



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA

LUCAS BERTINETTI LOPES

GÊIS CONDUTORES NA HOMOGENEIZAÇÃO DO CAMPO
ELÉTRICO EM ELETROPORAÇÃO E ELETROQUIMIOTERAPIA:
ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO*

Florianópolis - SC
2021

Lucas Bertinetti Lopes

**GÉIS CONDUTORES NA HOMOGENEIZAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO EM
ELETROPORAÇÃO E ELETROQUIMIOTERAPIA:
ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO***

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

Orientadora: Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.

Florianópolis - SC

2021

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

Bertinetti Lopes, Lucas

Géis condutores na homogeneização do campo elétrico em eletroporação e eletroquimioterapia : Estudo in silico e in vitro / Lucas Bertinetti Lopes ; orientador, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2021.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroporação. 3. Eletroquimioterapia. I. Ota Hisayasu Suzuki, Daniela. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Lucas Bertinetti Lopes

Géis condutores na homogeneização do campo elétrico em eletroporação e eletroquimioterapia:

Estudo *in silico* e *in vitro*

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

Prof. Adao Antonio de Souza Junior, Dr.
Instituto Federal Sul-rio-grandense - IFSUL

Profa. Claudia Mirian de Godoy Marques, PhD.
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

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.

Telles Brunelli Lazzarin, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica

Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Florianópolis - SC, 18 de Janeiro de 2021.

*Dedico este trabalho ao meu avô, João,
pelo incentivo e ensinamentos deixados à mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Daniela, por me guiar ao longo desses anos de mestrado e compartilhar não apenas os conhecimentos técnicos, mas também reflexões acerca do "porquê e pra que" das coisas na vida.

Agradeço também aos colegas e professores do IEB-UFSC e de outros laboratórios pela convivência e incentivo, em especial aos colegas Guilherme, Afrânio e Helton, pelas importantes contribuições neste trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Universidade Federal de Santa Catarina e seus servidores por toda infraestrutura e suporte na vida acadêmica.

Palavras não são suficientes pra expressar minha gratidão à minha família. Pelo apoio e incentivo incondicional, por acreditarem e abraçarem meus objetivos e pela preocupação em deixar a educação e o conhecimento como herança.

À todas as pessoas que estiveram comigo, compartilhando momentos bons e ruins, histórias, conversas e parceria, meu sincero agradecimento.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

*“A vida é uma sequência de encontros inéditos com o mundo,
e portanto ela não se deixa traduzir em fórmulas de nenhuma espécie”*
Clóvis de Barros Filho

RESUMO

A eletroquimioterapia é um tratamento para câncer que combina a quimioterapia e a eletroporação. A eletroporação consiste na aplicação de pulsos de campo elétrico em tecidos biológicos causando um aumento na permeabilidade da membrana celular e facilitando a entrada dos quimioterápicos ao interior das células tumorais, aumentando sua citotoxicidade. Para o sucesso do tratamento, toda região tumoral deve ser exposta a um campo elétrico adequado. A modelagem numérica e estudos *in vitro* são usados em uma etapa de pré-tratamento para avaliar a distribuição de campo elétrico e possíveis problemas, principalmente quando as estruturas dos tecidos possuem geometria irregular. Géis condutores podem ser utilizados para homogeneizar a distribuição de campo elétrico. Sendo assim, esta dissertação de mestrado traz um estudo *in silico* e *in vitro* para avaliar o uso dos géis na homogeneização do campo elétrico. Foram testados géis comerciais e géis preparados em laboratório. Os resultados mostram que os géis são efetivos, porém é indicado que seja preparado um gel de condutividade ótima determinada no pré-tratamento.

Palavras-chaves: Eletroporação. Eletroquimioterapia. Distribuição de Campo Elétrico. Géis Condutivos. Modelos Vegetais.

ABSTRACT

Electrochemotherapy is a cancer treatment that combines chemotherapy and electroporation. Electroporation consists of applying electric field pulses in biological tissues causing an increase in the cell membrane permeability and facilitating the entrance of drugs inside tumour cells and increasing their cytotoxicity. For successful treatment, the entire tumour region needs to be exposed to an adequate electric field intensity. Numerical modeling and in vitro studies are used in a pre-treatment step to assess the electric field distribution and possible issues, especially in tissue structures with irregular geometry. Conductive gels can be used to homogenize the electric field distribution. Therefore, this master's dissertation brings an in silico and in vitro study to evaluate the use of gels in homogenization of electric field. Commercial gels and gels prepared in laboratory were tested. The results show that the gels are effective, however it is recommended to prepare an optimum conductivity gel in the pre-treatment step.

Keywords: Electroporation. Electrochemotherapy. Electric Field Distribution. Conductive Gels. Vegetal Models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema representativo do surgimento de um tumor. Células normais em um tecido (A) crescem e dividem-se (B). Agentes cancerígenos influenciam no processo, produzindo uma célula cancerígena (C) que começa a multiplicar-se de maneira desordenada e contínua (D) dando origem a um tumor (E). Fonte – adaptado de (ONCOLOGIA DO BRASIL, 2017)	19
Figura 2.2 – Formação de poros na membrana plasmática durante eletroporação. Na parte superior, um esquema idealizado da membrana plasmática. Na parte inferior, uma simulação a nível molecular da membrana plasmática. A membrana plasmática aparece intacta quando o campo elétrico é aplicado (A). Após 0,15 ns algumas moléculas começam a penetrar a membrana (B). E após 0,5 ns o poro se estabiliza, permitindo que uma maior quantidade de moléculas trafegue pela membrana (C). Fonte - (YARMUSH et al., 2014)	20
Figura 2.3 – EQT de um tumor de pele canino. (A) Antes do tratamento; (B) Imediatamente após a aplicação da EQT; (C) Um mês após o tratamento; (D) Dois meses após o tratamento sem recidiva do tumor. Fonte – (SUZUKI; ANSELMO et al., 2015)	22
Figura 2.4 – Diferentes tipos de eletrodos. (a) Eletrodo agulha linear; (b) Eletrodo agulha hexagonal; (c) Eletrodo de placas; (d) Eletrodos de dedo; (e) Eletrodo agulha ajustável. Fonte – (GEHL et al., 2018)	23
Figura 2.5 – Resultados da simulação com géis de diferentes condutividades: (a) sem gel, (b) 0,05 S/m, (c) 0,1 S/m, (d) 0,2 S/m, (e) 0,5 S/m e (f) 1 S/m. A área em preto indica ausência de eletroporação; a área em cinza indica ER; e a área em branco indica EIR. Fonte – (IVORRA et al., 2008)	25
Figura 2.6 – Batatas sendo usadas em experimento <i>in vitro</i> para analisar possíveis perdas de campo elétrico em geometria irregular. Fonte – (HEYSE; PINTARELLI; SUZUKI, 2019)	27
Figura 2.7 – Sessão transversal de uma batata e suas estruturas internas. Fonte – Adaptado de (OEY et al., 2016)	27
Figura 3.1 – Modelo geométrico simulado. Fonte – Elaborada pelo autor	29
Figura 3.2 – Configuração experimental (a) Sem gel condutor; (b) Com gel condutor. Fonte – Elaborada pelo autor	32
Figura 3.3 – Equipamento eletroporador desenvolvido no IEB	32
Figura 3.4 – Medidor de condutividade HI 8733	33
Figura 3.5 – Suporte cilíndrico para medição de condutividade de géis. (a) Esquemático 3D da área (A) e altura (l) usadas para o cálculo. (b) Suporte aberto com eletrodos de ouro. Fonte – (PINTARELLI et al., 2019)	33
Figura 3.6 – Suporte para fotos das amostras. Fonte – Elaborada pelo autor	34
Figura 4.1 – Corrente nos terminais do eletrodo em função da condutividade do gel. Fonte – Elaborada pelo autor	35
Figura 4.2 – Volume de tecido eletroporado (cm ³) em função da condutividade do gel. Fonte – Elaborada pelo autor	36

Figura 4.3 – Volume de RE e Volume de IRE (cm ³) em função da condutividade do gel para 500 V. Fonte – Elaborada pelo autor	36
Figura 4.4 – Campo elétrico na região da descontinuidade para gel de condutividade: (A) 0,0001 S/m; (B) 0,01 S/m; (C) 0,02 S/m; (D) 0,03 S/m; (E) 0,04 S/m; (F) 0,05 S/m; (G) 0,06 S/m; (H) 0,07 S/m; (I) 0,08 S/m; (J) 0,09 S/m; (K) 0,1 S/m; (L) 0,2 S/m	37
Figura 4.5 – Geometria em arco simulada	38
Figura 4.6 – Campo elétrico na região da descontinuidade com gel em formato de arco para: (A) 0,05 S/m; (B) 0,07 S/m; (C) 0,09 S/m; (D) 0,11 S/m; (E) 0,13 S/m; (F) 0,15 S/m; (G) 0,17 S/m; (H) 0,19 S/m; (I) 0,21 S/m	38
Figura 4.7 – Geometria com espaço sem gel entre agulha e descontinuidade	39
Figura 4.8 – Campo elétrico na região da descontinuidade com a falta do gel entre a agulha e a descontinuidade para: (A) 0,1 S/m; (B) 0,2 S/m; (C) 0,5 S/m; (D) 1 S/m; (E) 2 S/m; (F) 4 S/m	39
Figura 4.9 – Comparação entre simulação (<i>in silico</i>) e estudo <i>in vitro</i> : (A) Sem gel; (B) Gel de 0,057 S/m preparado pelo autor; (C) Gel comercial de 0,1 S/m; (D) Gel comercial de 0,2 S/m;	42
Figura 5.1 – Campo distorcido em casos extremos. Regiões transparentes representam a área onde o campo elétrico foi abaixo de 20 kV/m (sem efeitos significantes), a cor cinza representa o campo elétrico entre 20 e 80 kV/m (RE) e a cor cinza escuro representa campo elétrico acima de 80 kV/m (IRE).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Condutividade de géis comerciais.	26
Tabela 3.1 – Parâmetros do modelo de eletroporação	28
Tabela 3.2 – Parâmetros da geometria nas simulações	30
Tabela 4.1 – Condutividade elétrica da água deionizada e soro fisiológico.	40
Tabela 4.2 – Géis preparados.	40
Tabela 4.3 – Resultados de corrente elétrica	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
EP	Eletroporação
EQT	Eletroquimioterapia
IEB-UFSC	Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ER	Eletroporação Reversível
EIR	Eletroporação Irreversível
ESOPE	Padrão Europeu de Procedimentos Operacionais em Eletroquimioterapia
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LISTA DE SÍMBOLOS

σ_0	Condutividade Elétrica Inicial [S/m]
σ_{max}	Condutividade Elétrica Máxima [S/m]
E_{er}	Limiar de Eletroporação Reversível [V/m]
E_{eir}	Limiar de Eletroporação Irreversível [V/m]
σ	Condutividade Elétrica [S/m]
V	Tensão Elétrica [V]
∇	Operador Gradiente
Ω	Unidade de Resistência Elétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO TEÓRICA	18
2.1	O CÂNCER	18
2.1.1	Causas e Tratamentos	18
2.2	O FENÔMENO DA ELETROPORAÇÃO	20
2.2.1	A Eletroporação como técnica	20
2.3	ELETROQUIMIOTERAPIA	21
2.3.1	Padrão Europeu de Procedimentos Operacionais em Eletroquimioterapia	22
2.3.2	Planejamento do tratamento	23
2.3.3	Simulações no planejamento do tratamento	24
2.3.4	Géis condutores	24
2.3.5	Experimentação com modelos vegetais na EQT	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	MODELAGEM NUMÉRICA E SIMULAÇÃO	28
3.2	PREPARO DOS GÉIS CONDUTORES	30
3.3	EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	31
3.4	EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	34
4	RESULTADOS	35
4.1	ESTUDO <i>IN SILICO</i>	35
4.1.1	Outras simulações	37
4.2	GÉIS CONDUTORES	40
4.2.1	Preparo proposto por Ivorra e Rubisnky	40
4.2.2	Preparo proposto pelo autor	40
4.3	EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	41
5	DISCUSSÃO	43
5.1	EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
5.2	MODELAMENTO NUMÉRICO E ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	44
5.3	PREPARO DOS GÉIS	46
6	TRABALHOS FUTUROS	47
6.1	PATENTE DO MÉTODO DE PREPARO DO GEL CONDUTOR	47
6.2	USO DO GEL CONDUTOR PARA MIMETIZAR TECIDOS	47
6.3	MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO PARA GÉIS CONDUTORES EM EQT	47
6.4	ESTUDO DE CASO	48
7	CONCLUSÃO	49

Referências 50

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Em 2018 foram cerca de 18 milhões de novos casos e 9,5 milhões de mortes causadas pela doença no mundo, números que devem crescer em aproximadamente 20% até 2025, segundo a Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

Dentro deste panorama, é imprescindível que a tecnologia aliada as práticas médicas esteja em constante evolução, de forma a aumentar a eficiência e a acessibilidade de diagnósticos e tratamentos para o câncer.

Novas abordagens de tratamento têm sido exploradas com o intuito de proporcionar melhores resultados e minimizar efeitos colaterais. Dentre elas, destaca-se as terapias com eletroporação (EP). A EP consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos e intensos com objetivo de abrir poros na membrana plasmática das células locais, reduzindo a seletividade natural da membrana e facilitando a entrada de íons, moléculas e até macromoléculas no interior das células. (KINOSITA JR; TSONG, 1977; KINOSITA JR; ASHIKAWA et al., 1988; BARNETT; WEAVER, 1991; CHANG et al., 2012). A EP vem sendo usada no tratamento de câncer como um método não-termal para ablação de tumores (HJOUJ; RUBINSKY, 2010; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015; BONAKDAR et al., 2015; BANÚS COBO, 2015; DONG et al., 2018) e também associada à quimioterapia, aplicação chamada de eletroquimioterapia (EQT).

A EQT consiste na combinação da quimioterapia e da eletroporação, com o objetivo de facilitar o transporte dos fármacos ao interior das células tumorais, aumentando seu efeito citotóxico (ORLOWSKI et al., 1988; MIR; ORLOWSKI et al., 1991). Esta técnica vem se destacando na medicina humana e veterinária como um tratamento oncológico minimamente invasivo e com poucos efeitos colaterais, sendo estudada nos últimos 30 anos. Embora a EQT seja amplamente utilizada na Europa em mais de 130 centros clínicos (MIKLAVČIČ et al., 2014) como tratamento reconhecido para melanoma (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2013), carcinoma basocelular e epidermoides primários (NATIONAL

INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2014), no Brasil a técnica não está entre as terapias anticâncer reconhecidas pela comunidade médica, sendo restrita ao uso veterinário. Portanto, para que haja uma maior confiabilidade técnica por parte da classe médica e dos órgãos de saúde no Brasil, é necessário que o fenômeno continue sendo estudado ostensivamente. O Instituto de Engenharia Biomédica (IEB-UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) desempenha um papel importante na pesquisa em EQT, com estudos que visam um melhor entendimento dos diversos parâmetros que envolvem a técnica através de modelagem matemática, simulação, experimentação e o relato de casos clínicos veterinários (SUZUKI; RAMOS et al., 2011; SUZUKI; ANSELMO et al., 2015; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016; SUZUKI; BERKENBROCK; OLIVEIRA et al., 2017; SUZUKI; BERKENBROCK; FREDERICO et al., 2018; BERKENBROCK; BRASIL PINTARELLI et al., 2018; BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018).

Embora existam diretrizes oficiais que especificam os protocolos de tratamento em alguns casos, tem sido encorajado o planejamento específico para cada caso de tratamento, onde se leva em consideração as particularidades fisiológicas e anatômicas do paciente em questão, como o tamanho e formato dos tumores, bem como os tecidos adjacentes, que influenciam na distribuição dos campos elétricos (SUZUKI; ANSELMO et al., 2015; COROVIC et al., 2013; LACKOVIĆ; MAGJAREVIĆ; MIKLAVČIČ, 2010; BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018; PAVLIHA et al., 2012), sendo uma prática que pode reduzir consideravelmente a chance de falha do tratamento, já que o tumor pode recidivar em locais onde o campo elétrico não é suficiente (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

Dentro desse contexto, este trabalho visa analisar o efeito de géis condutores comerciais e preparados em laboratório, na homogeneização do campo elétrico em tratamentos de EQT através de um estudo *in silico* e *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os géis condutores na homogeneização do campo elétrico na eletroporação em geometria irregular, utilizando eletrodos agulha.

1.1.2 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos serviram de base para alcançar os objetivos gerais:

- Preparar géis condutores com condutividades específicas;
- Analisar a distribuição de campo elétrico, corrente elétrica e volume de eletroporação em relação à condutividade dos géis em regiões descontínuas através de estudos *in silico* e *in vitro*;
- Realizar testes estatísticos para conduzir os experimentos com tamanho de amostra adequado e para comparar os resultados de forma a obter evidências estatísticas.

CAPÍTULO 2

REVISÃO TEÓRICA

Neste capítulo são apresentados conceitos, dados e informações relevantes para a compreensão do contexto no qual este trabalho está inserido. São apresentados dados acerca do câncer e suas características de tratamento. Em seguida são comentados os conceitos que permeiam o fenômeno da eletroporação e também suas utilizações. E então a fundamentação teórica é finalizada com um panorama da eletroquimioterapia, suas características e ferramentas utilizadas para o desenvolvimento da técnica.

2.1 O CÂNCER

Segundo a OMS, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Dados da Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil em 2018, publicada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a), estimam 640 mil novos casos no país no biênio 2018-2019, sendo o câncer de pele o mais frequente com 30% de todos as malignâncias. Além da alta taxa de letalidade, o câncer é conhecido pelos sintomas agressivos como rápida perda de peso, fadiga extrema, dor constante e hemorragia (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018).

É inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, sendo foco de investimentos em prevenção, tratamentos e pesquisas. Mas, apesar de todos os esforços despendidos pelas autoridades públicas e instituições de pesquisa, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estima que os números de incidências e mortes causadas pelo câncer no mundo crescerão em 20% até 2025 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

2.1.1 Causas e Tratamentos

O câncer se caracteriza por uma divisão celular desordenada e contínua. O processo de divisão celular é natural e necessário nos humanos e animais para o desenvolvimento e manutenção de seus corpos. Este processo é controlado pelo conteúdo genético de cada célula e está normalmente sob controle. O câncer acontece quando o controle genético falha, seja

por causa natural ou agente externo, gerando células anormais que passam a se dividir de maneira descontrolada e agressiva, produzindo tumores locais ou migrando através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos até outra parte do corpo (metástase), causando danos a células saudáveis e tecidos do corpo (STEPHENS; AIGNER; ALLEN-MERSH et al., 2016). Na Figura 2.1 é mostrado um esquema representativo do surgimento de um tumor.

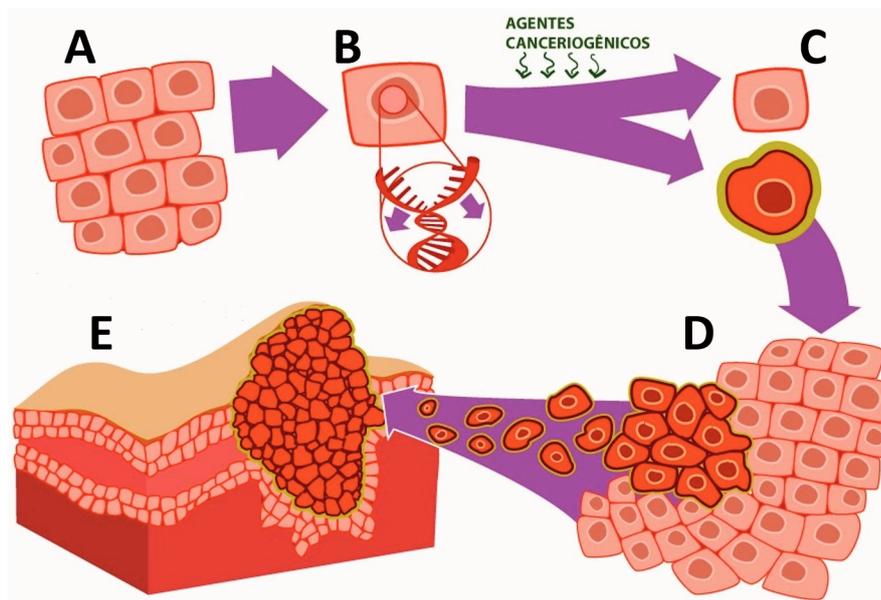


Figura 2.1 – Esquema representativo do surgimento de um tumor. Células normais em um tecido (A) crescem e dividem-se (B). Agentes cancerígenos influenciam no processo, produzindo uma célula cancerígena (C) que começa a multiplicar-se de maneira desordenada e contínua (D) dando origem a um tumor (E). Fonte – adaptado de (ONCOLOGIA DO BRASIL, 2017)

Segundo o INCA, apenas 10 a 20% dos casos de câncer não estão ligados a fatores externos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018b), sendo atribuídos a fatores hormonais, envelhecimento e condições genéticas. Portanto, a maior parte dos casos de câncer está relacionada diretamente a agentes externos mutagênicos. Aproximadamente um terço das mortes por câncer se deve a fatores comportamentais e alimentares, tais como: uso de tabaco e álcool, obesidade, má alimentação e falta de atividade física. Infecções por vírus ou bactérias, como o HPV (*Human Papilloma Virus*), e a exposição a raios ultravioletas e radiação também são agentes causadores de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Os tratamentos mais usados para o câncer são a remoção cirúrgica, a radioterapia, quimioterapia e combinações destes, levando em consideração fatores como o estágio da doença, local e possíveis impactos no paciente (COELHO; VIEIRA, s.d.). Estas abordagens comumente desencadeiam efeitos colaterais que prejudicam o bem estar do paciente em tratamento, tais como sequelas cirúrgicas, perda de cabelo, infertilidade, depressão, entre outros (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018).

2.2 O FENÔMENO DA ELETROPORAÇÃO

O fenômeno da eletroporação vem sendo estudado desde a década de 50, a partir dos primeiros relatos da ruptura reversível e irreversível da membrana de nervos, quando expostos a campos elétricos (FRANKENHAEUSER; WIDÉN, 1956; STÄMPFLI; WILLI, 1957; STÄMPFLI, 1958). Entretanto, somente em 1977, Kinoshita e Tsong apresentam a ideia de formação de poros hidrofílicos na membrana plasmática (KINOSHITA JR; TSONG, 1977). Os poros ocorrem quando o potencial transmembrana das células atinge um limiar (normalmente 0.2-1 V), que é alcançado através da aplicação de campos elétricos de alta intensidade e curta duração sobre essas células. A abertura dos poros aumenta momentaneamente a permeabilidade da membrana plasmática a íons, moléculas e até mesmo macromoléculas (KINOSHITA JR; ASHIKAWA et al., 1988; BARNETT; WEAVER, 1991; CHANG et al., 2012). A Figura 2.2 ilustra a formação de um poro na membrana plasmática.

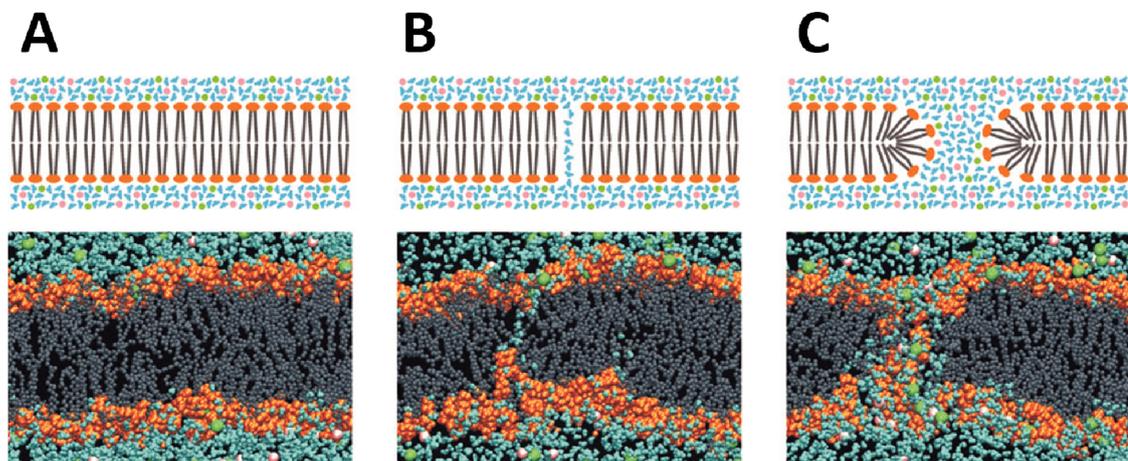


Figura 2.2 – Formação de poros na membrana plasmática durante eletroporação. Na parte superior, um esquema idealizado da membrana plasmática. Na parte inferior, uma simulação a nível molecular da membrana plasmática. A membrana plasmática aparece intacta quando o campo elétrico é aplicado (A). Após 0,15 ns algumas moléculas começam a penetrar a membrana (B). E após 0,5 ns o poro se estabiliza, permitindo que uma maior quantidade de moléculas trafegue pela membrana (C). Fonte - (YARMUSH et al., 2014)

A eletroporação pode ocorrer de maneira reversível ou irreversível, dependendo de parâmetros do campo elétrico aplicado, como intensidade, número e largura dos pulsos. Estes parâmetros serão abordados com mais detalhes nas próximas seções. Na eletroporação reversível (ER), assim que o campo é interrompido, os poros se fecham gradualmente e a membrana é restabelecida. Na eletroporação irreversível (EIR), a membrana é destruída e a célula morre. Estudos de revisão traçam um bom panorama teórico (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996; CHEN et al., 2006; FOX et al., 2006; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015).

2.2.1 A Eletroporação como técnica

Os dois estágios da eletroporação vêm sendo aplicados em vários campos da química, biologia e medicina.

A eletroporação irreversível vem ganhando popularidade como uma alternativa não-termal para ablação de tumores (DAVALOS; MIR; RUBINSKY, 2005; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015), uma vez que as técnicas atuais envolvem temperaturas extremamente baixas (crio-ablação) ou altas (ablação por radio-frequência ou micro-ondas) (JAHANGEER et al., 2013; CHU; DUPUY, 2014). A EIR também vem sendo estudada como método não-farmacológico para esterilização de feridas (GOLBERG et al., 2014; KHAN et al., 2016).

A eletroporação reversível tem sido empregada na transferência de DNA e RNA (PAGANIN-GIOANNI et al., 2011; LUFT; KETTELER, 2015) como forma de melhorar a imunidade contra câncer, doenças infecciosas, esclerose múltipla e outras patologias (YARMUSH et al., 2014), na administração transdérmica de fármacos, expandindo a quantidade de medicamentos que podem ser administrados desta forma (DENET; VANBEVER; PRÉAT, 2004; PRAUSNITZ et al., 2012; ZOREC et al., 2013) e, além disso, a eletroporação é usada em conjunto com a quimioterapia, como terapia anticâncer na chamada eletroquimioterapia (MIKLAVČIČ et al., 2014).

2.3 ELETROQUIMIOTERAPIA

A EQT é o tratamento de câncer que usa a eletroporação reversível como ferramenta para aumentar a citotoxicidade do quimioterápico (NEUMANN et al., 1982; MIR, 2001; PAGANIN-GIOANNI et al., 2011; KOTNIK et al., 2015). Este processo permite entrada facilitada do fármaco para o interior das células, devido ao aumento na permeabilidade da membrana pela ER. Diferentemente da ablação por IRE, que não é capaz de separar tecidos saudáveis e tumores, e que pode causar danos desnecessários, a EQT se caracteriza por preservar tecidos adjacentes saudáveis (JAHANGEER et al., 2013; MIR, 2001).

Para tal, um eletrodo é inserido no tecido de maneira conveniente e, através de um equipamento adequado, uma série de pulsos elétricos é aplicada no local. O fármaco deve ser administrado cerca de 10 minutos antes da aplicação dos pulsos, para que esteja disponível no tecido no momento da eletroporação. A bleomicina é o quimioterápico mais utilizado na EQT, seguido da cisplatina, sendo aplicados de maneira intravenosa ou local (RAMIREZ et al., 1998; CAMPANA et al., 2009; GROSELJ; BOSNJAK et al., 2018; MICHEL et al., 2018). A bleomicina não é permeável na membrana celular, tendo sua entrada no meio intracelular por um processo lento e pouco eficiente. Entretanto, em conjunto com a ER, sua citotoxicidade pode aumentar em até 1000 vezes (ORLOWSKI et al., 1988).

A Figura 2.3 mostra o resultado de um tratamento clínico veterinário com EQT em um tumor de pele canino de 5 mm. O tratamento resultou na eliminação do tumor e na não recidiva do mesmo. Em comparação a intervenções cirúrgicas, pode-se perceber que a EQT causa um dano diminuto devido à aplicação do tratamento (B) e mantém grande parte do tecido saudável intacto (D).

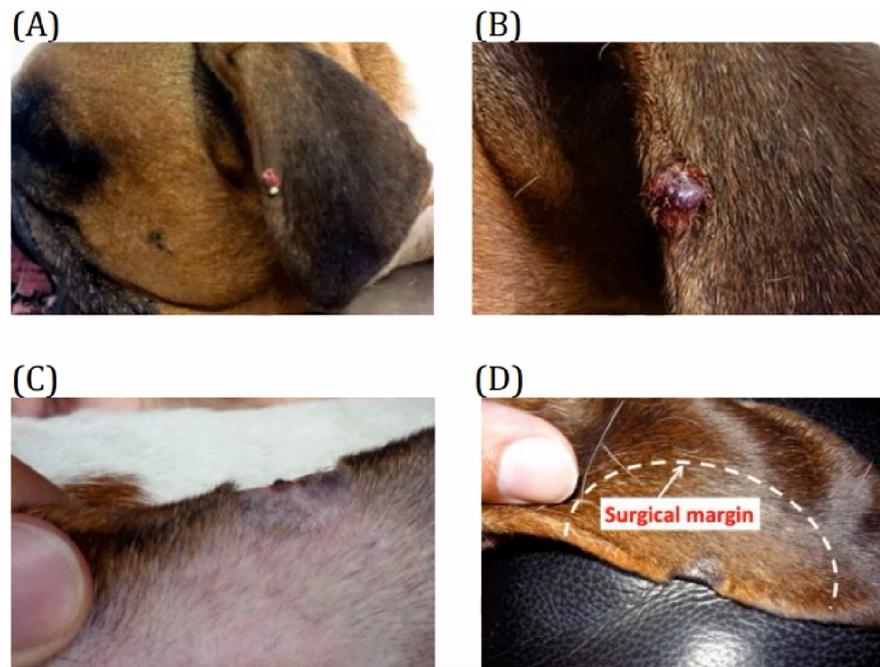


Figura 2.3 – EQT de um tumor de pele canino. (A) Antes do tratamento; (B) Imediatamente após a aplicação da EQT; (C) Um mês após o tratamento; (D) Dois meses após o tratamento sem recidiva do tumor. Fonte – (SUZUKI; ANSELMO et al., 2015)

2.3.1 Padrão Europeu de Procedimentos Operacionais em Eletroquimioterapia

Em 2006, foi publicado o Padrão Europeu de Procedimentos Operacionais em Eletroquimioterapia (ESOPE) no intuito de disseminar diretrizes e protocolos para a realização da EQT em tumores cutâneos e subcutâneos de maneira eficaz e segura (MIR; GEHL et al., 2006). Três tipos de eletrodos foram incluídos, sendo utilizados de acordo com o número e o diâmetro dos nódulos tumorais: De placas (Tipo I), par de agulhas (Tipo II) e agulhas em configuração hexagonal (Tipo III). O padrão também prevê a aplicação de 8 pulsos de $100 \mu\text{s}$ nas frequências de 1 ou 5000 Hz.

Este padrão veio a ser atualizado em 2018 (GEHL et al., 2018), de forma a incorporar e regulamentar novas práticas, além de uma gama maior de eletrodos (Figura 2.4).

Embora os eletrodos agulha sejam indicados para tumores profundos com diâmetro abaixo de 4mm, vem sendo discutido o uso deste tipo de eletrodos em tumores superficiais, uma vez que os eletrodos de placas conferem um melhor contato entre o tumor e o eletrodo (ČOROVÍČ et al., 2008), mas requerem diferentes configurações de potencial elétrico e afastamento das placas de acordo com o tamanho e o número de nódulos tumorais, o que pode tornar a aplicação do tratamento longa e complexa para os profissionais da saúde. Os eletrodos agulha, em conjunto com géis condutores, podem ser efetivos no tratamento de tumores superficiais e tornam o procedimento mais simples, pois o eletrodo e o potencial elétrico são fixos independente do tamanho do tumor e o eletrodo é reposicionado para várias aplicações no caso de tumores volumosos (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016; BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018).

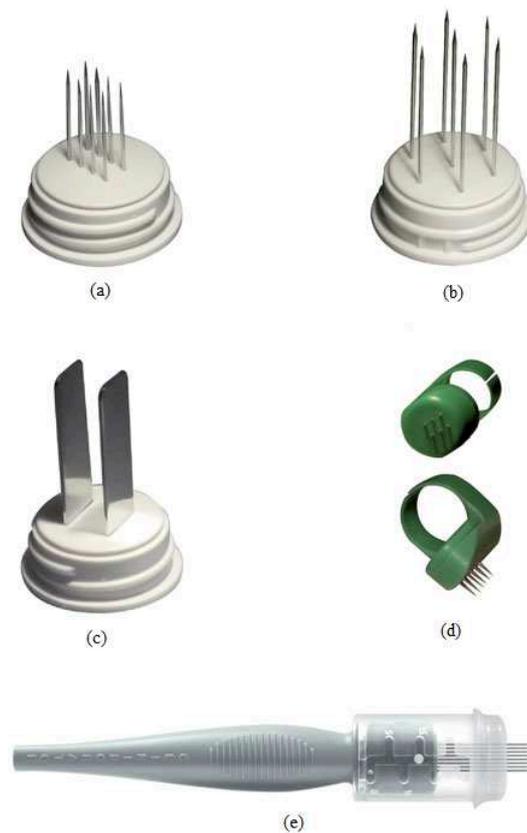


Figura 2.4 – Diferentes tipos de eletrodos. (a) Eletrodo agulha linear; (b) Eletrodo agulha hexagonal; (c) Eletrodo de placas; (d) Eletrodos de dedo; (e) Eletrodo agulha ajustável. Fonte – (GEHL et al., 2018)

2.3.2 Planejamento do tratamento

No contexto da engenharia, um dos principais obstáculos para o sucesso da EQT é garantir que haja campo elétrico suficiente em todo o volume tumoral, em outras palavras, é necessário garantir que todas as células tumorais sejam eletroporadas. Esta tarefa pode ser complexa, uma vez que a distribuição do campo elétrico depende das condutividades das estruturas teciduais (e.g., tecido ósseo, derme, epiderme, vasos sanguíneos) e das geometrias dos tecidos, que pelo crescimento desordenado dos tumores podem apresentar formatos irregulares, descontínuos e assimétricos. Isso implica em correntes e campos elétricos diferentes num arranjo de diferentes tecidos (IVORRA, Antoni; RUBINSKY, Boris, 2007).

O planejamento individual do tratamento, também chamado de pré-tratamento, é uma prática que vem sendo encorajada na EQT para identificar possíveis regiões tumorais que não serão submetidas a um campo elétrico adequado (*blind spots*), sobretudo no tratamento de tumores profundos, uma vez que as recomendações da ESOPE trazem diretrizes genéricas para a prática da EQT em tumores cutâneos e subcutâneos, mas não abrangem as especificidades e detalhes de cada caso (PAVLIHA et al., 2012).

O pré-tratamento parte de exames de imagem, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, que proporcionam a análise de uma série de fatores da anatomia das regiões de interesse, tais como a quantidade, tamanho e formato dos tumores, espessura e geometria dos tecidos adjacentes (MIKLAVCIC et al., 2010; PAVLIHA et al., 2012) e permitem

o modelamento matemático e simulação individual para que se chegue a uma configuração ótima de eletrodos, nível de tensão e protocolo a ser implementado (GROSELJ; KOS et al., 2015).

2.3.3 Simulações no planejamento do tratamento

As simulações computacionais são uma ferramenta valiosa no pré-tratamento da EQT. Através de técnicas computacionais, como por exemplo elementos finitos, é possível modelar os tecidos biológicos e a distribuição de campo elétrico através deles. Além disso, as simulações são importantes para analisar a corrente elétrica que será demandada do equipamento, bem como se esta corrente pode ser lesiva aos tecidos biológicos.

Além de conhecer as geometrias dos tecidos e eletrodos, para que a simulação ocorra, é preciso conhecer como cada tipo de tecido responde, em termos de condutividade elétrica, aos estímulos da eletroporação. O modelo matemático (Equação 2.1) proposto em (SEL et al., 2005) utiliza uma função sigmoide e leva em consideração a dinâmica da eletroporação, já que a distribuição do campo elétrico nos tecidos biológicos depende da condutividades dos mesmos, ao passo que a própria a distribuição de campo elétrico causa uma variação na condutividade do tecido, sendo um modelo amplamente aplicado em simulações de eletroporação.

$$\sigma(E) = \sigma_0 + \frac{\sigma_{max} - \sigma_0}{1 + D \cdot e^{-\left(\frac{E-A}{B}\right)}} \quad (2.1)$$

$$A = \frac{E_{eir} + E_{er}}{2} \quad B = \frac{E_{eir} - E_{er}}{C}$$

onde C e D são constantes do modelo proposto e iguais a 8 e 10, respectivamente. σ_0 , σ_{max} , E_{er} e E_{eir} são os parâmetros que caracterizam o tecido e representam, respectivamente, as condutividades inicial e máxima do tecido [S/m], e os limiares de campo elétrico para ER e EIR [V/m].

Com este modelo de condutividade, é possível empregar a técnica de elementos finitos à equação de Laplace para o princípio de conservação de cargas, conforme demonstrado na (Equação 2.2)

$$-\nabla \cdot (\sigma \cdot \nabla V) = 0 \quad (2.2)$$

onde σ representa a função condutividade elétrica do tecido em [S/m] e V a tensão elétrica aplicado em [V]. As condições de contorno de Dirichlet e de Neumann são usadas para modelar a tensão aplicada na superfície dos eletrodos e os limites externos das geometrias (SEL et al., 2005; COROVIC et al., 2013)

2.3.4 Géis condutores

Na prática da eletroporação em tecidos biológicos, os profissionais podem se deparar com situações onde um arranjo de eletrodos não é suficiente para obter uma distribuição de campo elétrico adequado em toda a área desejada, especialmente quando os tecidos envolvidos possuem

formato irregular. Os géis condutores são usados para melhorar o contato entre os eletrodos e os tecidos e pode ser usados para preencher possíveis espaços deixados por geometrias irregulares (IVORRA, Antoni; RUBINSKY, Boris, 2007; TOZON et al., 2010; MAHNA; FIROOZABADI; SHANKAYI, 2014; CALVET et al., 2014).

Autoni Ivorra e Rubinsky (2007) começaram a investigar o efeito da condutividade do gel quando usado em conjunto com eletrodos de placas paralelas. Posteriormente, Ivorra et al. (2008) voltaram a analisar esta questão simulando através do *software* COMSOL Multiphysics® a eletroporação de um tumor cutâneo ($\sigma_0 = 0,15$ S/m, $\sigma_{max} = 0,26$ S/m, $E_{er} = 10$ kV/m e $E_{eir} = 160$ kV/m) juntamente com tecido muscular ($\sigma_0 = 0,1$ S/m, $\sigma_{max} = 0,5$ S/m, $E_{er} = 20$ kV/m e $E_{eir} = 60$ kV/m) e pele ($\sigma_0 = 0,01$ S/m, $\sigma_{max} = 0,4$ S/m, $E_{er} = 30$ kV/m e $E_{eir} = 120$ kV/m) com géis variando de 0,05 S/m a 1 S/m. Os resultados (Figura 2.5) mostraram que ausência de gel e géis de baixa condutividade produzem áreas não tratadas, enquanto que géis de condutividade maior resultam em áreas saudáveis desnecessariamente eletroporadas. Portanto, a melhor distribuição de campo elétrico foi obtida com o gel de condutividade de 0,5 S/m, não só causando ER ao tumor, como também minimizando a eletroporação dos tecidos adjacentes saudáveis. Autoni Ivorra e Rubinsky (2007) consideram a faixa entre 0,5 e 1 S/m (3,33 a 6,66 vezes maior que a condutividade inicial do tecido tumoral) como faixa ótima de condutividade para os géis em EQT.

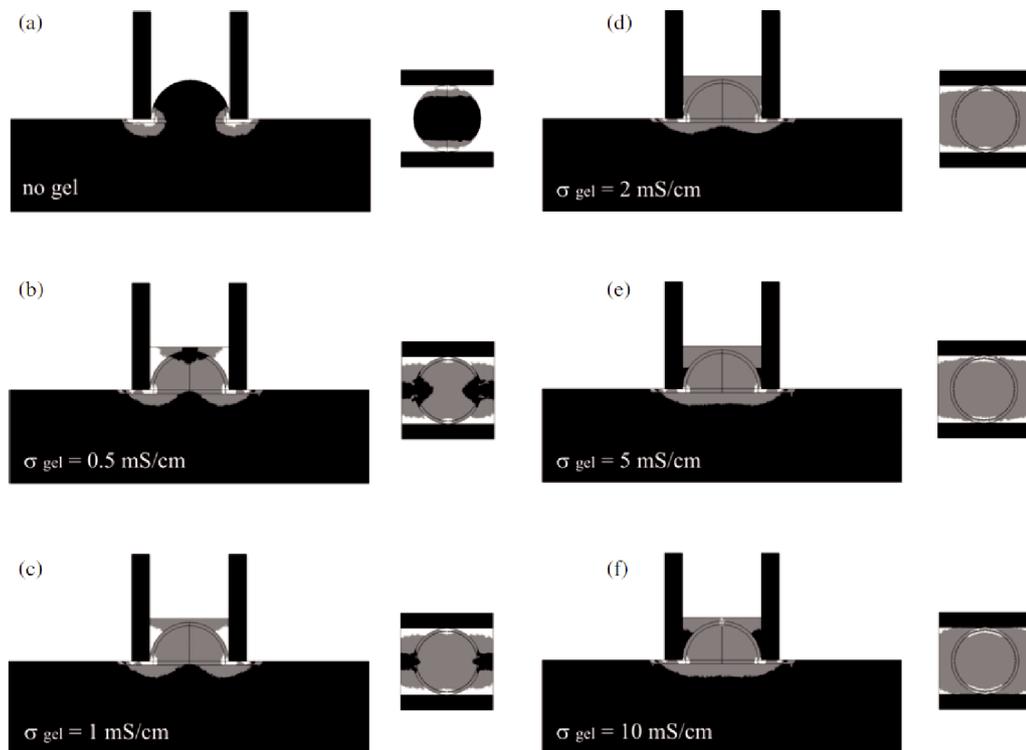


Figura 2.5 – Resultados da simulação com géis de diferentes condutividades: (a) sem gel, (b) 0,05 S/m, (c) 0,1 S/m, (d) 0,2 S/m, (e) 0,5 S/m e (f) 1 S/m. A área em preto indica ausência de eletroporação; a área em cinza indica ER; e a área em branco indica EIR. Fonte – (IVORRA et al., 2008)

Os géis normalmente usados são géis comerciais para eletrocardiograma e ultrassonografia, mas para estas utilizações a condutividade não é um parâmetro importante, o que resulta

em pouca ou nenhuma informação a respeito nas embalagens e manuais, além de uma grande diversidade de valores de condutividade de acordo com cada fabricante (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016; PINTARELLI et al., 2019). Ivorra e Pintarelli (IVORRA et al., 2008; PINTARELLI et al., 2019) trazem medidas de condutividade de géis comerciais, onde é possível ver que nenhum gel se encaixa na faixa ótima de condutividade. Todas as medidas foram tomadas a uma frequência de 10 kHz.

Tabela 2.1 – Condutividade de géis comerciais.

Gel Comercial	Fabricante	Condutividade (S/m)
UltraBio Sterile	Sonotech, Inc.	0,00015
Eko-Gel	CA.MI.NA, S.r.l	0,155
Ultrapasonic	Pharmaceutical Innovations, Inc.	0,085
Aquasonic 100 Sterile	Parker Laboratories, Inc.	0,205
Signal Gel	Parker Laboratories, Inc.	4,15
Redux Gel	Parker Laboratories, Inc.	3,95
Gelytev	Caithec.	0,15
Carbogel ECG	Carbogel	0,13
Ultra Gel - Ultrasound Gel	Multigel	0,197
Carbogel ULT	Carbogel	0,104

Fonte – adaptado de (IVORRA et al., 2008; PINTARELLI et al., 2019).

Ivorra ainda descreve a preparação de um gel condutor através de uma solução salina e ágar-ágar (IVORRA, Antoni; RUBINSKY, Boris, 2007). Adicionando 0,8 g de ágar-ágar para cada 100 ml da solução salina, aquecendo até o ponto de ebulição e então refrigerando a mistura, deve-se chegar a uma solução sólida e então basta mexê-la até tomar a consistência de gel.

Frente a isso, vale salientar que o uso dos géis condutores na homogeneização do campo elétrico não é uma prática comum na EQT, uma vez que não há géis comerciais específicos pra EQT e também não existem relatos científicos de géis preparados com a condutividade controlada para EQT, bem como seu uso em tratamentos.

2.3.5 Experimentação com modelos vegetais na EQT

Outra técnica bastante utilizada nos estudos de EQT são os experimentos *in vitro* com tecidos vegetais. A batata é o vegetal utilizado nos experimentos por ter seu tecido considerado homogêneo e de fácil manuseio (OEY et al., 2016). A eletroporação no tecido da batata facilita a interação entre a enzima polifenoloxidase e fenóis presentes, acelerando o processo de oxidação do tecido e, com isso, o acúmulo de pigmento marrom no local (CASTELLVÍ; BANÚS; IVORRA, 2016; OEY et al., 2016). Isto significa que a região da batata em que ocorrer eletroporação ficará visivelmente escura após 8 a 24 horas (Figura 2.6), trazendo não só um *feedback* visual da efetividade da eletroporação, mas também permitindo o teste de novos tipos de eletrodos e

parâmetros dos pulsos de tensão (CIMA; MIR, 2004; HJOUJ; RUBINSKY, 2010; CASTIELLO et al., 2014; SUAREZ et al., 2014; BHONSLE et al., 2015). Além disso, os experimentos *in vitro* são compatíveis com o conceito dos 3Rs no uso de animais em pesquisa: redução do número de animais, refinamento dos procedimentos e protocolos para minimizar a dor e o estresse, e a substituição por outras formas que não envolvam animais (BERKENBROCK; BRASIL PINTARELLI et al., 2018).



Figura 2.6 – Batatas sendo usadas em experimento *in vitro* para analisar possíveis perdas de campo elétrico em geometria irregular. Fonte – (HEYSE; PINTARELLI; SUZUKI, 2019)

Entretanto, o manuseio das batatas demanda alguns cuidados para que os efeitos macroscópicos da eletroporação não sejam mascarados por outros fenômenos que podem ocorrer simultaneamente. A estrutura tecidual da batata é composta por diferentes tecidos (Figura 2.7), como um sistema vascular e uma medula rica em aminoácidos livres, o que resulta em uma condutividade elétrica maior na região. Além disso, a quantidade de fenóis presentes no tecido da batata pode variar entre batatas individuais, principalmente se estas tiverem formas de cultivo diferentes (OEY et al., 2016).

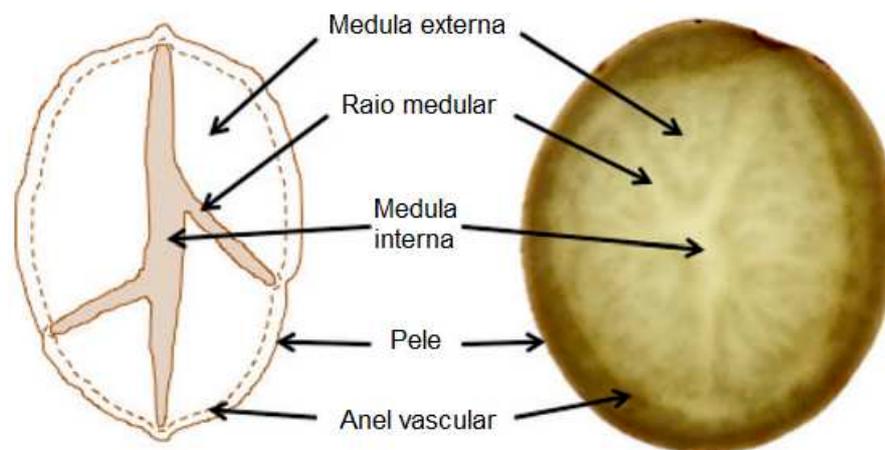


Figura 2.7 – Sessão transversal de uma batata e suas estruturas internas. Fonte – Adaptado de (OEY et al., 2016)

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentadas as metodologias, ferramentas e materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Os seguintes passos foram seguidos para chegar aos resultados deste trabalho:

- Modelagem numérica e simulação;
- Confecção dos géis condutores;
- Estudo *in vitro* da geometria em questão e diferentes géis;
- Análise estatística dos dados.

3.1 MODELAGEM NUMÉRICA E SIMULAÇÃO

A modelagem numérica foi desenvolvida no *software* COMSOL Multiphysics (COMSOL AB, Sweden), que permite a simulação tridimensional através do método de elementos finitos. Este método numérico consiste na subdivisão de domínios complexos em pequenas partes encontrando soluções aproximadas através de equações diferenciais (MACEJKOVIC; HEANEY, 1999).

Foi utilizado o módulo de corrente estacionária do COMSOL para resolver as equações do modelo (Equação 2.1 e Equação 2.2) de eletroporação anteriormente descritas na Subseção 2.3.3. Os parâmetros utilizados nas simulações são descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros do modelo de eletroporação

Parâmetro	Valor
Permissividade relativa do eletrodo	1
Condutividade elétrica do eletrodo	$1,74 \times 10^9$ S/m
Permissividade relativa da batata	1
Condutividade elétrica inicial da batata (σ_0)	0,03 S/m

continua na próxima página

Tabela 3.1: Parâmetros do modelo de eletroporação (continuação)

Condutividade elétrica final da batata (σ_{max})	0,36 S/m
Limiar de ER da batata (E_{er})	20 kV/m
Limiar de EIR da batata (E_{eir})	80 kV/m
Constante C	8
Constante D	10

Fonte – (BERKENBROCK; BRASIL PINTARELLI et al., 2018).

A geometria modelada (Figura 3.1) compreende uma região descontínua (protuberância) que representa o caso mais extremo de difração de campo elétrico na interface entre o ar e o tecido. Desta forma, a metodologia de otimização de gel pode ser usada para casos específicos de eletroquimioterapia.

Além disso, as análises foram delimitadas em uma região de interesse, determinada por um cilindro alinhado com o centro do eletrodo e o topo da protuberância. O volume de tecido eletroporado pode crescer de maneira irregular com o aumento da condutividade do gel, principalmente pelo efeito de bordas e regiões de interface entre tecidos (assim como a descontinuidade simulada). Por isso é interessante, do ponto de vista prático, delimitar a região de interesse a uma geometria regular.

Foram escolhidos eletrodos agulha pois o afastamento entre as agulhas e o nível de tensão são fixos. Desta forma, o tratamento tende a ser menos complexo para os profissionais da saúde em relação aos eletrodos de placas paralelas, que demandam diferentes afastamentos e potenciais elétricos para cada nódulo tumoral. As agulhas foram completamente inseridas no tecido e o afastamento entre as mesmas foi ajustado entre suas extremidades, não entre seus centros que é um erro comum ao simular. O gel condutor foi simulado como um bloco.

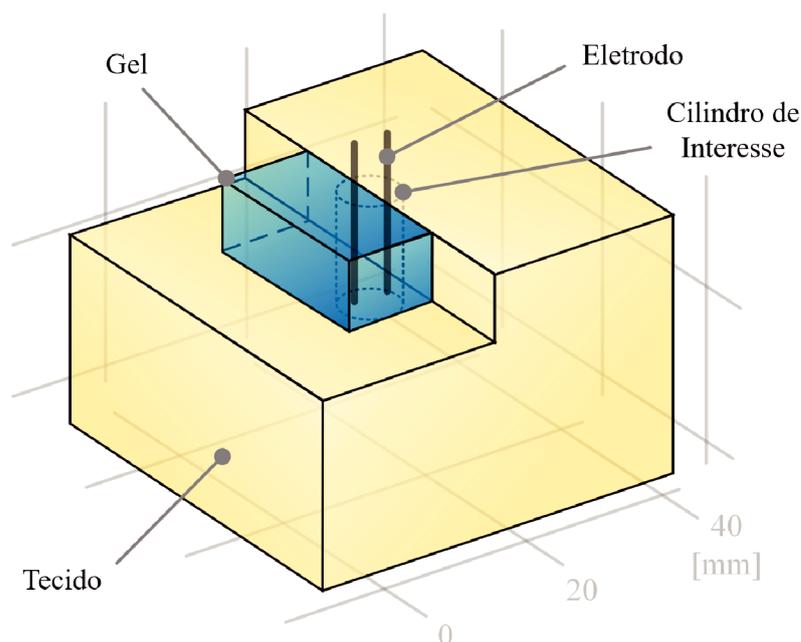


Figura 3.1 – Modelo geométrico simulado. Fonte – Elaborada pelo autor

A Tabela 3.2 mostra os parâmetros geométricos utilizados no modelamento.

Tabela 3.2 – Parâmetros da geometria nas simulações

Parâmetro	Valor (mm)
Altura da base	25
Largura da base	50
Profundidade da base	50
Altura da protuberância	10
Largura da protuberância	50
Profundidade da protuberância	25
Altura das agulhas	13,5
Diâmetro das agulhas	0,7
Afastamento entre as agulhas	5
Diâmetro do cilindro de interesse	7,5
Altura do cilindro de interesse	19,375

Fonte – Elaborada pelo autor.

A malha de elementos finitos, utilizada na aplicação do método para dividir a análise em diversos elementos, foi automaticamente gerada pelo software na opção *extremely fine* e resultou em 1.789.467 elementos na simulação sem gel condutor e 1.978.071 elementos na simulação com gel condutor.

O protocolo de EQT consiste de 8 pulsos de tensão. Entretanto, na simulação computacional considera-se o comportamento do campo elétrico em regime permanente devido ao módulo do COMSOL utilizado.

Todas as simulações deste trabalho foram realizadas em um computador pessoal (com processador AMD Ryzen 5 3600 3,6 GHz com 16 GB de memória RAM) rodando sistema operacional Windows 10 64 bits (Microsoft, Inc., Redmond, Estados Unidos).

3.2 PREPARO DOS GÉIS CONDUTORES

Foram escolhidos dois géis comerciais para os experimentos *in vitro*: Carbogel ULT e Ultra Gel. Estas escolhas foram feitas baseadas na condutividade elétrica dos mesmos, de aproximadamente 0,1 S/m e 0,2 S/m respectivamente (Tabela 2.1). Através dos estudos *in silico*, que serão abordados na seção 4.1, foi verificado que estas condutividades de gel seriam suficiente para eliminar o *blind spot* na geometria em questão.

Além dos géis comerciais, foram testados dois métodos de preparo de géis. O método proposto por Ivorra e Rubinsky (IVORRA, Antoni; RUBINSKY, Boris, 2007) que consiste na mistura de ágar-ágar, que é um hidrocolóide gelatinoso extraído de algas marinhas, com uma solução salina de 0,045% de concentração de NaCl, na proporção de 0,8 g de ágar-ágar para 100 ml de solução salina. A mistura foi aquecida até o ponto de ebulição e, após, refrigerada.

Outro método testado, proposto pelo autor, parte da mistura de água deionizada (solução de baixa condutividade) com soro fisiológico (solução salina de alta condutividade), numa proporção que se chegue a uma solução salina com a condutividade elétrica desejada. A água deionizada foi obtida através de um deionizador presente no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC e armazenada em recipiente sob refrigeração. O soro fisiológico (solução cloreto de sódio 0,9%) da marca Panvel (Panvel, São Paulo) foi comprado em farmácia no dia do experimento e estava dentro do prazo de validade. Na solução salina são adicionados carbopol 940 (Auro's Química Industria Comércio LTDA, São Paulo), que é um espessante comumente usado na indústria de cosméticos na fabricação de produtos em gel, e alcalinizante líquido T85 (Auro's Química Industria Comércio LTDA, São Paulo), que serve para elevar o pH da mistura e assim permitir a gelificação da solução. As quantidades base de carbopol e T85 utilizados foram 6g/L e 6ml/L, respectivamente. Porém, outras medidas foram utilizadas para fins de teste e são descritas na seção 4.2. Após preparar a solução salina e adicionar o carbopol 940, a mistura foi armazenada por cerca de 20 horas para que o carbopol pudesse diluir de maneira adequada. Somente após esse tempo o alcalinizante T85 foi adicionado.

3.3 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos *in vitro* foram realizados no intuito de evidenciar as diferenças de corrente e de área escurecida na batata em quatro casos: Sem gel e com géis de aproximadamente 0,057 S/m (preparado pelo autor), 0,1 S/m (Carbogel ULT) e 0,2 S/m (Ultra Gel). As condutividades dos géis foram medidos utilizando o analisador de impedância Agilent 4291A (Agilent, Inc. California, USA) e um aparato desenvolvido no laboratório. Ambos equipamentos são descritos com detalhes na subseção 3.4

O protocolo de EP usado segue as recomendações ESOPE (MIR; GEHL et al., 2006) e consiste na aplicação de 8 pulsos de 100 μ s numa frequência de 1 Hz com um campo elétrico de 100 kV/m (500 V em 5 mm de afastamento entre as agulhas). O equipamento de eletroporação utilizado é descrito na subseção 3.4.

As batatas (*solanum tuberosum*) foram compradas no dia dos experimentos e foram cortadas cuidadosamente utilizando uma lâmina dobrada de tal forma a se obter a descontinuidade de 90 graus na batata. Após o corte, as amostras foram secas com folhas de papel para que não houvesse acúmulo de líquidos provenientes da batata que possam influenciar no processo de oxidação do tecido e mascarar os resultados.

O eletrodo agulha foi introduzida na região da descontinuidade de maneira que uma das agulhas ficasse totalmente inserida na protuberância e a outra parcialmente. O gel foi inserido posteriormente de forma a cobrir toda região da descontinuidade e as agulhas. A Figura 3.2 mostra uma amostra com o eletrodo posicionado antes de ser completamente inserido (Figura 3.2 A) e com a adição do gel (Figura 3.2 B.)

Após a aplicação da eletroporação, as amostras foram armazenadas em recipientes selados, sobre uma toalha de papel umedecida com 3 ml de ácido cítrico 4% por um período de 24

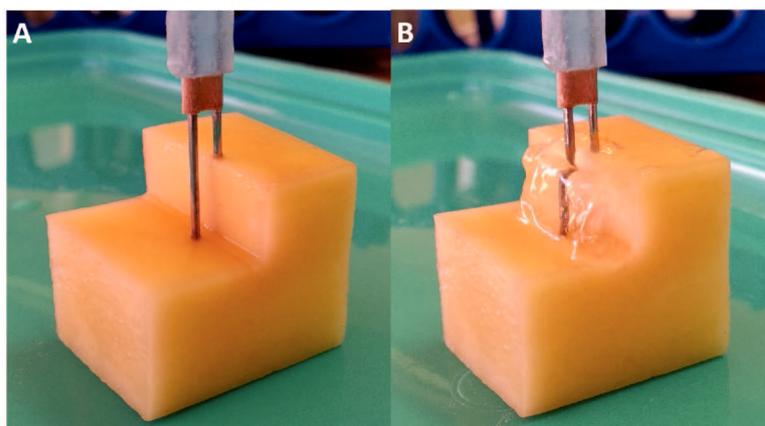


Figura 3.2 – Configuração experimental (a) Sem gel condutor; (b) Com gel condutor. Fonte – Elaborada pelo autor

horas numa sala a 25 °C. O ambiente ácido no qual as amostras são submetidas desacelera o processo de oxidação natural. Após o tempo de descanso, as amostras foram cortadas com uma faca convencional no plano dos eletrodos e secas novamente com toalha de papel, para que o efeito da eletroporação no interior da batata fosse avaliado.

A cada amostra submetida ao corte, protocolo de eletroporação e armazenamento, todos os instrumentos, ferramentas e o eletrodo foram higienizados com folhas de papel e álcool 70%.

Para cada um dos quatro grupo experimentados, foi utilizada um tamanho de amostra de 14 (N = 14). Um grupo controle também foi testado com o mesmo protocolo, mas com nenhuma tensão aplicada.

3.4 EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS

O equipamento utilizado para realizar a eletroporação (Figura 3.3) foi desenvolvido no IEB-UFSC e consiste de um gerador de sinais programável compatível com os protocolos de eletroporação para tratamento de câncer e oferece suporte para diversos tipo de eletrodos. O equipamento possui tensão de saída máxima de 800 V e corrente máxima de 25 A.



Figura 3.3 – Equipamento eletroporador desenvolvido no IEB

Nas medições de condutividade de soluções líquidas, como no processo inicial do preparo dos géis, foi utilizado o medidor de condutividade portátil HI 8733 (Figura 3.4) da fabricante Hanna Instruments. Este equipamento dispõe de uma ponteira ideal para soluções aquosas e possui *range* de $0,1 \mu\text{S}/\text{m}$ a $199,9 \text{ mS}/\text{m}$ com acurácia de $\pm 1\%$ do fundo de escala.



Figura 3.4 – Medidor de condutividade HI 8733

Já para as soluções viscosas, foi utilizado o analisador de impedância Agilent 4294A (Agilent, Inc., California, USA) que possui *range* de frequências de 40 Hz a 110 MHz com resolução de 1 mHz, *range* de impedância de $3 \text{ m}\Omega$ a $500 \text{ M}\Omega$ com acurácia de $\pm 0,08\%$. Juntamente com o analisador de impedância, foi utilizado um suporte cilíndrico (Figura 3.5) com diâmetro e altura de 15 mm. Eletrodos de ouro foram acoplados nas bases do cilindro. O gel é inserido de forma a preencher todo o interior do cilindro. A cada medição, o suporte e os eletrodos foram limpos com água corrente e secos com folhas de papel.

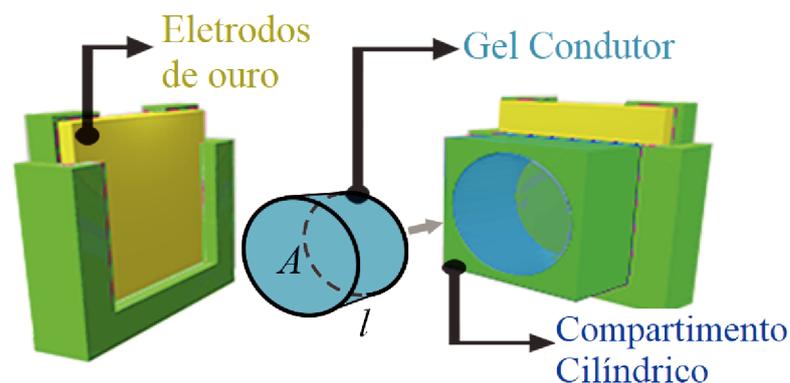


Figura 3.5 – Suporte cilíndrico para medição de condutividade de géis. (a) Esquemático 3D da área (A) e altura (l) usadas para o cálculo. (b) Suporte aberto com eletrodos de ouro. Fonte – (PINTARELLI et al., 2019)

A condutividade pode ser calculada através da Equação 3.1.

$$\sigma = \frac{l}{A \cdot R} \quad (3.1)$$

onde σ representa a condutividade do material medido [S/m], l representa a altura do cilindro [m], A representa a área da base do cilindro [m^2] e R a resistência a 10 kHz medida no analisador de impedância [Ω].

As medições de tensão e corrente foram feitas com o osciloscópio Tektronix DPO2012B e a ponteira de corrente Tektronix A621.

As fotos das amostras foram tiradas em um suporte com lâmpada fixa (Figura 3.6), de forma a padronizar o brilho das imagens e a distância da câmera. As fotos foram tiradas com o celular Samsung J5 Prime. As análises de imagem foram feitas com o software ImageJ (National Institutes of Health, USA).



Figura 3.6 – Suporte para fotos das amostras. Fonte – Elaborada pelo autor

As medidas de carbopol 940 e de alcalinizante T85 foram realizadas com uma balança de precisão e uma pipeta, respectivamente.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Valores de corrente observados nos experimentos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk a 95% de nível de confiança que indicaram aderência à distribuição normal dos quatro grupos de dados. Os dados também foram submetidos ao teste t não pareado com variâncias desconhecidas, que indicaram diferença estatística entre os quatro grupos de dados a um nível de confiança de 95%.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na modelagem numérica, no preparo dos géis e na experimentação *in vitro*.

4.1 ESTUDO *IN SILICO*

Foi avaliada quantitativamente a corrente nos terminais do eletrodo e o volume de tecido que foi submetido a ER e EIR. Foi avaliado qualitativamente o *blind spot* na seção transversal da descontinuidade.

A Figura 4.1 mostra as correntes simuladas em função da condutividade do gel, variando de 0,0004 S/m a 0,5 S/m, para tensões variando de 300 V a 700 V.

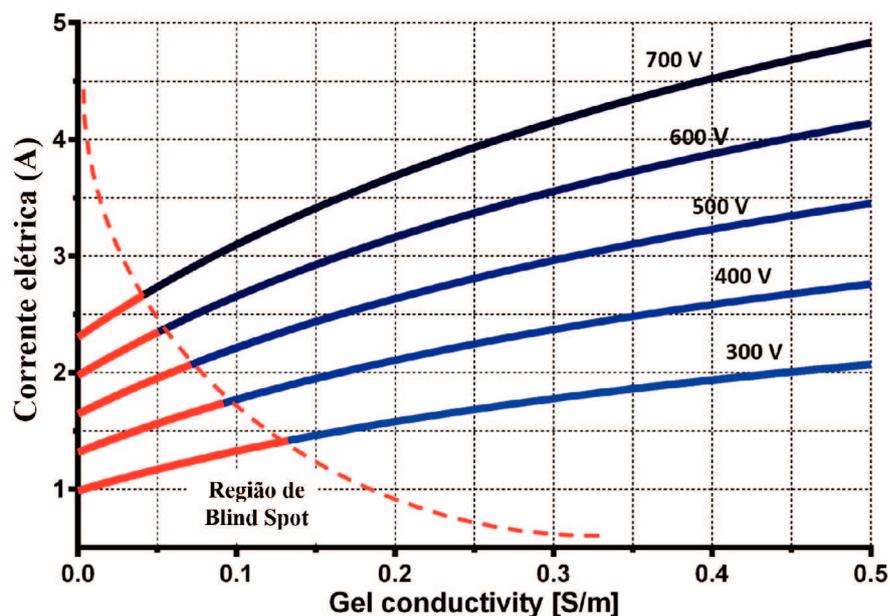


Figura 4.1 – Corrente nos terminais do eletrodo em função da condutividade do gel. Fonte – Elaborada pelo autor

A Figura 4.2 mostra o volume de tecido eletroporado (campo elétrico acima de 20 kV/m) na região de interesse, em relação à condutividade do gel, para tensões variando de 300 V a 700 V.

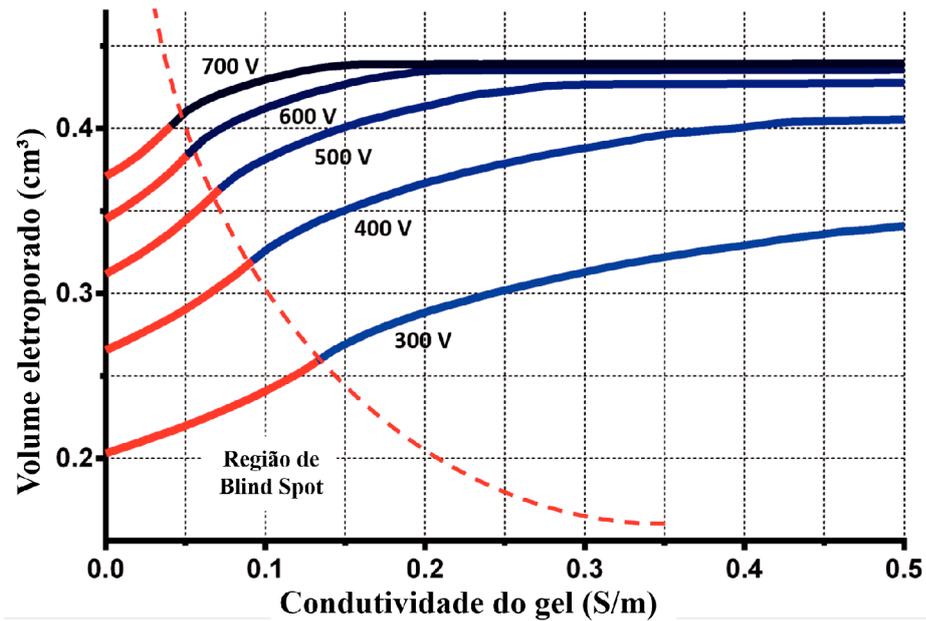


Figura 4.2 – Volume de tecido eletroporado (cm^3) em função da condutividade do gel. Fonte – Elaborada pelo autor

A Figura 4.3 mostra o volume de tecido submetido a RE a IRE, a 500 V, em relação à condutividade do gel.

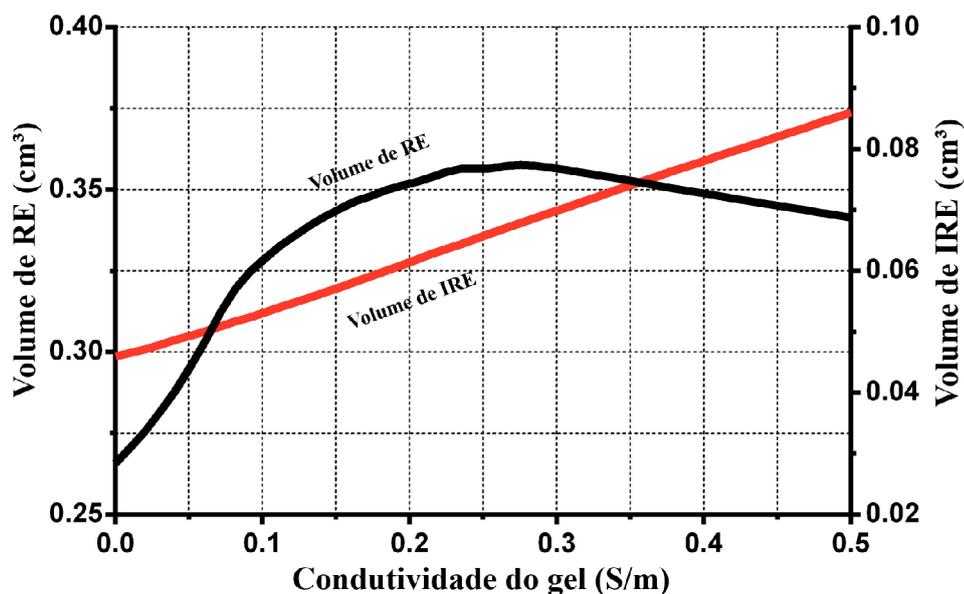


Figura 4.3 – Volume de RE e Volume de IRE (cm^3) em função da condutividade do gel para 500 V. Fonte – Elaborada pelo autor

A Figura 4.4 mostra o campo elétrico na região da descontinuidade para diferentes valores de condutividade do gel. A tensão utilizada entre os terminais do eletrodo foi de 500 V.

A cor cinza claro representa a área onde o campo elétrico foi abaixo de 20 kV/m (sem efeitos significantes), a cor cinza representa o campo elétrico entre 20 e 80 kV/m (RE) e a cor cinza escuro representa campo elétrico acima de 80 kV/m (IRE). Os *blind spots* foram marcados com um círculo vermelho.

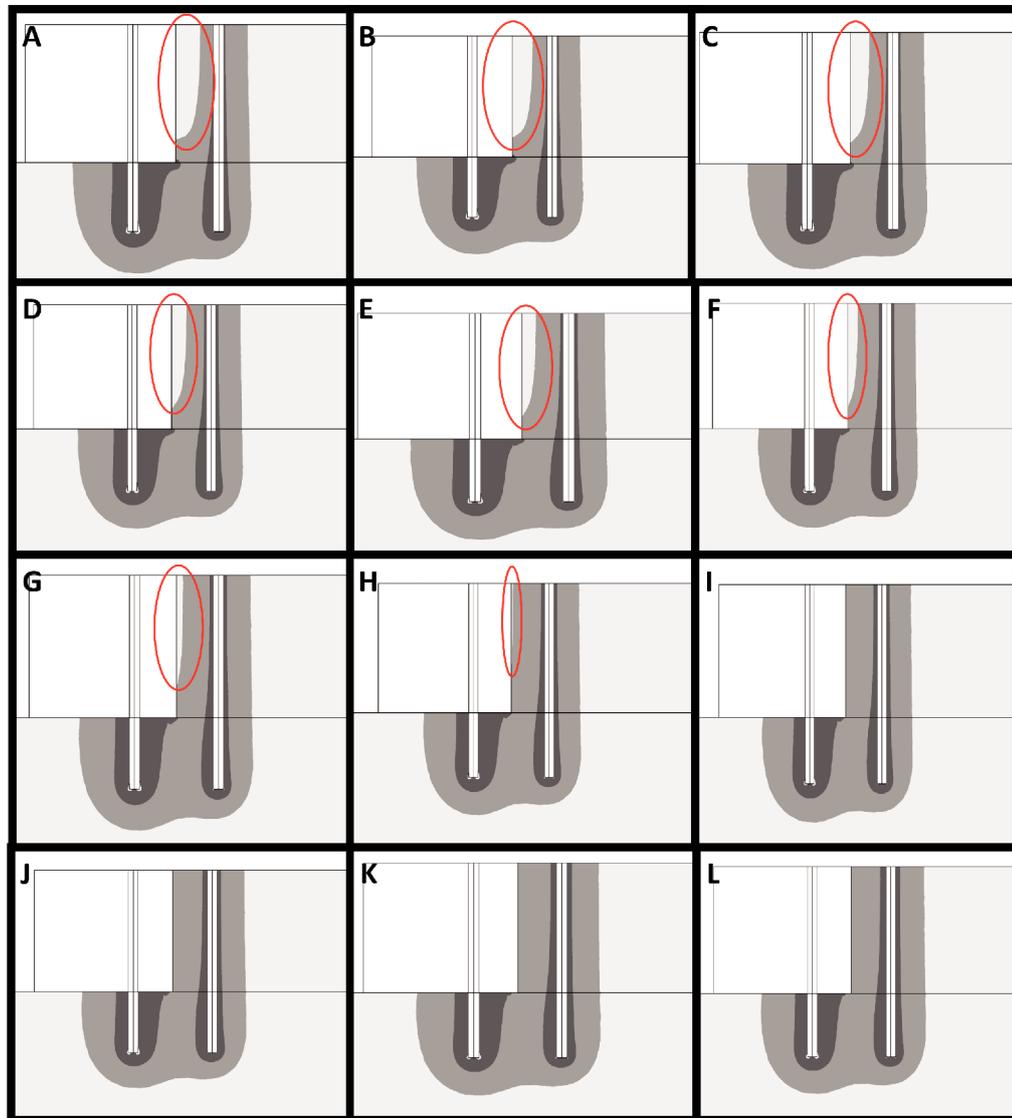


Figura 4.4 – Campo elétrico na região da descontinuidade para gel de condutividade: (A) 0,0001 S/m; (B) 0,01 S/m; (C) 0,02 S/m; (D) 0,03 S/m; (E) 0,04 S/m; (F) 0,05 S/m; (G) 0,06 S/m; (H) 0,07 S/m; (I) 0,08 S/m; (J) 0,09 S/m; (K) 0,1 S/m; (L) 0,2 S/m

É possível observar que a área de *blind spot* reduz conforme o aumento da condutividade do gel, sendo completamente eliminada a partir do gel de 0,08 S/m.

4.1.1 Outras simulações

Foi observado durante os experimentos que a aplicação do gel é um processo delicado e o mesmo pode ficar distribuído de maneira heterogênea na superfície da amostra. No intuito de avaliar o impacto na distribuição de campo elétrico, foram simuladas algumas configurações que recorrentemente foram vistas nos experimentos *in vitro*. Todos os casos foram simulados com 500 V de potencial entre os terminais do eletrodo.

Foi simulado o caso onde o gel forma um arco e uma das agulhas não é completamente imersa no gel (Figura 4.5). O arco foi simulado utilizando a operação *Fillet*, com parâmetro de raio de 18 mm. Este problema pode acontecer devido a aplicação indevida e também caso o gel preparado não fique consistente o suficiente, podendo escorrer.

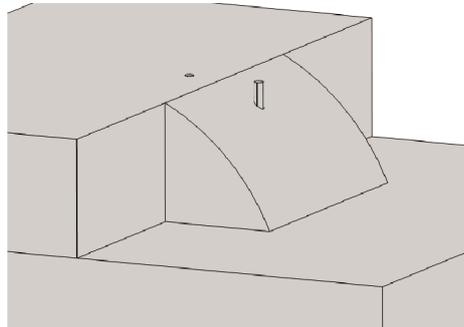


Figura 4.5 – Geometria em arco simulada

A Figura 4.6 mostra o resultado das simulações com a geometria em arco, os *blind spots* estão marcados com um círculo vermelho. É possível reparar que o *blind spot* só é eliminado a partir do gel de 0,19 S/m, diferentemente da aplicação padrão onde o gel de 0,08 S/m já era suficiente para solucionar o problema.

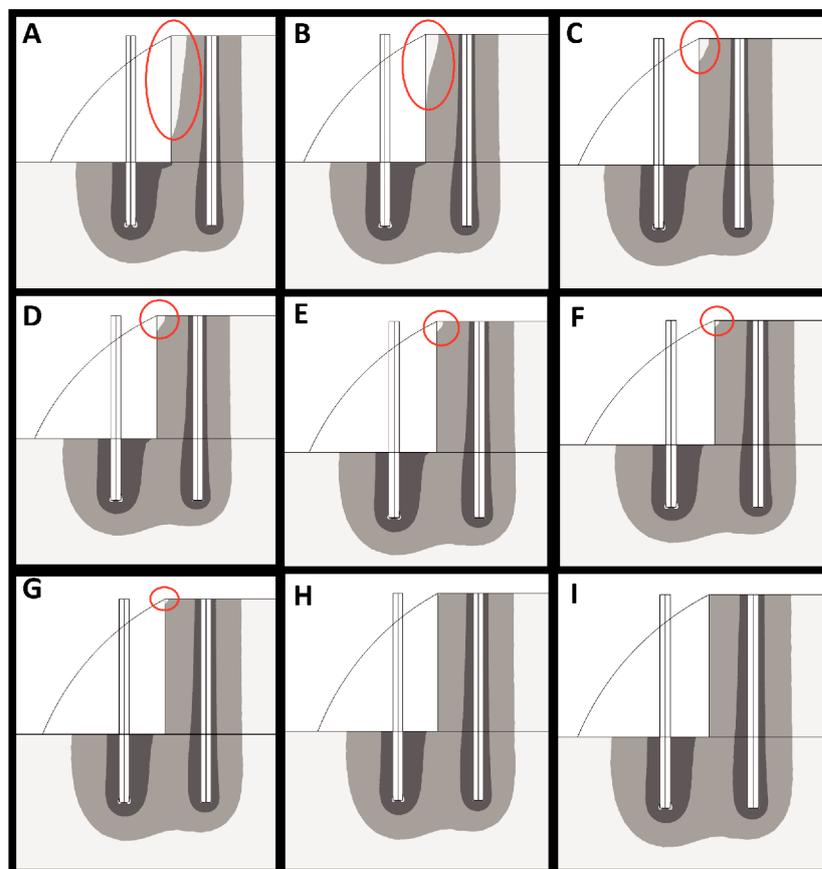


Figura 4.6 – Campo elétrico na região da descontinuidade com gel em formato de arco para: (A) 0,05 S/m; (B) 0,07 S/m; (C) 0,09 S/m; (D) 0,11 S/m; (E) 0,13 S/m; (F) 0,15 S/m; (G) 0,17 S/m; (H) 0,19 S/m; (I) 0,21 S/m

Foi simulado também o caso onde o espaço entre a agulha e a descontinuidade não é devidamente preenchido por gel (Figura 4.7) Esse problema pode acontecer pois há um pequeno espaço entre a agulha e a descontinuidade e o gel é aplicado por fora, podendo deixar esse espaço não preenchido.

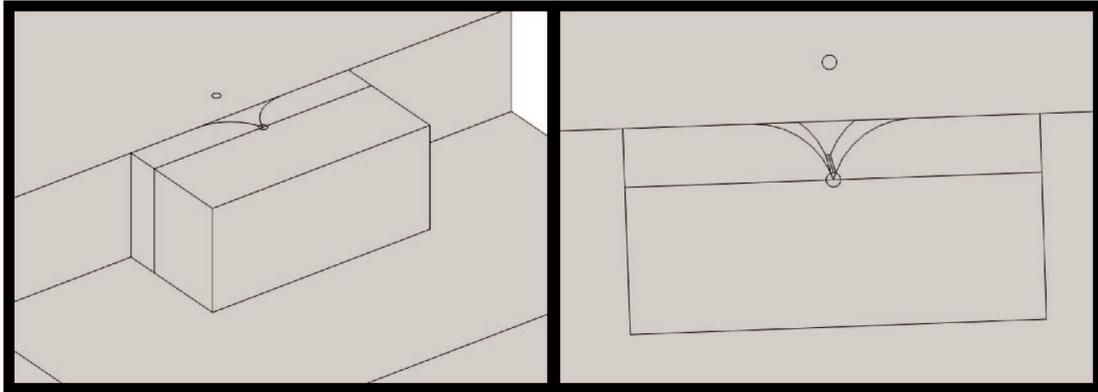


Figura 4.7 – Geometria com espaço sem gel entre agulha e descontinuidade

A Figura 4.8 mostra o resultado das simulações com o espaço sem gel entre a agulha e a descontinuidade, os *blind spots* estão marcados com um círculo vermelho. Os resultados demonstram que este é um problema crítico, distorcendo em excesso a distribuição de campo elétrico, mesmo com um gel de alta condutividade como mostrado na Figura 4.8 F.

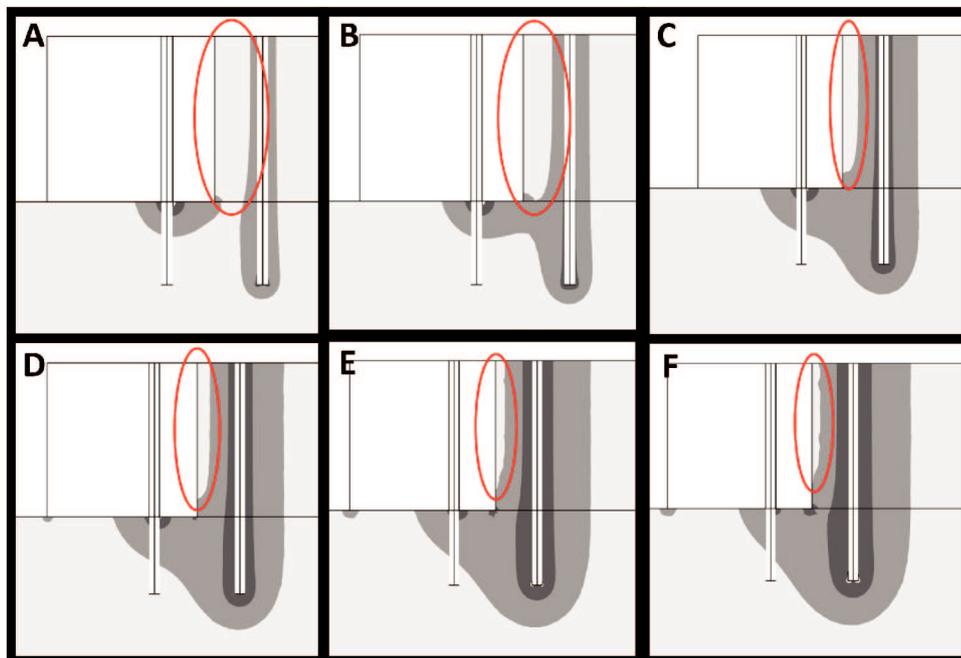


Figura 4.8 – Campo elétrico na região da descontinuidade com a falta do gel entre a agulha e a descontinuidade para: (A) 0,1 S/m; (B) 0,2 S/m; (C) 0,5 S/m; (D) 1 S/m; (E) 2 S/m; (F) 4 S/m

4.2 GÉIS CONDUTORES

4.2.1 Preparo proposto por Ivorra e Rubinsky

Não houve sucesso com a forma de preparo proposta por Antoni Ivorra e Boris Rubinsky (2007). Em nenhuma das tentativas obteve-se aspecto de gel na mistura.

4.2.2 Preparo proposto pelo autor

Foram realizadas medições de condutividade elétrica na água deionizada e no soro fisiológico, para que fosse possível aproximar a quantidade de cada um na mistura. A Tabela 4.1 mostra os resultados de condutividade para a água deionizada e o soro fisiológico. Foram feitas 7 medidas ($N = 7$) para cada solução.

Tabela 4.1 – Condutividade elétrica da água deionizada e soro fisiológico.

	Água Deionizada	Soro Fisiológico
Média (S/m)	0,0016	1,97
Desvio Padrão (S/m)	0,00015	0,029

Fonte – Elaborada pelo autor

Foi variada a condutividade da solução salina (água deionizada e soro fisiológico) e a fração da receita de químicos (carbopol 940 e alcalinizante T85) de maneira a avaliar o efeito dos químicos na condutividade resultante dos géis.

Cinco géis produzidos foram medidos e relatados. A Tabela 4.2 mostra os parâmetros utilizados em cada gel e o resultado das medições de condutividade elétrica (média e intervalos de confiança para 95% de nível de confiança). Foram tomadas 3 medidas para cada gel ($N = 3$).

Tabela 4.2 – Géis preparados.

Condutividade da solução salina (S/m)	Fração da receita	Condutividade elétrica medida (S/m)
0,0016	25%	0,027 \pm 0,00013
0,0016	50%	0,058 \pm 0,0011
0,0016	100%	0,11 \pm 0,0015
0,4*	100%	0,52 \pm 0,0056
0,45	150%	0,6 \pm 0,0042

* Não gelificou da maneira adequada.

Fonte – Elaborada pelo autor

Através dos três primeiros géis apresentados na 4.2, foi observado que os químicos utilizados interferem aditivamente na condutividade do gel. Os três géis foram preparados com uma solução salina de condutividade fixa, variando apenas a fração da receita. Neste caso, o

aumento da condutividade resultante do gel foi aproximadamente proporcional à quantidade de químicos utilizados.

Através dos dois últimos géis apresentados na 4.2, foi possível que soluções salinas mais condutivas requerem mais quantidade de químicos para gelificar de maneira adequada. Foi preparado um gel com solução salina de 0,4 S/m e 100% da receita proposta, o que não resultou e um gel adequado. Logo foi testado uma nova solução salina de alta condutividade (0,45 S/m) com um aumento de 50% nos químicos (150% da receita proposta), o que demonstrou uma gelificação adequada.

Através das observações feitas na confecção dos géis, foi possível chegar a uma equação empírica para controlar a condutividade elétrica do gel em função da fração da receita e da condutividade da solução salina.

$$\sigma_{gel} \cong 0,1 \cdot R + \sigma_{solução} \quad (4.1)$$

onde σ_{gel} representa a condutividade resultante do gel [S/m], R representa a fração da receita e $\sigma_{solução}$ representa a condutividade da solução salina [S/m]. Esta equação ainda deve ser validada.

4.3 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

A Figura 4.9 mostra a comparação entre os resultados da simulação e amostras de batata após serem submetidas ao protocolo de eletroporação com diferentes géis.

Foi verificado que, como esperado, os géis de 0,1 e 0,2 S/m homogenizam a distribuição de campo elétrico de forma a eliminar o *blind spot*, enquanto que o gel de 0,057 S/m não produz o mesmo efeito.

A Tabela 4.3 mostra para cada valor de gel experimentado, o valor de corrente simulado e o valor de corrente experimentado (média e intervalos de confiança para 95% de nível de confiança).

Tabela 4.3 – Resultados de corrente elétrica

Experimento	Corrente simulada (A)	Corrente experimentada (A)	Desvio (%)
Sem gel	1,36	1,49 ± 0,03	9,56
Gel de 0,057 S/m	2,01	2,06 ± 0,05	2,49
Gel de 0,1 S/m	2,21	2,28 ± 0,06	3,17
Gel de 0,2 S/m	2,63	2,67 ± 0,04	1,52

Fonte – Elaborada pelo autor

No grupo controle não houve quaisquer marcas ou escurecimento no tecido.

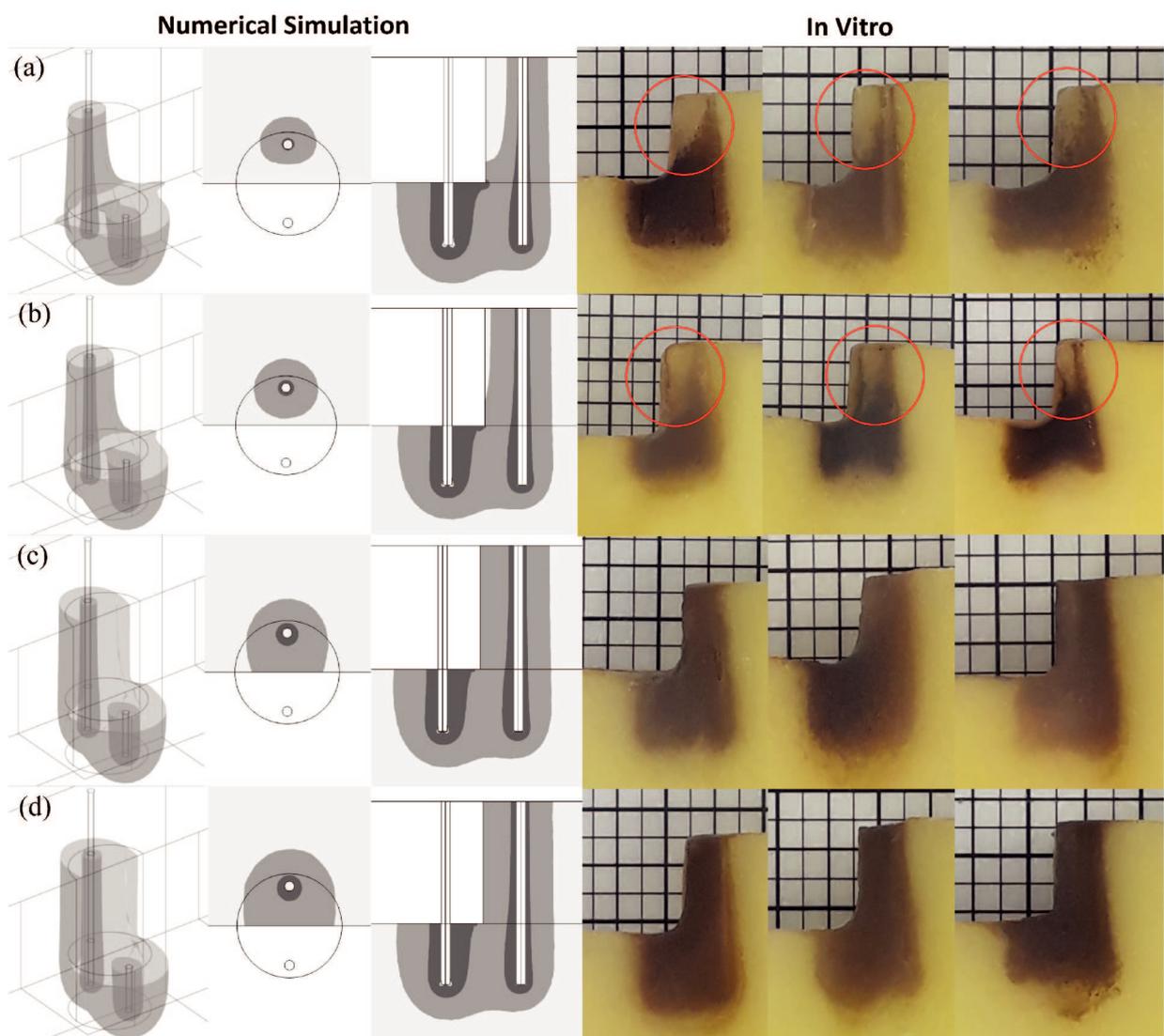


Figura 4.9 – Comparação entre simulação (*in silico*) e estudo *in vitro*: (A) Sem gel; (B) Gel de 0,057 S/m preparado pelo autor; (C) Gel comercial de 0,1 S/m; (D) Gel comercial de 0,2 S/m;

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão discutidos os resultados obtidos neste trabalho, bem como os procedimentos utilizados.

5.1 EXPERIMENTAÇÃO IN VITRO

O uso da batata (*solanum tuberosum*) como modelo de eletroporação permite a análise indireta do sucesso da EP através do escurecimento do tecido, bem como a análise da corrente demandada pelo protocolo de EP. Desta forma, o modelo vegetal aparece como um meio rápido, barato e compatível com a redução do uso de animais em pesquisas para testar novas configurações de eletrodos, parâmetros do protocolo de EP, modelos numéricos e também avaliar o funcionamento de dispositivos de eletroporação.

Neste trabalho, o modelo vegetal permitiu analisar visualmente a difração do campo elétrico numa geometria de protuberância que resulta numa interface entre tecido e ar. A aplicação de géis de diferentes condutividades provocaram diferenças no escurecimento do tecido da batata, sobretudo na eliminação do *blind spot*, que representaria uma possibilidade de falha num tratamento de EQT. Isso leva a crer que os géis condutores podem ser projetados e preparados de tal forma a homogeneizar o campo elétrico em casos onde a difração do campo elétrico cause *blind spots*, desde que haja uma combinação da condutividade do gel com a condutividade do tecido biológico.

Em termos de corrente elétrica, foi verificado um aumento na corrente entre os géis testados, chegando a uma diferença de aproximadamente 93% entre o caso sem gel e o gel de 0,2 S/m e de 19% entre o gel de 0,1 S/m e o de 0,2 S/m, onde ambos eliminam o *blind spot*. Isto é esperado, uma vez que os géis de condutividade mais alta oferecem menos resistência. Este é um ponto que merece atenção, uma vez que na EQT a corrente elétrica é aplicada em um tecido biológico vivo. Logo, a experimentação *in vitro*, junto da modelagem numérica também contribuem para que haja um controle sobre a corrente elétrica que estará sendo aplicada

no tratamento, de forma a garantir a segurança do paciente e também de que o dispositivo eletroporador é capaz de suprir esta demanda.

Entretanto, ao passo que o parâmetro de corrente elétrica se mostra um parâmetro com boa repetibilidade, o escurecimento do tecido é influenciado por vários fatores externos, sendo uma desvantagem do uso deste modelo vegetal. Foi constatado que qualquer acúmulo de líquidos no tecido da batata provoca a oxidação e, conseqüentemente, o escurecimento indesejado do tecido. Esta variável também está relacionada a fatores difíceis de controlar, como o nível de maturação da batata (batatas mais maduras liberam mais líquido), o tamanho da batata, e também a forma de cultivo que pode variar de acordo com o fornecedor ou o lugar onde foi comprada. Além disso, foi observado que a região da batata onde é aplicada a EP também influencia no resultado. A EP realizada próxima ao anel vascular tende a não escurecer devidamente, enquanto que a aplicação próxima à medula interna mostrou melhores resultados. Todos estes fatores aumentam o nível de detalhamento necessário neste tipo de experimentação e diminuem a repetibilidade do processo, em termos de escurecimento do tecido, ainda que o protocolo de experimentação seja o mesmo.

Outra limitação da batata é que na maioria dos casos é inviável analisar o volume eletroporado, limitando a análise apenas a uma seção transversal do tecido. Além disso, na área escurecida não há distinção entre região de ER e EIR.

5.2 MODELAMENTO NUMÉRICO E ESTUDOS *IN SILICO*

O modelamento numérico é uma ferramenta importante no pré-tratamento de EQT pois com a resolução de modelos criados a partir de medições práticas realizadas, é possível, em ambiente virtual, simular e extrapolar o comportamento das grandezas físicas que envolvem a EQT.

A partir da simulação computacional foi possível avaliar o comportamento da corrente elétrica e do volume de tecido eletroporado em relação à condutividade elétrica do gel aplicado para diversos valores. Também foi avaliado qualitativamente a difração de campo elétrico na região da descontinuidade. Esta metodologia permite chegar a um valor de condutividade para o gel que elimine o *blind spot*.

Foi observado que o volume total eletroporado sempre cresce em função do aumento da condutividade do gel empregado. Entretanto, este aumento se dá de forma irregular para géis de maior condutividade pelo efeito difrativo de bordas e regiões de interface entre tecidos (Figura 5.1 A e B). Portanto, muito embora o volume de tecido eletroporado esteja crescendo continuamente, o que em primeiro momento leva a crer que o tratamento será mais efetivo, na prática temos regiões de eletroporação isoladas e irregulares, que não contribuem significativamente para o tratamento. Devido a este efeito, foi proposto neste trabalho a análise em uma região de interesse, determinada por um cilindro centralizado com as agulhas do eletrodo. O uso de um sólido regular como região de interesse permite manejar as variáveis da EQT, incluindo a condutividade do gel, para obter a maior região geometricamente regular com campo elétrico adequado para o tratamento. Este tipo de aplicação também permite passar informações pre-

cisas e simples pra equipe médica que irá realizar o procedimento, reduzindo a complexidade do tratamento e proporcionando um passo exato para múltiplas aplicações.

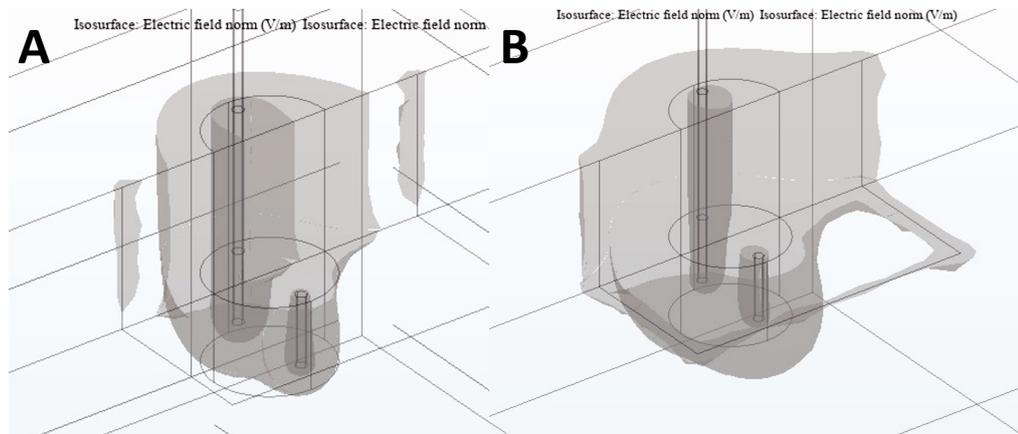


Figura 5.1 – Campo distorcido em casos extremos. Regiões transparentes representam a área onde o campo elétrico foi abaixo de 20 kV/m (sem efeitos significantes), a cor cinza representa o campo elétrico entre 20 e 80 kV/m (RE) e a cor cinza escuro representa campo elétrico acima de 80 kV/m (IRE).

Através das Figuras 4.1 e 4.2 é possível perceber que o volume de EP alcança um platô na região de interesse, enquanto a corrente elétrica continua crescendo. Minimizar a corrente elétrica nos tecidos biológicos pode reduzir o efeito Joule e as contrações musculares durante o tratamento. A Figura 4.3 mostra que o volume de IRE cresce constantemente, enquanto o volume de RE decresce com o aumento da condutividade do gel. Embora regiões de IRE sejam inevitáveis na EQT, é desejável minimizá-las ao máximo, principalmente quando o tratamento envolve regiões sensíveis como cérebro e olhos, mas também em função da alta seletividade e preservabilidade dos tecidos saudáveis que a EQT pode oferecer. Essas simulações mostram que ao invés de um valor de condutividade de gel ótimo e fixo a ser aplicado na maior parte dos casos, como sugeriu Ivorra et al. (2008), a otimização e preparação do gel condutivo pode ser incluído na etapa de pré-tratamento para, além de contribuir na distribuição do campo elétrico e eliminar *blind spots*, otimizar volume de RE e IRE, corrente elétrica e margem de campo elétrico.

É importante salientar que o tecido da batata é menos condutivo que os tecidos normais e tumorais (BERKENBROCK; BRASIL PINTARELLI et al., 2018). Isto significa que os valores de condutividade de gel diferem entre a batata e tumores. Entretanto, a mesma rotina de simulação e preparo do gel associado à batata pode ser aplicado no pré-tratamento de um caso clínico de EQT.

Também foram simulados possíveis problemas relacionados à aplicação do gel. O escorrimo do gel pode descobrir uma das agulhas, o que dificulta a homogeneização do campo elétrico, sendo necessário um gel mais condutivo para contornar este problema. Entretanto, o não preenchimento do espaço entre a agulha e a protuberância mostrou um efeito mais adverso, provocando uma extrema difração do campo elétrico. Este tipo de análise também pode ser incluída no pré-tratamento e as informações passadas aos profissionais de saúde que conduzirão

o tratamento.

O desvio entre a corrente simulada e a corrente experimentada foi de 9,6% no pior caso. Esta análise indica que o modelo numérico empregado é uma boa forma de prever a corrente elétrica.

5.3 PREPARO DOS GÉIS

O preparo dos géis foi uma etapa importante neste trabalho, uma vez que o único relato de modo de preparo de géis para EQT na literatura é o proposto por Antoni Ivorra e Boris Rubinsky (2007). Ivorra et al. (2008), na sequência dos trabalhos relacionados a gel condutivo, aplicou géis em um estudo *in vivo* para o tratamento de tumores implantados em ratos. Entretanto, nesta ocasião foi aplicado um gel comercial, fora da faixa ótima proposta pelo autor e mencionado como inadequado para a aplicação, embora tenha apresentado melhora no resultados. Portanto, ao passo que existem trabalhos que evidenciem as vantagens de géis específicos pra EQT (IVORRA et al., 2008; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016; PINTARELLI et al., 2019), não há registro na literatura de géis condutivos preparados para EQT com a condutividade elétrica controlada e utilizados em estudos *in vivo* ou clinicamente em estudos de caso.

A receita proposta por Antoni Ivorra e Boris Rubinsky (2007) foi testada neste trabalho, mas não apresentou sucesso. Mesmo após o aquecimento da solução ao ponto de ebulição, em todas as tentativas a mistura continuou líquida, inviabilizando o uso determinado. Antes de prosseguir com mais testes com este método, foi testado o modo de preparo proposto pelo autor, que demonstrou bons resultados. O método proposto foi baseado no preparo de álcool gel, utilizando dois produtos químicos comumente utilizados para espessar e gelificar soluções líquidas.

Tantos os géis comerciais quanto os géis preparados demonstraram o funcionamento esperado nos experimentos *in vitro* sendo o gel preparado pelo autor e utilizado na experimentação (0,057 S/m) foi especificamente escolhido pelo fato do mesmo não eliminar o *blind spot*.

Através das medições de condutividade elétrica dos géis preparados, foi possível aproximar uma equação que permite manipular a condutividade do gel em função da condutividade da solução salina e a quantidade de químicos adicionados. Entretanto, esta equação demanda validação através de ensaios experimentais.

Da mesma forma, outra importante análise a ser feita é o efeito da autoclavagem na condutividade do gel. Este processo é necessário para eliminar os agentes patogênicos presentes no gel, permitindo o uso clínico de maneira segura.

CAPÍTULO 6

TRABALHOS FUTUROS

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, surgiram sugestões e ideias para utilizar os géis condutores e estudos *in vitro*. Neste capítulo, serão apresentados os experimentos e trabalhos que poderão suceder a partir dos resultados obtidos.

6.1 PATENTE DO MÉTODO DE PREPARO DO GEL CONDUTOR

Está sendo avaliada a possibilidade de patentear o método de preparo do gel condutor para eletroquimioterapia. Já existem patentes relacionadas ao preparo e ao uso de géis condutores com eletroquimioterapia, o que está sendo analisado na revisão patentaria que está em processo atualmente.

6.2 USO DO GEL CONDUTOR PARA MIMETIZAR TECIDOS

O ajuste da condutividade no preparo de um gel possibilita que este também seja usado em experimentos para mimetizar diferentes tipos de tecidos biológicos para o estudo de distribuição do campo elétrico. Isto significa que usando géis condutores de baixa condutividade é possível avaliar o efeito de, por exemplo, ossos ou dentes, que são tecidos de baixa condutividade e que comumente promovem difração no campo elétrico na EQT.

6.3 MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO PARA GÉIS CONDUTORES EM EQT

Planeja-se publicar um trabalho explanando um método para otimização computacional do gel condutor para eletroquimioterapia, apresentando experimentos para a validação da equação de condutividade de gel e os efeitos da autoclavagem do gel, juntamente com estratégias de simulação e experimentação para determinar a condutividade ótima do gel e os passos para o preparo do mesmo.

6.4 ESTUDO DE CASO

Planeja-se aplicar a metodologia de otimização de gel em um ou mais casos de tratamento de EQT, com o objetivo de fomentar o uso dos géis condutores no tratamento e demonstrar a possibilidade de incluir o preparo do gel específico para o tratamento na etapa de pré-tratamento.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho mostraram a eficácia dos géis condutores na homogeneização da distribuição do campo elétrico na eletroporação de tecidos e eliminação de *blind spots*. Foi demonstrado que a otimização do gel condutor pode reduzir a quantidade de eletroporação irreversível e a corrente elétrica em mais de 20%. São necessários novos estudos em relação ao preparo dos géis para que haja controle na condutividade do gel e para que os géis se adéquem aos padrões de segurança para uso clínico.

REFERÊNCIAS

- BANÚS COBO, Jaume. 3d assessment of irreversible electroporation treatments in vegetal models, 2015. Citado 1 vez na página 16.
- BARNETT, Alan; WEAVER, James C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, Elsevier, v. 320, n. 2, p. 163–182, 1991. Citado 2 vezes nas páginas 16, 20.
- BERKENBROCK, José Alvim; BRASIL PINTARELLI, Guilherme et al. Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation. **Journal of Medical and Biological Engineering**, Springer, p. 1–6, 2018. Citado 4 vezes nas páginas 17, 27, 29, 45.
- 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. Citado 3 vezes nas páginas 17, 22.
- BHONSLE, Suyashree P et al. Mitigation of impedance changes due to electroporation therapy using bursts of high-frequency bipolar pulses. **Biomedical engineering online**, Springer, v. 14, S3, s3, 2015. Citado 1 vez na página 27.
- BONAKDAR, Mohammad et al. The feasibility of a smart surgical probe for verification of IRE treatments using electrical impedance spectroscopy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 62, n. 11, p. 2674–2684, 2015. Citado 1 vez na página 16.
- CALVET, Christophe Y et al. Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an hTERT-based DNA vaccine in mice. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, Elsevier, v. 1, p. 14045, 2014. Citado 1 vez na página 25.
- CAMPANA, Luca G et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. **Annals of Surgical Oncology**, Springer, v. 16, n. 1, p. 191–199, 2009. Citado 1 vez na página 21.
- CASTELLVÍ, Q; BANÚS, J; IVORRA, A. 3D assessment of irreversible electroporation treatments in vegetal models. In: SPRINGER. 1ST World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. [S.l.: s.n.], 2016. P. 294–297. Citado 1 vez na página 26.
- CASTIELLO, M et al. A new grid electrode for electrochemotherapy treatment of large skin tumors. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, IEEE, v. 21, n. 3, p. 1424–1432, 2014. Citado 1 vez na página 27.
- CHANG, D.C. et al. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. [S.l.]: Elsevier Science, 2012. ISBN 9780080917276. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=70S8R19b%5C_t8C>. Citado 2 vezes nas páginas 16, 20.
- CHEN, C et al. Membrane electroporation theories: a review. **Medical and Biological Engineering and Computing**, Springer, v. 44, n. 1-2, p. 5–14, 2006. Citado 1 vez na página 20.
- CHU, Katrina F; DUPUY, Damian E. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 14, n. 3, p. 199, 2014. Citado 1 vez na página 21.

- CIMA, Lionel F; MIR, Lluís M. Macroscopic characterization of cell electroporation in biological tissue based on electrical measurements. **Applied physics letters**, American Institute of Physics, v. 85, n. 19, p. 4520–4522, 2004. Citado 1 vez na página 27.
- COELHO, E.G.; VIEIRA, S.C. **Oncologia Basica**. [S.l.]: LEMAR. ISBN 9788586652431. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=vr1QvgAACAAJ>>. Citado 1 vez na página 19.
- COROVIC, Selma et al. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **Biomedical engineering online**, BioMed Central, v. 12, n. 1, p. 16, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 17, 24.
- ČOROVIĆ, Selma et al. Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. **Technology in cancer research & treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 7, n. 5, p. 393–399, 2008. Citado 1 vez na página 22.
- DAVALOS, Rafael V; MIR, LM; RUBINSKY, B. Tissue ablation with irreversible electroporation. **Annals of biomedical engineering**, Springer, v. 33, n. 2, p. 223, 2005. Citado 1 vez na página 21.
- DENET, Anne-Rose; VANBEVER, Rita; PRÉAT, Véronique. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Advanced drug delivery reviews**, Elsevier, v. 56, n. 5, p. 659–674, 2004. Citado 1 vez na página 21.
- DONG, Shoulong et al. First Human Trial of High-Frequency Irreversible Electroporation Therapy for Prostate Cancer. **Technology in cancer research & treatment**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 17, p. 1533033818789692, 2018. Citado 1 vez na página 16.
- FOX, MB et al. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Springer, v. 385, n. 3, p. 474, 2006. Citado 1 vez na página 20.
- FRANKENHAEUSER, Bernhard; WIDÉN, Lennart. Anode break excitation in desheathed frog nerve. **The Journal of physiology**, Wiley Online Library, v. 131, n. 1, p. 243–247, 1956. Citado 1 vez na página 20.
- 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. Citado 1 vez nas páginas 22, 23.
- GOLBERG, Alexander et al. Eradication of multidrug-resistant *A. baumannii* in burn wounds by antiseptic pulsed electric field. **Technology**, World Scientific, v. 2, n. 02, p. 153–160, 2014. Citado 1 vez na página 21.
- GROSELJ, Ales; BOSNJAK, Masa et al. Efficiency of electrochemotherapy with reduced bleomycin dose in the treatment of nonmelanoma head and neck skin cancer: Preliminary results. **Head & neck**, Wiley Online Library, v. 40, n. 1, p. 120–125, 2018. Citado 1 vez na página 21.
- GROSELJ, Ales; KOS, Bor et al. Coupling treatment planning with navigation system: a new technological approach in treatment of head and neck tumors by electrochemotherapy. **Biomedical engineering online**, BioMed Central, v. 14, n. 3, s2, 2015. Citado 1 vez na página 24.
- HEYSE, AB; PINTARELLI, GB; SUZUKI, DOH. Electric Field Distribution and Electroporation in Discontinuous Regions Using Vegetal Model: In Vitro and In Silico Study. In: SPRINGER. XXVI Brazilian Congress on Biomedical Engineering. [S.l.: s.n.], 2019. P. 465–469. Citado 0 vez na página 27.
- HJOIJ, Mohammad; RUBINSKY, Boris. Magnetic resonance imaging characteristics of nonthermal irreversible electroporation in vegetable tissue. **The Journal of membrane biology**, Springer, v. 236, n. 1, p. 137–146, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 16, 27.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2018**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2019. Citado 1 vez na página 18.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que causa o câncer?** [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cause-cancer>>. Acesso em: 27 mar. 2019. Citado 1 vez na página 19.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Tomorrow**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 27 mar. 2019. Citado 2 vezes nas páginas 16, 18.

IVORRA, Antoni; RUBINSKY, Boris. Electric field modulation in tissue electroporation with electrolytic and non-electrolytic additives. **Bioelectrochemistry**, Elsevier, v. 70, n. 2, p. 551–560, 2007. Citado 7 vezes nas páginas 23, 25, 26, 30, 40, 46.

IVORRA, Antoni et al. Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies. **Physics in Medicine & Biology**, IOP Publishing, v. 53, n. 22, p. 6605, 2008. Citado 6 vezes nas páginas 25, 26, 45, 46.

IVORRA, Autoni; RUBINSKY, B. Optimum conductivity of gels for electric field homogenization in tissue electroporation therapies. In: SPRINGER. IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health. [S.l.: s.n.], 2007. P. 619–622. Citado 2 vezes na página 25.

JAHANGEER, Saleem et al. Review of current thermal ablation treatment for lung cancer and the potential of electrochemotherapy as a means for treatment of lung tumours. **Cancer treatment reviews**, Elsevier, v. 39, n. 8, p. 862–871, 2013. Citado 2 vezes na página 21.

JIANG, Chunlan; DAVALOS, Rafael V; BISCHOF, John C. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 62, n. 1, p. 4–20, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 16, 20, 21.

KHAN, Saiqa I et al. Eradication of multidrug-resistant pseudomonas biofilm with pulsed electric fields. **Biotechnology and bioengineering**, Wiley Online Library, v. 113, n. 3, p. 643–650, 2016. Citado 1 vez na página 21.

KINOSITA JR, Kazuhiko; ASHIKAWA, Ikuo et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 53, n. 6, p. 1015–1019, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 16, 20.

KINOSITA JR, Kazuhiko; TSONG, Tian Yow. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 268, n. 5619, p. 438, 1977. Citado 2 vezes nas páginas 16, 20.

KOTNIK, Tadej et al. Electroporation-based applications in biotechnology. **Trends in biotechnology**, Elsevier, v. 33, n. 8, p. 480–488, 2015. Citado 1 vez na página 21.

LACKOVIĆ, Igor; MAGJAREVIĆ, Ratko; MIKLAVČIČ, Damijan. Incorporating Electroporation-related conductivity changes into models for the calculation of the electric field distribution in tissue. In: SPRINGER. XII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2010. [S.l.: s.n.], 2010. P. 695–698. Citado 1 vez na página 17.

LUFT, Christin; KETTELER, Robin. Electroporation knows no boundaries: the use of electrostimulation for siRNA delivery in cells and tissues. **Journal of biomolecular screening**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 20, n. 8, p. 932–942, 2015. Citado 1 vez na página 21.

MACEJKOVIC, Eric; HEANEY, Allison. Basic principles of the finite element method, 1999. Citado 1 vez na página 28.

- MAHNA, A; FIROOZABADI, SMP; SHANKAYI, Z. The effect of ELF magnetic field on tumor growth after electrochemotherapy. **The Journal of membrane biology**, Springer, v. 247, n. 1, p. 9–15, 2014. Citado 1 vez na página 25.
- MICHEL, Olga et al. Electroporation with Cisplatin against Metastatic Pancreatic Cancer: In Vitro Study on Human Primary Cell Culture. **BioMed research international**, Hindawi, v. 2018, 2018. Citado 1 vez na página 21.
- MIKLAVCIC, Damijan et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. **Biomedical engineering online**, Springer, v. 9, n. 1, p. 10, 2010. Citado 1 vez na página 23.
- MIKLAVČIČ, Damijan et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. **Biomedical engineering online**, BioMed Central, v. 13, n. 1, p. 29, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 16, 21.
- MIR, Lluís M. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. **Bioelectrochemistry**, Elsevier, v. 53, n. 1, p. 1–10, 2001. Citado 2 vezes na página 21.
- MIR, Lluís M; GEHL, Julie 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. Citado 2 vezes nas páginas 22, 31.
- MIR, Lluís M; ORLOWSKI, Stéphane et al. 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. Citado 1 vez na página 16.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Symptoms of Cancer**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/symptoms>>. Acesso em: 12 fev. 2019. Citado 1 vez na página 18.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Side Effects of Cancer Treatment**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>>. Acesso em: 12 fev. 2019. Citado 1 vez na página 19.
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. **Electrochemotherapy for primary basal cell carcinoma and primary squamous cell carcinoma**. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ipg478/resources/electrochemotherapy-for-primary-basal-cell-carcinoma-and-primary-squamous-cell-carcinoma-1899869938127557>>. Acesso em: 12 fev. 2019. Citado 1 vez na página 16.
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. **Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin and melanoma**. [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ipg446/resources/treating-metastases-in-the-skin-from-tumours-of-nonskin-origin-and-melanoma-using-chemotherapy-with-electrical-pulses-pdf-364715101>>. Acesso em: 12 fev. 2019. Citado 1 vez na página 16.
- NEUMANN, Eberhard et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, Wiley Online Library, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982. Citado 1 vez na página 21.
- OEY, Indrawati et al. 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. Citado 3 vezes nas páginas 26, 27.
- ONCOLOGIA DO BRASIL. **Câncer: Introdução pt.1**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<http://oncologicadobrasil.com.br/sobre-o-cancer/cancer-introducao-ao-tema/>>. Acesso em: 27 mar. 2019. Citado 0 vez na página 19.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Folha informativa - Câncer**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 27 mar. 2019. Citado 2 vezes nas páginas 16, 18.
- ORLOWSKI, Stéphane et al. Transient electroporation of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. **Biochemical pharmacology**, Elsevier, v. 37, n. 24, p. 4727–4733, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 16, 21.
- PAGANIN-GIOANNI, A et al. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 108, n. 26, p. 10443–10447, 2011. Citado 2 vezes na página 21.
- PAVLIHA, Denis et al. Patient-specific treatment planning of electrochemotherapy: Procedure design and possible pitfalls. **Bioelectrochemistry**, Elsevier, v. 87, p. 265–273, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 17, 23.
- PINTARELLI, GB et al. Computer simulation of commercial conductive gels and their application to increase the safety of electrochemotherapy treatment. **Medical Engineering & Physics**, Elsevier, v. 74, p. 99–105, 2019. Citado 4 vezes nas páginas 26, 33, 46.
- PRAUSNITZ, Mark R et al. Skin barrier and transdermal drug delivery. **Dermatology**, Elsevier Health Sciences Philadelphia, PA, v. 3, p. 2065–2073, 2012. Citado 1 vez na página 21.
- RAMIREZ, LH et al. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 77, n. 12, p. 2104, 1998. Citado 1 vez na página 21.
- SEL, Davorka et al. Sequential finite element model of tissue electroporation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 52, n. 5, p. 816–827, 2005. Citado 2 vezes na página 24.
- STÄMPFLI, R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node. **An Acad Brasil Ciens**, v. 30, p. 57–63, 1958. Citado 1 vez na página 20.
- STÄMPFLI, R; WILLI, M. Membrane potential of a Ranvier node measured after electrical destruction of its membrane. **Experientia**, Springer, v. 13, n. 7, p. 297–298, 1957. Citado 1 vez na página 20.
- STEPHENS, Frederick O; AIGNER, Karl; ALLEN-MERSH, Timothy G et al. **Basics of oncology**. [S.l.]: Springer, 2016. Citado 1 vez na página 19.
- SUAREZ, Cecilia et al. The role of additional pulses in electroporation protocols. **PloS one**, Public Library of Science, v. 9, n. 12, 2014. Citado 1 vez na página 27.
- SUZUKI, Daniela OH; ANSELMO, Jânio et al. Numerical model of dog mast cell tumor treated by electrochemotherapy. **Artificial organs**, Wiley Online Library, v. 39, n. 2, p. 192–197, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 17, 22.
- SUZUKI, Daniela OH; BERKENBROCK, José A; FREDERICO, Marisa JS et al. 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. Citado 1 vez na página 17.
- SUZUKI, Daniela OH; BERKENBROCK, José A; OLIVEIRA, Krishna D de et al. Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. **Artificial organs**, Wiley Online Library, v. 41, n. 8, p. 767–773, 2017. Citado 1 vez na página 17.
- SUZUKI, Daniela OH; MARQUES, Claudia MG; RANGEL, Marcelo MM. Conductive gel increases the small tumor treatment with electrochemotherapy using needle electrodes. **Artificial organs**, Wiley Online Library, v. 40, n. 7, p. 705–711, 2016. Citado 5 vezes nas páginas 17, 22, 26, 46.

- SUZUKI, Daniela OH; RAMOS, Airton et al. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 58, n. 12, p. 3310–3318, 2011. Citado 1 vez na página 17.
- TOZON, Nataša et al. Electrochemotherapy is highly effective for the treatment of canine perianal hepatoid adenoma and epithelioma. **Acta veterinaria**, v. 60, n. 2-3, p. 285–302, 2010. Citado 1 vez na página 25.
- WEAVER, James C; CHIZMADZHEV, Yu A. Theory of electroporation: a review. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, Elsevier, v. 41, n. 2, p. 135–160, 1996. Citado 1 vez na página 20.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 28 mar. 2019. Citado 1 vez na página 19.
- YARMUSH, Martin L et al. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. **Annual review of biomedical engineering**, Annual Reviews, v. 16, p. 295–320, 2014. Citado 1 vez nas páginas 20, 21.
- ZOREC, Barbara et al. Active enhancement methods for intra-and transdermal drug delivery: a review. **Slovenian Medical Journal**, v. 82, n. 5, 2013. Citado 1 vez na página 21.