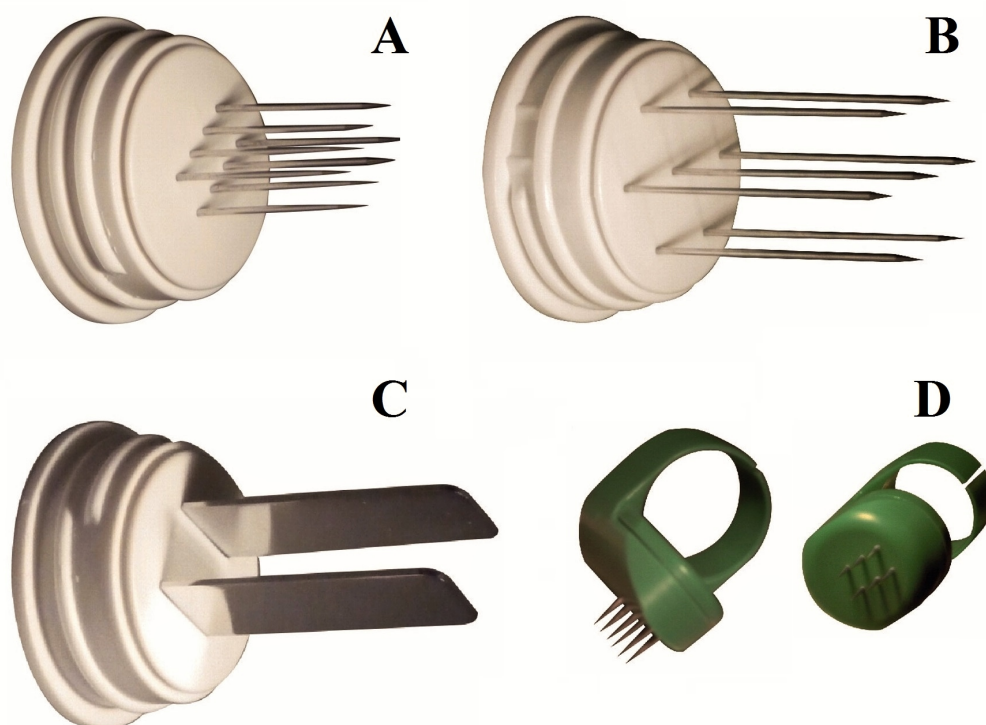
A EQT aparece amplamente no tratamento de cânceres cutâneos e subcutâneos em seres humanos (MATTHIESSEN *et al.*, 2011) (MATTHIESSEN *et al.*, 2012) (PASQUALI *et al.*, 2018), e animais domésticos e selvagens (SPUGNINI *et al.*, 2011) (MAGLIETTI *et al.*, 2017) (SPUGNINI *et al.*, 2016), aumentando a expectativa e qualidade de vida. No Brasil, ainda não existe regulamentação para uso deste tratamento em seres humanos, sendo disponível apenas em aplicações veterinárias (SUZUKI *et al.*, 2017) (SUZUKI *et al.*, 2018) (RANGEL *et al.*, 2019).

O protocolo dos campos pulsados é gerado por equipamentos chamados eletroporadores, que produzem ondas de alta tensão de forma, amplitude, duração, número e frequência de repetição específicos, e a energia fornecida à carga (tecidos, órgãos) é dependente da combinação desses parâmetros. Em aplicações biomédicas, a energia chega à alguns joules; já na biotecnologia, como por exemplo no tratamento de produtos agrícolas e água, em alguns quilojoules (REBERSEK *et al.*, 2014). Existem diferentes eletroporadores comerciais, nos quais as configurações variam de acordo com as necessidades de aplicação (ver Apêndice A). O IEB-UFSC possui equipamentos próprios e geradores de onda quadrada DC (ou de corrente contínua, em inglês, *direct current*) com protocolos pré estabelecidos e personalizáveis (PINTARELLI *et al.*, 2019), utilizado em estudos com suspensão celular e tecidos (BERKENBROCK *et al.*, 2018) (BERKENBROCK *et al.*, 2019).

Os pulsos são entregues à região alvo por intermédio dos eletrodos. Os eletrodos utilizados para as suspensões celulares incluem as câmaras de célula única (eletrodo *patch-clamp*) (WANG *et al.*, 2010), câmaras de fluxo (GENG *et al.*, 2011) e micro eletrodos (LEE; DENG, 2012). Para EQT também são estabelecidos, pelo ESOPE, alguns eletrodos de configurações predefinidas para uso em tecidos, como mostrado na Figura 5 (MIR *et al.*, 2006) (GEHL *et al.*, 2018). Os eletrodos de agulha são utilizados em regiões mais profundas ou para tumores de grande volume. As agulhas podem ser dispostas em matriz linear (5A) ou hexagonal (5B) e podem ser arranjadas de acordo com o plano de tratamento; já as placas são normalmente usadas para tecidos superficiais (5C).

Uma EQT eficiente depende, predominantemente, de dois fatores: que uma quantidade aceitável do fármaco seja administrada no local e que o campo elétrico tenha intensidade e duração suficientes para permeabilizar toda a região do tratamento (MIKLAVČIČ *et al.*, 1998). O ESOPE estabelece a amplitude mínima dos pulsos dado

Figura 5 – Eletrodos do ESOPE (A) matriz linear, (B) matriz hexagonal, (C) placas paralelas, (D) eletrodo *finger*.



Fonte – Adaptado de (GEHL *et al.*, 2018).

eletrodo utilizado e as concentrações de bleomicina pelo volume tumoral (MIR *et al.*, 2006) (GEHL *et al.*, 2018).

2.3 MODELAGEM NUMÉRICA DA ELETROPORAÇÃO

Um tecido biológico pode ser caracterizado por sua heterogeneidade elétrica, interpretada como a coexistência de diferentes condutividades presentes em sua extensão. A condutividade depende do tipo e propriedades geométricas das células, vascularização irregular, variação do potencial de hidrogênio (pH) e concentração de oxigênio no local (SIENI *et al.*, 2020). Desta forma, é interessante estudar o comportamento não linear de tecidos complexos submetidos à potenciais elétricos para prever suas alterações químicas e fisiológicas utilizando simulações computacionais de modelos numéricos (SEL *et al.*, 2003) (RAMOS, 2005).

A dinâmica da condutividade biológica já foi modelada em diversos trabalhos de eletroporação (SEL *et al.*, 2005) (IVORRA *et al.*, 2010) (NEAL II *et al.*, 2012) (GOLBERG *et al.*, 2015). A aproximação numérica destes modelos de condutividade é feita por *softwares* que utilizam o método de elementos finitos, em inglês *Finite Element Method, FEM*. O uso deste método permite o cálculo da alteração de condutividade no

tecido e consegue prever a distribuição final de campo elétrico (SEL *et al.*, 2003) (RAMOS, 2005). As equações numéricas mais usadas para descrever o comportamento da condutividade dos tecidos dependente de campo elétrico são as funções sigmóides ou logística (SEL *et al.*, 2005) (PAVSELJ *et al.*, 2005), *Gomphertz* adaptada (IVORRA *et al.*, 2010) (NEAL II *et al.*, 2012) (GARCIA *et al.*, 2012a) e *Peleg-Fermi* (GOLBERG; RUBINSKY, 2010) (SANO *et al.*, 2018). Os modelos atuais são amplamente utilizados nos trabalhos com EQT (SUZUKI *et al.*, 2017) (SUZUKI *et al.*, 2018) (RANGEL *et al.*, 2019).

O desenvolvimento desses modelos se inicia com experimentação *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* dos tecidos pela aplicação de uma faixa de potenciais elétricos do protocolo da EP para descrever a curva de condutividade a partir dos resultados obtidos de corrente elétrica. O limiar elétrico de permeabilização, ou seja, a magnitude mínima de campo aplicado para desencadear as mudanças elétricas, varia entre diferentes tecidos. No tecido tumoral animal esse limiar é de 40 kV/m (SEL *et al.*, 2005). A partir daí, é observado o aumento da corrente elétrica até sua saturação, ponto em que todas as células submetidas ao campo foram permeabilizadas, similar à um efeito dominó. Com a aplicação de potenciais mais elevados, é observado um platô da condutividade, compreendido a partir do limiar de EP irreversível. Esses parâmetros são incorporados às equações e os resultados são calculados pelos *softwares*. O cálculo numérico iterativo também utiliza a condutividade inerente ao tecido em situações normais, ou seja, quando não há atuação de potenciais externos sobre ele. Esse parâmetro geralmente é extraído a partir da análise de espectroscopia de impedância. Este processo é realizado ao aplicar uma tensão ou corrente sinusoidal à amostra com uma ampla faixa de frequências, obtendo o resultado de impedância expresso em sua parte real (resistência, R) e imaginária (reatância, X) (GROSSI; RICCÒ, 2017).

Os modelos atuais que descrevem a distribuição de campo nos tecidos pela EP são do tipo estático, ou seja, a distribuição é resultado da condutividade máxima alcançada, e apenas esse parâmetro é utilizado no cálculo de distribuição de campo elétrico feito no *software*. Assim, a maioria das análises experimentais de corrente consideram apenas o último pulso para verificação dos modelos. Os modelos dinâmicos, por sua vez, realizam o cálculo da distribuição com dependência de outros parâmetro além da condutividade, como por exemplo, tempo ou frequência.

Em pré-tratamentos de EQT ou de otimização de eletrodos, a melhor solução para verificar os modelos simulados é sempre obtida quando existe a possibilidade de realizar os experimentos no tecido alvo, ou possuir uma base de dados experimentais. Todavia, não são em todos os casos que se dispõe desse aparato experimental necessário, ou desejado.

No sentido de possuir uma alternativa compatível eletricamente para testes preliminares relacionados à EQT (*phantom*), e como forma de contribuir para o conceito de

abordagem 3Rs para testes com animais (redução do número de animais, refinamento dos procedimentos para redução do sofrimento animal e reposição de técnicas animais com as não animais) (COUNCIL *et al.*, 2010), iniciou-se uma busca por outros tecidos biológicos que também pudessem descrever a eletroporação. Assim, em 2010, surgiu o primeiro modelo de condutividade do tecido vegetal de batata como uma alternativa para o estudo dos aspectos elétricos nos tecidos animais (IVORRA *et al.*, 2010). Outros modelos e otimizações da pesquisa original foram desenvolvidos posteriormente (SUÁREZ *et al.*, 2014) (BERKENBROCK *et al.*, 2019).

O *phantom* da batata é amplamente utilizado pelo seu fácil acesso e tamanho satisfatório para testes com diferentes tamanhos de eletrodos, mas principalmente para análise visual de campo elétrico que ele proporciona. Após algumas horas da aplicação dos pulsos, o tecido torna-se escuro pela interação da enzima polifenoloxidase (PPO) e dos substratos fenólicos (IVORRA *et al.*, 2010) (OEY *et al.*, 2016) (CAMPANA *et al.*, 2019) (BERKENBROCK *et al.*, 2019). A ativação da PPO ocorre instantaneamente quando os compartimentos celulares são interrompidos devido aplicação de potencial elétrico, e este processo permite o acúmulo de pigmentos marrons (OEY *et al.*, 2016). Assim, é possível observar o volume eletroporado no tecido vegetal analisando este escurecimento.

2.3.1 Desafios e Limitações

Os modelos de condutividade para a Eletroporação atuais são desenvolvidos a partir de experimentos *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* do tecido. Os testes geralmente utilizam eletrodos de configurações padrões tal como o eletrodo de placas paralelas. A distribuição de campo elétrico modelada para esses casos geralmente é uniforme. Para eletrodos de matriz linear por exemplo, essa distribuição é dita homogênea apenas na região interior aos pares das agulhas, sendo este eletrodo geralmente utilizado para a validação dos modelos (IVORRA *et al.*, 2010) (SEL *et al.*, 2005).

Com o crescente número de tumores de variadas anatomias e localizados em diferentes regiões do organismo e sendo tratados pela EQT, surgiu-se a necessidade do desenvolvimento de eletrodos personalizados. Recentes estudos mostram tanto avaliações para otimização do posicionamento dos eletrodos padronizados em diferentes tumores (ONGARO *et al.*, 2016) (ŽUPANIČ *et al.*, 2008) (CAMPANA *et al.*, 2013), como também o desenvolvimento e aplicação da EQT utilizando novas configurações de eletrodos (MAHMOOD; GEHL, 2011) (MAGLIETTI *et al.*, 2017) (RITTER *et al.*, 2018) (IZZO *et al.*, 2020). Apesar dos resultados com novos eletrodos apresentados sugerirem êxito nos tratamentos, deve-se considerar que estes eletrodos produzem uma distribuição de campo não homogênea, diferente das previstas para os eletrodos padronizados. Por conseguinte, os modelos utilizados para a análise pré-tratamento podem não descrever integralmente a faixa de condutividade gerada pela aplicação da

EQT nesses casos, uma vez que possivelmente os próprios resultados simulados se encontrem nos extremos da validação dos modelos.

Outro fator que gera a distribuição não correta de campo elétrico e afeta a EQT ocorre especialmente em eletrodos de agulhas, tais como os de matriz linear (em que se inclui também o *finger*) e hexagonal. A inserção desses eletrodos em tecidos e órgãos não raramente gera deflexões nas agulhas. A Figura 6 mostra o resultado das deflexões ocasionadas nas agulhas do eletrodo após sessão de EQT.

Figura 6 – Eletrodo de matriz linear com agulhas defletidas após sessão de eletroquimioterapia em animal.



Fonte – Cedida pelo Hospital VetCâncer, São Paulo (2018).

A deflexão de agulhas utilizadas em práticas médicas é um problema recorrente. A literatura mostra que uma inserção sem a mínima deflexão é dificilmente concebível visto que ela é decorrente de fatores como resistência mecânica dos tecidos, espessura, velocidade, força e rotação da agulha durante inserção e, em especial, pela geometria da ponta da agulha (ABOLHASSANI; PATEL, 2006) (ROESTHUIS *et al.*, 2011) (GERWEN *et al.*, 2012) (VEEN *et al.*, 2012) (WAINE *et al.*, 2016) (VAN DE BERG *et al.*, 2017) (LI *et al.*, 2020). Os tumores são conhecidos pela particular heterogeneidade,

resultante dos variados tipos de células que se agregam por toda sua extensão. Além disso, destaca-se o desenvolvimento desses neoplasmas em regiões de fronteira com outros órgãos, músculos e ossos.

As deflexões podem causar o posicionamento incorreto da ponta da agulha no alvo, fazendo com que ela seja desviada para regiões que não necessitem da aplicação da EP. Regiões tumorais não permeabilizadas, resultantes da distribuição incorreta do campo elétrico, são passíveis de remissão da lesão. Além disso, pela deflexão das agulhas, curto-circuitos e danos aos tecidos podem ser esperados. Problemas como esses podem implicar na ineficácia do tratamento.

A avaliação mais detalhada deste problema não foi totalmente abordada até o momento. Trabalhos anteriores sugerem a reaplicação do protocolo da EP ou a utilização de campos elétricos mínimos para garantir que toda a região do tumor seja permeabilizada como forma de compensar por possíveis deflexões (MIR *et al.*, 2006) (MIKLAVČIČ *et al.*, 2006). Ainda, (CAMPANA *et al.*, 2019) analisou os efeitos de distribuição de campo decorrente da aproximação de 1 par de agulhas e notou um aumento significativo da intensidade de campo elétrico no tecido quando comparado com o caso sem aproximações. Esses resultados sugerem mudanças negativas nos resultados da EQT. Entretanto, não há base teórica suficiente para a avaliação dos efeitos do mal posicionamento do eletrodo padrão utilizado para os tratamentos de câncer.

3 METODOLOGIA

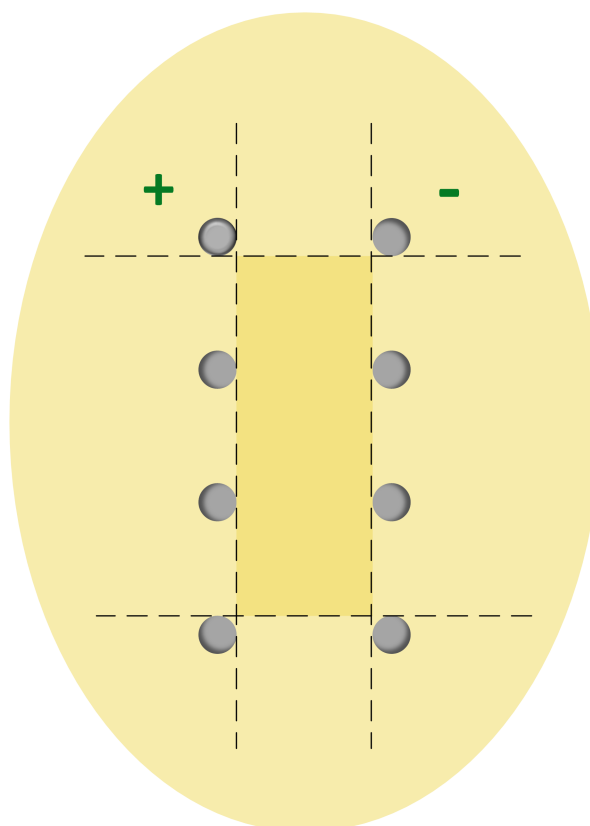
Esta seção descreve os métodos e materiais utilizados na avaliação do objeto de estudo deste trabalho, que incluiu simulações numéricas de tecidos vegetal e tumoral, enquanto que os experimentos *in vitro* limitaram-se ao vegetal, de acordo com as normas éticas dos 3Rs para testes com animais (COUNCIL *et al.*, 2010).

A deflexão do eletrodo de matriz linear, ou tipo II, ocorre ao longo de seu comprimento, enquanto que sua base permanece sem alterações mecânicas, ou seja, as distâncias padrões são mantidas em sua porção basal. Este arranjo foi mantido nos estudos *in silico* e *in vitro*. A direção radial de uma agulha defletida ocorre de forma aleatória quando inserida em tecidos biológicos heterogêneos (ROESTHUIS *et al.*, 2011) (GERWEN *et al.*, 2012) (VAN DE BERG *et al.*, 2017), o que torna a quantificação desses eventos bastante desafiadora. As simulações e experimentos foram limitados às direções tais quais ilustram a região ampliada da Figura 9A. Como antes definido, o objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos introduzidos quando as pontas das agulhas encontram-se de forma não intencionalmente espaçadas. Desta forma, outras direções de deflexão além das escolhidas resultariam na mesma distância efetiva entre essas pontas.

O termo d_p , utilizado neste trabalho, representa a distância entre as pontas dos pares anodo-catodo do eletrodo. Para ambos estudos, simulado e experimental, as agulhas anodo foram espaçadas das agulhas catodo, que foram mantidas fixas. Os efeitos causados pelas deflexões foram quantificados tendo como referência o eletrodo em sua forma padrão (sem deflexões) e foram divididos em: Efeitos de aproximação e Efeitos de afastamento.

Foram utilizados eletrodos com 3 e 4 pares de agulhas, ambos empregados em práticas de EQT. Os campos elétricos aplicados foram escolhidos baseados em dois aspectos. O primeiro, 100 kV/m, é relacionado com as recomendações do ESOPE para tratamento de EQT com o eletrodo em estudo (GEHL *et al.*, 2018). Assim, os resultados podem ser diretamente associados com estudos clínicos. O segundo foi escolhido como sendo o campo elétrico de intensidade mínima o suficiente para garantir a EP reversível na região mostrada na Figura 7. Os extremos desta região são os limites da margem de segurança para o tratamento com EQT (BERKENBROCK *et al.*, 2018). Assim, os campos utilizados foram 60 kV/m para o tecido vegetal e 80 kV/m para o tecido tumoral. Para facilitar a compreensão dos resultados (Capítulo 4), foram definidos grupos, apresentados na Tabela 2, das composições descritas nesta metodologia.

Figura 7 – Vista superior do eletrodo tipo II com a margem de segurança para a EQT, representada pela região retangular interior aos eletrodos (amarelo escuro).



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 2 – Grupos das configurações da metodologia do trabalho.

Grupo	Pares de agulhas	Campo Elétrico	Tecido
A	3	60 kV/m	Batata
B	4	60 kV/m	Batata
C	3	100 kV/m	Batata
D	4	100 kV/m	Batata
E	3	80 kV/m	Tumor
F	4	80 kV/m	Tumor
G	3	100 kV/m	Tumor
H	4	100 kV/m	Tumor

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

3.1 MODELAGEM NUMÉRICA

O modelo computacional foi processado pelo *software* baseado no método de elementos finitos *COMSOL Multiphysics*®, versão licenciada pelo IEB-UFSC 5.1

(COMSOL Inc., Suécia), executado em um servidor *cluster* (Intel Xeon Gold 6126 @ 2.60 GHz, 20 cores, 300 GB RAM) de sistema operacional *Ubuntu Linux* (x64, Canonical Ltd. Reino Unido). A equação matemática que descreve a distribuição de campo elétrico em sistemas biológicos pode ser descrito pela equação de Laplace em condição estacionária (Eq. (1)).

$$-\nabla \cdot (\sigma \cdot \nabla V) = 0 \quad (1)$$

em que σ é a condutividade elétrica do tecido biológico dependente de campo elétrico (S/m) e V o potencial elétrico aplicado (V). O gradiente de potencial elétrico ∇ é representado pela distribuição de campo elétrico E (Eq. (2)). As condições de contorno são todas isolantes nas superfícies externas (condições de contorno de Neuman), e o contato eletrodo-tecido é modelada pelas condições de contorno de Dirichlet.

$$E = -\nabla V \quad (2)$$

A Eq.(3) apresenta a função sigmoide utilizada por Ivorra e colaboradores para descrever as mudanças de condutividade do tecido da batata sob exposição aos campos elétricos (IVORRA *et al.*, 2010).

$$\sigma(E) = 0,03 + 0,35 \cdot e^{-e^{-0.01(|E|-250)}} \quad (3)$$

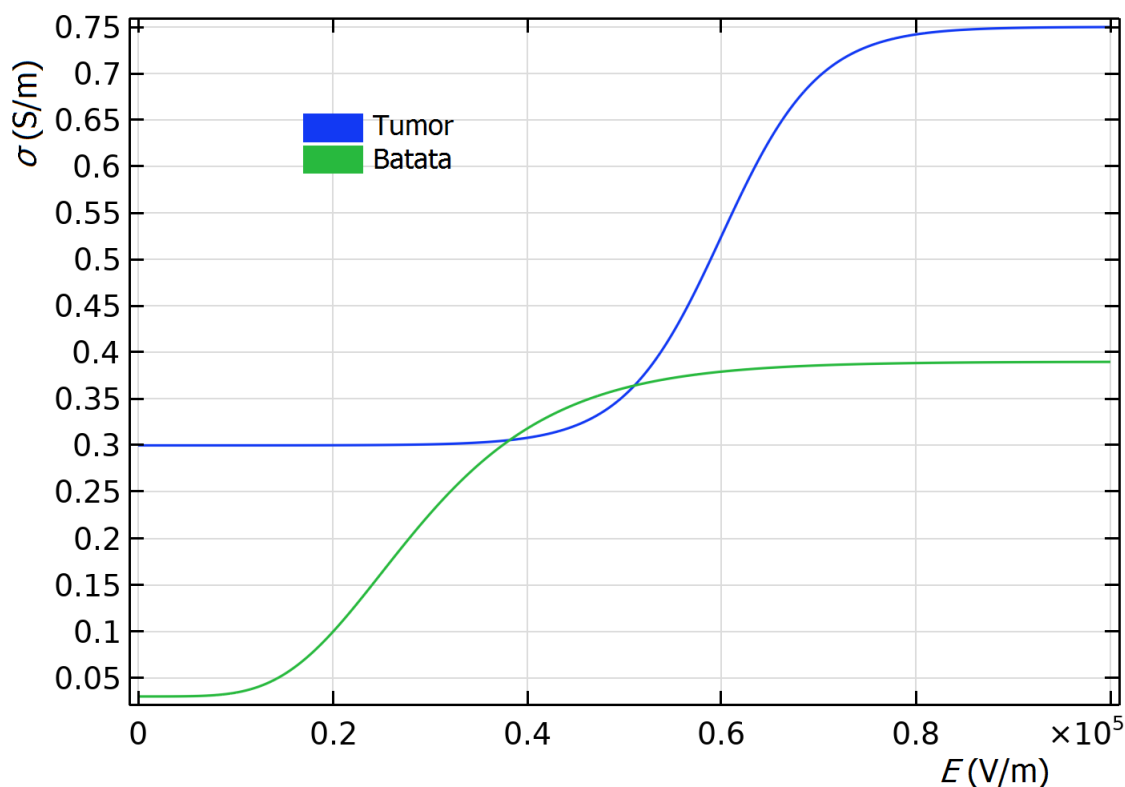
em que σ representa a condutividade elétrica no tecido vegetal (S/m), e E o campo elétrico. Simulações numéricas do modelo de tumor também foram incluídas neste trabalho. A Eq. (4) descreve a função sigmoide.

$$\sigma(E) = \sigma_0 + \frac{\sigma_{max} - \sigma_0}{1 + D \cdot e^{-\frac{E-A}{B}}} \quad (4)$$

em que $A = \frac{E_{IRE} + E_{RE}}{2}$, $B = \frac{E_{IRE} - E_{RE}}{C}$, $C = 8$ e $D = 10$. Os limiares de eletroporação reversível e irreversível são dados por E_{RE} e E_{IRE} , respectivamente. As constantes C e D também são definidas pela função sigmoide apresentada pelo professor Miklavčič e colaboradores (SEL *et al.*, 2005). A Figura 8 mostra as curvas de σ em função do E , geradas a partir da implementação das Eq. (3) e (4) No *Comsol*. Na Tabela 3 são informados os parâmetros do modelo tumoral descrito por (SEL *et al.*, 2005).

A geometria tridimensional para os testes com deflexão consistiu em pares de agulhas de aço inoxidável (AISI 304) de 1 mm de diâmetro e 20 mm de altura (inseridos nos tecidos). Foram replicadas as distâncias da agulha do eletrodo de matriz linear ESOPE (3 mm entre agulhas de mesma polaridade e 4 mm entre polaridades opostas) (MIR *et al.*, 2006). Os pares foram inseridos em um cilindro de 40 mm de altura e 60 mm de diâmetro, com propriedades elétricas dos tecidos correspondentes. As tensões aplicadas foram, de acordo com os campos elétricos escolhidos, 240 V e 400 V para tecido vegetal e 320 V e 400 V para tecido tumoral.

Figura 8 – Curvas de condutividade σ em função do campo elétrico E geradas pelo *software*, e descritas pelos modelos vegetal (curva em verde) e tumoral (curva em azul). As curvas representam a dinâmica de condutividade elétrica nos tecidos decorrente da aplicação de um campo elétrico pulsado, e seus valores absolutos são dependentes das características elétricas intrínsecas aos tecidos.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 3 – Parâmetros elétricos de tecido tumoral utilizados nas simulações do trabalho.

Tecido	σ_0 (S/m)	σ_{max} (S/m)	E_{RE} (kV/m)	E_{IRE} (kV/m)
Tumor	0,30	0,75	40	80

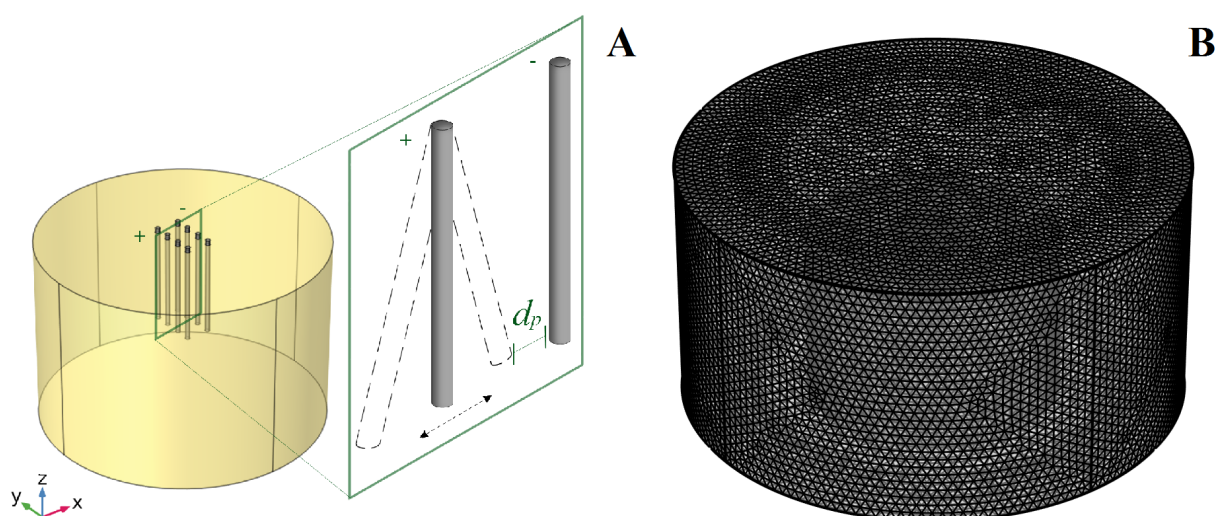
Fonte – (SEL *et al.*, 2005).

Nas simulações, cada agulha anodo foi defletida com passo de $0,5^\circ$, até que as pontas atingissem distâncias extremas. Para aproximação dos pares, a deflexão máxima da agulha resultou em $8,5^\circ$, com d_p mínimo de 1 mm, enquanto a distância máxima correspondia a $d_p=8$ mm, ou $11,5^\circ$.

Em torno dessas geometrias, um bloco de ar foi inserido e considerado de

dimensões infinitas para evitar problemas de condição de contorno nas superfícies da geometria. Cada simulação do *COMSOL*, realizada com malha em configuração extremamente fina, resultou, em média, 3 milhões de elementos tetraédricos. A Figura 9 mostra as geometrias simuladas. A partir das simulações foi possível analisar o fluxo e a densidade de corrente elétrica, e a distribuição de campo elétrico nos tecidos.

Figura 9 – Geometria da simulação numérica. (A) Eletrodo com disposição padrão inserido no tecido. A região ampliada mostra as possíveis direções da deflexão das agulhas anodo (+) (o passo de deflexão simulado foi 0.5°) (B) Malha gerada pelo *COMSOL*.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

3.2 PROCEDIMENTOS *IN VITRO*

Modelos matemáticos de alteração de condutividade são importantes ferramentas de análise da distribuição de campo elétrico. Todavia, esses modelos são validados apenas quando são associados à procedimentos experimentais. Experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in silico* tem como função planejamento do tratamento, validação de eletrodos e até mesmo detectar as limitações do processo.

3.2.1 Análise do *phantom*

Uma etapa importante para validação dos testes com modelos de condutividade inclui certificar-se que o *phantom* possui as características mais semelhantes possíveis como as descritas pelo modelo. O tubérculo da batata (*Solanum tuberosum*), como tecido biológico, é anisotrópico. Devido a isso, ele possui diferenças elétricas (i.e. condutividade) entre as porções internas (OEY *et al.*, 2016). Além disso, é possível

que haja uma variabilidade elétrica entre amostras de uma mesma espécie, resultante das condições que envolvem sua produção (BURLINGAME *et al.*, 2009). Assim, numa primeira etapa analisou-se se a origem do tubérculo influenciaria nos resultados, testando a resposta em condutividade (expressa em corrente elétrica) de batatas não orgânicas (de fácil acesso, sendo adquiridas em supermercados locais e tendo preço mais baixo), comumente utilizadas em experimentação e validação do modelo, em relação à batatas orgânicas (certificadas e de origem rastreável).

Os experimentos foram realizados com 14 amostras do tubérculo de batata, tendo o grupo de origem não orgânica $n=7$, e o grupo de origem orgânica $n=7$. O grupo de origem orgânica (Rio Bonito Orgânicos, Itatinga, Brasil), possui certificação por auditoria e rastreabilidade (código de certificação PPGHO390M0FIHIHB, rastreabilidade disponível na plataforma Paripassu - <https://conecta.paripassu.com.br/>).

O manuseio/tratamento incorreto das amostras geram artefatos que contribuem para a análise equivocada dos resultados. Neste sentido, os tubérculos não foram descascados e receberam a mínima quantidade de cortes, além da secagem das superfícies antes e depois da aplicação dos pulsos como forma de minimizar a presença de artefatos não relacionados ao processo, como por exemplo, as manchas formadas pela dispersão do fluido extra celular para regiões não eletroporadas (OEY *et al.*, 2016).

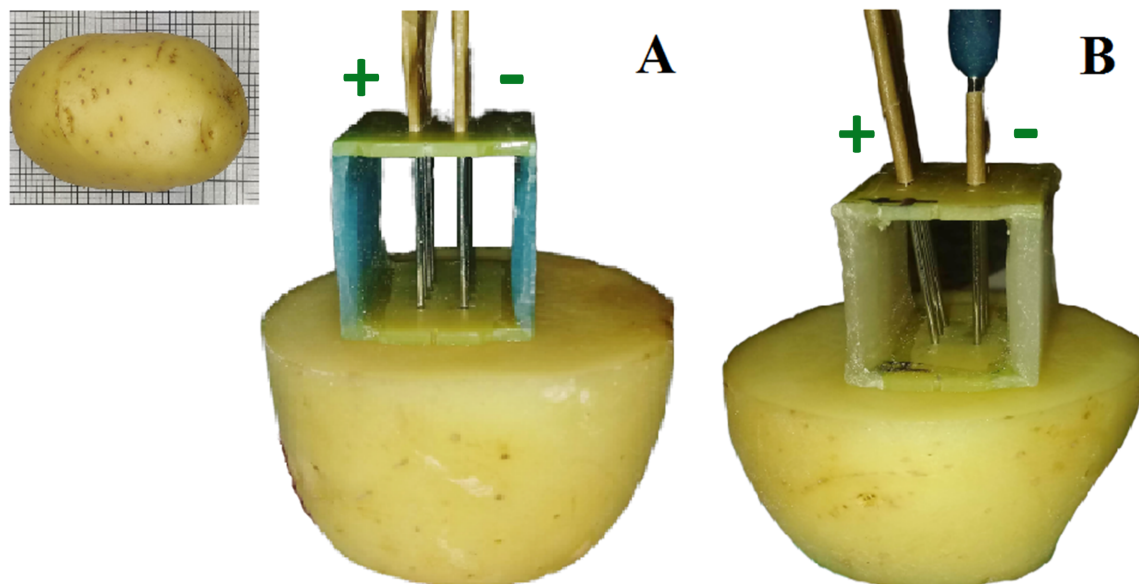
O eletrodo utilizado possuía 1 par de agulhas de aço inoxidável (AISI 304) de 0,7 mm de diâmetro e 18 mm de altura (total inserido nas amostras). O protocolo de aplicação dos pulsos seguiu o padrão ESOPE (8 pulsos quadrados com 100 μ s de duração e 1 Hz de frequência (GEHL *et al.*, 2018)) com tensões de 180 V (40 kV/m), 225 V (50 kV/m) e 315 V (70 kV/m), pelo gerador programável personalizado do IEB-UFSC (PINTARELLI *et al.*, 2019). As medições de corrente foram obtidas do 8º pulso utilizando a ponteira de corrente Tektronix A622 (Tektronix Inc., Estados Unidos) e osciloscópio digital Tektronix TDS 2004C (Tektronix Inc., Estados Unidos).

3.2.2 Deflexão das agulhas

Os experimentos de deflexão foram conduzidos utilizando 320 amostras de tubérculos de batata adquiridos em supermercados locais. Cada grupo d_p obteve 10 amostras. O tratamento das amostras foi realizado tal qual descrito na seção 3.2.1. A Figura 10 mostra o arranjo experimental.

O gerador programável (PINTARELLI *et al.*, 2019) forneceu às amostras o trem de 8 pulsos quadrados com 100 μ s de duração e 1 Hz de frequência (GEHL *et al.*, 2018), com tensões de 240 V e 400 V. Por questões de viabilidade experimental, todas as agulhas anodo foram reposicionadas simultaneamente, desta vez com passo de 1 mm. A medição das correntes também seguiu o padrão do experimento anterior (8º pulso, ponteira Tektronix A622 e osciloscópio Tektronix TDS 2004C (Tektronix Inc.,

Figura 10 – Arranjo experimental para o eletrodo de matriz linear (A) Configuração padrão (sem deflexão), (B) Configuração com $d_p = 2$ mm. Nem todos os arranjos são mostrados.



Fonte – Elaborado pela autora.

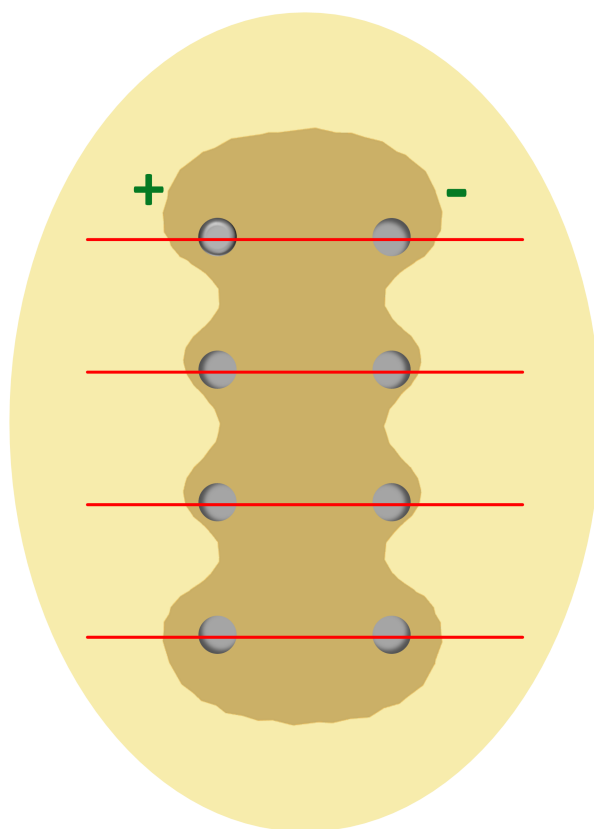
Estados Unidos)). Após aplicação dos pulsos, as amostras foram armazenadas em placas de Petri por 24 horas em 25° C. Passado esse período, cortes perpendiculares à superfície eletroporada foram feitos precisamente no local da inserção dos pares, como mostrado na Figura 11. Imagens das fatias foram feitas sob um sistema de iluminação controlada, com uma câmera digital de 13 MP, f. 2.2 LG M250F (LG, Coreia do Sul).

A indentação na distribuição de campo elétrico causada pela deflexão das agulhas foi calculada utilizando a ferramenta de processamento de imagens *ImageJ* (University of Wisconsin, Estados Unidos). Nesse caso, o eletrodo sem deflexões foi considerado o grupo controle, uma vez que o mesmo representa a configuração do eletrodo do ESOPE. A altura da indentação, ou h dos experimentos *in silico* representa a ausência de escurecimento na batata na região entre os pares do eletrodo. A Figura 12 ilustra o caso. O máximo de valor que h pode alcançar corresponde ao comprimento total da agulha, ou, 20 mm.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

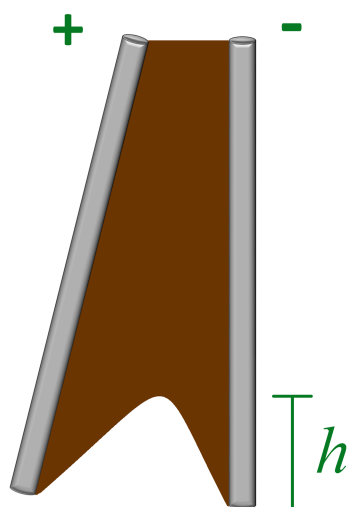
A análise de dados experimentais requer uma validação estatística para que as conclusões obtidas sejam precisas e confiáveis. Nesse sentido, os testes adequados para os dados experimentais deste trabalho foram os testes não pareados (para amostras independentes) e os testes não paramétricos (suposição de distribuição

Figura 11 – Vista superior da superfície da batata com a localização dos cortes representados pelas linhas vermelhas.



Fonte – Elaborado pela autora.

Figura 12 – Representação da indentação h causada pelo afastamento não intencional das agulhas do eletrodo.



Fonte – Elaborado pela autora.

não Gaussiana) (BOX *et al.*, 1978) (MANDEL, 2012). As análises foram realizadas utilizando *software* RStudio versão 1.2 (RStudio Inc, Estados Unidos).

Os resultados experimentais foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se os dados amostrais tinham distribuição normal (SHAPIRO; WILK, 1965). Se positivo, esses resultados seriam expressos como seus valores médios e serem adequadamente comparados, entre experimentos ou entre simulação e experimento. Para estes casos, o teste *t* de *Student* não pareado foi aplicado para comparações entre experimentos ou entre experimento e simulação.

Assim, o teste *t* de *Student* não pareado foi conduzido entre os resultados experimentais de corrente na análise do *phantom*, como também entre valores simulados e experimentais de corrente na análise das deflexões, testando a diferença estatística entre grupos. O nível de significância, ou valor *p*, usado foi de 5% ($p = 0,05$). Além disso, considerando os erros associados ao gerador de pulsos e ao equipamento de medição, foram calculados o erro relativo e o intervalo de confiança (95%).

Para grupos sem distribuição normal, foi aplicado o teste estatístico de *Kruskal Wallis*. Este teste não paramétrico é usado para determinar se há diferenças estatísticas significativas entre três ou mais medianas amostradas para dados não normalmente distribuídos (KRUSKAL; WALLIS, 1952), como em todos os grupos experimentais de análise *h*, com a única exceção do grupo controle, que tem um valor absoluto. Subsequentemente, o teste *posthoc* de Dunn foi aplicado para encontrar, usando comparação por pares, a diferença detectada pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados são mostrados nos Resultados (Capítulo 4) pelas seguintes notações:

- *ns* - sem diferença significativa ($p > 0,05$);
- * - baixa diferença significativa ($p \leq 0,05$);
- ** - moderada diferença significativa ($p \leq 0,01$); e
- *** - alta diferença significativa ($p \leq 0,001$)

4 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os dados resultantes da aplicação da Metodologia (Capítulo 3). A apresentação dos resultados está dividida da seguinte forma:

- Efeitos da aproximação das agulhas pela análise da curva de aumento da corrente elétrica;
- Efeitos do afastamento das agulhas pela análise da distribuição de campo elétrico; e
- Avaliação do modelo vegetal baseado nos resultados estatísticos das correntes elétricas.

Os resultados experimentais em corrente elétrica dos dois grupos de batata submetidos aos campos descritos nos métodos podem ser vistos na Tabela 4. Ambos os grupos apresentaram distribuição normal, e o resultado do teste *t* mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos. Por este motivo, os resultados experimentais seguintes provêm das batatas não orgânicas.

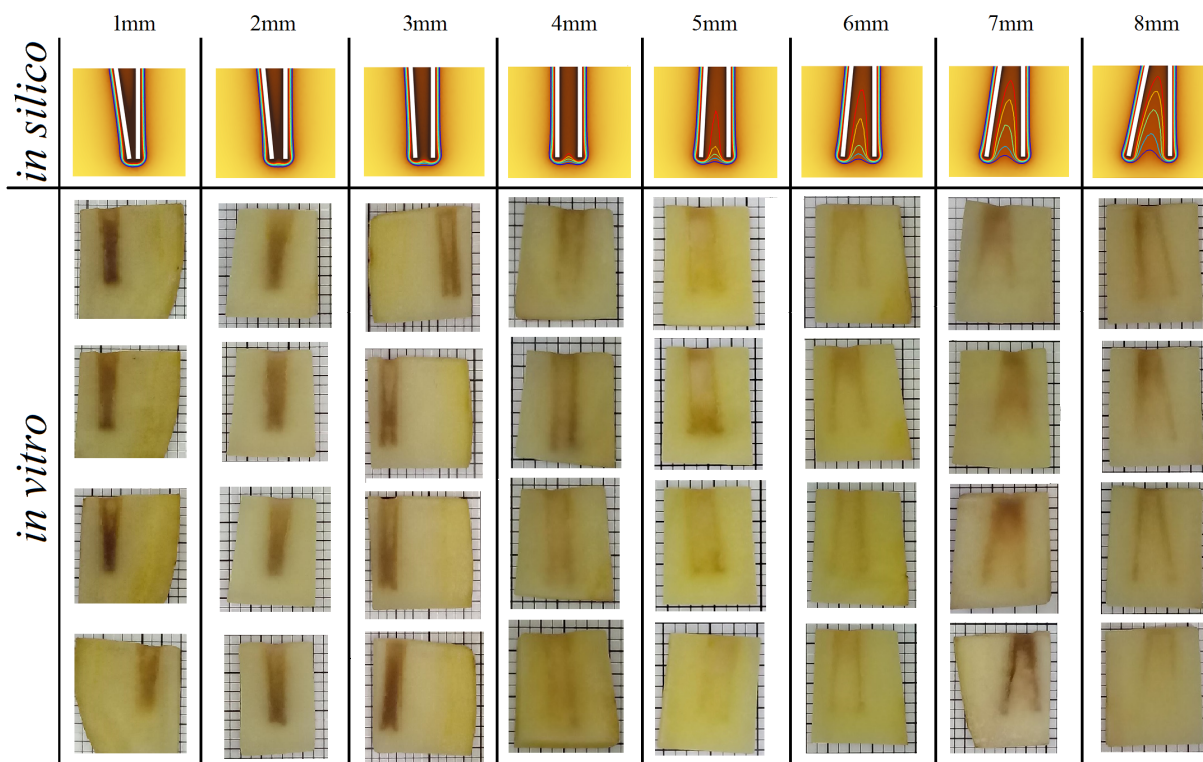
Tabela 4 – Resultados experimentais de corrente resultante da aplicação dos pulsos de EP em batatas não orgânicas e orgânicas. A significância representa o resultado do teste *t* para diferença estatística entre os grupos. $n = 7$.

Campo elétrico	Não orgânica <i>médias e I. C. 95%</i> <i>desvio padrão</i>	Orgânica (rastreável) <i>médias e I. C. 95%</i> <i>desvio padrão</i>	Significância	p-valor
40 kV/m	0,72 (0,61 - 0,84) A 0,1229	0,64 (0,59 - 0,69) A 0,05877	ns	0,1360
50 kV/m	1,21 (1,04 - 1,38) A 0,1860	1,15 (1,11 - 1,19) A 0,03901	ns	0,4152
70 kV/m	2,12 (2,00 - 2,23) A 0,1631	2,23 (2,17 - 2,29) A 0,06376	ns	0,1110

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados das simulações *in silico*, para os casos de deflexão d_p , na qual observa-se a distribuição de campo elétrico no tecido vegetal (linhas coloridas). Uma tendência similar de distribuição pode ser vista nas fatias experimentais. São apresentadas amostras apenas dos grupos de 4 pares (**B** e **D**), devido similaridade das imagens das fatias com os grupos de 3 pares e mesma tensão aplicada (**A** e **C**, respectivamente).

Figura 13 – Distribuição de campo elétrico para as os testes *in silico* e *in vitro* no tecido vegetal. As imagens das simulações exibem as linhas de campo elétrico (de azul a vermelho, 20 - 40 kV/m). Grupo **B** (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz).



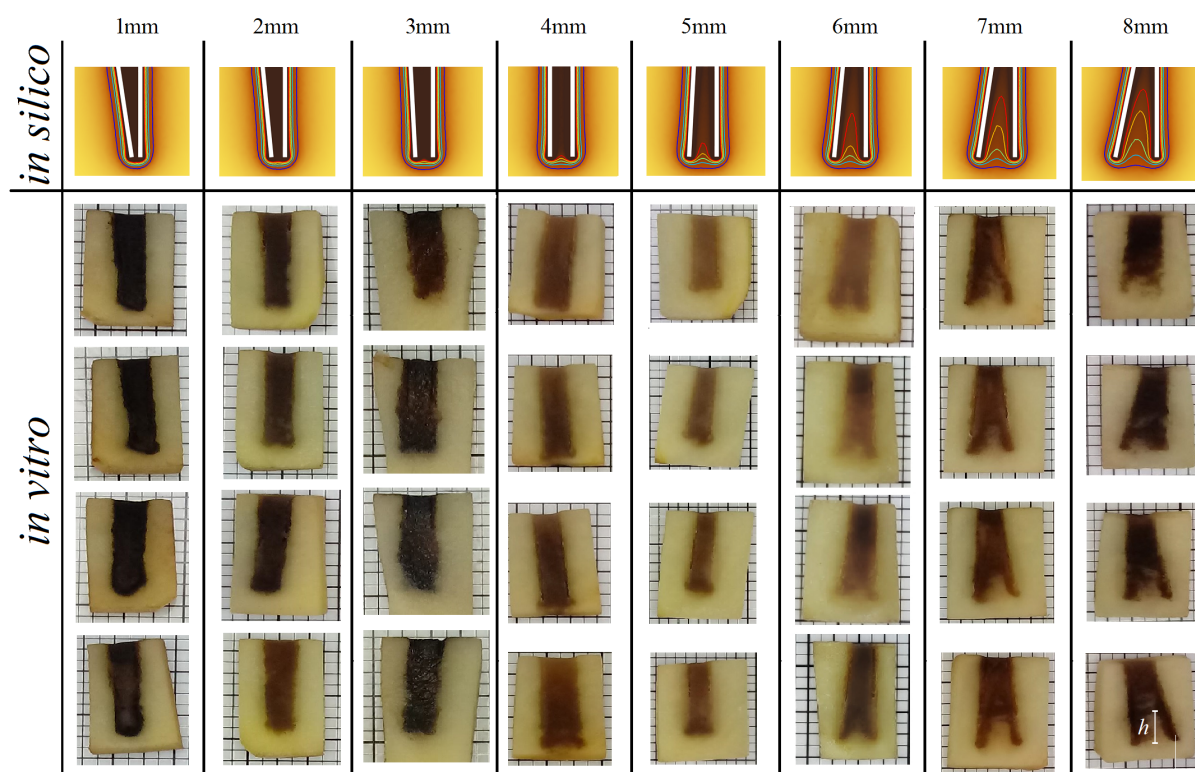
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

4.1 EFEITOS DE APROXIMAÇÃO

O aumento percentual de corrente elétrica resultante da aproximação das agulhas no tecido vegetal (grupos **A**, **B**, **C** e **D**) é apresentado nos *insets* das Figuras 15 e 16. Os pontos representam os resultados simulados. Os percentuais de aumento foram calculados em relação aos valores de corrente resultante do eletrodo sem deflexões. Já os resultados experimentais (quantidade máxima de pares aproximados simultaneamente) são mostrados nos *boxplots* da porção ampliada do gráfico. A linha contínua representa a tendência de aumento *in silico*.

Os resultados *in silico* para tecido tumoral são mostrados na Figura 17. Os pontos vermelhos indicam as situações de aproximação (valor d_p e quantidade de pares aproximados) nas quais as correntes ultrapassam o limite suportado pelo equipamento eletroporador *Cliniporator*TM(20 A). Os valores basais de corrente foram de 10,98 A (Grupo **E**), 13,85 A (Grupo **F**), 15,61 A (Grupo **G**) e 19,12 A (Grupo **H**). A Figura 18 mostra as alterações na densidade de corrente e na distribuição do campo elétrico no

Figura 14 – Distribuição de campo elétrico para as os testes *in silico* e *in vitro* no tecido vegetal. As imagens das simulações exibem as linhas de campo elétrico (de azul a vermelho, 20 - 60 kV/m). Grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz).



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

plano de inserção de um par de agulhas. Foram observados valores de campo acima dos 150 kV/m em regiões de maior área para d_p de aproximação a partir de 2 mm.

4.2 EFEITOS DE AFASTAMENTO

A Tabela 5 mostra os resultados *in silico* da indentação h para as configurações de afastamento das agulhas no tecido vegetal. Os valores representam a indentação para intensidades de campo abaixo de 40 kV/m.

A análise experimental de h dos grupos **A** e **B** (60 kV/m) não foi realizada devido ausência de distribuição de campos elétricos elevados o bastante para distinção efetiva das marcações nas fatias da batata. Para estes grupos, foram feitas as análises das correntes elétricas (seções 4.1 e 4.3).

A configuração padrão do eletrodo ($d_p = 4$ mm) não obteve indentação em ambos os testes *in silico* e *in vitro* para os grupos **C** e **D** (100 kV/m). Os resultados de h nas fatias *in vitro* são mostrados na Figura 19. Foram observadas indentações com

Tabela 5 – Indentação *h in silico* resultante do afastamento dos pares das agulhas no tecido vegetal. Grupo **A** (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **B** (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **C** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), d_p (distância entre as pontas do pares de agulha). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

Grupo d_p	A (mm)	B (mm)	C (mm)	D (mm)
4 mm	0,0	0,0	0,0	0,0
5 mm	10,6	10,3	0,0	0,0
6 mm	15,2	14,8	0,6	0,7
7 mm	17,3	17,3	2,8	2,5
8 mm	18,1	18,0	4,2	4,5

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

distâncias d_p a partir de 5 mm, e maior variabilidade de indentação para d_p a partir de 6 mm.

A Figura 20 apresenta as os valores de indentação em faixas percentuais. Em $d_p = 5$ mm, 87,5% e 86,6% das fatias não tiveram indentação, $h = 0$ mm. As outras fatias obtiveram h máximo de 5 mm. Uma maior variabilidade do h foi observada em d_p maiores; em 6 mm, apenas 55,5% e 53,3% das fatias não apresentaram indentação; para $d_p = 7$ mm, apenas 12,5% e 16,6% do total das fatias tinham $h = 0$. Todas as fatias de $d_p = 8$ mm apresentaram indentação. As porcentagens citadas referem-se aos grupos **C** e **D**, respectivamente.

Com exceção da configuração padrão, nenhuma outra configuração d_p *in silico* de afastamento apresentou distribuição normal. Desta forma, os resultados *in vitro* foram comparados entre si, sendo a configuração $d_p = 4$ mm o grupo controle. O teste de *Kruskal-Wallis* apontou que as medianas das configurações variaram significativamente (p -valor $<0,0001$). As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados do teste *post-hoc* de *Dunn* das comparações dois a dois, no qual observa-se que, estatisticamente, não existe diferença entre as configurações d_p 4 e 5 mm para ambos os grupos **C** e **D** (p -valor $>0,05$). Apenas no grupo **C**, também não houve significância entre d_p de 4 e 6 mm. Ainda, são apresentados os resultados do teste das outras possibilidades de comparação.

Os resultados de indentação *in silico* para o tecido tumoral (grupos de **E** a **H**) são mostrados na Tabela 8 e referem-se à distribuição de campo abaixo do limiar de 50 kV/m. Para ilustrar, a Figura 21 mostra as indentações *in silico* do grupo **H**, no qual nota-se a perturbação do campo elétrico em d_p superior a 6 mm.

Tabela 6 – Teste *post-hoc* para as configurações experimentais de afastamento das agulhas. Grupo **C** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

Comparação	Significância	p-valor
4 mm vs. 5 mm	ns	>0,9999
4 mm vs. 6 mm	ns	0,0525
4 mm vs. 7 mm	***	<0,0001
4 mm vs. 8 mm	***	<0,0001
5 mm vs. 6 mm	ns	0,2498
5 mm vs. 7 mm	***	<0,0001
5 mm vs. 8 mm	***	<0,0001
6 mm vs. 7 mm	ns	0,0502
6 mm vs. 8 mm	***	<0,0001
7 mm vs. 8 mm	**	0,0307

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 7 – Teste *post-hoc* para as configurações experimentais de afastamento das agulhas. Grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

Comparação	Significância	p-valor
4mm vs. 5mm	ns	>0,9999
4mm vs. 6mm	**	0,0053
4mm vs. 7mm	***	<0,0001
4mm vs. 8mm	***	<0,0001
5mm vs. 6mm	**	0,0398
5mm vs. 7mm	***	<0,0001
5mm vs. 8mm	***	<0,0001
6mm vs. 7mm	ns	0,0502
6mm vs. 8mm	***	<0,0001
7mm vs. 8mm	ns	>0,9999

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

4.3 AVALIAÇÃO DO MODELO VEGETAL

As tabelas 9, 10, 11 e 12 mostram os resultados, para os grupos de **A** a **D**, das correntes elétricas das simulações *in vitro* e médias (com intervalo de confiança de 95%) dos experimentos *in silico* de todas as configurações d_p do eletrodo no tecido vegetal. O erro relativo configura a relação experimento-simulação, e os p-valores indicam os resultados do Teste *t* não pareado. As linhas em cinza indicam em quais configurações d_p o modelo foi validado, ou seja, não houve significância estatística

Tabela 8 – Indentação *h in silico* resultante do afastamento dos pares das agulhas no tecido tumoral. Grupo **E** (3 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **F** (4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **G** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), grupo **H** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s, 1 Hz), d_p (distância entre as pontas do pares de agulha). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

Grupo d_p	E (mm)	F (mm)	G (mm)	H (mm)
4 mm	0,0	0,0	0,0	0,0
5 mm	0,8	0,8	0,0	0,0
6 mm	8,2	7,1	0,0	0,0
7 mm	11,8	10,7	3,9	3,6
8 mm	13,9	13,3	7,6	7,7

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

entre a média experimental e o modelo numérico de condutividade do vegetal. Na configuração $d_p = 4$ mm não houve diferença estatística entre os pares *in silico* e *in vitro* para todos os grupos.

Tabela 9 – Correntes elétricas resultantes dos testes *in vitro* e *in silico* do modelo vegetal. Grupo **A** (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

d_p	<i>In silico</i>	Médias <i>in vitro</i> (I. C. 95%)	Erro relativo	p-valor
1 mm	9,01 A	8,38 (7,83 - 8,92) A	-7,03%	0,0170
2 mm	7,57 A	7,368 (6,90 - 7,83) A	-2,62%	0,3492
3 mm	6,96 A	6,44 (6,04 - 6,84) A	-7,48%	0,0090
4 mm	6,45 A	6,03 (5,58 - 6,48) A	-6,49%	0,0512
5 mm	6,18 A	5,89 (5,57 - 6,20) A	-4,63%	0,0560
6 mm	5,89 A	5,44 (5,17 - 5,712) A	-7,57%	0,0015
7 mm	5,63 A	4,70 (4,51 - 4,89) A	-16,57%	<0,0001
8 mm	5,24 A	4,57 (4,32 - 4,83) A	-12,69%	<0,0001

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 10 – Correntes elétricas resultantes dos testes *in vitro* e *in silico* do modelo vegetal. Grupo **B** (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

d_p	<i>In silico</i>	Médias <i>in vitro</i> (I. C. 95%)	Erro relativo	p-valor
1mm	11,54 A	11,38 (10,75 - 12) A	-1,43%	0,5479
2mm	9,63 A	9,12 (8,83 - 9,41) A	-5,28%	0,0008
3mm	8,64 A	7,96 (7,3 - 8,62) A	-7,83%	0,0324
4mm	7,97 A	7,77 (7,11 - 8,43) A	-2,55%	0,4959
5mm	7,37 A	6,72 (6,29 - 7,15) A	-8,73%	0,0032
6mm	7,00 A	6,51 (6,19 - 6,83) A	-7,03%	<0,0001
7mm	6,64 A	5,69 (5,23 - 6,16) A	-14,2%	<0,0001
8mm	6,37 A	5,34 (5,07 - 5,62) A	-16,12%	<0,0001

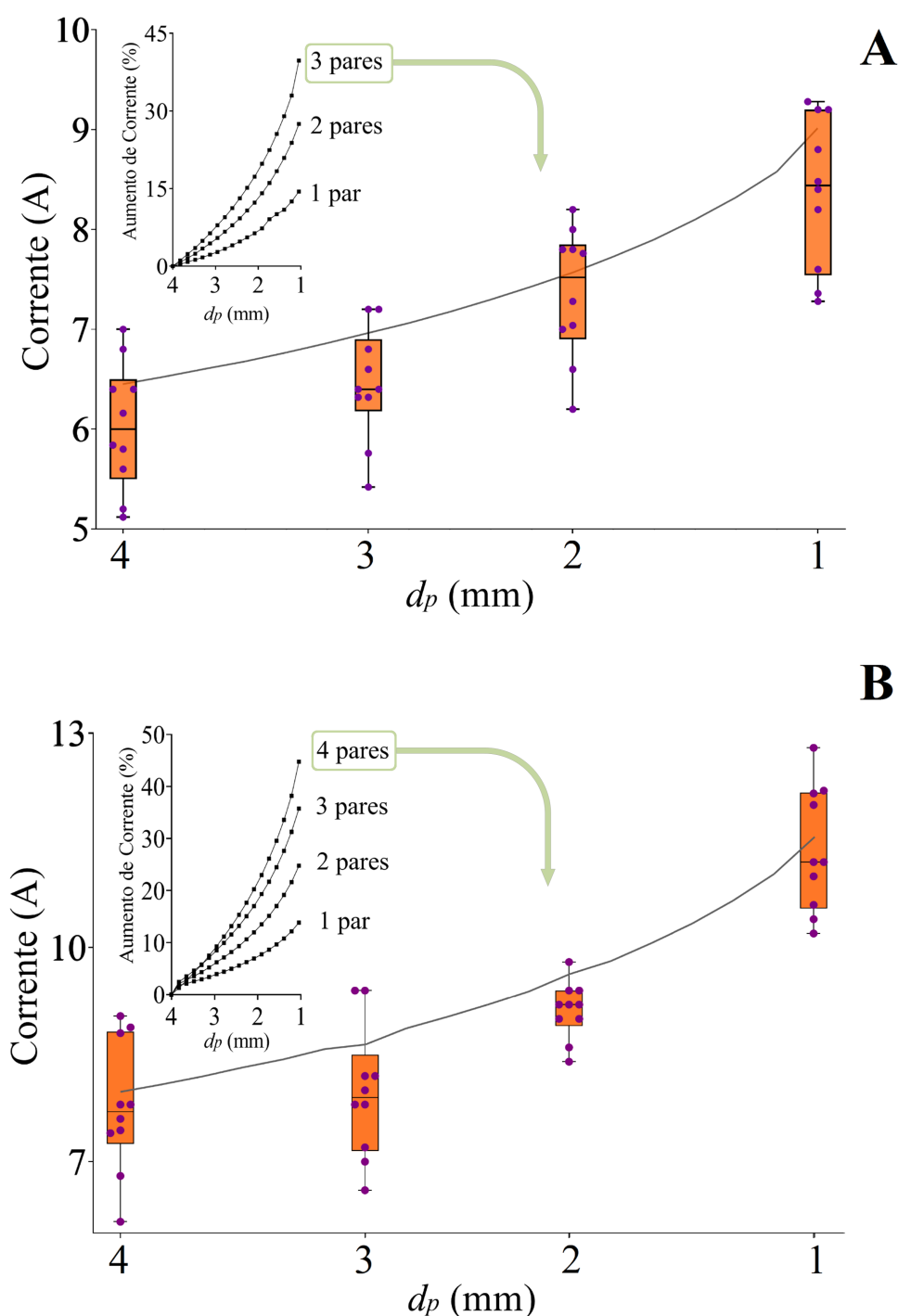
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 11 – Correntes elétricas resultantes dos testes *in vitro* e *in silico* do modelo vegetal. Grupo **C** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

d_p	<i>In silico</i>	Médias <i>in vitro</i> (I. C. 95%)	Erro relativo	p-valor
1mm	15,04 A	16,62 (16,06 - 17,18) A	10,51%	<0,0001
2mm	12,89 A	13,47 (12,71 - 14,23) A	5,23%	0,1040
3mm	11,76 A	12,18 (11,35 - 13) A	3,55%	0,2676
4mm	10,99 A	10,68 (10,34 - 11,02) A	-2,81%	0,0527
5mm	10,36 A	9,84 (9,24 - 10,43) A	-5,05%	0,0621
6mm	9,83 A	9,54 (9,07 - 10,01) A	-2,95%	0,1824
7mm	9,41 A	9,3 (8,95 - 9,65) A	-1,14%	0,4989
8mm	8,75 A	8,87 (8,59 - 9,14) A	1,35%	0,3421

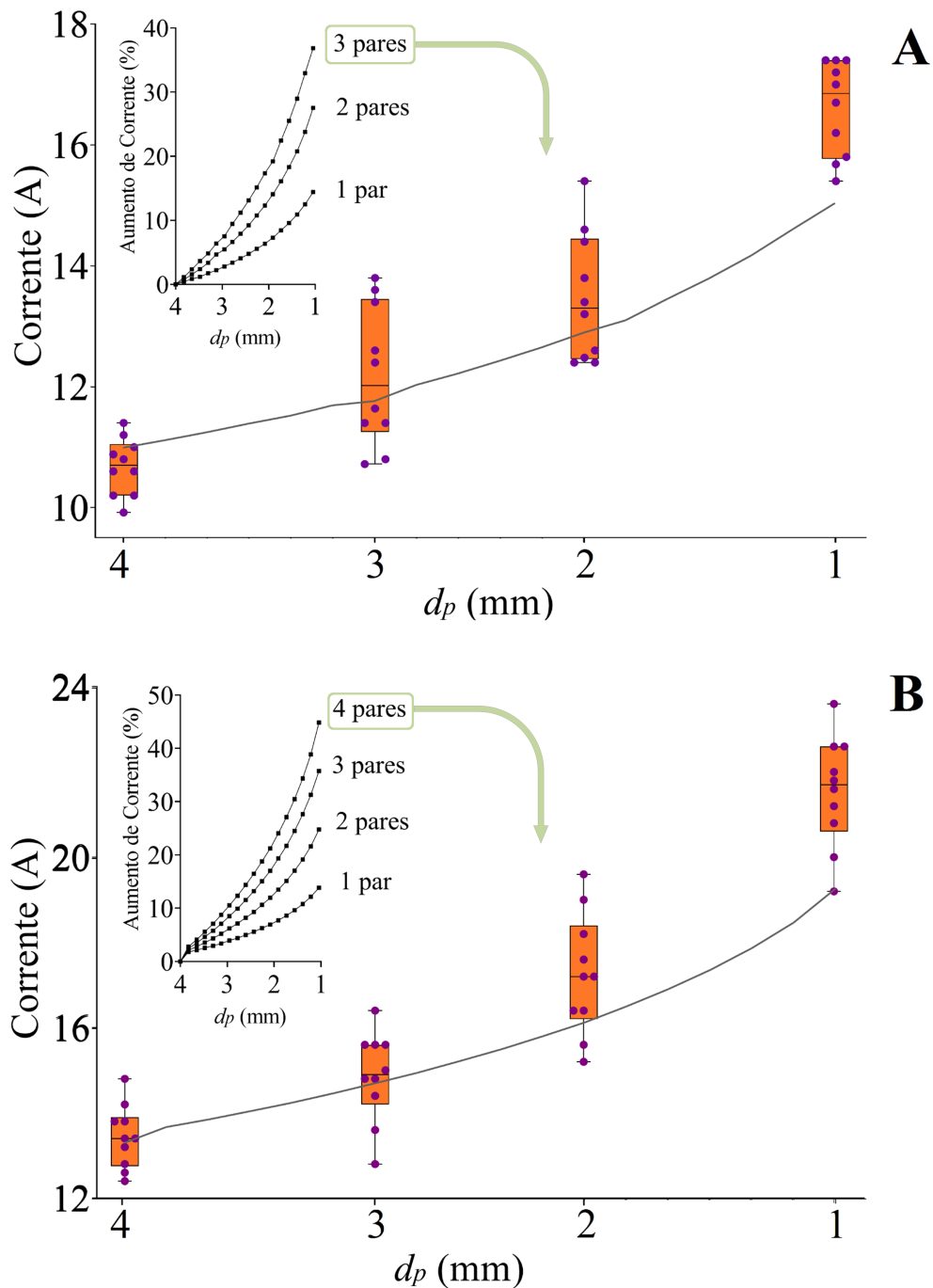
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 15 – Correntes elétricas resultantes dos testes para aproximação d_p das agulhas em tecido vegetal. O *inset* apresenta o aumento percentual *in silico*. O gráfico ampliado contém os resultados *in vitro* (boxplots e dados individuais) e *in silico* (linha contínua) da quantidade máxima de pares sendo aproximados. (A) Grupo **A** (3 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo **B** (4 pares, 60 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.



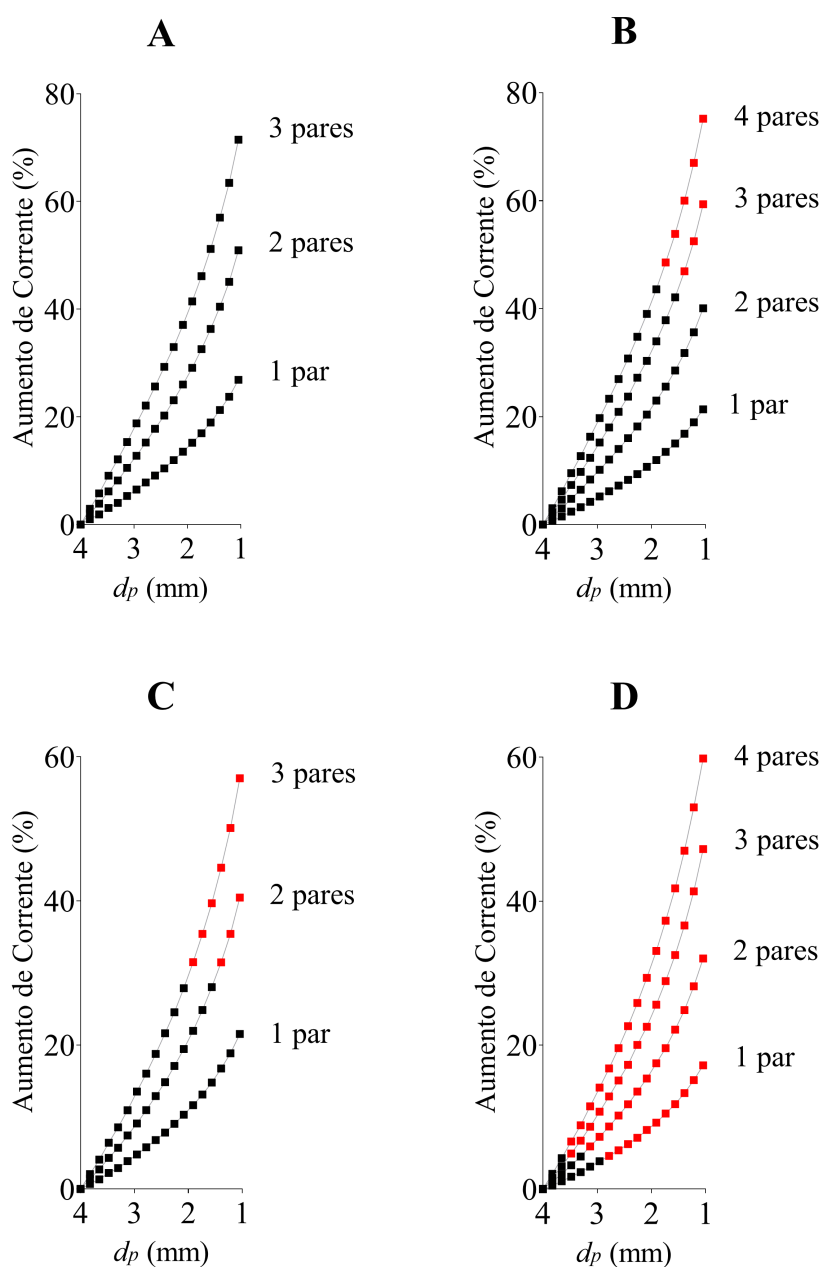
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 16 – Correntes elétricas resultantes dos testes para aproximação d_p das agulhas em tecido vegetal. O *inset* apresenta o aumento percentual *in silico*. O gráfico ampliado contém os resultados *in vitro* (boxplots e dados individuais) e *in silico* (linha contínua) da quantidade máxima de pares sendo aproximados. (A) Grupo C (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo D (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.



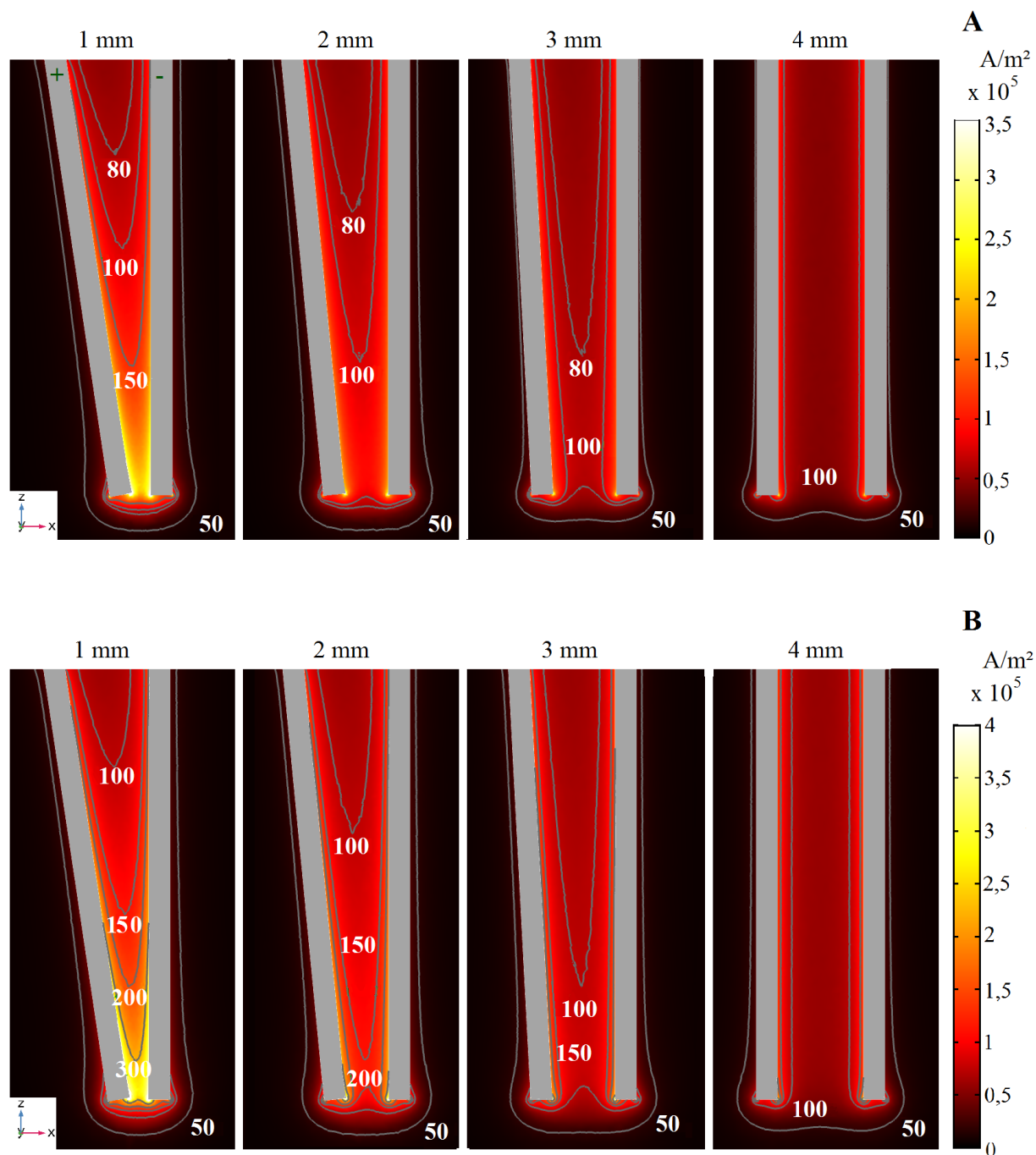
Fonte – Elaborado pela autora.

Figura 17 – Aumento percentual de corrente elétrica resultante da aproximação dos eletrodos para tecido tumoral *in silico*. Os 'pontos 0' dos gráficos correspondem aos valores de corrente para os casos sem deflexão. Destacam-se, em vermelho, as situações nas quais a corrente excedeu 20 A. (A) Grupo E (3 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (B) Grupo F (4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (C) Grupo G (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz), (D) Grupo H (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência de 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.



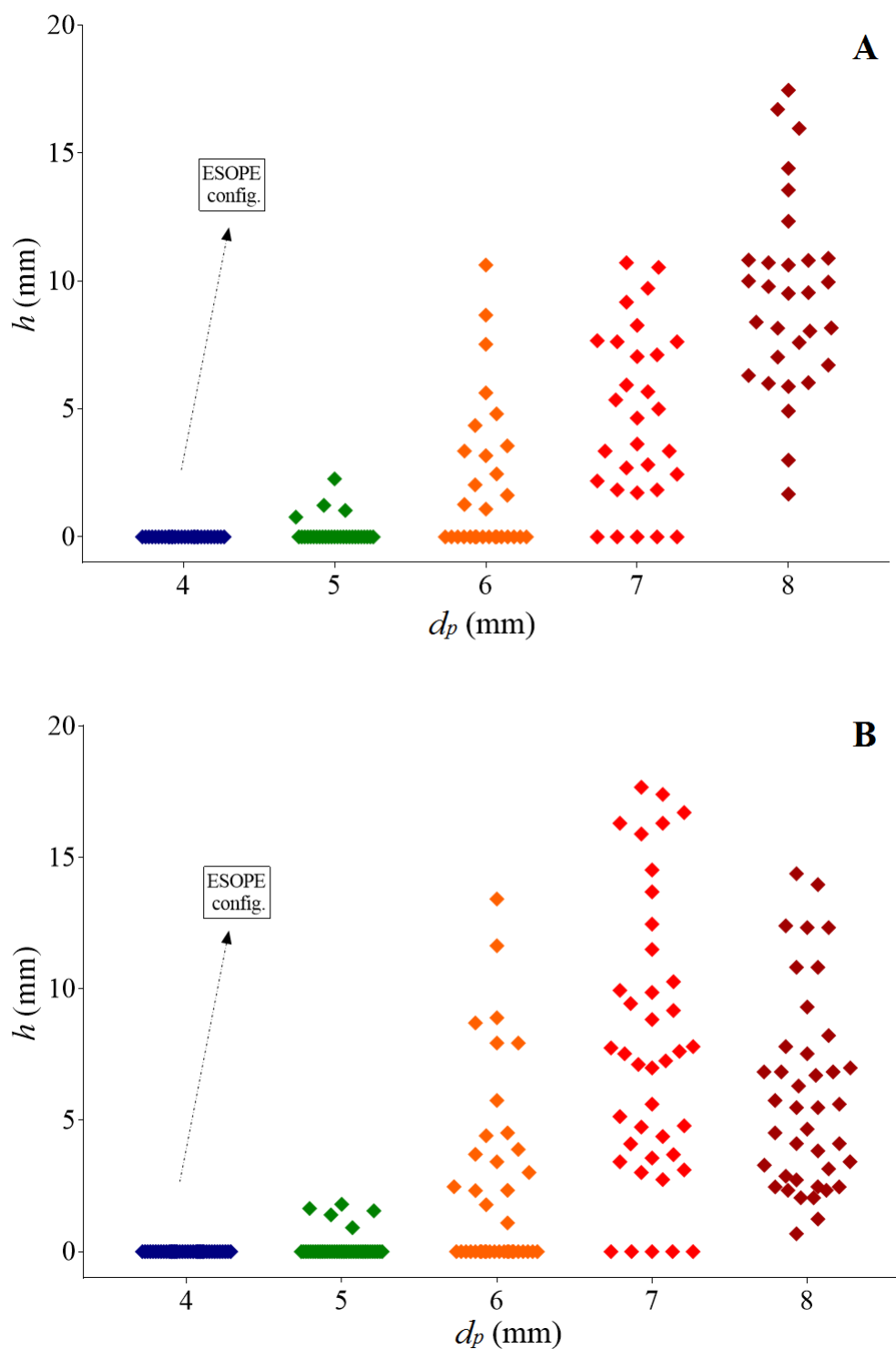
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 18 – Densidade de corrente e intensidades de campo elétrico (linhas cinza) *in silico* do tecido tumoral. (A) Grupos **E/F** (3/4 pares, 80 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupos **G/H** (3/4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz).



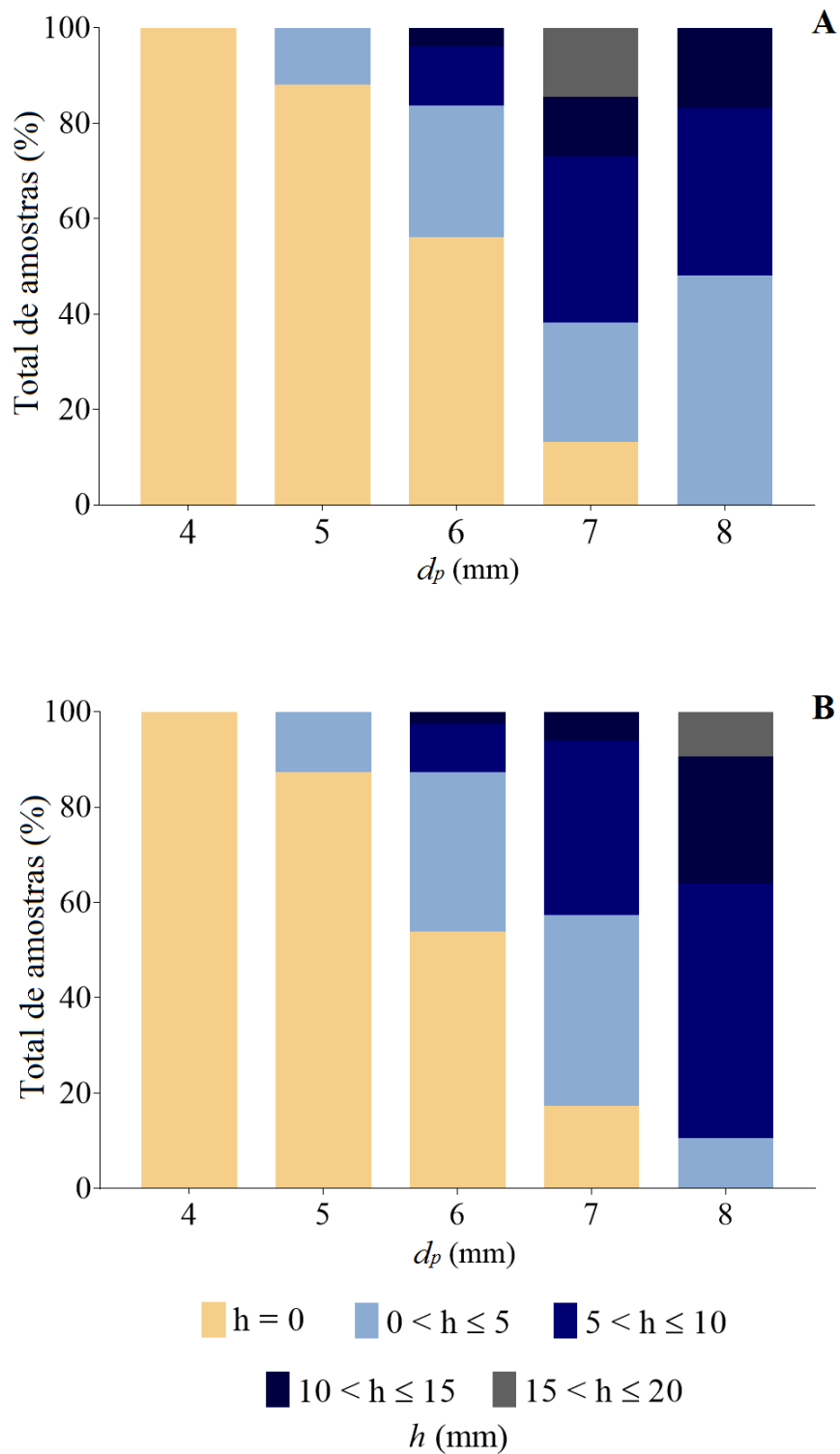
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 19 – Indentação h nas fatias do tecido vegetal dado afastamento das agulhas.
 (A) Grupo **C** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz),
 (B) Grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz).
 d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.



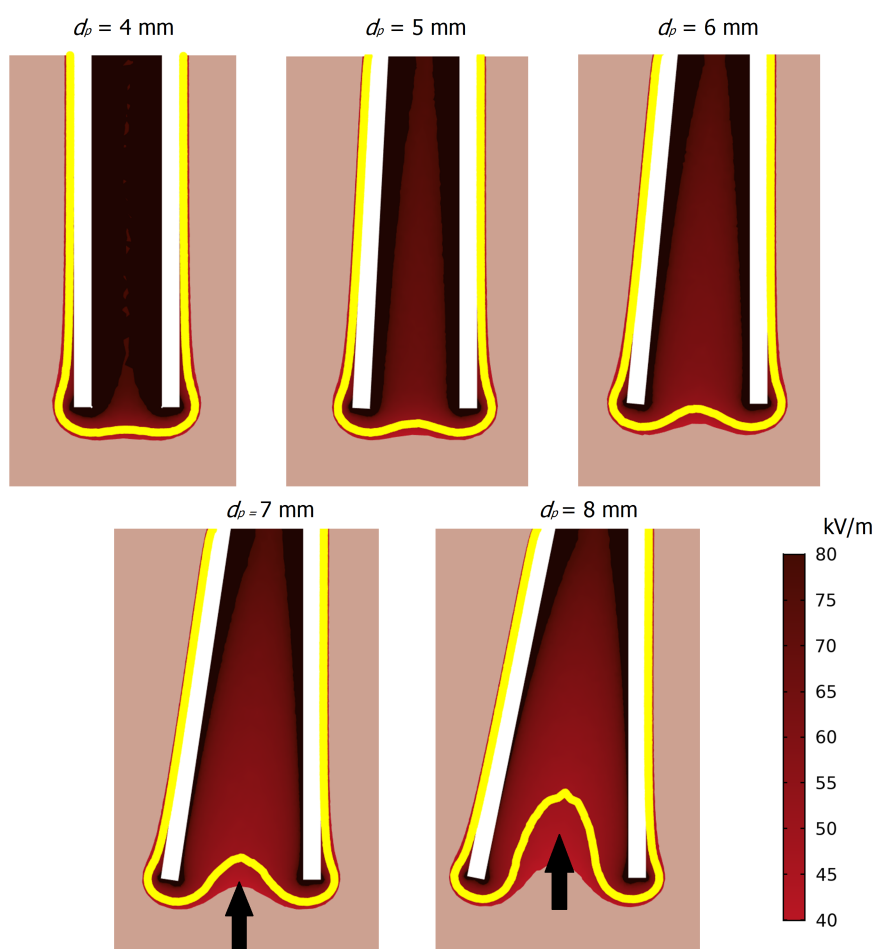
Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 20 – Faixas de indentação h das fatias amostrais do tecido vegetal devido distanciamento das pontas das agulhas. (A) Grupo **C** (3 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz), (B) Grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Figura 21 – Distribuição de campo elétrico *in silico* no tecido tumoral acusando indentação h na porção inferior de inserção das agulhas para os d_p 7 e 8 mm. A linha de campo em amarelo (50 kV/m), representa o limiar mínimo de segurança (permeabilização permanente) em procedimentos com EQT. As setas em preto indicam as indentações de campo.



Fonte – Elaborado pela autora (2020).

Tabela 12 – Correntes elétricas resultantes dos testes *in vitro* e *in silico* do modelo vegetal. Grupo **D** (4 pares, 100 kV/m, 8 pulsos de 100 μ s e frequência 1 Hz). d_p representa a distância entre pontas dos pares de agulhas.

d_p	<i>In silico</i>	Médias <i>in vitro</i> (I. C. 95%)	Erro relativo	p-valor
1mm	19,25 A	21,54 (20,61 - 22,47) A	11,88%	<0,0001
2mm	16,07 A	17,24 (16,23 - 18,25) A	7,27%	0,0176
3mm	14,46 A	14,86 (14,1 - 15,62) A	2,73%	0,2533
4mm	13,32 A	13,44 (12,91 - 13,97) A	0,92%	0,6061
5mm	12,29 A	12,54 (11,48 - 13,6) A	1,96%	0,6126
6mm	11,69 A	11,44 (10,82 - 12,06) A	-2,19%	0,3635
7mm	11,08 A	10,38 (9,851 - 10,91) A	-6,33%	0,0076
8mm	10,64 A	10,07 (9,769 - 10,38) A	-5,38%	0,0005

Fonte – Elaborado pela autora (2020).

5 DISCUSSÃO

Uma Eletroquimioterapia bem sucedida é resultado da permeabilização das células tumorais decorrente da distribuição correta do campo elétrico na região. Para que isto ocorra, o posicionamento correto dos eletrodos no tecido precisa ser mantido. A deflexão das agulhas em eletrodos para tratamentos com EQT configura um problema relevante, sendo alertado por alguns trabalhos anteriores. (MIR *et al.*, 2006) afirma que, caso as agulhas desviem de sua posição normal durante o tratamento, os pulsos elétricos devem ser reaplicados. Repetir o protocolo de EP diversas vezes no mesmo local, além de percorrer a extensão do tumor reposicionando o eletrodo são dois procedimentos comuns nos tratamentos de EQT (MIR *et al.*, 2006) (QUAGLINO *et al.*, 2008) (MATTHIESSEN *et al.*, 2012).

(MIKLAVČIČ *et al.*, 2006), analisando a distribuição do campo elétrico em vários tecidos, determinou um potencial elétrico mínimo para aplicação dos pulsos em diferentes tipos de células como uma tentativa de compensar as possíveis deflexões das agulhas durante o tratamento. Embora este tenha sido um relevante trabalho sobre o tema, resultados quantitativos são necessários para avaliar os limites da eficácia do tratamento com EQT. Neste sentido, (CAMPANA *et al.*, 2019) expressou resultados mais detalhados para os efeitos que ocorrem pela aproximação do par de agulhas. Por meio de simulações numéricas e experimentos com tubérculos de batata, foi possível detectar a distribuição não linear de campo elétrico na região entre as agulhas pela aproximação das pontas em 5°, 10° e 30° com 1 e 2 cm de distância inicial. Como resultado, campos elétricos extremos ocorreram na porção de aproximação das agulhas. Resultados similares de distribuição do campo elétrico foram observados neste trabalho.

No processo de modelagem do *phantom* (batata), quase sempre é considerado que o tecido tem características homogêneas (IVORRA *et al.*, 2010) (SUÁREZ *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se que sua estrutura fisiológica possui características elétricas heterogêneas. A batata, por ser um material anisotrópico, é composta por diferentes tecidos internos com diferentes propriedades físicas e elétricas, que não devem ser ignorados na avaliação da distribuição do campo elétrico (OEY *et al.*, 2016). Ainda, considera-se a variabilidade de entre batatas, fator que depende, por exemplo, do tipo, temperatura e teor de sais minerais do solo e de nutrientes presentes nos tubérculos, fatores que afetam sua condutividade elétrica (BURLINGAME *et al.*, 2009). Apesar da variabilidade amostral neste quesito, os resultados experimentais da Tabela 4 mostraram que esses fatores não influenciam de forma significativa nos resultados da dinâmica de condutividade experimental em relação ao modelo de (IVORRA *et al.*, 2010) para EP, visto que as médias de corrente possuem igualdade estatística. Este fato sugere uma reprodutibilidade nos resultados dos testes de EP ao utilizar amostras

da espécie *Solanum tuberosum* de diferentes origens.

5.1 EFEITOS DE APROXIMAÇÃO

Um crescimento exponencial da corrente elétrica no tecido da batata foi observado nas simulações *in silico*, e tal comportamento pôde ser validado pelos experimentos *in vitro* para situações de aproximação entre as agulhas. É importante destacar que os resultados apresentados pelos *boxplots* das Figuras 15 e 16 representam a zona aceitável experimental, no qual deve-se ser considerada a variabilidade do tecido e os erros associados aos equipamentos, fatores não considerados pelas simulações.

A Figura 16 ($E = 100\text{kV/m}$) mostra que as correntes elétricas experimentais apresentaram erro relativo acima de 10% para d_p de 1 mm. Este comportamento pode ser explicado pelas alterações fisiológicas do tecido sob um campo elétrico extremamente alto (acima de 200 kV/m), situação não mais relacionada ao fenômeno da eletroporação. Esse platô das mudanças de condutividade dos tecidos em 200 kV/m já foi observado anteriormente (NEAL II *et al.*, 2012). Intensidades de campo elétrico acima daquelas previstas para a configuração sem deflexão *in silico* foram observadas também no tecido tumoral. Os resultados da Figura 18 identificam campos elétricos acima de 200 kV/m na porção mais profunda da inserção do eletrodo com $d_p=1$ mm e 100 kV/m aplicados. Como efeito resultante da eletroporação, esperam-se campos mais elevados em regiões próximas às agulhas, mas quando sua distribuição abrange uma área maior, pode ocorrer a ablação não desejada no tecido, resultando em necrose local.

Outro problema inerente aos resultados de aproximação das agulhas relaciona-se à segurança elétrica dos procedimentos com EQT. Os eletroporadores da *Igea*, equipamentos comerciais para tratamentos de EQT em humanos, suportam uma corrente máxima de 20 A quando utilizado o eletrodo de matriz linear com distâncias padronizadas (3 mm x 4 mm) (ver Apêndice A) (STAAL; GILBERT, 2011) (BERTACCHINI, 2017). As simulações numéricas de tumor mostraram que a corrente excede esse limite de diversas formas diferentes. Para o grupo **H** (Figura 17D) em específico, o limite de corrente é alcançado se $d_p < 3$ mm em apenas 1 dos 4 pares de agulhas, ou se $d_p \approx 3$ mm em 2 pares. Nesses casos, a aplicação da EQT pode ser abruptamente interrompida devido ao desligamento do equipamento. As simulações de tumor também mostraram que a densidade de corrente ultrapassou 20 A/cm² na porção mais profunda dos eletrodos (Figura 18B) para as d_p de 2 e 1 mm, o que pode ser explicado pela redução de impedância local do tecido e consequente aumento da potência no sistema. Caso o equipamento já não tenha sido desligado pela extrapolação do limite suportado de corrente, há risco de excessivo aquecimento do tecido e curto-circuitos em aplicações com d_p menores que 3 mm.

5.2 EFEITOS DE AFASTAMENTO

As simulações e experimentos do afastamento das agulhas também produziram resultados interessantes. Pela Tabela 5 foi possível verificar que a distribuição *in silico* de campo ocorreu de forma não homogênea em d_p diferentes de 4 mm. Os resultados dos experimentos (Figuras 13 e 14) mostraram, pelo escurecimento enzimático da batata, que não houve campo elétrico suficiente para permeabilização das porções mais profundas do tecido.

Os resultados *in vitro* da aplicação de 60 kV/m (grupos **A** e **B**) indicaram que este valor de campo se encontra muito próximo a faixa de permeabilização permanente. Apesar da porção superior da aplicação dos pulsos (margem definida pela Figura 7 da Metodologia) ter sido garantida, a viabilidade celular para marcação foi reduzida nas regiões mais internas do tecido devido intensidade do campo aplicado. Por conseguinte, o contraste entre regiões marcadas e não marcadas prejudicaria a análise adequada da indentação, uma vez que até nas amostras $d_p = 4$ mm o escurecimento não ocorreu conforme indicou a distribuição de campo das simulações.

Já para os grupos **C** e **D** *in vitro*, em que o limiar de marcação foi mais definido, a análise h mostrou que houve perda de profundidade na EP para d_p maiores que 5 mm, tal como indicado pelas linhas de campo de 40 kV/m das simulações. Foi observada, ainda, alta variabilidade de h entre amostras e também dentro de cada amostra de batata com d_p a partir de 6 mm (Figura 19). Aproximadamente 50% das fatias em $d_p = 6$ mm apresentaram algum recuo. Essa porcentagem aumentou à medida que as pontas se distanciavam e, em 8 mm (isto é, duas vezes a distância padrão), todas as fatias apresentaram indentação diferente de zero (Figura 20). Acredita-se que as distorções no campo elétrico geradas pelo mal posicionamento do eletrodo, bem como a heterogeneidade condutiva do tecido, podem explicar a distribuição de campo com valor de h não previsível nos três últimos d_p .

As simulações no tecido tumoral também atestaram para indentação significativa. De acordo com a literatura, o limiar de permeabilização permanente dos tumores animais se inicia entre 50 e 60 kV/m (ARENA *et al.*, 2012) (GARCIA *et al.*, 2010) (NEAL II *et al.*, 2012). Este é o limiar de segurança para garantir eficácia do tratamento e evitar uma possível remissão do tumor devido multiplicação das células sobreviventes, diferente do limiar de 40 kV/m, descrito por (SEL *et al.*, 2005), para início de permeabilização reversível. Os grupos **E** e **F** ($E = 80$ kV/m) mostraram que uma deflexão de apenas 1 mm é capaz de gerar alguma indentação no campo elétrico. Porém, neste caso em especial, analisando conjuntamente os resultados dos grupos **A** e **B** (tecido vegetal), é indicado que não apenas a análise de cobertura do campo elétrico na margem da porção superior do tecido para planejamento de EQT seja realizada, mas também as regiões internas no tecido e observando o limiar acima de 50 kV/m, tendo em vista a elevada heterogeneidade dielétrica dos tumores, o que necessita da aplica-

ção de um campo mais elevado, tal qual os indicados pelo *ESOPE*. Já para os grupos **G** e **H** ($E = 100$ kV/m), campo utilizado na EQT, a indentação ocorre em d_p acima de 6 mm. Estima-se que esta perda de profundidade ocorra mais agressivamente e com indentação também variável em aplicações clínicas/veterinárias nestas circunstâncias devido elevada heterogeneidade do tecido tumoral.

O limiar que compromete efetivamente o tratamento com EQT pelo mal posicionamento do eletrodo é bastante sutil. Por exemplo, $d_p = 2$ mm equivale à $5,5^\circ$ de deflexão, que nem sempre pode ser detectada facilmente. Não obstante, uma inserção de agulhas em tecidos biológicos sem a mínima deflexão é dificilmente concebível visto que ela é decorrente de fatores como deformação dos tecidos por sua resistência mecânica, velocidade e força de inserção das agulhas, e, especialmente, pela geometria da ponta (GERWEN *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores mostraram, utilizando *phantoms* artificiais (espuma e gel) e animais (tecido cardíaco de porco *ex vivo*), que a deflexão de agulhas de chanfro único resulta em torno de 1 a 2 mm para 20 mm inseridos (ABOLHASSANI; PATEL, 2006) (ROESTHUIS *et al.*, 2011). Mais recentemente, (VEEN *et al.*, 2012) realizou, entre outras análises relacionadas às agulhas utilizadas em práticas médicas, a de deflexão quando inseridas em gel. Como resultado, as agulhas cônicas apresentaram menor deflexão em relação às agulhas de chanfro único e múltiplo (*franseen* e *diamond*); conclusões similares foram encontradas por (VAN DEN BOS *et al.*, 2016) e (LI *et al.*, 2020), este último concluindo que as agulhas de chanfro único não são indicadas para uso em procedimentos que requerem precisão, tais como biópsia de tecidos.

5.3 AVALIAÇÃO DO MODELO VEGETAL

Os resultados das correntes *in silico* mostraram que a configuração padrão ($d_p=4$ mm) foi validada em todos os grupos experimentais *in vitro* (**A - D**). O modelo também foi validado para outros casos em que não houve diferença estatística entre o resultado *in silico* e *in vitro*. Entretanto, foi observado que os resultados *in silico* de corrente em alguns casos ficaram fora do intervalo de confiança experimental (Tabelas 9-12). Ainda, nos casos extremos, ou seja, distâncias maiores e campo menor ($d_p>6$ mm, 60 kV/m) e distâncias menores com campo mais elevado ($d_p=1$ mm, 100 kV/m) o erro relativo de corrente superou 10%. Estes resultados sugerem que a dinâmica da condutividade nestas circunstâncias não seja compreendida pelo modelo vegetal proposto por (IVORRA *et al.*, 2010), o que pode indicar que resultados de corrente para eletrodos de geometrias não convencionais e de distribuição de campo não uniforme, tal qual as configurações de deflexão mostradas nesse trabalho, não sejam validados pelas simulações do modelo.

O uso de modelos vegetais é uma ferramenta para a avaliação do campo elétrico devido ao conceito de 3Rs, baixo custo e *feedback* visual. O tubérculo de batata

é comumente utilizado para validar modelos numéricos e configurações de eletrodos (BERNARDIS *et al.*, 2017) (ONGARO *et al.*, 2018). Todavia, a translação dos resultados vegetais para animais pode ser bastante desafiadora. Apesar das respostas espaciais que o vegetal fornece para o planejamento dos tratamentos com EQT, esse tecido é eletricamente diferente do sistema animal. Os tumores apresentam alta condutividade elétrica, geralmente dez vezes maior que batata (ver Figura 8), além da rede vascular e de outros tecidos e órgãos que circundam os tumores. Assim, os resultados absolutos dos limiares da eletroporação, distribuição de campo e correntes elétricas não serão iguais para os tecidos animais. Entretanto, como sistemas biológicos, tecidos vegetais e tumorais apresentam semelhanças relevantes para a avaliação do campo, como heterogeneidade, anisotropia e dispersão dielétrica. Ainda, os modelos numéricos que descrevem as alterações da condutividade do tecido vegetal, que foram validados por diversos trabalhos experimentais (ONGARO *et al.*, 2016) (GONZÁLEZ *et al.*, 2018), apresentam comportamento semelhante (isto é, condutividade expressa como uma função de desativação do campo elétrico) em relação ao tecido tumoral.

A avaliação dos resultados simulados do tumor tem mais poder de decisão quando associada a resultados experimentais de tecido vegetal do que quando utilizada isoladamente nos planejamentos de EQT. Alguns trabalhos associam a marcação enzimática da batata com uma EQT satisfatória (ARENA *et al.*, 2012) (GONZÁLEZ *et al.*, 2018) (CAMPANA *et al.*, 2019). A mimetização para os resultados de EQT no tecido animal, nesses casos, é feita pela associação das marcações no vegetal, ou seja, nas regiões acometidas pela EP irreversível, em que garante-se que o campo elétrico local induziu a permeabilização permanente. Neste trabalho, os valores de campo elétrico para essa associação, resultantes de testes *in silico* e *in vitro* com o eletrodo utilizado, foram 40 kV/m e 50 kV/m para os tecidos vegetal e tumoral, respectivamente e são aplicáveis apenas nos casos em que o modelo vegetal foi validado pelos experimentos.

6 CONCLUSÃO

Os efeitos da deflexão do eletrodo de matriz linear do ESOPE foram descritos neste trabalho, a partir de testes *in silico* e *in vitro* de tecido vegetal. Também foram previstos esses efeitos para tecido tumoral em casos clínicos/veterinários a partir dos resultados simulados utilizando campo elétrico padrão do ESOPE. A deflexão pela aproximação das agulhas em tumores *in silico* indicaram densidade de corrente prejudicial ao tecido (i.e. aquecimento excessivo) para distâncias menores que 3 mm entre pontas. Além disso, o limite de corrente suportado pelo equipamento eletroporador (20 A) foi excedido, no eletrodo de 3 pares, quando 2 destes estão à 2 mm distantes. Ainda, com apenas com 1 par aproximado em 3 mm (do eletrodo de 4 pares), há risco de interrupção no tratamento devido sobrecarga no equipamento. Deflexões por afastamento expuseram uma indentação do campo elétrico para distâncias superiores à 6 mm entre as pontas das agulhas, o que significa uma perda da efetividade na EQT devido regiões não eletroporadas e posterior recorrência do tumor. Estas perturbações alteram diretamente o resultado do tratamento.

A pesquisa realizada nesta dissertação originou-se de problemas recorrentes em tratamentos com EQT, uma vez que os eletrodos de agulhas são inseridos em tecidos biológicos. Em aplicações clínicas e veterinárias da EQT, alerta-se para a verificação do eletrodo antes e após cada inserção, para que não haja soma das deflexões que resulte em um tratamento antitumoral malsucedido, além da preferência pela utilização de agulhas de pontas do tipo canônica e multi chanfrada no uso e desenvolvimento de eletrodos.

Outro ponto resultante desta pesquisa foi a identificação das limitações do modelo de condutividade proposto por (IVORRA *et al.*, 2010). Apesar dos testes *in vitro* mostrarem que o modelo é validado para eletrodos tradicionais (casos sem deflexão) para os dois campos elétricos e eletrodos testados, nos outros casos de deflexão, em especial para os testes com 60 kV/m, foram destacadas as fronteiras da validação desse modelo. Estes fatos alertam para o uso inapropriado do modelo vegetal em testes com eletrodos despadronizados.

Esta dissertação produziu resultados que sugerem novas investigações. Novas pesquisas já foram iniciadas durante o mestrado, além das pesquisas futuras que serão realizadas ao longo do doutorado.

6.1 TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO

- Desenvolvimento de um novo modelo vegetal (batata) a partir de testes *in vitro* e otimização das equações que descrevem a dinâmica da condutividade em função do campo elétrico. Este modelo compreende diferentes faixas de Eletroporação não abordadas nos modelos atuais da literatura;

- Desenvolvimento de um modelo para descrição da dinâmica de condutividade na zona de Eletroporação Irreversível, utilizando testes *ex vivo* e análise histopatológica do tecido animal;
- Desenvolvimento de modelo de condutividade para avaliação mais rápida da distribuição dos campos elétricos para otimização de novos eletrodos e equipamentos, com a utilização de um vegetal alternativo e de características dielétricas semelhantes à batata.

6.2 TRABALHOS FUTUROS

- Validação do novo modelo de condutividade vegetal, o qual encontra-se em andamento, utilizando novas configurações de eletrodos personalizados;
- Desenvolvimento de dispositivo para detecção de deflexão nas agulhas do eletrodo para Eletroquimioterapia;
- Estudo *ex vivo* de tecido tumoral submetido à Eletroporação com os eletrodos em configurações tais quais as apresentadas neste trabalho;
- Investigação histopatológica dos efeitos causados pela aplicação dos pulsos nos tecidos vegetais, tais como escurecimento enzimático e marcação por corantes nas áreas eletroporadas, com a finalidade de identificar a viabilidade celular e os limiares de Eletroporação para os vegetais.

REFERÊNCIAS

- ABOLHASSANI, Niki; PATEL, RajniV. Deflection of a flexible needle during insertion into soft tissue. *In: IEEE. INTERNATIONAL Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. [S.l.: s.n.], 2006. P. 3858–3861.
- ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; HOPKIN, Karen; JOHNSON, Alexander D; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Essential cell biology**. [S.l.]: Garland Science, 2013. ISBN 0393680363.
- ANDRE, F; MIR, L M. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. **Gene therapy**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, s33–s42, 2004.
- ARENA, Christopher B; SZOT, Christopher S; GARCIA, Paulo A; RYLANDER, Marissa Nichole; DAVALOS, Rafael V. A three-dimensional in vitro tumor platform for modeling therapeutic irreversible electroporation. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 103, n. 9, p. 2033–2042, 2012.
- BAGLA, Sandeep; PAPADOURIS, Dimitrios. Percutaneous irreversible electroporation of surgically unresectable pancreatic cancer: a case report. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, Elsevier, v. 23, n. 1, p. 142–145, 2012.
- BALL, Christine; THOMSON, Kenneth R; KAVNOUDIAS, Helen. Irreversible electroporation: a new challenge in “out of operating theater” anesthesia. **Anesthesia & Analgesia**, LWW, v. 110, n. 5, p. 1305–1309, 2010.
- BASKAR, Rajamanickam; LEE, Kuo Ann; YEO, Richard; YEOH, Kheng-Wei. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International journal of medical sciences**, Ivyspring International Publisher, v. 9, n. 3, p. 193, 2012.
- BELEHRADEK, Michel; DOMENGE, Christian; LUBOINSKI, Bernard; ORLOWSKI, Stephane; BELEHRADEK JR, Jean; MIR, Lluís M. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. **Cancer**, Wiley Online Library, v. 72, n. 12, p. 3694–3700, 1993.
- BERKENBROCK, José Alvim; MACHADO, Rafaela Grecco; SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. Electrochemotherapy effectiveness loss due to

electric field indentation between needle electrodes: A numerical study. **Journal of healthcare engineering**, Hindawi, v. 2018, 2018.

BERKENBROCK, José Alvim; PINTARELLI, Guilherme Brasil; JÚNIOR, Afrânio de Castro Antônio; SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation. **Journal of Medical and Biological Engineering**, Springer, v. 39, n. 2, p. 224–229, 2019.

BERNARDIS, Alessia; BULLO, Marco; CAMPANA, Luca Giovanni; DI BARBA, Paolo; DUGHIERO, Fabrizio; FORZAN, Michele; MOGNASCHI, Maria Evelina; SGARBOSSA, Paolo; SIENI, Elisabetta. Electric field computation and measurements in the electroporation of inhomogeneous samples. **Open Physics**, De Gruyter, v. 15, n. 1, p. 790–796, 2017.

BERTACCHINI, Claudio. **Medical electroporation of tumors**. [S.l.]: Springer, 2017. P. 927–959.

BERTACCHINI, Claudio; MARGOTTI, Pier Mauro; BERGAMINI, Enrico; LODI, Andrea; RONCHETTI, Mattia; CADOSSO, Ruggero. Design of an irreversible electroporation system for clinical use. **Technology in cancer research & treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 6, n. 4, p. 313–320, 2007.

BIOTECH, Leroy. **ELECTROcell B10 HV-LV User Manual**. 2010.

BOSMA, Madeleen; SPARKS, LM; HOOIVELD, GJ; JORGENSEN, JA; HOUTEN, SM; SCHRAUWEN, Patrick; KERSTEN, Sander; HESSELINK, MKC. Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Elsevier, v. 1831, n. 4, p. 844–852, 2013.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. [S.l.]: John Wiley e sons New York, 1978. v. 664.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L; TORRE, Lindsey A; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Wiley Online Library, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUNZ, Fred. **Principles of cancer genetics**. [S.l.]: Springer, 2008. v. 1. ISBN 9781402067839.

BURLINGAME, Barbara; MOUILLÉ, Beatrice; CHARRONDIÈRE, Ruth. Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. **Journal of food composition and analysis**, Elsevier, v. 22, n. 6, p. 494–502, 2009.

CAMPANA, LUCA GIOVANI; BARBA, PAOLO DI; DUGHIERO, FABRIZIO; FORZAN, MICEHELE; MOGNASCHI, MARIA EVELINA; RIZZO, RUDY; SIENI, ELISABETTA. Non-parallelism of needles in electroporation: 3D computational model and experimental analysis. **COMPEL-The international journal for computation and mathematics in electrical and electronic engineering**, Emerald Publishing Limited, 2019.

CAMPANA, LUCA GIOVANI; BARBA, PAOLO DI; DUGHIERO, FABRIZIO; FORZAN, MICEHELE; ROSSI, CARLO RICCARDO; SIENI, ELISABETTA. Optimal needle positioning for electrochemotherapy: a constrained multiobjective strategy. **IEEE transactions on magnetics**, IEEE, v. 49, n. 5, p. 2141–2144, 2013.

CHEETHAM, SW; GRUHL, F; MATTICK, JS; DINGER, ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 108, n. 12, p. 2419–2425, 2013.

CHEN, C; SMYE, SW; ROBINSON, Martin P; EVANS, JA. Membrane electroporation theories: a review. **Medical and Biological Engineering and Computing**, Springer, v. 44, n. 1-2, p. 5–14, 2006.

COROVIC, Selma; LACKOVIC, Igor; SUSTARIC, Primoz; SUSTAR, Tomaz; RODIC, Tomaz; MIKLAVCIC, Damijan. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **Biomedical Engineering Online**, Springer, v. 12, n. 1, p. 16, 2013.

COUNCIL, National Research *et al.* **Guide for the care and use of laboratory animals**. [S.l.]: National Academies Press, 2010.

DAVALOS, Rafael V; MIR, LM; RUBINSKY, B. Tissue ablation with irreversible electroporation. **Annals of biomedical engineering**, Springer, v. 33, n. 2, p. 223, 2005.

DINE, Jennifer; GORDON, RuthAnn; SHAMES, Yelena; KASLER, Mary Kate; BARTON-BURKE, Margaret. Immune checkpoint inhibitors: an innovation in immunotherapy for the treatment and management of patients with cancer.

Asia-Pacific journal of oncology nursing, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 4, n. 2, p. 127, 2017.

EECKHAUT, Tom; LAKSHMANAN, Prabhu Shankar; DERYCKERE, Dieter; VAN BOCKSTAELE, Erik; VAN HUYLENBROECK, Johan. Progress in plant protoplast research. **Planta**, Springer, v. 238, n. 6, p. 991–1003, 2013.

ELLIS, Thomas L; GARCIA, Paulo A; ROSSMEISL, John H; HENAO-GUERRERO, Natalia; ROBERTSON, John; DAVALOS, Rafael V. Nonthermal irreversible electroporation for intracranial surgical applications. **Journal of neurosurgery**, American Association of Neurological Surgeons, v. 114, n. 3, p. 681–688, 2011.

FALK, Hanne; LAMBAA, Susanne; JOHANNESSEN, Helle Hjorth; WOOLER, Gitte; VENZO, Alessandro; GEHL, Julie. Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma – a case report. **Acta Oncologica**, Taylor Francis, v. 56, n. 8, p. 1126–31, 2017.

FRANSEN, SK; GIBOT, L; MADI, M; GEHL, J; ROLS, MP. Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. **PLoS One**, Public Library of Science, v. 10, n. 12, 2015.

FRANSEN, SK; GISSEL, H; HOJMAN, P; TRAMM, T; ERIKSEN, J; GEHL, J. Direct Therapeutic Applications of Calcium to Effectively Induce Tumor Necrosis. **Cancer Research**, v. 72, n. 6, p. 1336–41, 2013.

FRANSEN, SK; KRUGER, MB; MANGALANATHAN, UM; TRAMM, T; MAHMOOD, F; J, I Novak; GEHL. Normal and malignant cells exhibit differential responses to calcium electroporation. **Cancer research**, AACR, v. 77, n. 16, p. 4389–4401, 2017.

FUJII, Masayuki; MATANO, Mami; NANKI, Kosaku; SATO, Toshiro. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. **Nature protocols**, Nature Publishing Group, v. 10, n. 10, p. 1474, 2015.

FURUHATA, Yuichi; SAKAI, Ayako; MURAKAMI, Tomi; MORIKAWA, Mone; NAKAMURA, Chikashi; YOSHIKUNI, Takeshi; FUJIKURA, Ushio; NISHIDA, Keiji; KATO, Yoshio. A method using electroporation for the protein delivery of Cre recombinase into cultured Arabidopsis cells with an intact cell wall. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

GARCIA, Paulo A; ARENA, Christopher B; DAVALOS, Rafael V. Towards a predictive model of electroporation-based therapies using pre-pulse electrical measurements. *In: IEEE. 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. [S.l.: s.n.], 2012a. P. 2575–2578.*

GARCIA, Paulo A; ROSSMEISL, John H; NEAL, Robert E; ELLIS, Thomas L; OLSON, John D; HENAO-GUERRERO, Natalia; ROBERTSON, John; DAVALOS, Rafael V. Intracranial nonthermal irreversible electroporation: in vivo analysis. **The Journal of membrane biology**, Springer, v. 236, n. 1, p. 127–136, 2010.

GARCIA, Paulo A; ROSSMEISL JR, John H; ROBERTSON, John L; OLSON, John D; JOHNSON, Annette J; ELLIS, Thomas L; DAVALOS, Rafael V. 7.0-T magnetic resonance imaging characterization of acute blood-brain-barrier disruption achieved with intracranial irreversible electroporation. **PloS one**, Public Library of Science, v. 7, n. 11, e50482, 2012b.

GEHL, Julie *et al.* Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, Taylor & Francis, v. 57, n. 7, p. 874–882, 2018.

GELVIN, Stanton B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Am Soc Microbiol, v. 67, n. 1, p. 16–37, 2003.

GENG, Tao; ZHAN, Yihong; WANG, Jun; LU, Chang. Transfection of cells using flow-through electroporation based on constant voltage. **nature protocols**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 8, p. 1192–1208, 2011.

GERWEN, Dennis J van; DANKELMAN, Jenny; DOBBELSTEEN, John J van den. Needle-tissue interaction forces - A survey of experimental data. **Medical engineering & physics**, Elsevier, v. 34, n. 6, p. 665–680, 2012.

GISSEL, Hanne; LEE, Raphael C; GEHL, Julie. **Electroporation and cellular physiology**. [S.l.]: Springer, 2011. P. 9–17.

GO, RS; GUNDRUM, JD. Cancer in the adolescent and young adult (AYA) population in the United States: Current statistics and projections. **Journal of Clinical Oncology**, American Society of Clinical Oncology, v. 29, 15_suppl, p. 6072–6072, 2011.

GOLBERG, ALEX; RUBINSKY, BORIS. A statistical model for multidimensional irreversible electroporation cell death in tissue. **Biomedical engineering online**, Springer, v. 9, n. 1, p. 13, 2010.

GOLBERG, Alexander; BRUINSMA, Bote G; UYGUN, Basak E; YARMUSH, Martin L. Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by “electric field sinks”. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 5, p. 8485, 2015.

GONZÁLEZ, Maraelys Morales *et al.* Tissue Damage, Temperature, and ph induced by Different electrode arrays on Potato Pieces (*Solanum tuberosum* L.) **Frontiers in oncology**, Frontiers, v. 8, p. 101, 2018.

GOTHELF, Anita; MIR, Lluís M; GEHL, Julie. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer treatment reviews**, Elsevier, v. 29, n. 5, p. 371–387, 2003.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 445, n. 7130, p. 851, 2007.

GRESS, Donna M *et al.* Principles of cancer staging. **AJCC Cancer Staging Manual. 8th Ed. New York: Springer-Verlag**, p. 3–30, 2017.

GROSSI, Marco; RICCÒ, Bruno. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Sensors and Sensor Systems**, p. 303–325, 2017.

GUO, Yuqi; XU, Feng; LU, TianJian; DUAN, Zhenfeng; ZHANG, Zhan. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. **Cancer treatment reviews**, Elsevier, v. 38, n. 7, p. 904–910, 2012.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, Elsevier, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HUO, Zheng-Yang; LI, Guo-Qiang; YU, Tong; LU, Yun; SUN, Hao; WU, Yin-Hu; YU, Cecilia; XIE, Xing; HU, Hong-Ying. Impact of water quality parameters on bacteria inactivation by low-voltage electroporation: mechanism and control. **Environmental Science: Water Research & Technology**, The Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 6, p. 872–881, 2018.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals**, IARC, v. 63, p. 443–465, 1995.

INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. [S.l.: s.n.], 2020. ISBN 978-85-7318-389-4.

IVORRA, A; MIR, LM; RUBINSKY, B. Electric Field Redistribution due to Conductivity Changes during Tissue Electroporation: Experiments with a Simple Vegetal Model. *In*: WORLD Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. [S.l.: s.n.], 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-03895-2.

IVORRA, ANTONI. Tissue electroporation as a bioelectric phenomenon: Basic concepts. *In*: IRREVERSIBLE electroporation. [S.l.]: Springer, 2010. P. 23–61.

IZZO, Francesco *et al.* New Deployable Expandable Electrodes in the Electroporation Treatment in a Pig Model: A Feasibility and Usability Preliminary Study. **Cancers**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 12, n. 2, p. 515, 2020.

JAMES, Nicholas D *et al.* Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. **The Lancet**, Elsevier, v. 387, n. 10024, p. 1163–1177, 2016.

KINOSITA, KAZUHIKO; TSONG, TIAN YOW. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. **Nature**, v. 270, p. 673–678, 1977. ISSN 00280836. DOI: 10.1038/267585a0.

KLEINSMITH, Lewis J. **Principles of cancer biology**. [S.l.]: Benjamin-Cummings Publishing Company, 2006.

- KOS, Bor; VOIGT, Peter; MIKLAVCIC, Damijan; MOCHE, Michael. Careful treatment planning enables safe ablation of liver tumors adjacent to major blood vessels by percutaneous irreversible electroporation (IRE). **Radiology and oncology**, Sciendo, v. 49, n. 3, p. 234–241, 2015.
- KOTNIK, Tadej; FREY, Wolfgang; SACK, Martin; MEGLIČ, Saša Haberl; PETERKA, Matjaž; MIKLAVČIČ, Damijan. Electroporation-based applications in biotechnology. **Trends in biotechnology**, Elsevier, v. 33, n. 8, p. 480–488, 2015.
- KOTNIK, Tadej; KRAMAR, Peter; PUCIHAR, Gorazd; MIKLAVCIC, Damijan; TAREK, Mounir. Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, IEEE, v. 28, n. 5, p. 14–23, 2012.
- KOUKOUNARAS, Jim; KAVNOUDIAS, Helen; THOMSON, Kenneth R. Irreversible Electroporation of Kidney Tumours. *In: IRREVERSIBLE Electroporation in Clinical Practice*. [S.l.]: Springer, 2018. P. 201–213.
- KRANJC, MATEJ; MIKLAVCIC, DAMIJAN. Electric field distribution and electroporation threshold. *In: HANDBOOK of electroporation*. [S.l.]: Springer International Publishing AG, 2016. P. 1043–58.
- KRUSKAL, William H; WALLIS, W Allen. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, Taylor & Francis Group, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.
- LEBER, Mathias Felix; EFFERTH, Thomas. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. **International journal of oncology**, Spandidos Publications, v. 34, n. 4, p. 881–895, 2009.
- LEE, EDWARD; CHEN, CHRISTINE; PRIETO, VERONICA; DRY, SARA; LOR, CHRISTOPHER; KEE, STEPHEN. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation. **Radiology**, Radiological Society of North America, Inc., v. 255, n. 2, p. 426–433, 2010.
- LEE, YiKuen; DENG, PeiGang. Review of micro/nano technologies and theories for electroporation of biological cells. **Science China Physics, Mechanics and Astronomy**, Springer, v. 55, n. 6, p. 996–1003, 2012.

LI, Annie DR; PLOTT, Jeffrey; CHEN, Lei; MONTGOMERY, Jeffrey S; SHIH, Albert. Needle deflection and tissue sampling length in needle biopsy. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Elsevier, v. 104, p. 103632, 2020.

LIU, CAIFENG *et al.* A zebrafish model discovers a novel mechanism of stromal fibroblast-mediated cancer metastasis. **Clinical Cancer Research**, AACR, v. 23, n. 16, p. 4769–4779, 2017.

LIU, Chong; XIE, Xing; ZHAO, Wenting; LIU, Nian; MARACCINI, Peter A; SASSOUBRE, Lauren M; BOEHM, Alexandria B; CUI, Yi. Conducting nanosponge electroporation for affordable and high-efficiency disinfection of bacteria and viruses in water. **Nano letters**, ACS Publications, v. 13, n. 9, p. 4288–4293, 2013.

LÓPEZ-ALONSO, B *et al.* Histopathological and ultrastructural changes after electroporation in pig liver using parallel-plate electrodes and high-performance generator. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

MADDAMS, J; UTLEY, M; MØLLER, H. Projections of cancer prevalence in the United Kingdom, 2010–2040. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 107, n. 7, p. 1195–1202, 2012.

MAGLIETTI, Felipe; TELLADO, Matias; OLAIZ, Nahuel; MICHINSKI, Sebastian; MARSHALL, Guillermo. Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. **Radiology and oncology**, Sciendo, v. 51, n. 4, p. 422–430, 2017.

MAHMOOD, Faisal; GEHL, Julie. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation. **Bioelectrochemistry**, Elsevier, v. 81, n. 1, p. 10–16, 2011.

MAHNIČ-KALAMIZA, Samo; VOROBIEV, Eugene; MIKLAVČIČ, Damijan. Electroporation in food processing and biorefinery. **The Journal of membrane biology**, Springer, v. 247, n. 12, p. 1279–1304, 2014.

MANDEL, John. **The statistical analysis of experimental data**. [S.l.]: Courier Corporation, 2012.

MAOR, Elad; IVORRA, Antoni; LEOR, Jonathan; RUBINSKY, Boris. The effect of irreversible electroporation on blood vessels. **Technology in cancer research &**

treatment, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 6, n. 4, p. 307–312, 2007.

MARIEB, Elaine Nicpon; HOEHN, Katja. **Human anatomy & physiology**. [S.l.]: Pearson education, 2007.

MARTIN II, Robert CG; MCFARLAND, Kelli; ELLIS, Susan; VELANOVICH, Vic. Irreversible electroporation therapy in the management of locally advanced pancreatic adenocarcinoma. **Journal of the American College of Surgeons**, Elsevier, v. 215, n. 3, p. 361–369, 2012.

MATTHIESSEN, Louise Wichmann; CHALMERS, Richard Ling; SAINSBURY, David Christopher George; VEERAMANI, Sivakumar; KESSELL, Gareth; HUMPHREYS, Alison Claire; BOND, Jane Elisabeth; MUIR, Tobian; GEHL, Julie. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. **Acta Oncologica**, Taylor & Francis, v. 50, n. 5, p. 621–629, 2011.

MATTHIESSEN, Louise Wichmann; JOHANNESSEN, Helle Hjorth; HENDEL, Helle Westergren; MOSS, Timothy; KAMBY, Claus; GEHL, Julie. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial. **Acta Oncologica**, Taylor & Francis, v. 51, n. 6, p. 713–721, 2012.

MEAKING, WS; EDGERTON, J; WHARTON, CW; MELDRUM, RA. Electroporation-induced damage in mammalian cell DNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, Elsevier, v. 1264, n. 3, p. 357–362, 1995.

MENARD, Johanna C; HINDS, Pamela S; JACOBS, Shana S; CRANSTON, Katie; WANG, Jichuan; DEWALT, Darren A; GROSS, Heather E. Feasibility and acceptability of the patient-reported outcomes measurement information system measures in children and adolescents in active cancer treatment and survivorship. **Cancer Nursing**, LWW, v. 37, n. 1, p. 66–74, 2014.

MICHEL, Olga; KULBACKA, Julita; SACZKO, Jolanta; MAĆZYŃSKA, Justyna; BŁASIAK, Piotr; ROSSOWSKA, Joanna; RZETCHONEK, Adam. Electroporation with cisplatin against metastatic pancreatic cancer: in vitro study on human primary cell culture. **BioMed research international**, Hindawi, v. 2018, 2018.

MIKLAVČIČ, DAMIJAN; PUC, MARKO. Electroporation. **Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering**, Wiley Online Library, 2006.

MIKLAVČIČ, Damijan; BERAVS, Katarina; ŠEMROV, Dejan; ČEMAŽAR, Maja; DEMŠAR, Franci; SERŠA, Gregor. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 74, n. 5, p. 2152–2158, 1998.

MIKLAVČIČ, Damijan; PAVŠELJ, Nataša; HART, Francis X. Electric properties of tissues. **Wiley encyclopedia of biomedical engineering**, Wiley Online Library, 2006.

MILLER, Kimberly D; NOGUEIRA, Leticia; MARIOTTO, Angela B; ROWLAND, Julia H; YABROFF, K Robin; ALFANO, Catherine M; JEMAL, Ahmedin; KRAMER, Joan L; SIEGEL, Rebecca L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, Wiley Online Library, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.

MIN, Yuanzeng *et al.* Antigen-capturing nanoparticles improve the abscopal effect and cancer immunotherapy. **Nature nanotechnology**, Nature Publishing Group, v. 12, n. 9, p. 877, 2017.

MIR, Lluís M; ORLOWSKI, Stephane; BELEHRADEK, Jean; PAOLETTI, Claude. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, Elsevier, v. 27, n. 1, p. 68–72, 1991.

MIR, Lluís M *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 77, n. 12, p. 2336–2342, 1998.

MIR, Lluís M *et al.* Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. **European Journal of Cancer Supplements**, Elsevier, v. 4, n. 11, p. 14–25, 2006.

NAPOTNIK, TB; MIKLAVČIČ, D. In vitro electroporation detection methods—An overview. **Bioelectrochemistry**, Elsevier, v. 120, p. 166–182, 2018.

NEAL II, Robert E; GARCIA, Paulo A; ROBERTSON, John L; DAVALOS, Rafael V. Experimental characterization and numerical modeling of tissue electrical conductivity during pulsed electric fields for irreversible electroporation treatment planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 59, n. 4, p. 1076–1085, 2012.

NEUMANN, Eberhard; SCHAEFER-RIDDER, M; WANG, Y; HOFSCHEIDER, PhH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.

OEY, Indrawati; FARIDNIA, Farnaz; LEONG, Sze Ying; BURRITT, David J; LIU, Tingting. Determination of Pulsed Electric Fields Effect on the Structure of Potato Tubers. **Handbook of Electroporation; D. Miklavcic, Editor. Springer International Publishing: Cham**, p. 1–19, 2016.

ONGARO, Alessia; CAMPANA, Luca Giovanni; DE MATTEI, Monica; DUGHIERO, Fabrizio; FORZAN, Michele; PELLATI, Agnese; ROSSI, Carlo Riccardo; SIENI, Elisabetta. Evaluation of the electroporation efficiency of a grid electrode for electrochemotherapy: from numerical model to in vitro tests. **Technology in Cancer Research & Treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 15, n. 2, p. 296–307, 2016.

ONGARO, Alessia *et al.* Effect of electrode distance in grid electrode: Numerical models and in vitro tests. **Technology in cancer research & treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 17, p. 1533033818764498, 2018.

PAKHOMOV, AG; MIKLAVCIC, D; PAKHOMOVA, ON. Nanopores: A distinct Transmembrane Passageway in Electroporated Cells. *In: ADVANCED Electroporation Techniques in Biology and Medicine. [S.l.: s.n.]*, 2010.

PASQUALI, Paola; SPUGNINI, Enrico P; BALDI, Alfonso. Successful treatment of a keratoacanthoma with electrochemotherapy: a case report. **Dermatology and therapy**, Springer, v. 8, n. 1, p. 143–146, 2018.

PAVSELJ, Natasa; BREGAR, Zvonko; CUKJATI, David; BATIUSKAITE, Danute; MIR, Lluís M; MIKLAVCIC, Damijan. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 52, n. 8, p. 1373–1381, 2005.

PHILLIPS, MA; NARAYAN, R; PADATH, T; RUBINSKY, B. Irreversible electroporation on the small intestine. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 106, n. 3, p. 490–495, 2012.

PINTARELLI, G.B.; ANTÔNIO JR., A.; SUZUKI, D.O.H. **Equipamento para Aplicação de Pulsos de Tensão Elétrica de Amplitude, Período e Forma de Onda Variáveis e Análise de Efetividade para Técnicas de Eletroporação na Transfecção Genética e Tratamento de Neoplasias**. [S.l.: s.n.], set. 2019. SINOVA UFSC RPI00060.

QUAGLINO, Pietro; MORTERA, C; OSELLA-ABATE, Simona; BARBERIS, M; ILLENGO, M; RISSONE, M; SAVOIA, Paola; BERNENGO, Maria Grazia. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. **Annals of surgical oncology**, Springer, v. 15, n. 8, p. 2215, 2008.

RAMOS, Airton. Effect of the electroporation in the field calculation in biological tissues. **Artificial organs**, Wiley Online Library, v. 29, n. 6, p. 510–513, 2005.

RANGEL, Marcelo MM; LUZ, Jean; OLIVEIRA, Krishna D; OJEDA, Javier; FREYTAG, Jennifer O; SUZUKI, Daniela O. Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral journal of veterinary sciences**, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias, v. 51, n. 2, p. 45–51, 2019.

REBERSEK, M; MIKLAVCIC, D; BERTACCHINI, C; SACK, M. Cell membrane electroporation-Part 3: the equipment. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, IEEE, v. 30, n. 3, p. 8–18, 2014.

REBERŠEK, Matej; MARJANOVIČ, Igor; BEGUŠ, Samo; PILLET, Flavien; ROLS, Marie-Pierre; MIKLAVČIČ, Damijan; KOTNIK, Tadej. Generator and setup for emulating exposures of biological samples to lightning strokes. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 62, n. 10, p. 2535–2543, 2015.

REBERŠEK, Matej; MIKLAVČIČ, Damijan. **Concepts of electroporation pulse generation and overview of electric pulse generators for cell and tissue electroporation**. [S.l.]: CRC Press, 2010. P. 343–360.

RITTER, Andreas; BRUNERS, Philipp; ISFORT, Peter; BARABASCH, Alexandra; PFEFFER, Joachim; SCHMITZ, Jula; PEDERSOLI, Federico; BAUMANN, Martin.

Electroporation of the liver: more than 2 concurrently active, curved electrodes allow new concepts for irreversible electroporation and electrochemotherapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 17, p. 1533033818809994, 2018.

ROESTHUIS, Roy J; VAN VEEN, Youri RJ; JAHYA, Alex; MISRA, Sarthak. Mechanics of needle-tissue interaction. *In: IEEE. 2011 IEEE/RSJ international conference on intelligent robots and systems. [S.l.: s.n.], 2011. P. 2557–2563.*

RUBINSKY, Boris; ONIK, Gary; MIKUS, Paul. Irreversible electroporation: a new ablation modality—clinical implications. **Technology in cancer research & treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 6, n. 1, p. 37–48, 2007.

SANO, Michael B; DEWITT, Matthew R; TEETER, Stephanie D; XING, Lei. Optimization of a single insertion electrode array for the creation of clinically relevant ablations using high-frequency irreversible electroporation. **Computers in biology and medicine**, Elsevier, v. 95, p. 107–117, 2018.

SANO, Michael B; NEAL, Robert E; GARCIA, Paulo A; GERBER, David; ROBERTSON, John; DAVALOS, Rafael V. Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion. **Biomedical engineering online**, BioMed Central, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2010.

SAULIS, Gintautas. Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. **Food Engineering Reviews**, Springer, v. 2, n. 2, p. 52–73, 2010.

SAULIS, Gintautas. Pore disappearance in a cell after electroporation: theoretical simulation and comparison with experiments. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 73, n. 3, p. 1299–1309, 1997.

SEL, Davorka; CUKJATI, David; BATIUSKAITE, Danute; SLIVNIK, Tomaz; MIR, Lluís M; MIKLAVCIC, Damijan. Sequential finite element model of tissue electropermeabilization. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 52, n. 5, p. 816–827, 2005.

SEL, Davorka; MAZERES, Serge; TEISSIE, Justin; MIKLAVCIC, Damijan. Finite-element modeling of needle electrodes in tissue from the perspective of frequent

model computation. **IEEE transactions on biomedical engineering**, IEEE, v. 50, n. 11, p. 1221–1232, 2003.

SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, JSTOR, v. 52, n. 3/4, p. 591–611, 1965.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, Wiley Online Library, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SIENI, Elisabetta; SGARBOSSA, Paolo; MOGNASCHI, Maria Evelina; FORZAN, Michele; PARUPUDI, Tejasvi; MITTAL, Lakshya; CAMARILLO, Ignacio G; SUNDARARAJAN, Raji. Electric field distribution study in inhomogeneous biological tissues. **International Journal of Numerical Modelling: Electronic Networks, Devices and Fields**, Wiley Online Library, v. 33, n. 2, e2699, 2020.

SIKIC, Branimir Ivan; ROZENCWEIG, Marcel; CARTER, Stephen K. **Bleomycin chemotherapy**. [S.l.]: Elsevier, 2016.

SILVA, Asitha T; NGUYEN, Alien; YE, Changming; VERCHOT, Jeanmarie; MOON, Joong Ho. Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts. **BMC plant biology**, Springer, v. 10, n. 1, p. 291, 2010.

SPUGNINI, Enrico P; AZZARITO, T; FAIS, S; FANCIULLI, M; BALDI, Alfonso. Electrochemotherapy as first line cancer treatment: experiences from veterinary medicine in developing novel protocols. **Current cancer drug targets**, Bentham Science Publishers, v. 16, n. 1, p. 43–52, 2016.

SPUGNINI, Enrico P; D'ALTERIO, Gian Lorenzo; DOTSINSKY, Ivan; MUDROV, Tzvetan; DRAGONETTI, Emanuele; MURACE, Raffaele; CITRO, Gennaro; BALDI, Alfonso. Electrochemotherapy for the treatment of multiple melanomas in a horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, Elsevier, v. 31, n. 8, p. 430–433, 2011.

SPUGNINI, Enrico P; FAIS, Stefano; AZZARITO, Tommaso; BALDI, Alfonso. Novel Instruments for the implementation of electrochemotherapy protocols: From bench side to veterinary clinic. **Journal of cellular physiology**, Wiley Online Library, v. 232, n. 3, p. 490–495, 2017.

SPUGNINI, Enrico P; MELILLO, Alessandro; QUAGLIUOLO, Lucio; BOCCELLINO, Mariarosaria; VINCENZI, Bruno; PASQUALI, Paola; BALDI, Alfonso.

Definition of novel electrochemotherapy parameters and validation of their in vitro and in vivo effectiveness. **Journal of cellular physiology**, Wiley Online Library, v. 229, n. 9, p. 1177–1181, 2014.

SPUGNINI, Enrico P; VINCENZI, B; BETTI, G; CORDAHI, F; DOTSINSKY, I; MUDROV, N; CITRO, G; BALDI, A. **Surgery and electrochemotherapy of a high-grade soft tissue sarcoma in a dog**. [S.l.]: British Medical Journal Publishing Group, 2008.

SRL, Biopulse. **Onkodisruptor Brochure**. 2017. Disponível em: <https://www.onkodisruptor.com/wp-content/uploads/2017/01/Onkodisruptor-Brochure.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2019.

STAAL, Lasse G; GILBERT, Richard. **Clinical aspects of electroporation**. [S.l.]: Springer, 2011. P. 45–65.

SUÁREZ, Cecilia; SOBA, Alejandro; MAGLIETTI, Felipe; OLAIZ, Nahuel; MARSHALL, Guillermo. The role of additional pulses in electroporation protocols. **PloS one**, Public Library of Science, v. 9, n. 12, 2014.

SUZUKI, Daniela OH; BERKENBROCK, José A; FREDERICO, Marisa JS; SILVA, Fátima RMB; RANGEL, Marcelo MM. Oral mucosa model for electrochemotherapy treatment of dog mouth cancer: ex vivo, in silico, and in vivo experiments. **Artificial organs**, Wiley Online Library, v. 42, n. 3, p. 297–304, 2018.

SUZUKI, Daniela OH; BERKENBROCK, José A; OLIVEIRA, Krishna D de; FREYTAG, Jennifer O; RANGEL, Marcelo MM. Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. **Artificial Organs**, Wiley Online Library, v. 41, n. 8, p. 767–773, 2017.

SZEWCZYK, Anna; GEHL, Julie; DACZEWSKA, Malgorzata; SACZKO, Jolanta; FRANDSEN, Stine Krog; KULBACKA, Julita. Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 9, n. 14, p. 11604, 2018.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo; MOLLER, Ian Max; MURPHY, Angus. **Plant physiology and development**. [S.l.]: Oxford University Press, 2015.

THOMSEN, Sharon; PEARCE, John A. **Thermal damage and rate processes in biologic tissues**. [S.l.]: Springer, 2010. P. 487–549.

THOMSON, Kenneth R *et al.* Investigation of the safety of irreversible electroporation in humans. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, Elsevier, v. 22, n. 5, p. 611–621, 2011.

TIELEMAN, DP. The molecular basis of electroporation. **BMC biochemistry**, Springer, v. 5, n. 1, p. 10, 2004.

TOEPFL, Stefan. Pulsed Electric Field food treatment-scale up from lab to industrial scale. **Procedia Food Science**, Elsevier, v. 1, p. 776–779, 2011.

VALERO, Ana; POST, Janine Nicole; NIEUWKASTEELE, Jan William van; BRAAK, Paulus Martinus ter; KRUIJER, W; BERG, Albert van den. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 1, p. 62–67, 2008.

VAN DE BERG, Nick J; DE JONG, Tonke L; VAN GERWEN, Dennis J; DANKELMAN, Jenny; VAN DEN DOBBELSTEEN, John J. The influence of tip shape on bending force during needle insertion. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

VAN DEN BOS, Willemien *et al.* Thermal energy during irreversible electroporation and the influence of different ablation parameters. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, Elsevier, v. 27, n. 3, p. 433–443, 2016.

VEEN, Youri RJ van; JAHYA, Alex; MISRA, Sarthak. Macroscopic and microscopic observations of needle insertion into gels. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 226, n. 6, p. 441–449, 2012.

VROOMEN, LGPH; PETRE, EN; CORNELIS, FH; SOLOMON, SB; SRIMATHVEERAVALLI, G. Irreversible electroporation and thermal ablation of tumors in the liver, lung, kidney and bone: What are the differences? **Diagnostic and interventional imaging**, Elsevier, v. 98, n. 9, p. 609–617, 2017.

WAGNER, Anna Dorothea; SYN, Nicholas LX; MOEHLER, Markus; GROTHE, Wilfried; YONG, Wei Peng; TAI, Bee-Choo; HO, Jingshan;

UNVERZAGT, Susanne. Chemotherapy for advanced gastric cancer. **Cochrane database of systematic reviews**, John Wiley & Sons, Ltd, n. 8, 2017.

WAINE, Michael; ROSSA, Carlos; SLOBODA, Ron; USMANI, Nawaid; TAVAKOLI, Mahdi. Needle tracking and deflection prediction for robot-assisted needle insertion using 2d ultrasound images. **Journal of Medical Robotics Research**, World Scientific, v. 1, n. 01, p. 1640001, 2016.

WANG, Manyan; ORWAR, Owe; OLOFSSON, Jessica; WEBER, Stephen G. Single-cell electroporation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 397, n. 8, p. 3235–3248, 2010.

WELTI, Jonathan; LOGES, Sonja; DIMMELER, Stefanie; CARMELIET, Peter. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **The Journal of clinical investigation**, Am Soc Clin Investig, v. 123, n. 8, p. 3190–3200, 2013.

WOO, Je Wook *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nature biotechnology**, Nature Publishing Group, v. 33, n. 11, p. 1162–1164, 2015.

YARMUSH, Martin L; GOLBERG, Alexander; SERSA, Gregor; KOTNIK, Tadej; DAMIJAN, Miklavcic. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. **Annual review of biomedical engineering**, Annual Reviews, v. 16, p. 295–320, 2014.

ZIMMERMANN, Ulrich; NEIL, GA. The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications. **Electromanipulation of cells**, CRC, p. 1–106, 1996.

ŽUPANIČ, Anže; ČOROVIĆ, Selma; MIKLAVČIČ, Damijan. Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy. **Radiology and Oncology**, Sciendo, v. 42, n. 2, p. 93–101, 2008.

APÊNDICE A – ESPECIFICAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS COMERCIAIS DE ELETROPORAÇÃO

A Tabela 13 foi construída a partir de uma revisão bibliográfica das especificações dos equipamentos comerciais mais utilizados para EP, em especial a corrente máxima suportada pelos equipamentos, visto que este parâmetro foi usado como limiar de segurança na avaliação dos efeitos de aproximação das agulhas no tecido tumoral.

Legenda:

*Geometria predefinida:

- eletrodo tipo II : 8 pulsos - 400 V ou 960 V
- eletrodo *finger*: 8 pulsos - 400 V
- eletrodo tipo III: 4 pulsos - 730 V

**Geometria personalizável:

- tecidos moles: eletrodo de agulha única (1,2 mm de diâmetro, 10-40 mm de profundidade)
- osso: eletrodo de agulha única (1,8 mm de diâmetro, 10-40 mm de profundidade)

Tabela 13 – APÊNDICE A - Especificações dos equipamentos comerciais utilizados para Eletroporação.

Equipamento	Aplicação	Número de pulsos	Duração dos pulsos	Frequência de repetição	Amplitude dos pulsos	Corrente máxima
<i>Igea Cliniporator™ EPS02</i> ^{1,2,3} geometria predefinida*	EQT	4-8*	100 µs	1 Hz ou 5 kHz	400/730/960 V*	20 A
<i>Igea Cliniporator VITAE</i> ^{1,2,3} geometria predefinida*	EQT/EGT	4-8*	100 µs	1 Hz ou 5 kHz	400/730/960 V*	20 A
<i>Igea Cliniporator VITAE</i> ^{1,2,3} geometria customizada**	EQT/EGT	4+4 bipolar	-	1 kHz	500-3000 V	50 A
<i>Angiodynamics NanoKnife</i> ^{3,4,5} <i>BTX ECM830</i> ⁶	NTIRE EQT/EGT	10-100 1 - 36	20-100 µs 10-600 µs	- 0,1 - 10 Hz	100-3000 V 30-3000 V	50 A < 500 A
<i>Protech International CUY21EDIT</i> ⁶ <i>Biopulse S.R.L. Ontkodisruptor</i> ^{7,8,9}	EGT ECT (vet)	- 8 bipolar	0,1 ms-1 s 50 µs + 50µs	1 Hz-10 kHz -	1-500 V 300-1500 V	descarga capacitiva <5 A 5 A
<i>Leroy Biotech ElectrocellIB</i> ¹⁰	EQT/EGT	1-10000	5-50000 µs	0,1 Hz-1 kHz	0-1000 V	6 - 10 A

Fonte – ¹(REBERSEK *et al.*, 2014), ²(BERTACCCHINI, 2017), ³(STAAL; GILBERT, 2011), ⁴(BERTACCCHINI *et al.*, 2007), ⁵(RUBINSKY *et al.*, 2007), ⁶(REBERSEK; MIKLAVC̃IC̃, 2010), ⁷(SPUGNINI *et al.*, 2017), ⁸(SRL, 2017), ⁹(SPUGNINI *et al.*, 2014), ¹⁰(BIOTECH, 2010)