

DANIELA OTA HISAYASU SUZUKI

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE
SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE RATOS
DURANTE APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS
INTENSOS: TEORIA, MODELAGEM E
EXPERIMENTAÇÃO**

**FLORIANÓPOLIS
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA ELÉTRICA**

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE
SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE RATOS DURANTE
APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS:
TEORIA, MODELAGEM E EXPERIMENTAÇÃO**

Tese submetida à
Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Doutora em Engenharia Elétrica.

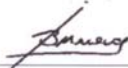
DANIELA OTA HISAYASU SUZUKI

Florianópolis, Abril de 2009.

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE
SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE RATOS DURANTE
APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS:
TEORIA, MODELAGEM E EXPERIMENTAÇÃO**

Daniela Ota Hisayasu Suzuki

'Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Elétrica, Área de Concentração em Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.'

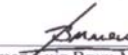


Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Ph.D.
Orientador



Prof. Kátia Campo de Almeida, Dra.
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:



Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Ph.D.
Presidente



Prof. Ailton Ramos, Dr.
Co-orientador



Prof. José Wilson Magalhães Bassani, Dr.



Prof. Humberto Remigio Gamba, Ph.D.



Prof. Fernanda Isabel Marques Argoud, Dra.



Prof. Fernando Mendes de Azevedo, Dr.

Não há caminhos bem trilhados
Na direção para onde sigo.
Trago na minha mochila as pedras
Com que pavimento o caminho dos meus sonhos.
Assim, quanto mais ando nele,
Mais leve é o fardo que carrego.
(Euler de Vilhena Garcia)

A beleza da vida está no equilíbrio dos opostos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos 6 anos de mestrado/doutorado, vivi intensamente cada momento de aprendizado. Foram momentos de amizade, brigas, discussões, vitórias e derrotas. Mas, sobretudo foram intensas e saudosas. Aprendi novas formas de ver o velho mundo. Nesse novo velho mundo, a criatividade não é uma barreira, mas estímulo para a vida. Os sonhos e imaginações não são ilusões. Podem tornar-se o início de um projeto inovador. Meus amigos e colegas contribuíram essencialmente nesse novo estágio da minha vida. A tentativa de citar todas as pessoas que colaboraram para esta evolução causaria injustiça, pois irei, com certeza, esquecer de alguém. Se isso ocorrer, por favor, perdoe-me.

Ao professor Jefferson, pela imensa paciência e dedicação.

Ao professor Airton, colega e companheiro de estudos sobre eletroporação e cálculo de campos elétricos em células. Foram longas as viagens, visitas de estudos, horas debruçada em cálculos, livros e artigos para tentar entendê-lo. Contudo, cada momento foi importante para aprender sobre um novo mundo, a ciência.

As várias fronteiras da ciência foram um desafio para a realização deste trabalho. No entanto, nelas encontrei amigos que me ajudaram a ultrapassar essas barreiras. Como toda nova terra a ser explorada, a ajuda deles foi fundamental para aprender as teorias, cultura, linguagem e hábitos. Entre eles, cito a professora Laura Difine Leite (Departamento de Ciências Fisiológicas), a professora Fátima Regina Mena Barreto e as amigas de Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica, os amigos do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética, em especial à professora Maria Cecília Menks Ribeiro, a professora Haidi Fiedler e ao professor Faruk Nome do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais do Departamento de Química.

À minha mãe Akemi, ao meu pai Mitsuo (falecido) e minha irmã Camila.

Aos meus filhos, Akira e Yudi.

E a pessoa que tornou possível este sonho, meu marido Celso.

A Deus.

Ao CNPq e a Capes pelo financiamento destes anos de estudo.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos Completos Publicados em Periódicos

SUZUKI, D. O. H.; RAMOS, A.; MARQUES, J. L. B. Modeling environment for numerical simulation of applied electric fields on biological cells, *Electromagnetic Biology and Medicine*, v. 26, p. 239-250, 2007.

RAMOS, A.; **SUZUKI, D. O. H.**; MARQUES, J. L. B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells, *Bioelectrochemistry*, v. 68, p. 213-217, 2006.

RAMOS, A., **SUZUKI, D. O. H.**, MARQUES, J. L. B. Numerical simulation of electroporation in spherical cells, *Artificial Organs*, v. 28, p. 357-361, 2004.

Artigos Completos em Anais de Congressos

RAMOS, A.; **SUZUKI, D. O. H.**; MARQUES, J. L. B.; 2008 .Simulação Numérica da Eletropermeabilização de Células Biológicas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROONDAS E OPTOELETRÔNICA (13) E CONGRESSO BRASILEIRO DE ELETROMAGNETISMO (8.: Set. 2008: Florianópolis, Santa Catarina). *Anais*. Florianópolis, 2008. p. 451-455.

SUZUKI D. O. H., RAMOS A., RIBEIRO M. C. M., CAZAROLLI L. H., SILVA F. R. M. B., LEITE L. D., MARQUES J. L. B. Estudo da Condutância da Membrana em Suspensões de Células Durante a Eletroporação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA (21.: Novembro, 2008: Salvador, Bahia). *Anais*. Salvador, 2008. p.1-4.

MATSUMI, C. T.; RUSCZAK, J. R.; RAMOS, A.; **SUZUKI, D.O.H.**; MARQUES, J.L.B. Desenvolvimento de um eletroporador de células biológicas. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA (21.: Novembro, 2008: Salvador, Bahia). *Anais*. Salvador, 2008. p. 1-4

Resumos em Anais de Congressos

SUZUKI, D. O. H.; SANTOS, F.; ARGOUD, F. I.; RAMOS, A.; MARQUES, J. L. B.; 2006. Numerical study of the electroporation process in cell suspension. In: WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING (Aug. 2006: Seul, Korea). *Proceedings*. Seul, Korea. p. 4816, 2006.

SUZUKI D. O. H., RAMOS A., RIBEIRO M. C. M., CAZAROLLI L. H., SILVA F. R. M. B., LEITE L. D., MARQUES J. L. M. Efeito da eletroporação em suspensões de células - Estudo experimental e teórico. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (23.: Agosto, 2008: Águas de Lindóia, São Paulo). *Anais*. Águas de Lindóia, 2008, p. 115.

Projeto de Pesquisa

Sistema Integrado para Aplicação e Estudo da Eletropermeabilização de Membranas Celulares. Edital Universal CNPq 2004. Processo 472484/2004-4.

Prêmio

Terceira colocação no concurso de melhor artigo do Prêmio Cândido Pinto de Melo, no 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 16 de Novembro de 2008, Salvador-Bahia.

Resumo da Tese apresentada à UFSC como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE RATOS DURANTE APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS: TEORIA, MODELAGEM E EXPERIMENTAÇÃO

Daniela Ota Hisayasu Suzuki

Abril/2009

Orientador: Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Palavras-chave: Modelos Matemáticos, Eletroporação, Hemácias, Campos Elétricos.

Número de Páginas: 81

A aplicação de campos elétricos intensos em suspensões de células provoca o aumento da condutância da membrana plasmática (G_m). Este fenômeno, chamado de eletroporação, tem sido utilizado na biologia e medicina. Alguns mecanismos e fundamentos da eletroporação ainda não são completamente entendidos. Neste trabalho realizou-se medições macroscópicas da condutividade de suspensões celulares, e através da análise numérica, obteve-se as alterações microscópicas (como, condutância e potencial na membrana) causadas pela eletroporação. A alteração da condutividade da suspensão de células foi medida com a aplicação de campo entre 400 e 1650V/cm, para frações volumétricas de $p=0,07$ e $0,35$. Os resultados experimentais ($p=0,07$) foram utilizados para obter os parâmetros dos modelos de Krassowska *et al.* (1999) e Hibino *et al.* (1993). Com a análise numérica, estudou-se a dinâmica de abertura e fechamento dos poros, a distribuição do potencial de transmembrana induzido, o potencial crítico, efeito da condutividade do meio (σ_0), do citoplasma e do raio da célula (r) na eletroporação. Comparamos os resultados com o modelo da condutividade de Maxwell e Pavlin *et al.* (2005). O máximo valor de G_m foi entre $1-7S/cm^2$, e variação do ângulo crítico (a partir do qual G_m é desprezível) entre 50° e 65° . Estes valores confirmam os resultados obtidos por Kakorin *et al.* (2002) e Schmeer *et al.* (2004). Os modelos matemáticos

apresentaram um erro menor que 3%. A metodologia desenvolvida mostrou-se adequada para o estudo experimental da eletroporação. Demonstrou-se que σ_0 e 'r' têm que ser considerados na escolha adequada da intensidade e duração dos pulsos. No entanto, para meios de baixa condutividade, contendo células maiores que $7\mu\text{m}$ de raio, as dimensões das células não afetam significativamente a abertura de poros.

Abstract of Thesis presented to UFSC as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Electrical Engineering.

STUDY OF THE ELECTRIC CONDUCTIVITY OF RAT RED BLOOD CELL SUSPENSION DURING APPLICATION OF INTENSE ELECTRIC FIELDS: THEORY, MODEL AND EXPERIMENTS

Daniela Ota Hisayasu Suzuki

April/2009

Supervisor: Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.

Area: Biomedical Engineering

Keywords: Electroporation models, Electric fields, Membrane Conductance, Red Blood Cells.

Number of Pages: 81

Intense electric field can be applied to cell suspension to increase the membrane conductance (G_m), and this phenomenon is named eletroporation. This mechanism provides a wide range of medical application, genetic engineering and therapy. However, some background of the electroporation phenomenon is not yet completely understood or explained. Therefore, to bridge this gap it was developed a methodology (a system and numerical models) for studying electroporated erythrocytes suspension and cell membrane conductance. We measured the electric conductivity of cell suspension under applied electric fields of 400 to 1650V/cm, with volumetric fraction of $p=0.07$ and 0.35 . Comparing the experimental and theoretical results we obtained the parameters of electroporation models (Krassowska *et al.* (1999) e Hibino *et al.* (1993)). The numerical models provided the electroporation dynamics, the induced transmembrane potential, the critical potential difference for electroporation, asymmetric pore distribution, the electroporation sensitivity to extracellular conductivity (σ_o), intracellular conductivity and cell radius (r). We compared the results to Maxwell conductivity model and Pavlin *et al.* (2005). The maximum G_m was $1-7S/cm^2$, and the critical angle (when the G_m is insignificant) as 50 to 65 degrees. These values agreed with the observations of Kakorin *et al.* (2002) e Schmeer *et al.* (2004). The methodology developed detected the changes in electric conductivity due the electroporation. Also, it was simulated the variation of physiological parameters to

verify the electroporation efficiency. The σ_0 and 'r' are important parameters affecting the pores opening phenomenon. However, if the cell radius is larger than $7\mu\text{m}$ in low conductivity medium, the cells dimensions are not so important.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Membrana Plasmática Celular	2
1.2 Potencial Transmembrana Induzido	3
1.3 Conceitos da Eletroporação	6
1.4 Modelos da Eletroporação	9
1.5 Condutividade Elétrica da Suspensão de Células e a Eletroporação	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3. MÉTODOS	18
3.1 Eletroporador	18
3.2 Células e Frações Volumétricas	19
3.3 Meio de Eletroporação e Cubeta	20
3.4 Diâmetro dos Esferócitos	21
3.5 Medição da Condutividade em Suspensões de Células	23
3.5.1 Filtro Digital	24
3.5.2 Erro de Medição Analítico	25
3.5.3 Erro de Medição Experimental	27
3.5.4 Efeito Joule	28
3.6 Marcador Fluorescente	28
3.7 Análise Teórica	29
3.7.1 Modelo Cossenoidal da Eletroporação	30
3.7.2 Modelo Assintótico da Eletroporação	30
4. RESULTADOS	34
4.1 Leitura da Condutividade da Suspensão de Células	34
4.2 Marcador Fluorescente	37
4.3 Modelo Cossenoidal da Eletroporação	40
4.4 Modelo Assintótico da Eletroporação	42
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	58
7. PERSPECTIVAS	60
ANEXO 1 – Energia e Densidade de Poros	61

ANEXO 2 – O Eletroporador.....	64
REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (a) Símbolo da molécula fosfolipídica. (b) Forças repulsivas do grupo hidrofílico e forças atrativas do grupo hidrofóbico (interface água e hidrocarbono). (c) Mobilidade dos fosfolipídios. Adaptado de Alberts *et al.* (1997) [24] e Israelachvili (1985) [26]. 3
- Figura 2** – Célula esférica com raio ‘a’, espessura da membrana ‘h’, E_0 é o campo elétrico aplicado e θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana. 4
- Figura 3** – Expor uma célula a um campo elétrico pode provocar permeabilização ou destruição da célula. Se os parâmetros do campo elétrico estão dentro de uma certa faixa, a eletroporação é reversível. Este mecanismo pode ser utilizado como ferramenta para a inserção de proteínas, introdução de pequenas e grandes moléculas para dentro da célula, e fusão celular. Adaptado de Miklavčič e Puc (2006) [4]. 6
- Figura 4** – (a) Poros hidrofóbicos são lacunas flutuantes na membrana. Ocorrem devido à flexão na dupla ligação cis dos ácidos graxos da cauda fosfolipídica. (b) Poro hidrofílico permite a passagem de moléculas polares, como a água. (c) Vista do poro hidrofílico no plano central da bicamada lipídica. Adaptado de Abidor *et al.* (1979) [57] e Weaver e Mintzer (1981) [65]. 10
- Figura 5** – Energia do poro, para $V_m=0$. (•) Energia do poro hidrofóbico. (-) Energia do poro hidrofílico. (a) Ampliação da energia do poro na região de transição entre as energias dos poros hidrofóbicos e hidrofílicos, pode-se observar a barreira de energia ΔW_p , W_{min} é a energia mínima dos poros hidrofílicos e o raio crítico (0,5nm). (b) Barreira de energia (238kT) limitando o crescimento dos poros em 18nm. 11
- Figura 6** – Simulação da equação de Smoluchowski com a função de energia do poro dada por Joshi *et al.* (2002) [71] (Anexo 1). Para $V_m>700mV$ o sistema é instável, este resultado é inconsistente com os resultados experimentais. A eletroporação é considerada reversível para $V_m\sim 1V$ [2, 4]. 12
- Figura 7** – Distribuição de campo elétrico para um pulso de 1800V durante 50 μs (a) sem a ocorrência da eletroporação (b) com o efeito da eletroporação. Adaptado de Ramos (2005) [77]. 14

Figura 8 – Aumento assimétrico da condutância da membrana eletroporada. As curvas de baixo para cima representam G_m nos tempos 0,5, 1, 2, 5, 50, 250 e 1000 μ s. Hibino <i>et al.</i> (1993) [38].....	15
Figura 9 – Diagrama esquemático do sistema de aplicação e estudo da aplicação de campos elétricos de alta intensidade. Este sistema dispõe de programa para a geração da forma da onda, uma placa de conversão digital para analógico e o estágio de potência.....	19
Figura 10 – Definição geométrica para o cálculo da resistência de uma solução de condutividade σ em um volume de área ‘A’ e comprimento ‘L’.....	20
Figura 11 - A) Hemácias em solução isotônica [5]. A seta branca indica a biconcavidade da hemácia, e seta preta apresenta a hemácia vista lateralmente. B) Hemácias de ratos em solução levemente hipotônica (67% da solução isotônica) [97].	22
Figura 12 – Diagrama esquemático do sistema integrado de estudo e aplicação da eletroporação.	24
Figura 13 – Leitura da condutividade de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr) com pulso de 400V/cm e 500 μ s de duração. (A) Antes e (B) após o filtro Butterworth de 4ª ordem com $f_c=100$ kHz. A seta indica o intervalo aceitável da leitura da condutividade da suspensão. (C) Resultado da aplicação do filtro Butterworth (linha contínua) em um pulso unitário (linha pontilhada), foi observado que o <i>overshoot</i> causado pelo filtro não apresenta efeito após 50 μ s após o início do pulso.	25
Figura 14 - Erro analítico da leitura da condutividade padrão ($\sigma_0=2,3$ mS/cm), calculado através da Equação (24).....	26
Figura 15 – Condutividade relativa da solução de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr), $\sigma_0=2,3$ mS/cm. A medição foi realizada com pulsos de 500 μ s com intensidade entre 400V/cm a 1,65kV/cm (N=3).	27
Figura 16 - Fluxograma ilustrativo do algoritmo desenvolvido para o cálculo numérico do potencial transmembrana com o modelo assintótico da eletroporação.	33
Figura 17 – Leitura da condutividade da suspensão de células de fração volumétrica $p=0,07$. No pulso de 600V/cm não houve a eletroporação (linha pontilhada). No entanto, para 1650V/cm, existe um aumento da condutividade da suspensão	

causada pela abertura de poros na membrana plasmática (linha contínua). A seta indica o intervalo de tempo considerado satisfatório para evitar erros decorrentes do filtro.	35
Figura 18 – Leitura de condutividade da suspensão de células durante o pulso de eletroporação para frações volumétricas de $p=0,07$. As linhas verticais largas apresentam os limites aceitáveis da leitura da condutividade da suspensão.	36
Figura 19 - Leitura de condutividade da suspensão de células durante o pulso de eletroporação para frações volumétricas de $p=0,35$. As linhas verticais largas apresentam os limites aceitáveis da leitura da condutividade da suspensão.	36
Figura 20 – Comparação entre resultados experimentais e teóricos da leitura de suspensão de células onde σ_0 é a condutividade do meio externo. A linha contínua representa o modelo de Maxwell (Equação (21)), os asteriscos são os resultados experimentais deste trabalho, o triângulo é o resultado apresentado por *Pavlin <i>et al.</i> (2005) [48].	37
Figura 21 – Imagens das hemácias de rato: A) em solução hipotônica com lente de 10x; B) em meio contendo FITC-Dextran 250S (peso molecular médio de 50k), os marcadores não entram passivamente na célula, lente de 40x; C) controle com $p=0,07$, lente de 10x; D) eletroporação de $p=0,07$ com 1650V/cm e 500 μ s; E) controle, mesmo experimento com lente de 40x; F) eletroporação com lente de 40x.	39
Figura 22 – Leitura da condutividade da suspensão durante a aplicação de pulso com duração de 500 μ s. A linha pontilhada é a leitura com pulso de 600V/cm (aplicado antes do pulso de eletroporação), e a linha contínua ($p=0,07$) e tracejada ($p=0,35$) com pulso de 1650V/cm. Com $p=0,07$ houve a entrada de marcadores fluorescentes na célula, como demonstrado nas Figuras 18(C), (D) e Tabela 5. Verificou-se que a variação da condutividade inicial ($\Delta\sigma_i$) entre as duas curvas sugere abertura de poros maiores para $p=0,07$. A variação da condutividade final ($\Delta\sigma_f$) para maiores concentrações celulares pode ser atribuída à formação de poros e a outros fatores (<i>e.g.</i> , eletroforese).	40
Figura 23 – Condutividade normalizada da suspensão em função do campo elétrico aplicado, para A) 100 μ s e B) 400 μ s. A linha contínua (-) apresenta a simulação teórica, o erro máximo é de 3% com o experimento; (*) são os pontos obtidos pelo	

experimento com fração volumétrica de 0,07; (x) mostra os resultado da aplicação dos pulsos em solução não contendo células (medição de referência).....	41
Figura 24 – Condutividade relativa da suspensão (σ/σ_o) em função da condutância (máxima) da membrana no pólo da célula (G_{mo}), para valores de θ_c entre 40° a 70°	42
Figura 25 – Condutividade relativa da suspensão de células com $p=0,07$, medido em $100\mu s$. Os asteriscos são os valores experimentais obtidos, os quadrados são os pontos simulados com o modelo assintótico. Erro menor que 1%.	43
Figura 26 – Simulação de suspensão de célula isolada, campo aplicado de $1kV/cm$. A) Potencial transmembrana com membrana intacta (linha tracejada) e membrana eletroporada (linha contínua), no pólo da célula; B) condutância da membrana em $\theta=0rad$	44
Figura 27 - Simulação de suspensão de célula isolada, campo aplicado de $1kV/cm$ em regime. Distribuição angular A) V_m e B) G_m	44
Figura 28 – Efeito da eletroporação na membrana da célula na aplicação de campo elétrico entre 400 a $1600V/cm$, $\sigma_o=2,3mS/cm$, $\sigma_i=6,2mS/cm$, $h=5nm$, $a=3,2\mu m$, em regime. A) Condutância da membrana no pólo da célula ($\theta=0rad$), os quadrados são os pontos simulados com o modelo assintótico e os losangos os resultados da Equação (34). As linhas representam a equação $E_o=a.G_{mo}-b$. Em ambos os modelos $a=8,75.10^{-3} V^2.cm.A^{-1}$. Entretanto $b=7V/cm$ para o modelo assintótico e $b=8,65V/cm$ para a Equação (34); e B) θ_c é o ângulo no qual a condutância da membrana é desprezível.	45
Figura 29 - Potencial transmembrana em $\theta=0rad$ em função da condutância máxima da membrana em regime.	45
Figura 30 – Distribuição angular da condutância da membrana. O efeito do potencial de repouso ($80mV$) não afeta, significativamente, a assimetria da eletroporação.	46
Figura 31 – Dinâmica de abertura e fechamento dos poros. Em $t=0s$, aplicou-se um pulso de $1300V/cm$, após $0,65\mu s$ o campo elétrico é desligado. A) Condutância da membrana no tempo, para várias ângulos na membrana, $\Delta\theta=0,032rad$. B) Distribuição angular da condutância da membrana, para alguns instantes de tempo, $\Delta t=1,3ns$. As linhas pretas representam os instantes de aplicação do campo, e em vermelho o desligamento.....	47

Figura 32 – Influência dos meios externos na condutância máxima da membrana eletroporada em regime (G_{mo}). O pulso aplicado foi de 1200V/cm. G_{mo} dependente da condutividade externa, as condições <i>in vivo</i> [19] indicadas pela seta incluem as soluções da Tabela 2. $a=3,2\mu\text{m}$, $\sigma_i=6,2\text{mS/cm}$, $h=5\text{nm}$ e $C_m=0,8\mu\text{F/cm}^2$	47
Figura 33 - Dependência da condutividade do citoplasma sobre a condutância máxima da membrana eletroporada ($a=3,2\mu\text{m}$, $h=5\text{nm}$ e $C_m=0,8\mu\text{F/cm}^2$).	48
Figura 34 – Efeito da dimensão das células na condutância máxima da membrana eletroporada em regime. O pulso aplicado foi de 1200V/cm, $\sigma_i=6,2\text{mS/cm}$, $\sigma_o=2,3\text{mS/cm}$, $h=5\text{nm}$ e $C_m=0,8\mu\text{F/cm}^2$	48
Figura 35 – Diferença de distribuição angular da condutância da membrana provoca diferença de G_{mo} entre os modelos assintótico (linha contínua) e cossenoidal (linha tracejada).	49
Figura A2.1 – Eletroporador desenvolvido para estudo da eletroporação. Possibilita a aplicação de formas de onda (pulso, rampa e senóide). O programa gráfico foi desenvolvido em Labview.....	64
Figura A2.2 – Tela de interface com o usuário do programa do Eletroporador desenvolvido em LabVIEW (National Instruments).	65
Figura A2.3 – Estágios de metade do esquema do amplificador de alta tensão. Cada metade amplifica o sinal com fase invertida em relação à outra metade. Máxima tensão de saída é de 200V.....	67
Figura A2.4 – Defasagem de fase, distorção da forma de onda (DFO) e ganho de amplitude do estágio de potência do eletroporador. As linhas verticais largas indicam a banda entre 100Hz a 10kHz onde DFO é menor que 5%.	67
Figura A2. 5 – Capacitância parasita do eletroporador, medida com carga resistiva não indutiva. Para a banda de 100Hz a 10kHz o valor máximo da capacitância parasita foi de 6nF.....	68

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
V_m	Potencial transmembrana induzido	V
F	Função dependente das propriedades dimensionais e elétricas da célula e do meio circundante.	Adimensional
a	Raio da célula esférica	M
h	Espessura da membrana	M
E_o	Campo elétrico aplicado	V/m
θ	Ângulo entre o campo elétrico aplicado e o vetor posição na membrana	Rad
φ_i	Potencial interno da membrana celular	V
φ_o	Potencial externo da membrana celular	V
σ_i	Condutividade do meio interno da célula	S/m
σ_o	Condutividade do meio externo da célula	S/m
σ_m	Condutividade da membrana	S/m
C_m	Capacitância da membrana	F/m
G_m	Condutância da membrana	S/m ²
τ	Constante de tempo da membrana	S
p	Fração volumétrica da suspensão de células	Adimensional
V_c	Potencial transmembrana crítico, a partir do qual existe a permeabilização da membrana	V
P_π	Pressão osmótica	mmol/Kg
C_{mol}	Molaridade	mol/L
R	Constante dos gases	L.atm/K.mol
T	Temperatura	K
C_{LW}	Capacitância da membrana alterada pela abertura de poros	F/m
W_o	Energia do poro hidrofóbico	J
W_i	Energia do poro hidrofílico	J
W_{elet}	Energia associada à formação do poro devido ao potencial transmembrana induzido	J

Símbolo	Descrição	Unidade
W_{mec}	Energia do poro relacionada com o aparecimento do poro na membrana intacta	J
W_{interm}	Energia do poro associada com as forças inter-moleculares	J
r_p	Raio do poro	M
$\sigma(\infty)$	Constante do modelo de energia do poro hidrofílico	N/m
I_0 e I_1	Funções de Bessel	Adimensional
ΔW_p	Barreira de energia para o poro hidrofílico converter-se em poro hidrofóbico	J
r_{min}	Raio mínimo do poro	M
r_{max}	Raio máximo do poro	M
W_b	Barreira de energia para a destruição e criação de poros	J
χ	Taxa pré-fator de criação de poros	$m \cdot s^{-1}$
ϖ	Taxa pré-fator de destruição de poros	s^{-1}
ϵ_w e ϵ_m	Permissividade relativa da água e da membrana	Adimensional
ϵ_0	Permissividade do vácuo	F/m
$P\left(\frac{\epsilon_m}{\epsilon_w}\right)$	Função de Parsegian	Adimensional
e	Carga elétrica do íon	$N \cdot m^2 \cdot C^{-2}$
Δr	Incremento de raio	M
Δt	Incremento de tempo	S
$\Gamma_{eff}(A_p=0)$	Tensão superficial da membrana	J/m^2
γ	Tensão linear da membrana	J/m
C	Repulsão entre as cabeças dos lipídios da membrana plasmática	$J^{1/4} \cdot m$
D_p	Constante de difusão	$m^2 \cdot s^{-1}$
A_m	Área da membrana	m^2
Z_{Na^+}	Número de elétrons na camada de valência do íon sódio	Adimensional

Símbolo	Descrição	Unidade
Z_{Cl^-}	Número de elétrons na camada de valência do íon cloro	Adimensional
μ_{Na^+}	Mobilidade do íon sódio	$cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$
μ_{Cl^-}	Mobilidade do íon cloro	$cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$
r_{Na^+}	Raio hidratado do íon sódio	m
r_{Cl^-}	Raio hidratado do íon cloro	m
c_{Na^+}	Concentração do íon sódio	M
c_{Cl^-}	Concentração do íon cloro	M
N	Função distribuição de poros	m^2
G	Condutividade média dos poros	S
ν	Frequência de flutuação lateral das moléculas de lipídio	s^{-1}
a_o	Área da molécula de lipídio	m^2
S	Área da membrana plana	m^2
R_b	Raio do poro para a barreira de energia ΔW_p	M
λ	Mobilidade relativa da membrana	Adimensional
β	Parâmetro do modelo da mobilidade relativa da membrana	Adimensional
V_{pp}	Parâmetro do modelo da mobilidade relativa da membrana	V
G_p	Condutância do poro	S
N_p	Densidade de poros	m^2
α	Constante do modelo assintótico	$m^{-2} \cdot s^{-1}$
V_p	Constante do modelo assintótico	V
Q	Constante do modelo assintótico	Adimensional
ζ	Comprimento relativo da entrada do poro	Adimensional
W_o	Barreira de energia interna do poro	J
G_{mo}	Condutância máxima da membrana	S/m^2
θ_c	Ângulo crítico a partir do qual não existe alteração da condutância da membrana	rad

Símbolo	Descrição	Unidade
σ_p	Condutividade da partícula (modelo da condutividade de Maxwell)	S/m
ΔT	Varição da temperatura em uma amostra na aplicação de um pulso	°C
C_p	Calor específico	J(g°C) ⁻¹
ρ	Densidade da amostra	g/cm ³
t_{pulso}	Duração do pulso	s
σ/σ_o	Condutividade relativa da amostra	Adimensional
$\Delta\sigma_i$	Varição da condutividade inicial entre dois pulsos	S/m
$\Delta\sigma_f$	Varição da condutividade final entre dois pulsos	S/m
V_{mo}	Potencial teórico máximo da membrana intacta	V

1. INTRODUÇÃO

A membrana celular é uma barreira para a passagem de substâncias entre o meio intracelular e extracelular. Quando um campo elétrico, suficientemente, intenso é aplicado na célula, há uma redução desta barreira. Este fenômeno é chamado de eletroporação e permite a transferência de íons e moléculas solúveis em água para dentro da célula [1-4].

A eletroporação tem sido aplicada em vários campos da bioquímica, biologia molecular, medicina e oncologia. É utilizada como forma de aumentar a eficiência das vacinas de DNA, para ativar a imunidade contra o câncer [5]; na eletroquimioterapia, na transferência de quimioterápicos (*e.g.*, bleomicina, cisplatina) para dentro de células tumorais cutâneas e sub-cutâneas [6]; na transferência de plasmídeos (DNA) e fusão de células, como ferramenta no melhoramento genético [7, 8]; transporte de moléculas (*e.g.*, vitamina C, lidocaina, entre outras) para a pele [9]; e inserção de proteínas na membrana celular [10]. Entretanto, ocorre um efeito indesejado da eletroporação na terapia de desfibrilação cardíaca. Este tratamento é necessário na reversão das arritmias cardíacas, mas causa eletroporação nas membranas e conseqüente desequilíbrio iônico nas células do coração [11].

O primeiro artigo sobre o rompimento elétrico reversível da membrana celular é atribuído a Stampfli em 1958¹. Na década seguinte, Sale e Hamilton (1967) relatam a destruição de micro-organismos utilizando pulsos elétricos. Na década de 70, Neumann e Rosenheck (1972) mostram que a aplicação de campos elétricos aumenta a permeabilidade da membrana plasmática em vesículas. Kinosita e Tsong (1977) introduzem o conceito de formação de poros na membrana [12]. Nos anos 80, a eletroporação foi aplicada na introdução de DNA [13], bleomicina [14, 15], sacarose, marcadores e íons. No início da década seguinte, os poros da membrana eletroporada são visualizados usando microscopia ótica [16]. Na última década, houve um aumento do número de trabalhos focados na eficiência da transferência de moléculas para dentro da célula, e conseqüentemente, nos estudos dos fatores que influenciam a eletroporação

¹ As observações experimentais foram efetuadas em nós de Ranvier e publicadas nos Anais da Academia Brasileira de Ciências.

[3, 17-21]. (Para uma revisão histórica completa da eletroporação, ver referências [2, 4 e 22]).

O entendimento dos mecanismos da eletroporação fornece subsídios para aplicação desta ferramenta de forma eficiente e segura. No entanto, as explicações teóricas não concordam com os resultados experimentais. A dificuldade no entendimento da eletroporação está associada aos poros terem diâmetros da ordem de nanômetros e sua dinâmica ocorrer na ordem de nano-microsegundos. A dinâmica de abertura e fechamento, bem como o tamanho e quantidade de poros sofrem a influência de fatores como: campo elétrico aplicado e propriedades do meio celular (*e.g.*, raio da célula, condutividade interna e externa do meio). A complexidade estrutural e a composição dos tecidos e células dificultam a compreensão do fenômeno.

A obtenção experimental da alteração da condutância da membrana durante pulsos de eletroporação (na faixa de μs) não é possível. Dessa forma, desenvolveu-se nesta tese uma metodologia de medição do efeito da eletroporação na condutividade da suspensão de células. Analisou-se através de cálculos numéricos, as mudanças na condutância e potencial da membrana celular para provocar a alteração macroscópica. Estudou-se como as características elétricas e dimensionais das suspensões celulares podem afetar os resultados dos experimentos com a eletroporação de suspensões de células.

1.1 Membrana Plasmática Celular

A membrana plasmática celular é constituída, principalmente, por fosfolípidios e proteínas. Os fosfolípidios da membrana plasmática são moléculas que possuem grupos atômicos hidrofóbicos e hidrofílicos (molécula anfifílica), Figura 1(a). O grupo hidrofóbico provoca uma força de atração na interface água e hidrocarbono. O grupo hidrofílico cria uma força de repulsão entre os dipolos da molécula lipídica (cabeça polar), Figura 1(b). O equilíbrio de forças permite a formação e manutenção de uma membrana estável.

No entanto, este equilíbrio de forças permite que a membrana plasmática seja dinâmica, fluida e suas moléculas movem-se no plano da membrana. Os fosfolípidios apresentam quatro tipos de movimentos: difusão lateral, rotação, flexão e *flip-flop*

(Figura 1(c)). A aplicação de um campo elétrico externo provoca um aumento da mobilidade dos fosfolipídios, e esta é a origem da dinâmica da eletroporação [23].

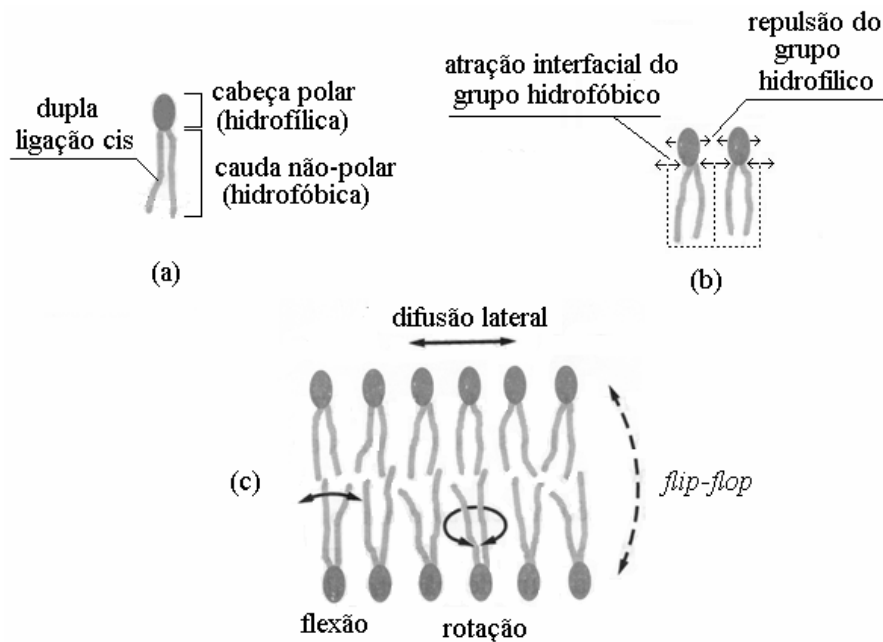


Figura 1 - (a) Símbolo da molécula fosfolipídica. (b) Forças repulsivas do grupo hidrofílico e forças atrativas do grupo hidrofóbico (interface água e hidrocarbono). (c) Mobilidade dos fosfolipídios. Adaptado de Alberts *et al.* (1997) [24] e Israelachvili (1985) [26].

1.2 Potencial Transmembrana Induzido

Quando um tecido biológico ou uma suspensão de células são excitados por um campo elétrico externo, ocorrem movimentações iônicas no eletrólito e íons acumulam-se em ambos os lados da membrana celular [26]. O problema em questão será analisado para uma célula esférica de raio 'a', espessura da membrana 'h', imersa em uma solução condutora, com campo elétrico uniforme aplicado E_0 , o potencial transmembrana induzido V_m é dado por [26]:

$$V_m = 1,5.F.a.E_0.\cos\theta(1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

onde $V_m = \varphi_i - \varphi_o$, φ_i e φ_o são os potenciais interno e externo da membrana, respectivamente, 'F' é um fator dependente da condutividade, τ é a constante de tempo de carregamento da membrana. θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana (Figura 2), relativo ao centro da célula.

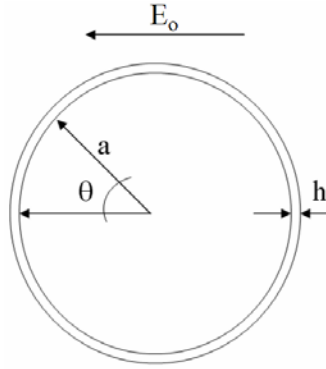


Figura 2 – Célula esférica com raio 'a', espessura da membrana 'h', E_o é o campo elétrico aplicado e θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana.

Neumann (1989) [28] apresentou 'F' como uma função das condutividades do meio interno (σ_i), do meio externo (σ_o), da membrana da célula (σ_m) e de h/a . Considerando $\sigma_m \leq \sigma_i, \sigma_o$:

$$F = \frac{2.\sigma_o \left[2.\sigma_m + \sigma_i + (\sigma_m - \sigma_i) \cdot \left(\frac{a-h}{a} \right)^3 - 3.\sigma_m \frac{a-h}{a} \right]}{(2.\sigma_m + \sigma_i) \cdot (2.\sigma_o + \sigma_m) + 2 \cdot \left(\frac{a-h}{a} \right)^3 \cdot (\sigma_i - \sigma_m) \cdot (\sigma_m - \sigma_o)} \quad (2)$$

$$\tau = a.C_m \frac{\sigma_i + 2.\sigma_o}{2.\sigma_i.\sigma_o + a.G_m \cdot (\sigma_i + 2.\sigma_o)} \quad (3)$$

onde C_m é a capacitância da membrana ($\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) e G_m é a condutância da membrana intacta ($\sim 10^{-3} \text{S}/\text{cm}^2$) [28]. Quando $a \gg h$, $\sigma_m \ll \sigma_o \ll \sigma_i$ (meio externo de baixa condutividade) [29]:

$$F = \left[1 + \frac{0,5.a.\sigma_m}{h.\sigma_o} \right]^{-1} \quad (4)$$

com $G_m \ll \frac{2.\sigma_i.\sigma_o}{(\sigma_i + 2.\sigma_o)}$:

$$\tau = a.C_m \frac{\sigma_i + 2.\sigma_o}{2.\sigma_i.\sigma_o} \quad (5)$$

Além do trabalho de Neumann, outras soluções para V_m sem e com simplificações são apresentadas na literatura [30-34].

Para suspensões de células densas em uma solução eletrolítica, o potencial transmembrana induzido (de agora em diante chamado de “potencial transmembrana”) é diferente da distribuição cosseionoidal dada pela Equação (1). A proximidade entre as células causa distorção na distribuição da corrente no espaço intersticial próximo das membranas [26, 35-37]. V_m é menor que o valor teórico dado pela Equação (1), e depende da fração volumétrica das células ‘p’². Ramos *et al.* (2006) [26] propõem que a relação entre a concentração de células e o potencial transmembrana é de:

$$V_m = 1,5.F.a.E_o.(1 - 0,38.p). \cos \theta (1 - e^{-t/\tau}) \quad (6)$$

Quando V_m ultrapassa um certo potencial crítico V_c ocorre a permeabilização da membrana plasmática. Estudos experimentais demonstram que na eletropermeabilização reversível, o potencial crítico deve estar dentro de 200mV a 1V [38-40]. Na Figura 3 podemos verificar que a eletroporação reversível é utilizada para a inserção de proteínas na membrana celular, moléculas para dentro da célula e a fusão celular. A indução de valores maiores causa a hemólise ou destruição da célula.

² A fração volumétrica da suspensão de células é a relação entre o volume interno da célula e o volume específico ocupado pela célula na suspensão.

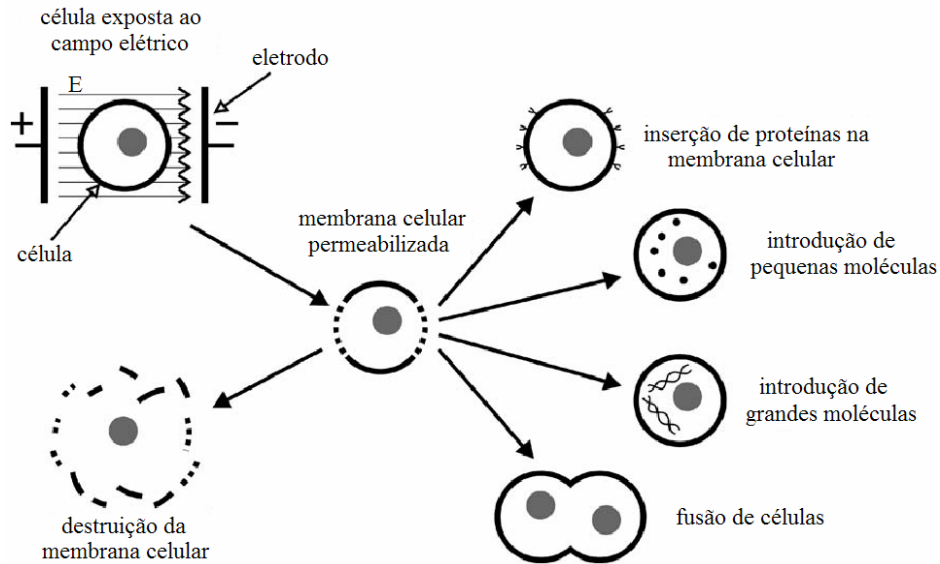


Figura 3 – Expor uma célula a um campo elétrico pode provocar permeabilização ou destruição da célula. Se os parâmetros do campo elétrico estão dentro de uma certa faixa, a eletroporação é reversível. Este mecanismo pode ser utilizado como ferramenta para a inserção de proteínas, introdução de pequenas e grandes moléculas para dentro da célula, e fusão celular. Adaptado de Miklavčič e Puc (2006) [4].

1.3 Conceitos da Eletroporação

O potencial transmembrana, induzido pelo campo elétrico, necessita ultrapassar um limite crítico para iniciar o processo de permeabilização da membrana plasmática [3, 42-44]. Com o potencial transmembrana mantido acima do limite crítico, existe um aumento da intensidade da permeabilidade [3, 33, 38, 45]. Gabriel e Teissié (1997) [46] estudaram a eletroporabilidade das células utilizando microscopia de fluorescência e concluíram que a intensidade do campo elétrico controla a região da membrana afetada da célula. Enquanto que a duração do pulso aplicado controla a densidade de poros nos pólos da membrana. Após a intensidade do potencial transmembrana se tornar menor que o limite crítico ocorre a estabilização. Neste estado a membrana torna-se permeável a pequenas moléculas [3, 38, 46].

Após o campo elétrico ser desligado, inicia-se a fase de recuperação da membrana, e o processo de fechamento dos poros [3]. Este fechamento tem uma forte

dependência da temperatura [47]. Mudanças estruturais (*e.g.*, distribuição assimétrica dos lipídios) e propriedades fisiológicas (*e.g.*, endocitose³) permanecem por um longo tempo, até que a célula recupere o comportamento normal [3, 47]. Se repetidos pulsos elétricos forem aplicados, em frequências de pelo menos 1Hz, o processo de fechamento é negligenciado [4]. Sucessivos pulsos contribuem para aumentar a permeabilidade da membrana na área afetada [49]. A Tabela 1 apresenta um resumo das fases da eletroporação.

Tabela 1 - Etapas da eletropermeabilização. Adaptado de Teissié *et al.* (2005) [3].

Etapas	Descrição do Efeito	Duração
Indução	O campo externo induz um aumento de V_m acima de um limite crítico, e a permeabilização da membrana tem início.	μs
Expansão	Se $V_m > V_c$, aumento do efeito da permeabilização da membrana.	μs -ms
Estabilização	Quando $V_m < V_c$, a permeabilização não aumenta e permite a passagem de pequenas moléculas.	μs –ms
Fechamento	Campo elétrico aplicado é desligado. Fechamento lento dos poros.	S
Memória	Alterações na propriedade da membrana permanecem. E a recuperação completa da membrana é muito lenta.	H

A eficiência da eletroporação depende de parâmetros de campo elétrico aplicado (amplitude e duração), características da célula, sua geometria e o meio circundante [49]. Dois tipos de pulsos de tensão podem ser utilizados: unipolar e bipolar. Os tipos mais comuns de sinais unipolares são: exponencial e retangular. Ambos apresentam resultados satisfatórios na transferência genética [50]. O aumento da eficiência da eletroporação, para estes sinais, está na duração do sinal após exceder o potencial crítico (V_c) [4]. Kotnik *et al.* (2003) [51] demonstraram que os pulsos bipolares simétricos necessitam de amplitudes 20% menores que pulsos unipolares, para apresentarem

³ Endocitose é o processo pelo qual as células absorvem moléculas através da membrana.

mesma transferência dos marcadores fluorescentes. Este resultado é válido para pulsos que excedem um valor limite crítico.

O campo elétrico é, possivelmente, o parâmetro mais importante para a eficiência da eletroporação [4]. Nas aplicações de campos elétricos *in vitro*, características como: forma e tamanho da célula, densidade, orientação e condutividade da suspensão, pressão osmótica e temperatura tornam-se importantes porque podem ser controlados. Ao contrário das condições *in vivo*, onde os experimentos são realizados em seres vivos.

As células variam em forma e tamanho. Mesmo em uma mesma cultura, as células podem variar em tamanho. Estes dois parâmetros afetam o valor do potencial transmembrana que é função das propriedades geométricas. As Equações (1) e (6) evidenciam que as células maiores são mais sensíveis à mesma intensidade de campo elétrico do que células menores [4, 30]. Nas células esferoidais, o potencial transmembrana induzido tem seu máximo valor quando o maior eixo está paralelo ao campo elétrico aplicado [52]. Além disso, a concentração de células em uma suspensão afeta o potencial transmembrana induzido de acordo com a Equação (6).

Em condições *in vitro*, a condutividade da suspensão de células e a pressão osmótica podem ser alteradas utilizando soluções diferentes durante o experimento. Alguns autores propõem que a diminuição da condutividade da solução aumenta a sobrevivência das células. No entanto, a porcentagem de células permeabilizadas não é afetada [53, 54]. A pressão osmótica (P_{π}) pode ser modificada com a variação da concentração de partículas da solução [54]:

$$P_{\pi} = C_{\text{mol}} \cdot R \cdot T \quad (7)$$

onde ' C_{mol} ' é a molaridade (mol/L), ' R ' a constante dos gases (0,082 L.atm.K⁻¹.mol⁻¹) e ' T ' a temperatura (K). Meios hipotônicos⁴ causam o aumento da célula. Barrau *et al.* (2004) [38] utilizaram uma solução hipotônica com pressão osmótica 67% menor que a solução isotônica, e verificaram que houve uma redução do potencial crítico de 14%.

A aplicação de pulsos elétricos provoca aquecimento devido ao efeito Joule na amostra [3]. Este aquecimento pode ser controlado, em condições *in vitro*, utilizando

⁴ No caso de suspensões de células, a pressão osmótica da solução é menor que o meio interno da célula.

soluções de baixa condutividade. *In vivo*, este controle pode ser obtido limitando os parâmetros do campo elétrico (amplitude, duração, frequência e número de pulsos) [4]. O aquecimento torna-se um fator importante quando o meio é muito condutivo ou quando pulsos de longa duração são utilizados. Entretanto, células tratadas com temperatura controlada têm apresentado bons resultados. Baixas temperaturas (4°C) antes da aplicação dos pulsos de eletroporação e altas temperaturas (37°C) depois do pulso, aumentam a taxa de sobrevivência e eficiência de transferência [56].

1.4 Modelos da Eletroporação

Abidor *et al.* (1979) [57], Patushenko *et al.* (1979) [58, 59], Chizmadzhev *et al.* (1979) [60], Arakelyan *et al.* (1979) [61] foram os primeiros a sugerir que poros seriam responsáveis pelo aumento da condutividade da membrana planar. A presença de poros na membrana, como base estrutural para a eletroporação, foi seguida por alguns autores para explicar resultados experimentais [23, 62-71]. Alguns experimentos sugerem que o início dos poros ocorre em lacunas existentes na matriz lipídica [2, 23]. Estas lacunas ocorrem devido à flexibilidade das cadeias de hidrocarboneto da cauda fosfolipídica (conformação trans-cis [24]), e são chamados de poros hidrofóbicos, Figura 4(a). Poros hidrofóbicos não são estáticos e estão em constante flutuação na escala de pico-segundos [23].

Os modelos iniciais de energia do poro não incluíam o efeito da energia eletrostática (W_{elet}) associada ao campo elétrico aplicado. Este potencial transmembrana induzido tende a diminuir a estabilidade da membrana favorecendo a criação de poros hidrofóbicos. Posteriormente, esta energia foi introduzida como uma mudança na capacitância da membrana, C_{LW} , causada pela abertura dos poros, e o preenchimento de partes da membrana por água [2, 58, 65, 71]:

$$W_o(r, V_m) = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot h \cdot \sigma(\infty) \cdot \left[\frac{I_1(r/r_o)}{I_0(r/r_o)} \right] - W_{\text{elet}} \quad (8)$$

$$W_{\text{elet}} = \frac{1}{2} C_{\text{LW}} V_m^2 \pi \cdot r^2$$

$$C_{\text{LW}} = \frac{(\epsilon_w - \epsilon_m)}{h}$$

onde $W_o(r, V_m)$ é a energia do poro hidrofóbico, $\sigma(\infty)$ é uma constante de valor igual a $5.10^{-2} \text{N.m}^{-1}$ [71], I_1 e I_0 são as funções de Bessel, $r_0=1 \text{nm}$ é um parâmetro do modelo [71], ϵ_w e ϵ_m são a permissividade relativa da água e da membrana.

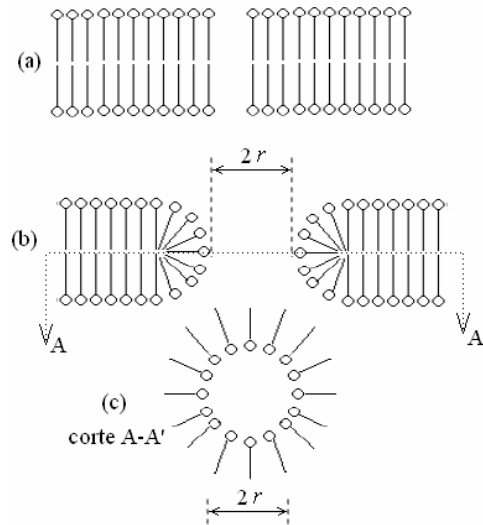


Figura 4 – (a) Poros hidrofóbicos são lacunas flutuantes na membrana. Ocorrem devido à flexão na dupla ligação cis dos ácidos graxos da cauda fosfolipídica. (b) Poro hidrofílico permite a passagem de moléculas polares, como a água. (c) Vista do poro hidrofílico no plano central da bicamada lipídica. Adaptado de Abidor *et al.* (1979) [57] e Weaver e Mintzer (1981) [65].

Se o raio do poro ultrapassar a barreira de energia ΔW_p , Figura 5(a)⁵, o poro hidrofóbico sofre uma re-orientação molecular e converte-se em poro hidrofílico, Figura 4(b).

A equação de energia do poro hidrofílico (de agora em diante chamado de poro) foi introduzida por Lister (1975) [71]. Definiu-se a energia mecânica (W_{mec}) como a soma de duas energias relacionadas com o aparecimento do poro na membrana: compressão da massa lipídica e interação da água com a membrana. A energia relacionada com as forças inter-moleculares (W_{interm}), também chamada de *steric repulsion*, ocorre quando a proximidade das moléculas provoca uma sobreposição das nuvens eletrônicas [73].

⁵ Os dados para a elaboração da Figura 5 estão em Anexo 1.

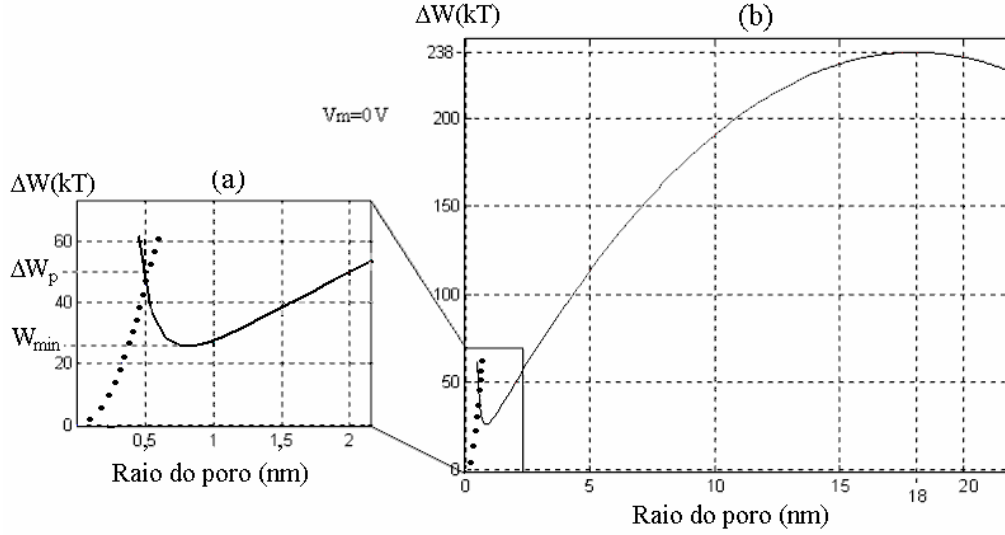


Figura 5 – Energia do poro, para $V_m=0$. (●) Energia do poro hidrofóbico. (-) Energia do poro hidrofílico. (a) Ampliação da energia do poro na região de transição entre as energias dos poros hidrofóbicos e hidrofílicos, pode-se observar a barreira de energia ΔW_p , W_{min} é a energia mínima dos poros hidrofílicos e o raio crítico (0,5nm). (b) Barreira de energia (238kT) limitando o crescimento dos poros em 18nm.

A mesma redução da energia total associada com a aplicação de campos elétricos da Equação (8) foi incluída nesta equação.

$$W_i(r, V_m) = W_{mec} + W_{interm} + W_{elet}$$

$$W_i(r, V_m) = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot \gamma - \pi \cdot r^2 \cdot \Gamma + \left(\frac{C}{r}\right)^4 - 0,5 \cdot C_{LW} \cdot V_m^2 \cdot \pi \cdot r^2 \quad (9)$$

Para $V_m > 300$ mV na Equação (9), a barreira (238kT na Figura 5(b)) para impedir que os poros cresçam indefinidamente desaparece [73]. Este resultado é inconsistente com os resultados experimentais. Experimentalmente, verificou-se que V_m de até 1V produz eletroporação reversível [2, 4]. Para corrigir este problema, Pastushenko *et al.* (1982) [74] alteraram a equação da energia eletrostática para adicionar a energia de Born. Posteriormente, Joshi *et al.* (2002) [71] apresentam uma nova proposta para a contribuição eletrostática e tensão superficial.

Alguns autores modelaram a dinâmica da evolução dos poros através da equação de Smoluchowski [58, 69, 75]. Esta equação diferencial parcial fornece a densidade de poros 'n' como o número de poros com raios entre 'r' e r+dr, em um dado tempo 't', depende da energia dos poros e de uma constante de difusão (D_p):

$$\frac{\partial n(r,t)}{\partial t} = D_p \left[\frac{\partial^2 n(r,t)}{\partial r^2} + \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{n(r,t)}{k.T} \cdot \frac{\partial W_i}{\partial r} \right) \right] \quad (10)$$

O modelo dos poros apresentado descreve as principais características da eletroporação: a ocorrência de ruptura reversível na membrana dependente do pulso aplicado; a natureza estocástica da eletroporação [57]; a magnitude máxima do potencial transmembrana para que ocorra eletroporação reversível ($V_m < 1V$). No entanto, existem algumas limitações deste modelo, tanto em relação a equação de energia quanto a constante de difusão do poro, que são de difícil obtenção experimental. Além disso, os modelos de energia existentes não apresentam uma barreira de energia para limitar o crescimento indefinido dos poros; para $V_m > 700mV$ a Equação (9) torna-se instável (Figura 6). As informações para simulação da Figura 6 estão em Anexo 1.

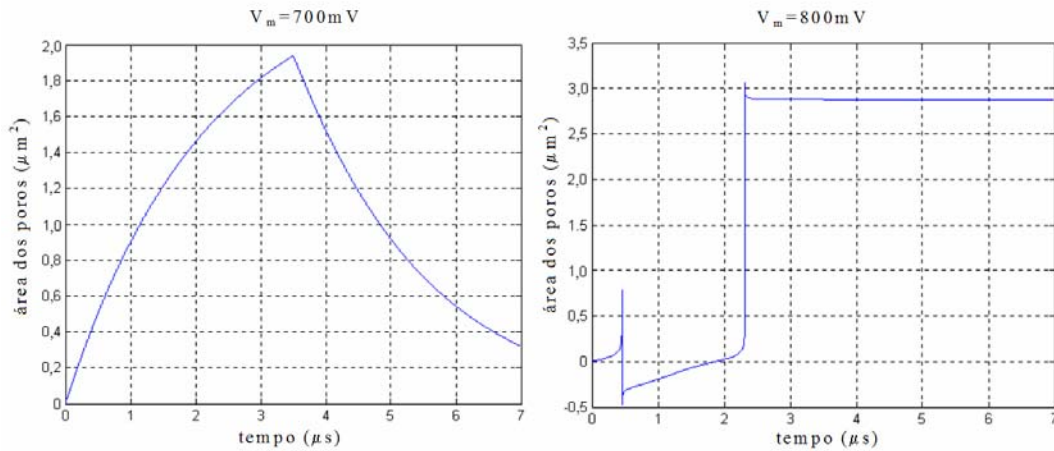


Figura 6 – Simulação da equação de Smoluchowski com a função de energia do poro dada por Joshi *et al.* (2002) [71] (Anexo 1). Para $V_m > 700mV$ o sistema é instável, este resultado é inconsistente com os resultados experimentais. A eletroporação é considerada reversível para $V_m \sim 1V$ [2, 4].

Dando continuidade aos experimentos com membranas planares, Glaser *et al.* (1988) [65] demonstraram uma dependência de $\ln(\Delta I/\Delta t)$ por V_m^2 , com pulsos de 0,65 a 1,9V:

$$\ln\left(\frac{\Delta I}{\Delta t}\right) = A_g + B_g \cdot V_m^2 \quad (11)$$

e

$$A_g = \ln\left(\frac{G \cdot \nu \cdot S}{a_o}\right) - \frac{\Delta W_p \cdot (V_m = 0)}{k \cdot T} \quad (12)$$

$$B_g = \frac{\pi \cdot R_b^2 \cdot (\epsilon_w - \epsilon_m) \cdot \epsilon_o}{2 \cdot h \cdot k \cdot T} \quad (13)$$

onde 'G' é a condutividade média dos poros, ν é a frequência de flutuação lateral das moléculas de lipídio, a_o é a área da molécula de lipídio, 'S' é a área da membrana e R_b é o raio para a barreira de energia ($\Delta W_p(V_m=0)$). Na Figura 5, $R_b \sim 0,5\text{nm}$ e $\Delta W_p(V_m=0) \sim 50\text{kT}$.

Baseado neste modelo, Ramos *et al.* (2004, 2005) [76, 77] propuseram que a criação dos poros aumenta a mobilidade iônica na membrana. Assim, a mobilidade relativa na membrana (λ) é a razão entre a mobilidade iônica na membrana e na água. Tem uma derivada no tempo dependente do potencial transmembrana:

$$\frac{d\lambda}{dt} = \beta \cdot \exp\left(\frac{V_m}{V_{pp}}\right)^2 \quad (14)$$

e

$$\beta = \frac{h \cdot \exp(A_g)}{A_g \cdot V_m \cdot \sigma_c} \quad (15)$$

$$V_{pp} = \frac{1}{\sqrt{B_g}} \quad (16)$$

' A_g ' e ' B_g ' são dados nas Equações (14) e (15). Assumindo os parâmetros do modelo $\beta=10^{-11}$ e $V_{pp}=0,46\text{V}$, Ramos (2005) [77] analisou as distribuições de campo elétrico em tecidos, com e sem o efeito da eletroporação (Figura 7). Os resultados mostraram que a eletroporação não pode ser ignorada no cálculo de campos em tecidos, durante a aplicação de intensos campos elétricos.

Este modelo responde adequadamente na fase inicial da eletroporação, mas para um tempo maior a tendência da corrente é um aumento infinito. Fisicamente, isto significa que os poros não param de crescer, provocando a destruição da membrana.

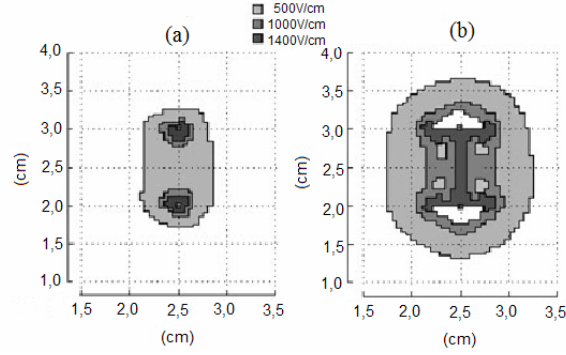


Figura 7 – Distribuição de campo elétrico para um pulso de 1800V durante 50µs (a) sem a ocorrência da eletroporação (b) com o efeito da eletroporação. Adaptado de Ramos (2005) [77].

O modelo assintótico tem sido utilizado por alguns autores [69, 73, 78] para representar a eletroporação e analiticamente reproduz os resultados experimentais com células e tecidos. Krassowska *et al.* (1999) [69, 73] representaram a condutância da membrana eletroporada por:

$$G_m = N_p \cdot G_p \quad (17)$$

G_p é a condutância em um poro simples. N_p é o número de poros por unidade de área:

$$\frac{\partial N_p}{\partial t} = \alpha \cdot \exp(V_m / V_p)^2 \cdot \left\{ 1 - \frac{N_p}{N_o} \cdot \exp[-q(V_m / V_p)^2] \right\} \quad (18)$$

onde N_o é a densidade de poros quando $V_m=0$. α , V_p e ‘q’ são constantes. Estes quatro parâmetros são otimizados para cada tipo de membrana. A condutância do poro G_p é uma função do potencial transmembrana:

$$G_p = \left(\frac{\pi \cdot r_p^2 \cdot \sigma_p}{h} \right) \frac{\exp(V_m / V_t) - 1}{\left[\frac{W_o \exp(\vartheta) - \zeta \cdot V_m}{W_o - \zeta \cdot V_m} \right] \exp(V_m / V_t) - \left[\frac{W_o \cdot \exp(\vartheta) + \zeta \cdot V_m}{W_o + \zeta \cdot V_m} \right]} \quad (19)$$

$$\text{onde } \vartheta = \frac{W_o - \zeta \cdot V_m}{V_t}$$

ζ é o comprimento relativo da entrada do poro, $V_t = k \cdot T / e$ onde $T=300K$ e ‘e’ é a carga elementar. r_p é o raio do poro, W_o é a barreira de energia dentro do poro.

O modelo apresenta algumas suposições para a solução analítica da condutância do poro calculada pela Equação (19): distribuição uniforme da corrente na área do poro; variação linear do potencial elétrico entre as faces da membrana; e a energia de Born

tem uma distribuição trapezoidal [69]. No entanto, a distribuição de campo elétrico dentro e nas proximidades do poro não é uniforme [74, 79]. A energia de Born depende da valência, número de íons (dentro do poro), espessura da membrana e tamanho dos poros [80-82]. Além disso, o modelo assintótico não apresenta uma evolução dos poros, fixos em 0,75nm. Contudo, Chang (1992) [16] mostrou poros com raios de até 80nm. Modificações recentes introduziram a evolução do tamanho dos poros no modelo [79].

Os resultados dos experimentos com microscopia fluorescente revelaram que os poros estão concentrados nos pólos das células [37, 83, 84]. Os autores não demonstraram a solução numérica do potencial transmembrana utilizado para comparar com as observações experimentais. Todavia, assumiram a condutância da membrana dada pela Equação (20) e ajustaram os resultados experimentais e teóricos.

$$G_m(\theta) = \begin{cases} G_{mo} \frac{(|\cos\theta| - \cos\theta_c)}{(1 - \cos\theta_c)} & (0 \leq \theta \leq \theta_c, 180^\circ - \theta_c \leq \theta \leq 180^\circ) \\ 0 & (\theta_c < \theta < 180^\circ - \theta_c) \end{cases} \quad (20)$$

θ_c é o ângulo crítico a partir do qual não existe alteração da condutância (ausência de poros). G_{mo} é a condutância máxima da membrana, obtida nos pólos da célula ($\theta=0$ e $\theta=180^\circ$). Os autores estimaram G_{mo} na faixa de 1-10S/cm² e $44^\circ < \theta_c < 70^\circ$ [38].

A Equação (20) foi modificada para calcular a alteração da condutância da membrana na assimetria da eletroporação. Hibino *et al.* (1993) [38] verificaram que no início da eletroporação existe uma assimetria entre os pólos da célula (Figura 8). Mas, dentro de 5 μ s existe uma equalização da condutância da membrana e pode-se considerar que a assimetria não é significativa [38].

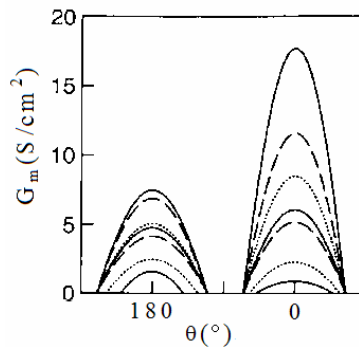


Figura 8 – Aumento assimétrico da condutância da membrana eletroporada. As curvas de baixo para cima representam G_m nos tempos 0,5, 1, 2, 5, 50, 250 e 1000 μ s. Hibino *et al.* (1993) [38].

1.5 Condutividade Elétrica da Suspensão de Células e a Eletroporação

A medição da alteração da condutividade da suspensão é uma técnica pouco explorada para estudar a eletroporação. Alguns estudos sugerem que a medição da condutividade poderia possibilitar observação e controle *on-line* da eletroporação [85, 86]. Abidor *et al.* (1994) [87] mediram mudanças na resistência de eritrócitos devido a eletroporação. Similarmente, Kinoshita e Tsong (1978, 1979) [88, 89] relataram um aumento da condutividade da suspensão de eritrócitos dependendo da amplitude, duração do campo e condutividade do meio externo. Pavlin *et al.* (2005, 2007) [48, 90] detectaram o limiar de eletropermeabilização das células e verificaram o aumento da condutividade com a aplicação consecutiva de pulsos.

Maxwell (1873) [91] propôs um modelo para a condutividade de suspensões de partículas esféricas em um meio condutor:

$$\frac{\sigma_o - \sigma}{2 \cdot \sigma_o + \sigma} = p \cdot \frac{\sigma_o - \sigma_p}{2 \cdot \sigma_o + \sigma_p} \quad (21)$$

onde a condutividade da partícula (σ_p) é dada por[48]:

$$\sigma_p = \sigma_m \frac{2 \cdot (1 - \xi) \cdot \sigma_m + (1 + 2 \cdot \xi) \cdot \sigma_i}{(2 + \xi) \cdot \sigma_m + (1 - \xi) \cdot \sigma_i} \quad \xi = \left(\frac{1 - h}{a} \right)^3 \quad (22)$$

Na Equação (22), a condutividade da membrana (σ_m) é considerada uniforme em toda a membrana.

Este modelo apresenta algumas limitações: (i) em suspensões densas de partículas este modelo não é satisfatório, pois o efeito da proximidade afeta o potencial transmembrana [12, 35, 91]; (ii) a dupla camada elétrica em torno da célula não é infinitesimal [92]. Ohshima (1999) [92] propôs uma expressão geral para a condutividade elétrica de suspensões, onde o potencial transmembrana é baixo e a sobreposição das duplas-camadas elétricas das partículas adjacentes pode ser negligenciado. Quando $p > 0,20$ e $V_m > 200\text{mV}$, no caso de partículas coloidais, existem aumentos da condutividade da solução maiores que os previstos pelo modelo de Maxwell [92, 93]. São atribuídos fatores como eletroforese⁶ e condução da dupla camada [93]. No entanto, não existe um modelo consolidado para estimar este valor.

⁶ Movimentação da célula pela aplicação de campo elétrico.

2. OBJETIVOS

A idéia geral deste trabalho é realizar medições macroscópicas da condutividade de suspensões celulares, e através da análise numérica, obter as alterações microscópicas (como, condutância e potencial na membrana) causadas pela eletroporação. Através deste estudo pretende-se estudar o efeito das dimensões, condutividades internas e externas das células na eletroporação.

2.1 Objetivos Específicos

- Inserir macromoléculas na célula e efetuar a leitura da condutividade para caracterizar que a abertura de poros na membrana causa o aumento da condutividade;
- Demonstrar a confiabilidade da leitura da condutividade da suspensão no limiar inicial da eletroporação⁷ em pequena concentração de células (fração volumétrica $p=0,07$);
- Compatibilizar a simulação dos modelos teóricos da eletroporação e os resultados experimentais obtidos;
- Verificar através dos modelos a área afetada pelos poros, os valores da condutância da membrana eletroporada e como estas mudanças afetam o potencial transmembrana;
- Investigar a sensibilidade da eletroporação com a variação das dimensões, condutividade interna e externa da célula.

⁷ Potencial de transmembrana (diferença de potencial entre a parte interna e externa da célula) induzido mínimo necessário para que a abertura de poros na membrana plasmática das células cause alteração na condutividade da suspensão.

3. MÉTODOS

Para desenvolver os experimentos deste trabalho foi necessário projetar e construir um eletroporador que sustentasse a amplitude do campo elétrico aplicado ($\sim 1\text{kV/cm}$) com cargas não lineares (suspensões de célula durante a eletroporação). Além disso, uma metodologia da leitura da alteração da condutividade da suspensão foi desenvolvida com objetivo de evidenciar a confiabilidade da leitura, principalmente, no início da eletroporação. Este é o ponto crítico da leitura, pois a variação da corrente é mínima. Com marcadores fluorescentes foi demonstrado que a alteração da condutividade da suspensão causava o aumento da permeabilidade da membrana. O entendimento microscópico (alteração da membrana celular) do efeito da alteração macroscópica da condutividade da suspensão de células foi estudado através da análise teórica com dois modelos da eletroporação.

As células utilizadas neste estudo são hemácias de ratos. Os eritrócitos são modelos utilizados na literatura [33, 34] por serem abundantes e anucleadas. Estes fatores facilitam os procedimentos experimentais e a comparação teórica. No entanto, a forma bicôncava da hemácia é um problema para a simulação numérica. Com o intuito de evitar este problema morfológico entre o modelo experimental e teórico, foi proposta a utilização de uma solução levemente hipotônica que altera o formato da hemácia para esferas (esferócitos). Dessa forma, foi necessário determinar em que intervalo os esferócitos estabilizavam o diâmetro e seu valor. Os experimentos utilizando a aplicação de pulsos de eletroporação foram realizados neste intervalo. Os experimentos, as características do eletroporador, a manipulação das células, a escolha da solução utilizada nos experimentos de eletroporação (meio de eletroporação), as dimensões das células, características elétricas para a análise numérica e procedimentos empregados serão apresentados a seguir.

3.1 Eletroporador

O esquema do eletroporador é mostrado na Figura 9. Com o programa em Labview pode-se configurar um sinal com forma de onda, amplitude, frequência e duração. Através de uma saída da placa de aquisição de dados modelo NI PCI 6251 da

National Instruments instalada em um computador, este sinal é aplicado na entrada de um amplificador linear e posteriormente, a tensão amplificada é enviada para a carga (Z_L).

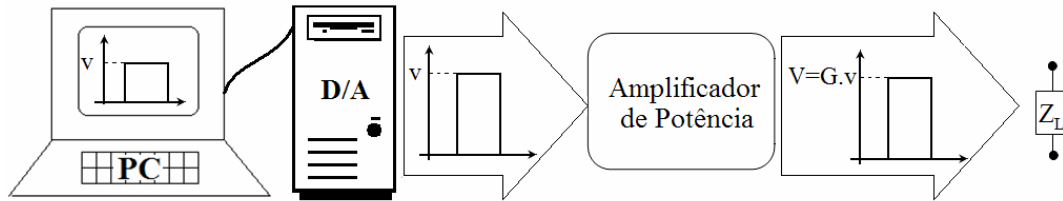


Figura 9 – Diagrama esquemático do sistema de aplicação e estudo da aplicação de campos elétricos de alta intensidade. Este sistema dispõe de programa para a geração da forma da onda, uma placa de conversão digital para analógico e o estágio de potência.

O eletroporador apresenta na faixa de 100Hz a 10kHz as melhores características de amplificação. Com distorção de forma de onda (DFO, ver Anexo 2) menor que 5%, capacitância parasita máxima de 6nF, defasagem máxima de 7° , ganho de $28,2 \pm 0,2$ dB (com carga de $205 \pm 4\Omega$), tempo de subida $t_s = 3,0 \pm 0,5 \mu s$ e de descida $t_d = 3,5 \pm 0,5 \mu s$. A resistência mínima de carga é de $R_L = 200\Omega$. Com *ripple* de saída máximo de 10V. A tensão diferencial máxima de saída (sem carga) é de 400V, com carga de 200Ω é cerca de 325V. Estas características do eletroporador são importantes para orientar e delimitar as especificações dos experimentos com suspensão de células. Detalhes do programa, especificações técnicas, esquemático do amplificador, limitações do eletroporador e incertezas da medição estão disponíveis em Anexo 2.

3.2 Células e Frações Volumétricas

O sangue do rato (*Rattus norvegicus*) foi utilizado no dia da coleta. O material foi centrifugado a 3000 rpm durante 4 minutos, $25^\circ C$ (Eppendorf mod. 5415R, Hamburg, Alemanha). O plasma foi retirado, as hemácias foram re-suspensas em solução isotônica (NaCl 13 mM, Sacarose 150m M, NaOH 14 mM, pH 7,4, [34]) e centrifugadas novamente. Antes da aplicação dos pulsos, as hemácias foram colocadas em meio de eletroporação de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de solução isotônica [98]), nas frações volumétricas de $p = 0,07$ ($0,51 \times 10^6$

células/mm³) e $p=0,35$ ($2,6 \times 10^6$ células/mm³). A contagem de células foi feita com câmara de Neubauer⁸, com diluição em tubo de ensaio, onde foi colocado 4mL de meio de eletroporação, e 20μL da fração volumétrica homogeneizada.

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as recomendações éticas do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. PP00040/CEUA. n°23080.013345/2006-80/UFSC.

3.3 Meio de Eletroporação e Cubeta

A resistência mínima de carga do eletroporador (200Ω) e as dimensões da cubeta especificam a máxima condutividade da solução. Pode-se calcular a relação entre resistência de carga do eletroporador e condutividade da solução como [94]:

$$R_L = k \frac{1}{\sigma}, \quad k = \frac{L}{A} \quad (23)$$

onde 'k' é a constante geométrica, 'L' é o comprimento e 'A' a área da seção pela qual a corrente é conduzida (Figura 10).

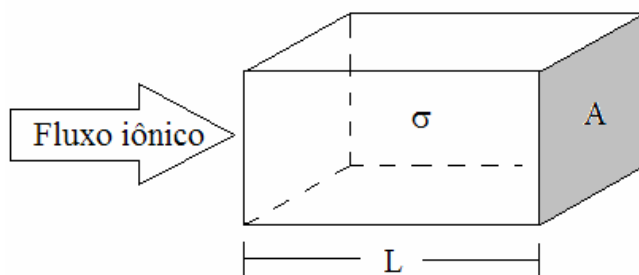


Figura 10 – Definição geométrica para o cálculo da resistência de uma solução de condutividade σ em um volume de área 'A' e comprimento 'L'.

As soluções isotônicas utilizadas para a manutenção das hemácias possuem condutividade entre 3-17mS/cm (ver Tabela 2). Com solução isotônica Kbr, condutividade de $\sigma_{Kbr}=3,67$ mS/cm, $L=0,2$ cm [95], $A=0,25$ cm², $R_L=218\Omega$.

⁸ Lâmina quadriculada com volume definido para contagem das células no microscópio.

Tabela 2 – Condutividades de soluções isotônicas adequadas à manutenção das hemácias.

Identificação	Solução	Condutividade ^a
NaCl (Soro fisiológico)	NaCl 0,87%	$\sigma_{\text{NaCl}}=17,9\text{mS/cm}$
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	7,65g de NaCl 0,724g de Na ₂ HPO ₄ 0,21g de KH ₂ PO ₄ 1L de H ₂ O destilada pH 7,2	$\sigma_{\text{PBS}}=15,15\text{mS/cm}$
Kbr ^b	NaCl 13mM Sacarose 150mM NaOH 14mM pH 7,4	$\sigma_{\text{Kbr}}=3,67\text{mS/cm}$

^a Medições efetuadas a 23°C com condutivímetro Metrohm mod. 712 (Metrohm, Herisau, Suíça).

^b [16].

A definição de ‘L’ é influenciada, principalmente, pela tensão de saída diferencial máxima com carga do eletroporador (em torno de 300V). No caso de eritrócitos, o campo elétrico aplicado para $V_m=1\text{V}$ fica em torno de $2,5\pm 0,5\text{kV/cm}$, mas causa hemólise em 50% das células [96]. Para $L=0,2\text{cm}$ o campo elétrico máximo aplicado seria de $1,5\text{kV/cm}$.

Utilizou-se uma solução de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr) que torna as hemácias esféricas, com uma condutividade um pouco menor ($\sigma_o=2,3\text{mS/cm}$). Com base nos dados anteriores, foi concluído que a cubeta utilizada em nossos experimentos deve ser de $L=0,2\text{cm}$ e $A=0,25\text{cm}^2$.

3.4 Diâmetro dos Esferócitos

A morfologia bicôncava das hemácias apresenta complicações na análise teórica. Hemácias esféricas (esferócitos) preparadas com NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de solução isotônica [98]) aumentam seu volume com entrada de água na célula, isto ocorre pela diferença entre a pressão osmótica interna e externa da célula [52]. No entanto, alguns mecanismos, como a bomba de sódio e potássio, tendem a restabelecer o volume normal da célula [98]. Barrau *et al.* (2004) [20] verificaram que a força osmótica aumenta o tamanho da célula dentro de 1 minuto

após a colocação das células na solução hipotônica, em seguida existe uma redução do diâmetro da célula e a estabilização ocorre após 6 minutos. Com esta alteração de volume necessitou-se determinar a estabilidade dos esferócitos durante um determinado tempo, a variação do diâmetro entre experimentos e o diâmetro médio das hemácias.

O procedimento de obtenção das hemácias é descrito em “Células e Frações Volumétricas” deste capítulo. A fração volumétrica utilizada foi de $p=0,07$, e a solução utilizada para obter os esferócitos foi de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr, Tabela 2). As hemácias foram colocadas na solução levemente hipotônica e foram medidas nos tempos 5, 10 e 15 minutos. Foram realizados três experimentos independentes. As dimensões das hemácias foram medidas utilizando um microscópio eletrônico Olympus Bx41 com uma câmera digital QColor 3 (Olympus América, Inc., Melville, NY) e o programa QCapture Pro (Media Cybernetics, Inc., Surrey, BC, Canadá). Utilizou-se lente de 40x. A calibração do equipamento foi efetuada para todas as lentes com uma graticula-padrão com precisão de $1\mu\text{m}$ (Olympus América, Inc., Melville, NY). O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 10.0; SPSS Inc., Chicago, IL) para Windows XP foi utilizado para a análise estatística dos dados.

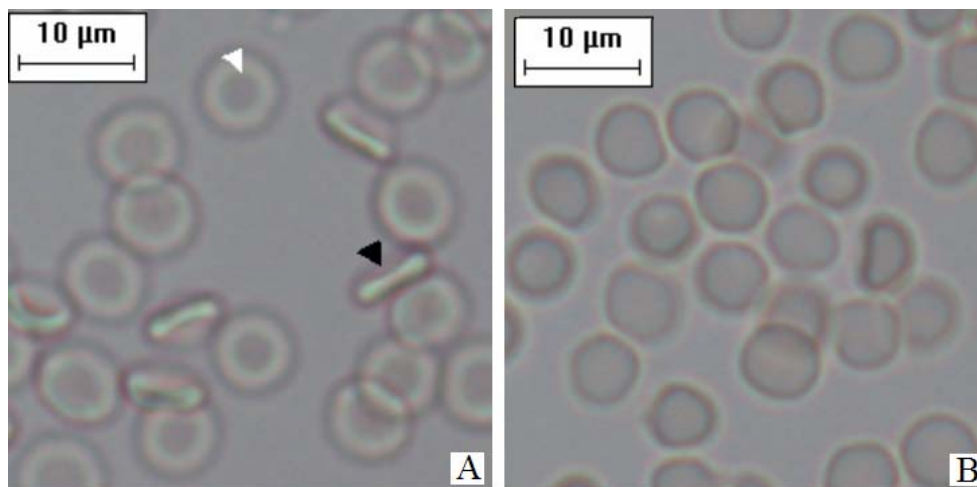


Figura 11 - A) Hemácias em solução isotônica [5]. A seta branca indica a biconcavidade da hemácia, e seta preta apresenta a hemácia vista lateralmente. B) Hemácias de ratos em solução levemente hipotônica (67% da solução isotônica) [97].

Na Figura 11(A) foram encontradas as hemácias vistas lateralmente (seta preta) e a biconcavidade (seta branca). As hemácias da Figura 11(B) estão na forma esferoidal e não apresentam a biconcavidade, as hemácias na posição lateral não são visíveis.

Verificou-se que os diâmetros das hemácias não apresentam uma curva de distribuição normal de probabilidade, os testes foram realizados com $N=100$ (número de diâmetros de hemácias medidos) em uma mesma amostra. Para a análise de variância em três experimentos nos tempos 5, 10 e 15 minutos, com $N=20$, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis [99] que é uma alternativa não-paramétrica para comparar amostras independentes (de diferentes cobaias) [100]. Os resultados mostraram que não houve uma variação do diâmetro das hemácias no tempo, nem entre os experimentos.

Concluiu-se que durante o tempo de 5 a 15 minutos não houve variação significativa do diâmetro das hemácias, nem mesmo entre experimentos. Dessa forma, os experimentos de medição da condutividade durante o pulso de eletroporação devem ocorrer dentro deste tempo, assim garantiu-se que os esferócitos apresentam um raio médio de $3,2\pm 0,6\mu\text{m}$. Foram consideradas insignificantes as alterações em V_m decorrentes das trocas iônicas na regulação do volume da célula.

3.5 Medição da Condutividade em Suspensões de Células

A abertura de poros na membrana ocorre entre 200mV-1V [4], e a influência da eletroporação da membrana na condutividade da suspensão de células foi observada para um $V_m=450\text{mV}$, para $p=0,30$ [48]. Na leitura de $p=0,07$, trabalhou-se com uma quantidade menor de fluxo de íons entre o meio intra e extra-celular. Nesta secção, verificou-se os erros, efeito eletrodo-meio e artefatos que possam afetar a leitura da condutividade da suspensão durante o pulso de eletroporação.

Nos experimentos de medição de condutividade de solução e suspensão de células foram utilizados eletrodos de aço-inox com dimensões de $0,5\times 0,5\text{cm}$, distanciados $0,2\text{cm}$. Este tipo de material é empregado em aplicações eletroquímicas, pois possuem excelentes propriedades elétricas e mecânicas [101]. O sistema foi calibrado através da determinação da constante geométrica 'k' (Equação (23)) de uma solução de NaCl $8,71\text{ mM}$, Sacarose $100,5\text{m M}$, NaOH $9,38\text{ mM}$, pH $7,4$ (67% de Kbr, Tabela 2), $\sigma_0=2,3\text{mS/cm}$ (Metrohm mod. 712, Herisau, Suíça), com pulso de 400V/cm . Aplicou-se pulsos de $500\mu\text{s}$ variando de 400V/cm a $1,65\text{kV/cm}$ e foi medido a

condutividade da solução. A Figura 12 apresenta um esquemático do sistema de medição de condutividade durante o pulso de eletroporação. Os resultados foram obtidos com a ponteira de corrente (Tektronix A622, Beaverton, Oregon, EUA), ponteira de tensão (Tektronix P5102, Beaverton, Oregon, EUA) e osciloscópio digital (Tektronix THS720A, Beaverton, Oregon, EUA) são armazenados e enviados ao microcomputador. Todo o procedimento foi efetuado em temperatura de $25\pm 3^\circ\text{C}$.

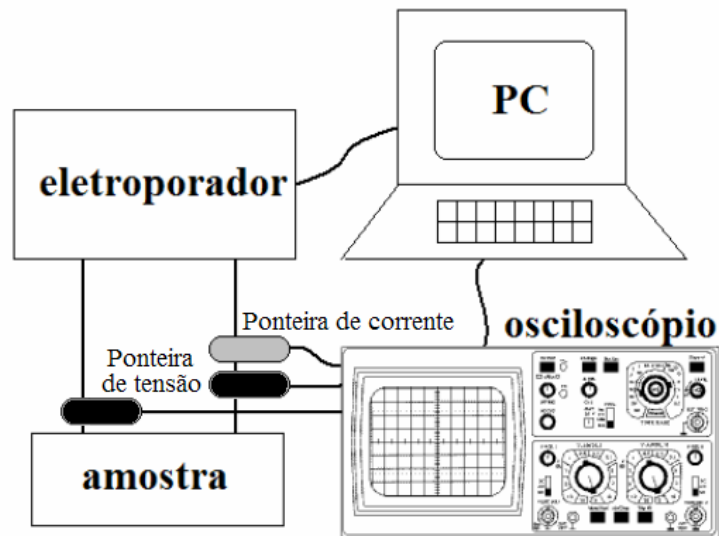


Figura 12 – Diagrama esquemático do sistema integrado de estudo e aplicação da eletroporação.

3.5.1 Filtro Digital

Um filtro digital passa-baixa Butterworth de 4ª ordem foi implementado com frequência de corte de $f_c=100\text{kHz}$, a frequência de amostragem foi de $f_s=2,5\text{MHz}$. As Figuras 13(A) e (B) mostram a curva da condutividade antes e depois do filtro. A Figura 13(C) apresenta a influência do filtro nas bordas do pulso devido à eliminação das altas frequências. Por esse motivo, considerou-se as leituras entre $100\text{-}400\mu\text{s}$ adequadas aos nossos resultados, este intervalo é mostrado nas Figuras 13 (A) e (B) pela seta.

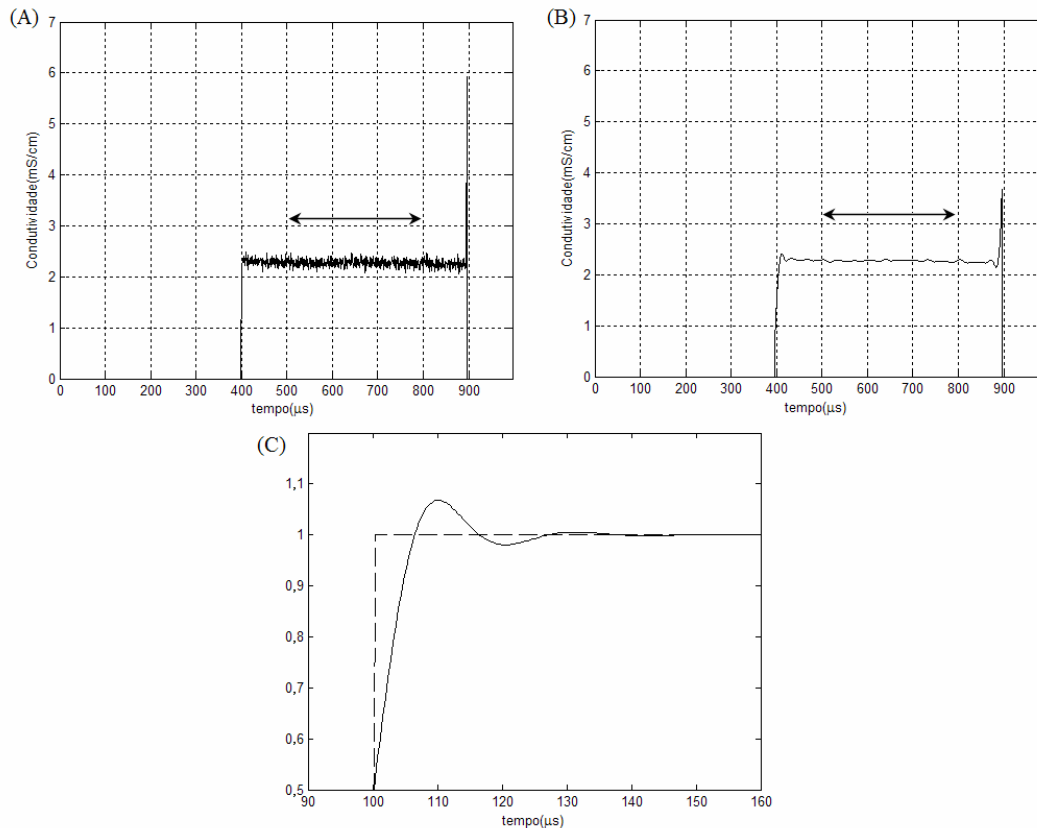


Figura 13 – Leitura da condutividade de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr) com pulso de 400V/cm e 500 μ s de duração. (A) Antes e (B) após o filtro

Butterworth de 4ª ordem com $f_c=100$ kHz. A seta indica o intervalo aceitável da leitura da condutividade da suspensão. (C) Resultado da aplicação do filtro Butterworth (linha contínua) em um pulso unitário (linha pontilhada), foi observado que o *overshoot* causado pelo filtro não apresenta efeito após 50 μ s após o início do pulso.

3.5.2 Erro de Medição Analítico

A Figura 14 apresenta o resultado da medição da condutividade da solução, não contendo células, de $\sigma_0=2,3$ mS/cm. Avaliou-se a incerteza teórica da medição do sistema que utiliza ponteira de corrente (Tektronix A622, Beaverton, Oregon, EUA), ponteira de tensão (Tektronix P5102, Beaverton, Oregon, EUA) e osciloscópio (Tektronix THS720A, Beaverton, Oregon, EUA). Para todos os experimentos a sensibilidade da ponteira de corrente foi ampliada adicionando cinco voltas em torno do

sensor, a resolução obtida foi de $\text{Erro}(I) = \pm 10\text{mA}$ [102]. O erro máximo de leitura da tensão no osciloscópio foi de $\text{Erro}(U_o) = \pm 0,2\text{V}$ [103], considerando que a leitura para os tempos de 100 e 400 μs foram efetuadas em 2V/divisão. $L = 0,230 \pm 0,001\text{cm}$, $A = 0,240 \pm 0,002\text{cm}^2$ (paquímetro Mitutoyo, 150mm, Tóquio, Japão)⁹. Então, o cálculo do erro analítico da leitura da condutividade é de:

$$E_a(\sigma) = \pm \frac{L}{A} \cdot \frac{I}{U_o} \cdot \sqrt{\left(\frac{\text{Erro}(L)}{L}\right)^2 + \left(\frac{\text{Erro}(A)}{A}\right)^2 + \left(\frac{\text{Erro}(I)}{I}\right)^2 + \left(\frac{\text{Erro}(U_o)}{U_o}\right)^2} \quad (24)$$

onde, U_o é a leitura da tensão no osciloscópio e 'I' a leitura de corrente da ponteira.

Desta forma, este sistema de medição tem como maior erro é de $E_a(\sigma)/\sigma_o = \pm 0,07$ em 400V/cm (Figura 14).

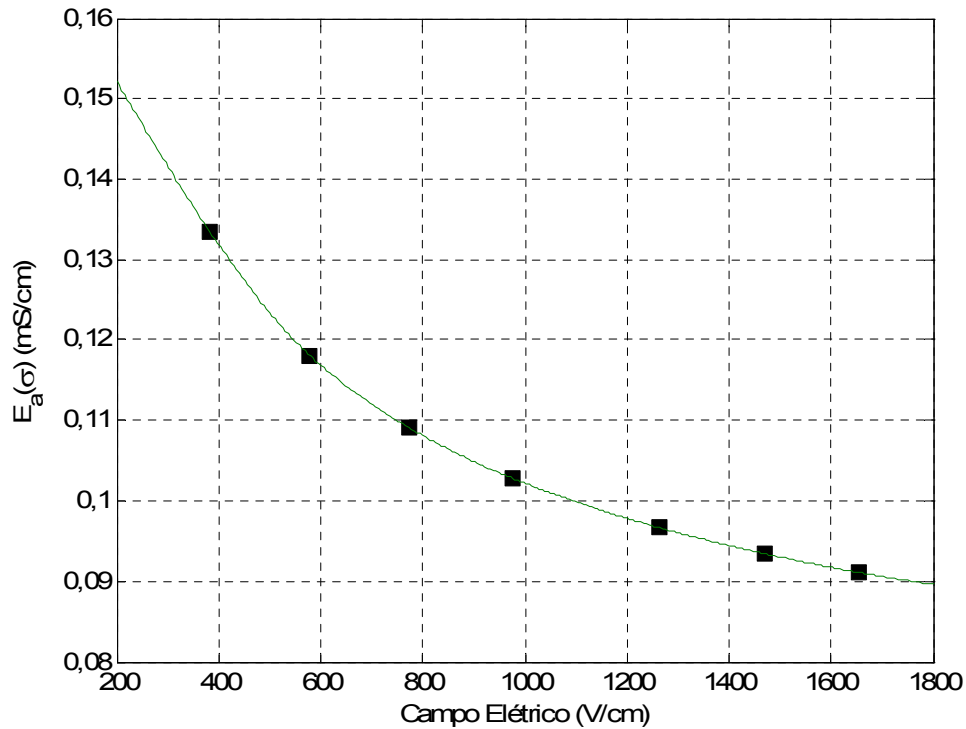


Figura 14 - Erro analítico da leitura da condutividade padrão ($\sigma_o = 2,3\text{mS/cm}$), calculado através da Equação (24).

⁹ No cálculo da incerteza expandida utilizamos níveis de confiança de 95,45%, $N=10$ [104]. Estes valores refletem a ação combinada das fontes de incertezas de repetitividade e resolução limitada sobre o resultado da medição, com uma probabilidade de enquadramento de 95,45%.

Pavlin *et al.* [48] propõe que a alteração da condutividade da suspensão ocorre em torno de 800V/cm, este é o campo elétrico crítico da medição da condutividade da suspensão de células, pois apresenta o início da eletroporação que o equipamento deve medir. Para este campo elétrico, o erro dado pela Figura 14 é de $E_a(\sigma)/\sigma_0$ para 800V/cm é de $\pm 0,05$.

3.5.3 Erro de Medição Experimental

Um aumento da condutividade relativa na medição de referência foi observado na Figura 15. Pavlin *et al.* (2005, 2007) [48, 105] consideraram que este efeito poderia ser devido à impedância de contato eletrodo-eletrólise (e depende da polarização, eletrólise, capacitância da dupla camada, entre outros [94]). Efetuou-se a correção utilizando este como um erro sistemático.

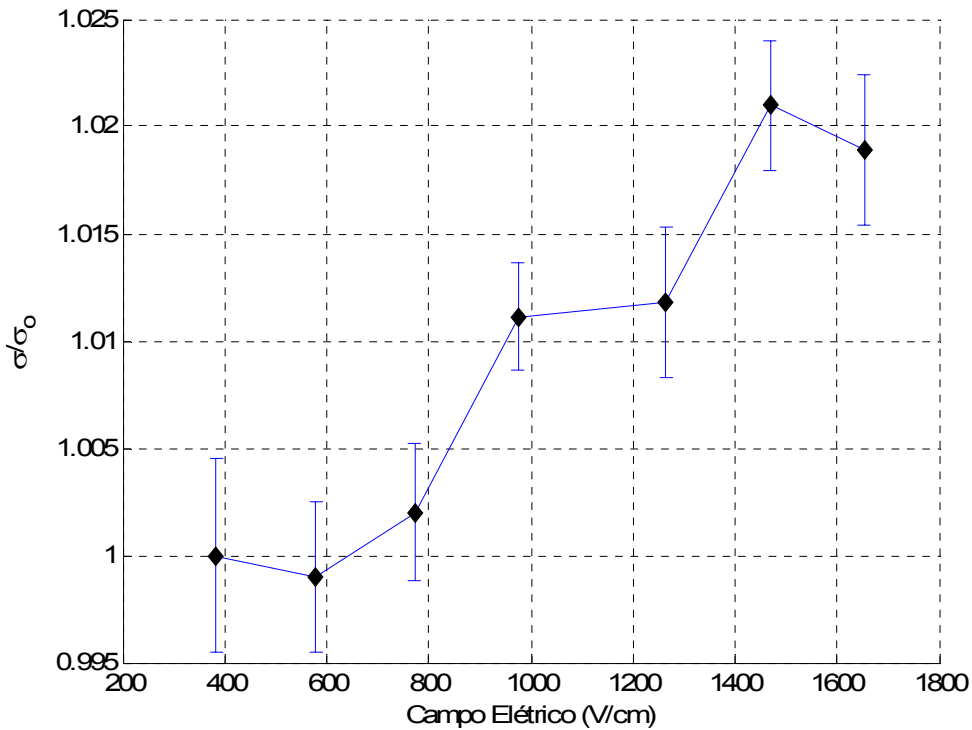


Figura 15 – Condutividade relativa da solução de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de Kbr), $\sigma_0=2,3\text{mS/cm}$. A medição foi realizada com pulsos de 500 μs com intensidade entre 400V/cm a 1,65kV/cm (N=3).

3.5.4 Efeito Joule

A passagem de corrente pela amostra causa aquecimento por efeito Joule. Para um pulso de E_o com duração t_{pulso} , considerando a conversão total de energia elétrica em calor, a mudança da temperatura na amostra ΔT é de [106]:

$$\Delta T = \frac{E_o^2 \cdot \sigma_o}{C_p \cdot \rho} t_{\text{pulso}} \quad (25)$$

onde C_p é o calor específico ($4,18 \text{ J(g}^\circ\text{C)}^{-1}$), ρ é a densidade da amostra (1g/cm^3). Com $E_o=1650\text{V/cm}$ e duração de $500\mu\text{s}$, o aumento da temperatura da amostra será de $0,75^\circ\text{C}$. A temperatura altera a fluidez da membrana plasmática. De acordo com Heimburg (2000) [106] em torno de 25°C a membrana apresenta a cauda lipídica rígida e bem ordenada, acima de 35°C existem caudas lipídicas ordenadas e desordenadas (fase transitória), e acima de 42°C a cauda é desordenada e líquida. Portanto, a elevação da temperatura demonstrada não apresentará alteração na membrana das células, o aquecimento nestes experimentos pode ser desprezado.

3.6 Marcador Fluorescente

Neste experimento foi utilizado um marcador fluorescente (fluorocromo) para estudar a abertura de poros nas células. Mediu-se a alteração da condutividade da suspensão durante o pulso de eletroporação, que permitiu a entrada dos marcadores fluorescentes na célula.

O sangue do rato foi centrifugado a 3000 rpm durante 4 minutos e utilizado no dia da coleta. O plasma foi retirado, e as hemácias foram re-suspensas em solução isotônica e centrifugadas novamente. A solução para o experimento foi de NaCl 8,71 mM, Sacarose 100,5m M, NaOH 9,38 mM, pH 7,4 (67% de solução isotônica [97]). As hemácias foram eletroporadas na presença de 1mg/ml de FITC-dextran 250S (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), com duas concentrações celulares $p=0,07$ e $0,35$. Em metade da suspensão de células com o marcador fluorescente foi aplicado pulso de 1650V/cm durante $500\mu\text{s}$, em cubeta de 2mm de espessura. A outra metade não foi eletroporada e utilizada como controle. Após a eletroporação as duas amostras foram

centrifugadas e re-suspendidas em solução isotônica por duas vezes. Visualizou-se as amostras com microscópio eletrônico Olympus Bx41 com uma câmera digital QColor 3 (Olympus América, Inc., Melville, NY). A lente de 10x foi utilizada para identificar o número de pontos fluorescentes com o programa ImageJ 1.39u (plataforma de domínio público, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, acessado em 26 de Agosto de 2008). Considerou-se pontos válidos com área entre 35 a 200 (μm)², e fator de esfericidade entre 0,50 e 1,00 ($4\pi \text{ área/perímetro}^2$). O valor 1,00 representa um círculo perfeito e este valor diminui com o aumento da irregularidade da forma.

Nas medições da condutividade da solução e das suspensões de células foram utilizadas um osciloscópio (Tektronix A622, Beaverton, Oregon, EUA), com ponteira de corrente (Tektronix A622, Beaverton, Oregon, EUA) e ponteira de tensão (Tektronix P5102, Beaverton, Oregon, EUA). Calibrou-se o sistema com uma solução padrão de 2,3mS/cm (condutivímetro Metrohm mod. 712, Metrohm, Herisau, Suíça) a 25°C.

3.7 Análise Teórica

Os resultados experimentais, da alteração da condutividade da suspensão com o campo elétrico aplicado, foram comparados com dois modelos de eletroporação: cossenoidal [38, 83, 84] e assintótico [67, 73]. Com os parâmetros dos modelos matemáticos obtidos através dos resultados experimentais, foi possível estimar os efeitos da eletroporação na membrana da célula.

O modelo cossenoidal apresenta análise em tempos específicos, e não considera o estado anterior da membrana. Este modelo não apresenta a evolução de V_m e dos poros até o momento da análise. Entretanto, o modelo assintótico apresenta uma proposta de evolução do número de poros em função da distribuição de V_m . Nas duas análises foram comparados os resultados teóricos e experimentais com fração volumétrica de $p=0,07$. A influência das células vizinhas na distribuição de V_m foi considerada desprezível, pois a redução de V_m no pólo da célula é cerca de 3% [12].

3.7.1 Modelo Cossenoidal da Eletroporação

Estudou-se a variação da condutância da membrana com modelo cossenoidal (Equação (20)) [38]. Os valores de condutividade de suspensões diluídas são dados pelas Equações (23) e (24). Os dados para a análise numérica estão disponíveis na Tabela 3.

A condutância da membrana foi verificada nos tempo 100 μ s e 400 μ s, e considerou-se o aumento da condutividade da suspensão devido a eletroporação. Utilizou-se pequena concentração de células, a eletroforese e a condução na dupla camada foram consideradas desprezíveis.

Tabela 3 - Dimensões e características elétricas para a análise numérica da aplicação de campos elétricos em suspensão diluídas de células.

Parâmetro	Valor
Raio da célula (a)	3,2 μ m
Condutividade externa (σ_o)	2,3mS/cm
Condutividade interna (σ_i)	6,2mS/cm*
Fração volumétrica (p)	0,07
Espessura da membrana (h)	7nm

*[97].

3.7.2 Modelo Assintótico da Eletroporação

O campo elétrico E_o foi aplicado em $t=0$. A equação de Laplace em coordenadas esféricas é escrita na forma:

$$\frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial r} \right) + \frac{1}{\sin \theta} \cdot \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \cdot \frac{\partial^2 \varphi}{\partial \phi^2} = 0 \quad (26)$$

Com assimetria azimutal, a solução geral para o potencial é dada por:

$$\varphi(r, \theta) = [A_1 \cdot r^n + A_2 \cdot r^{-(n+1)}] P_n(\cos \theta) \quad (27)$$

P_n são os polinômios de Legendre, A_1 e A_2 são constantes arbitrárias.

Resolvendo a equação de Laplace para $a \gg h$ e com as seguintes condições de contorno:

$$\sigma_o \cdot \frac{\partial \varphi_o}{\partial r}(a) + \epsilon_w \cdot \frac{\partial}{\partial t} \frac{\partial \varphi_o}{\partial r}(a) = \sigma_i \cdot \frac{\partial \varphi_i}{\partial r}(a) + \epsilon_w \cdot \frac{\partial}{\partial t} \frac{\partial \varphi_i}{\partial r}(a) = G_m \cdot V_m + C_m \cdot \frac{\partial V_m}{\partial t} \quad (28)$$

$$\begin{aligned} \varphi_i(r=0) &\rightarrow \text{finito} \\ \varphi_o(r \rightarrow \infty) &= -r \cdot E_o \cos \theta \end{aligned}$$

onde φ_o e φ_i são o potencial elétrico dentro e fora da célula, respectivamente. A coordenada radial 'r' é medida a partir do centro geométrico da célula e o gradiente é avaliado na membrana celular, $r=a$. O potencial transmembrana no domínio do tempo é $V_m = \varphi_o(a) - \varphi_i(a)$, pode ser obtido como solução da seguinte equação diferencial de primeira ordem:

$$\frac{dV_m}{dt} + k_1 \cdot V_m = -k_2 \cdot E_o \quad (29)$$

onde:

$$k_1 = \frac{G_m + \frac{C_m}{\tau_o}}{C_m + C_w} \quad (30)$$

$$k_2 = \frac{1,5 \cdot a \cdot \cos \theta}{\left(\tau_o + \frac{\epsilon_w}{\sigma_i} \right)} \quad (31)$$

$$C_w = \frac{\epsilon_w}{a \cdot \left(1 + \frac{\sigma_i}{2 \cdot \sigma_o} \right)} \quad (32)$$

(33)

$$\tau_o = a.C_m \left(\frac{1}{\sigma_i} + \frac{1}{2.\sigma_o} \right)$$

Neste estudo foi implementado o modelo de Krassowska *et al.* (1999) [69, 73] (Equações (19)-(21)). Os resultados simulados foram comparados com os experimentos para propormos os valores de α e 'q', alteramos o valor de V_p para 200mV [3, 4].

Na Tabela 4, $R=8,3145J.K^{-1}.mol^{-1}$ é a constante universal dos gases e $F_a=9,6485.10^4C.mol^{-1}$ a constante de Faraday. A Figura 16 apresenta o fluxograma do programa utilizado para a solução das Equações (31) a (35) e as Equações (19) a (21), do modelo da eletroporação. Estas equações foram resolvidas pelo método das diferenças finitas com 10^7 iterações e passo de tempo de $\tau_o/10^6$. Analisou-se o comportamento da condutância da membrana durante a aplicação de campos elétricos de 400 a 1600 V/cm. A dinâmica dos poros foi estudada através da aplicação de um campo elétrico de 1300V/cm durante 0,65 μ s, em seguida o fechamento dos poros quando o campo é desligado.

Tabela 4 - Parâmetros do modelo e características elétricas para simulação do modelo assintótico da eletroporação em suspensões diluídas de células.

Parâmetro	Valor
Espessura da membrana (h)	5nm
$V_t=RT/F_a$, T=300K	26mV
Barreira de energia dentro do poro (w_o) ^a	70mV
Comprimento relativo da entrada do poro (ζ) ^a	0,15
Raio do poro (r_p) ^a	0,76nm
Número de poros por unidade de área para $V_m=0$ (N_o) ^a	10^5
Capacitância da membrana (C_m) ^b	0,8 μ F/cm ²

^a[69]. ^b[108].

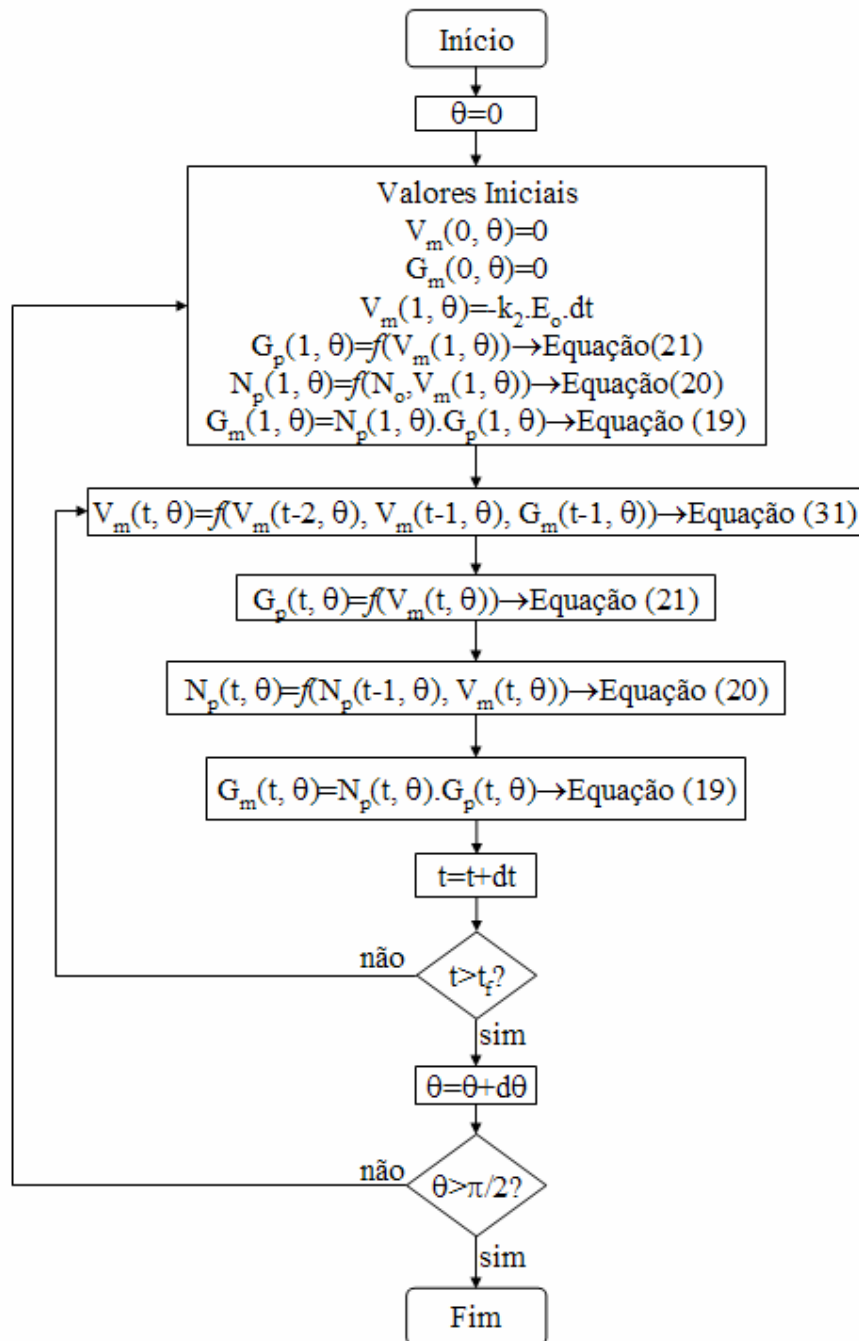


Figura 16 - Fluxograma ilustrativo do algoritmo desenvolvido para o cálculo numérico do potencial transmembrana com o modelo assintótico da eletroporação.

4. RESULTADOS

As leituras da alteração da condutividade da suspensão células, durante a eletroporação, empregando o método desenvolvido nesta tese são apresentadas para duas frações volumétricas de $p=0,07$ e $p=0,35$. Além disso, estes resultados mostram as variações da leitura da condutividade da suspensão para diferentes campos elétricos aplicados. Os resultados experimentais foram comparados com modelo teórico de Maxwell e com dado experimental da literatura.

Os resultados da entrada de marcadores fluorescentes na aplicação de campos elétricos foram apresentados para evidenciar que a abertura de poros na membrana provoca a alteração na leitura da condutividade da suspensão.

Através dos resultados experimentais, foram propostas alterações em dois modelos matemáticos da eletroporação. Os efeitos da abertura dos poros na condutância da membrana foram analisados comparando as diferenças entre os modelos. Verificou-se a dinâmica de abertura e fechamento dos poros, a distribuição do potencial transmembrana, o potencial crítico detectado pelo equipamento, ângulo máximo de condutância da membrana eletroporada, variação da condutância máxima da membrana, assimetria da eletroporação, efeito da condutividade do meio, do citoplasma e do tamanho da célula na eletroporação.

4.1 Leitura da Condutividade da Suspensão de Células

Os resultados da leitura da alteração da condutividade foram apresentados durante o pulso de eletroporação, para frações volumétricas de $p=0,07$ e $p=0,35$. Pulsos de diferentes amplitudes foram aplicados durante $500\mu s$. A variação de temperatura foi desprezível e o erro de $\Delta\sigma/\sigma_0=\pm 0,05$ (para $800V/cm$, Figura 14). Medições de referência foram realizadas para corrigir os valores de condutividade da suspensão.

A Figura 17 apresenta uma comparação na leitura da condutividade da suspensão quando ocorre a eletroporação ($1650V/cm$) e sem a abertura dos poros ($600V/cm$). As leituras de condutividade da solução foram consideradas satisfatórias $100\mu s$ após o início do pulso até $100\mu s$ antes do final do pulso. Assim, evita-se possíveis

erros de leitura devido aos *overshoots* no início e final dos pulsos provocados pelo filtro passa-baixa (Figura 13).

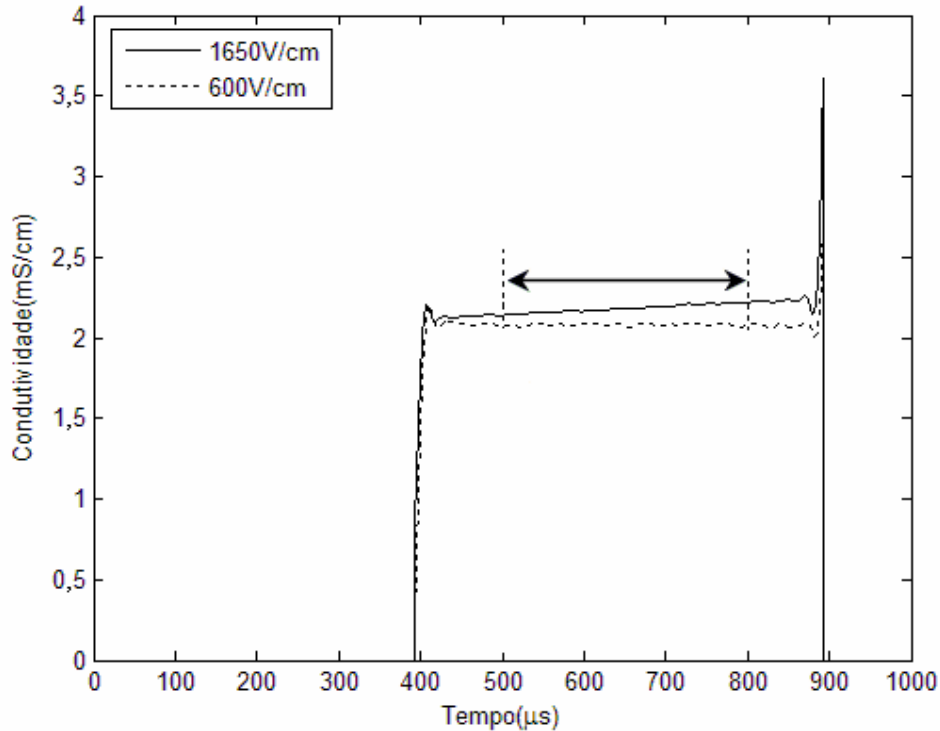


Figura 17 – Leitura da conduktividade da suspensão de células de fração volumétrica $p=0,07$. No pulso de 600V/cm não houve a eletroporação (linha pontilhada). No entanto, para 1650V/cm, existe um aumento da conduktividade da suspensão causada pela abertura de poros na membrana plasmática (linha contínua). A seta indica o intervalo de tempo considerado satisfatório para evitar erros decorrentes do filtro.

As Figuras 18 e 19 mostram as curvas de leitura da conduktividade da suspensão de células durante o pulso de eletroporação para duas frações volumétricas, fração volumétrica de $p=0,07$ e $p=0,35$, respectivamente. Pode-se verificar que para menores campos elétricos existe uma maior flutuação de valores das curvas, isso ocorre por causa dos ruídos inerentes ao sistema de medição (ponteira de corrente) e conversão analógico-digital.

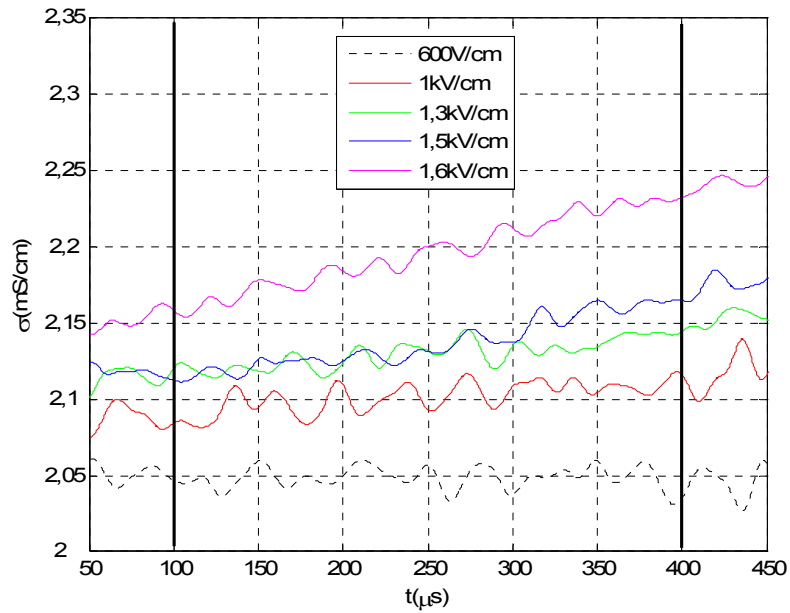


Figura 18 – Leitura de condutividade da suspensão de células durante o pulso de eletroporação para frações volumétricas de $p=0,07$. As linhas verticais largas apresentam os limites aceitáveis da leitura da condutividade da suspensão.

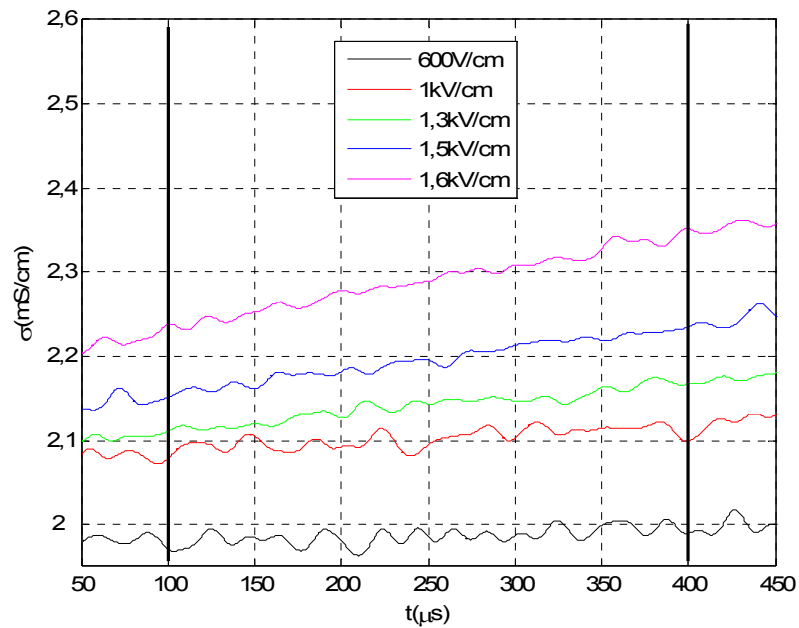


Figura 19 - Leitura de condutividade da suspensão de células durante o pulso de eletroporação para frações volumétricas de $p=0,35$. As linhas verticais largas apresentam os limites aceitáveis da leitura da condutividade da suspensão.

A dependência da condutividade da suspensão em função da fração volumétrica da suspensão de células foi avaliada. A Figura 20 mostra o modelo de Maxwell (linha contínua), os resultados experimentais deste trabalho (asteriscos) e o resultado obtido por Pavlin *et al.* (2005) [48] (triângulo).

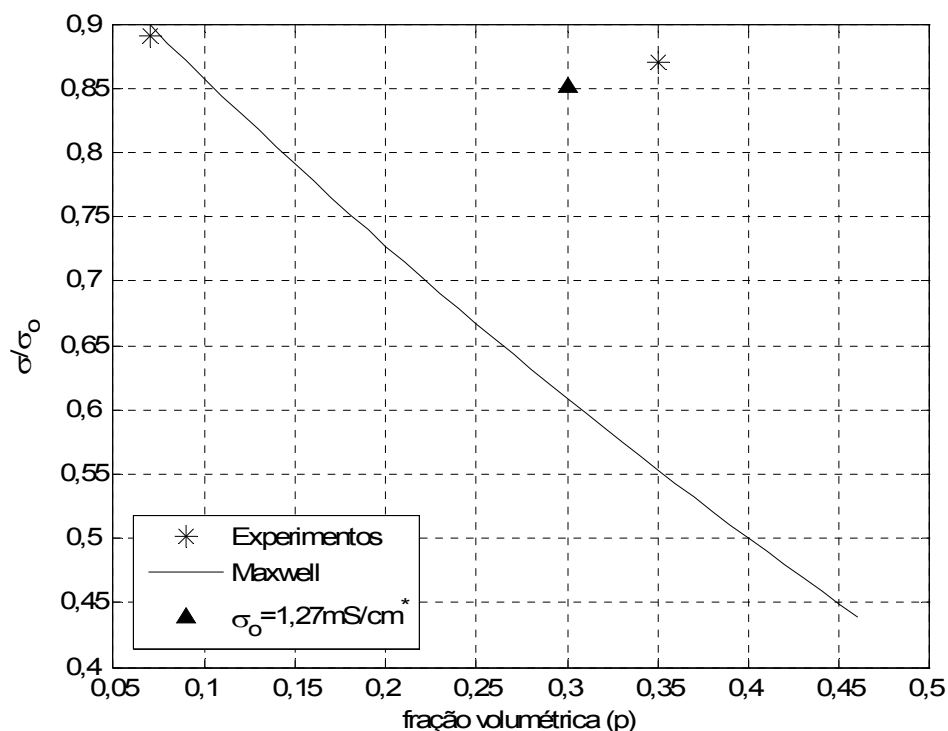


Figura 20 – Comparação entre resultados experimentais e teóricos da leitura de suspensão de células onde σ_0 é a condutividade do meio externo. A linha contínua representa o modelo de Maxwell (Equação (21)), os asteriscos são os resultados experimentais deste trabalho, o triângulo é o resultado apresentado por Pavlin *et al.* (2005) [48].

4.2 Marcador Fluorescente

A inserção de macromoléculas na célula e a leitura da condutividade foi proposta como forma de caracterizar que a abertura de poros na membrana causa o aumento da condutividade. Utilizou-se o FITC-Dextran 250S (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) que possui peso molecular médio de 50k. A Figura 21(A) apresenta as

hemácias em solução hipotônica com lente de 10x. A Figura 21(B) mostra as hemácias em um meio contendo os marcadores fluorescentes, verificou-se que os marcadores não entram na célula (as células aparecem como sombras). No experimento, utilizou-se metade da suspensão contendo marcadores fluorescentes como controle (Figura 21(C) e (E)), aplicou-se um campo elétrico de 1650V/cm durante 500 μ s em metade da solução (Figura 21(D) e (F)). Após a aplicação do campo elétrico, as suspensões foram centrifugadas, lavadas e visualizadas no microscópio.

Na suspensão com fração volumétrica $p=0,07$, a amostra controle, Figura 21(C), apresentou 12 partículas fluorescentes, a amostra eletroporada possui 150 partículas (Figura 21(D)). As partículas fluorescentes na amostra controle demonstram que nem toda a fluorescência pode ser retirada da suspensão. Entretanto, para $p=0,35$ a diferença entre controle e amostra eletroporada não foi significativo (27 e 26 partículas, respectivamente). As curvas de condutividade das suspensões correspondentes a estas frações volumétricas são mostradas na Figura 22. Com $p=0,07$, o potencial transmembrana induzido sobre a célula foi de 771mV, para que o marcador fluorescente pudesse entrar na célula. Em $p=0,35$, utilizando a Equação (6), $V_m=687$ mV. Esta diferença de 84mV entre $V_m(p=0,07)$ e $V_m(p=0,35)$ causou a entrada de marcadores fluorescentes em $p=0,07$, e confirma o efeito do aumento da proximidade das célula na diminuição da polarização da membrana [12, 35, 37], Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação de V_m e número de partículas fluorescentes para diferentes frações volumétricas.

p	Número de Partículas Fluorescentes na Suspensão Eletroporada	Número de Partículas Fluorescentes na Suspensão Controle	V_m (mV)
0,07	150	12	771
0,35	26	27	687

*Calculado com Equação (6).

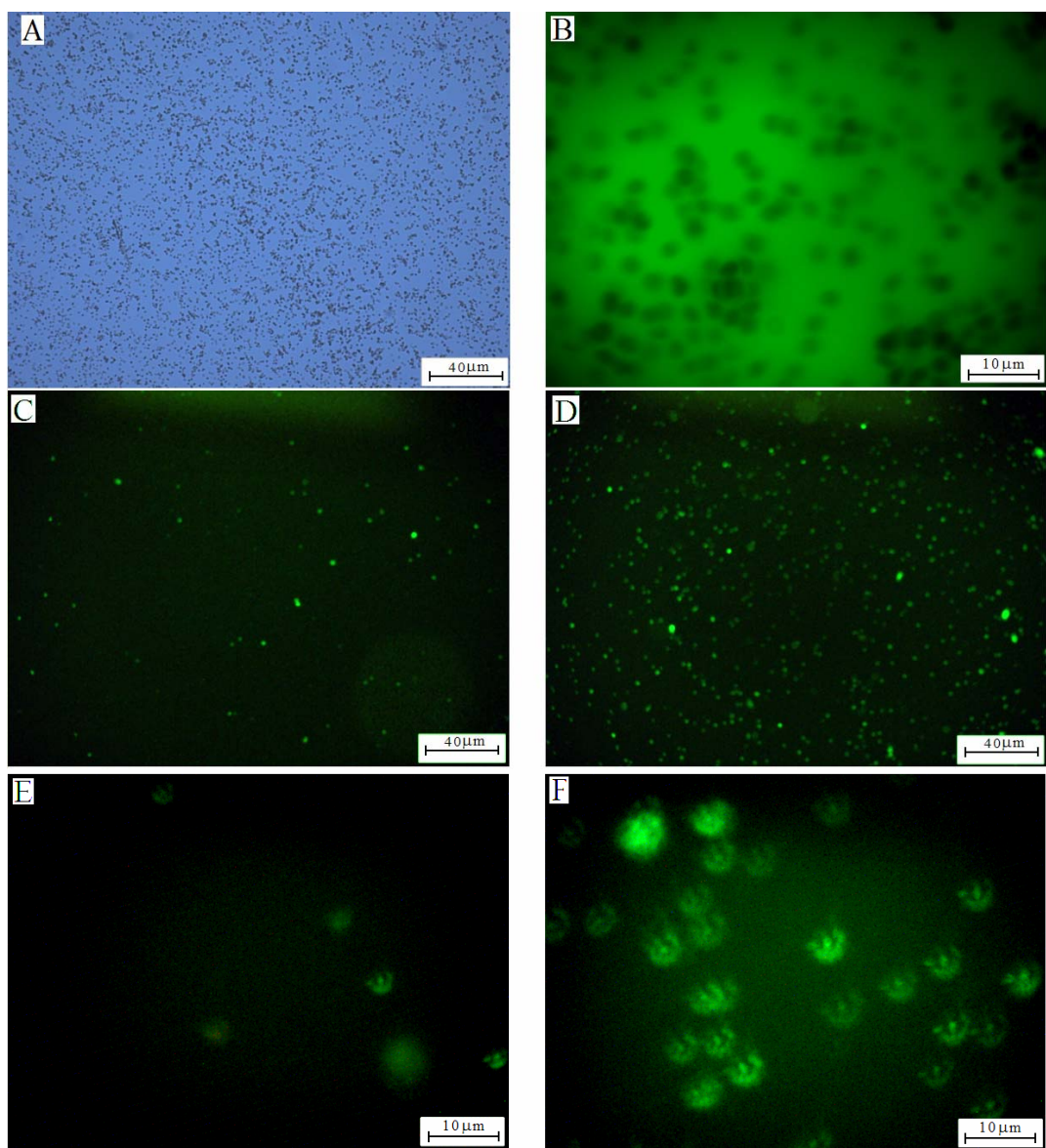


Figura 21 – Imagens das hemácias de rato: A) em solução hipotônica com lente de 10x; B) em meio contendo FITC-Dextran 250S (peso molecular médio de 50k), os marcadores não entram passivamente na célula, lente de 40x; C) controle com $p=0,07$, lente de 10x; D) eletroporação de $p=0,07$ com $1650V/cm$ e $500\mu s$; E) controle, mesmo experimento com lente de 40x; F) eletroporação com lente de 40x.

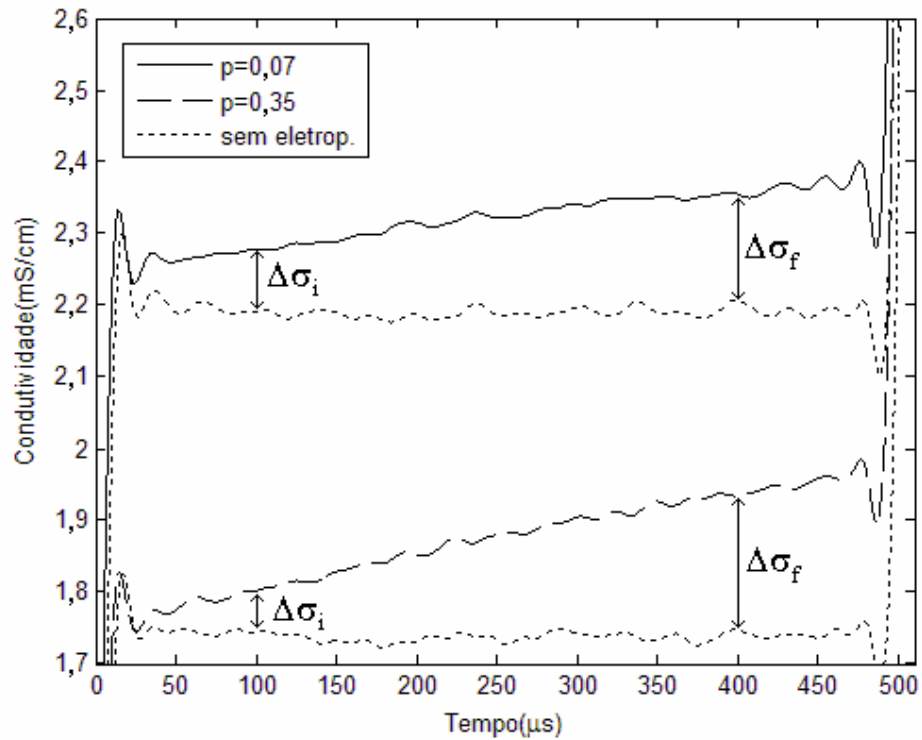


Figura 22 – Leitura da condutividade da suspensão durante a aplicação de pulso com duração de $500\mu\text{s}$. A linha pontilhada é a leitura com pulso de 600V/cm (aplicado antes do pulso de eletroporação), e a linha contínua ($p=0,07$) e tracejada ($p=0,35$) com pulso de 1650V/cm . Com $p=0,07$ houve a entrada de marcadores fluorescentes na célula, como demonstrado nas Figuras 18(C), (D) e Tabela 5. Verificou-se que a variação da condutividade inicial ($\Delta\sigma_i$) entre as duas curvas sugere abertura de poros maiores para $p=0,07$. A variação da condutividade final ($\Delta\sigma_f$) para maiores concentrações celulares pode ser atribuída à formação de poros e a outros fatores (e.g., eletroforese).

4.3 Modelo Cossenoidal da Eletroporação

Nesta análise teórica, a eletroforese e a condução na dupla camada foram consideradas desprezíveis. E que o aumento da condutividade da suspensão, para $p=0,07$, ocorre devido à abertura de poros na membrana.

Para estimar quantitativamente a condutância da membrana da célula, utilizou-se a leitura da alteração da condutividade da solução durante o pulso de eletroporação. A

fim de compatibilizar os resultados teóricos e experimentais, foi proposto que a condutância G_{mo} depende do potencial máximo de membrana V_{mo} (Equação (6), $F=1$, $\theta=0^\circ$, em regime) na célula intacta segundo a relação:

$$G_{mo} = A_h V_{mo}^2 - B_h \text{ para } 0,467V < V_{mo} \leq 0,770V \quad (34)$$

$$G_{mo} = 0 \text{ para } V_{mo} \leq 0,467V$$

Os limites de V_{mo} do modelo acima dizem respeito aos valores experimentais obtidos através da Equação (6). Na Figura 20 a linha contínua representa o melhor ajuste do modelo teórico para $\theta_c=50^\circ$, obtido para $t=100\mu s$ $A_h=5,5A.V^{-3}.cm^{-2}$ e $B_h=1S/cm^2$. Para $t=400\mu s$ $A_h=18,32A.V^{-3}.cm^{-2}$ e $B_h=4S/cm^2$. O erro máximo variando $45^\circ \leq \theta_c \leq 70^\circ$ para $t=100\mu s$ é de 3%, e para $t=400\mu s$ é menor que 1%.

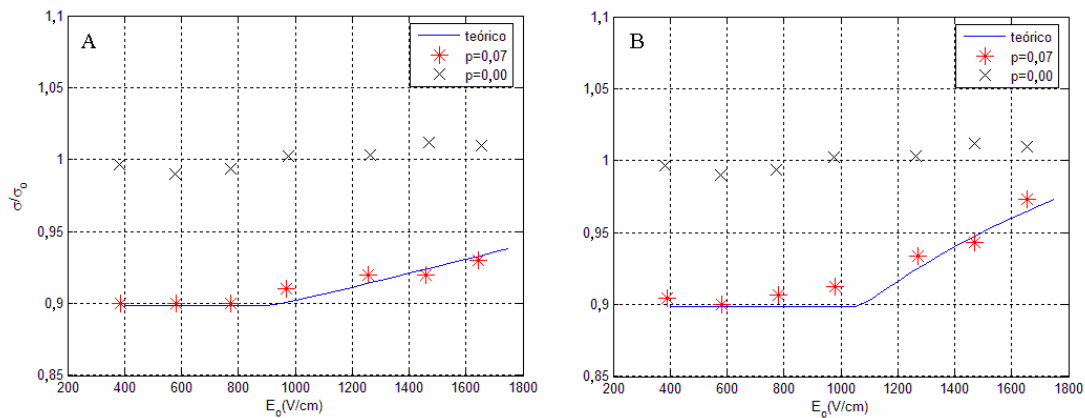


Figura 23 – Condutividade normalizada da suspensão em função do campo elétrico aplicado, para A) $100\mu s$ e B) $400\mu s$. A linha contínua (-) apresenta a simulação teórica, o erro máximo é de 3% com o experimento; (*) são os pontos obtidos pelo experimento com fração volumétrica de 0,07; (x) mostra os resultado da aplicação dos pulsos em solução não contendo células (medição de referência).

A Figura 24 mostra a dependência da condutividade prevista pelo modelo com ângulo crítico θ_c e condutância máxima G_{mo} .

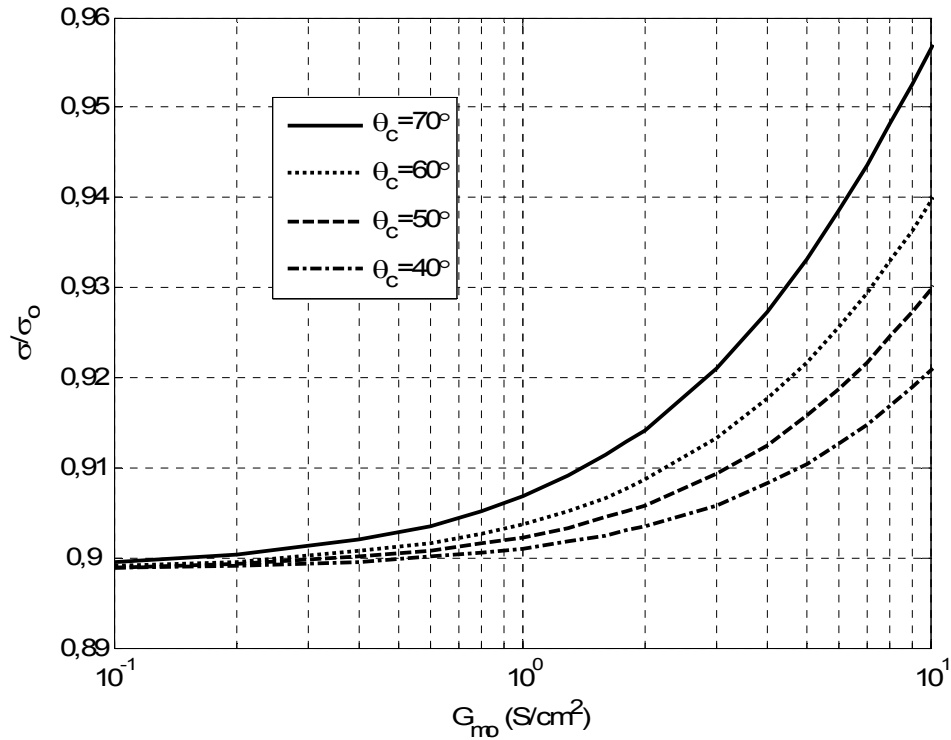


Figura 24 – Condutividade relativa da suspensão (σ/σ_0) em função da condutância (máxima) da membrana no pólo da célula (G_{mo}), para valores de θ_c entre 40° a 70° .

4.4 Modelo Assintótico da Eletroporação

A Figura 25 apresenta resultados comparativos da condutividade relativa da suspensão, teóricos (quadrados) e experimentais (asteriscos). Os resultados foram obtidos para suspensões com $0,07$, com $\sigma_0=2,3\text{mS/cm}$, $\sigma_i=6,2\text{mS/cm}$ [97] e $a=3,2\mu\text{m}$. Os seguintes parâmetros da Equação (18) foram modificados para obter o melhor ajuste do modelo assintótico aos dados experimentais:

Tabela 6 - Parâmetros alterados do modelo assintótico.

Parâmetros	Valor
Parâmetro de eletroporação (α)	$4 \cdot 10^{15} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
Tensão característica de eletroporação (V_p)	200mV
Constante de eletroporação (q)	3,48

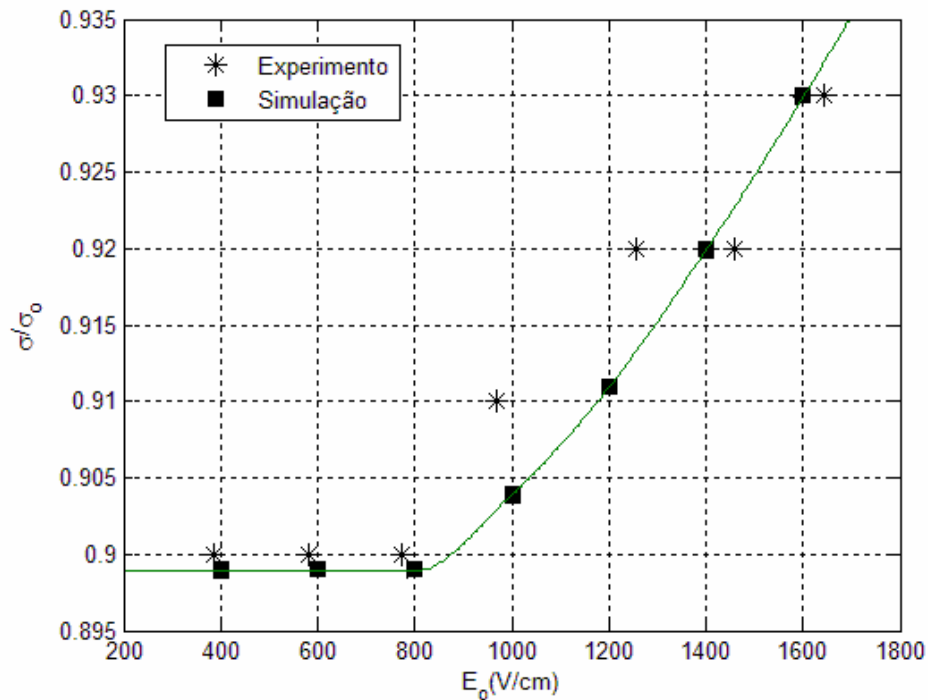


Figura 25 – Condutividade relativa da suspensão de células com $p=0,07$, medido em $100\mu s$. Os asteriscos são os valores experimentais obtidos, os quadrados são os pontos simulados com o modelo assintótico. Erro menor que 1%.

No modelo assintótico da eletroporação, o erro entre a curva teórica e experimental é menor que 1% (Figura 25).

As Figuras 26 e 27 apresentam as alterações na membrana plasmática com a aplicação de um pulso de $1kV/cm$. A Figura 26 apresenta (A) V_m e (B) G_m no tempo para o pólo da célula, $\theta=0rad$. As Figuras 27(A) e (B) mostram a alteração angular de V_m e G_m em regime, respectivamente.

A variação da condutância máxima (G_{m0}) e do ângulo limite da abertura de poros na membrana θ_c em função do campo elétrico aplicado é mostrado na Figura 28 (A) e (B), respectivamente. Valores de condutância máximos são apresentados, na Figura 28 (A), para o modelo assintótico (quadrados) e a Equação (34) (losangos). As linhas representam a equação $E_0=a.G_{m0}-b$. Em ambos os modelos $a=8,75.10^{-3}V^2.cm.A^{-1}$, para o modelo assintótico $b=7V/cm$ e para a Equação (34) $b=8,65V/cm$. Verificou-se o valor do potencial transmembrana em regime (Figura 29).

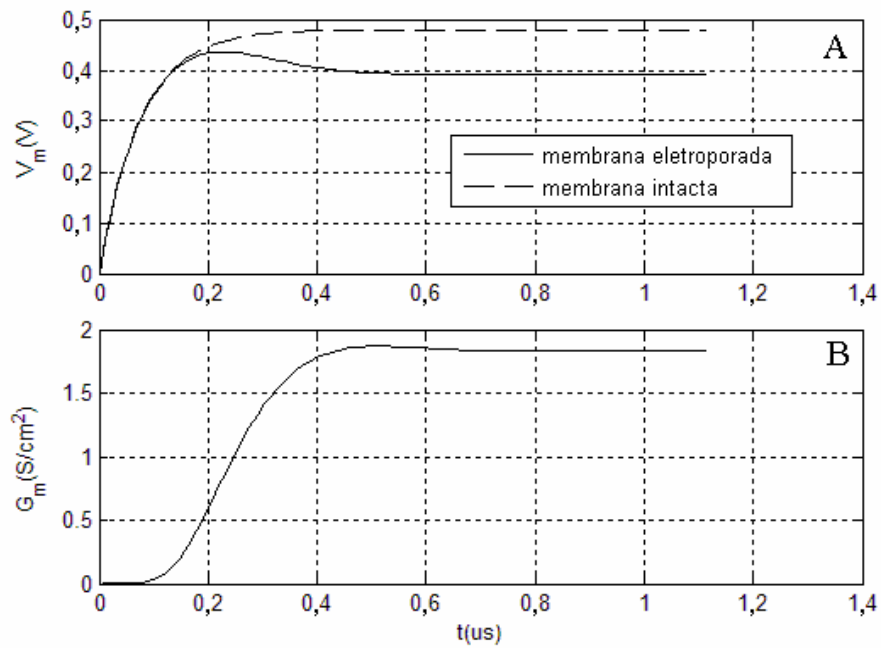


Figura 26 – Simulação de suspensão de célula isolada, campo aplicado de 1kV/cm. A) Potencial transmembrana com membrana intacta (linha tracejada) e membrana eletroporada (linha contínua), no pólo da célula; B) condutância da membrana em $\theta=0\text{rad}$.

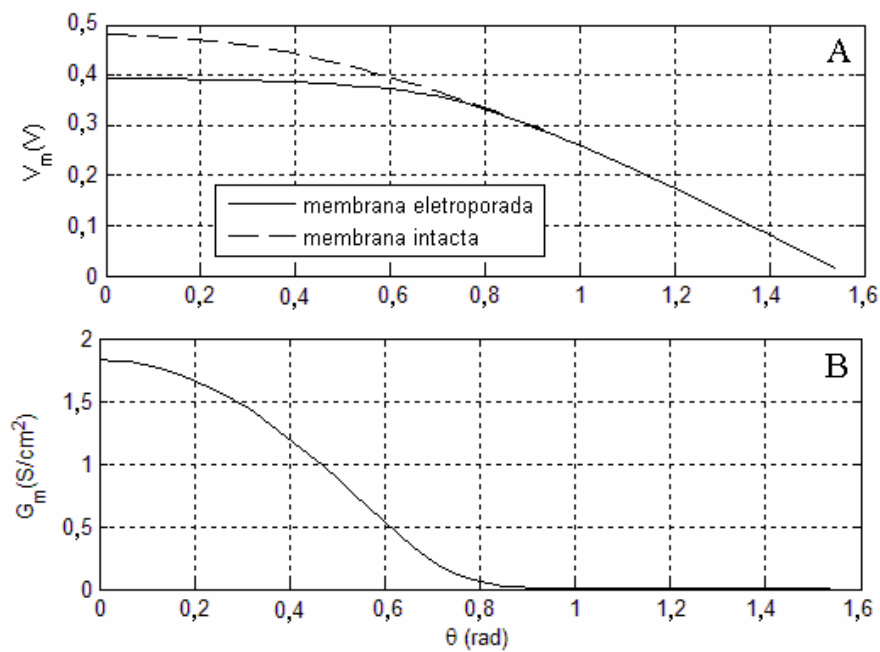


Figura 27 - Simulação de suspensão de célula isolada, campo aplicado de 1kV/cm em regime. Distribuição angular A) V_m e B) G_m .

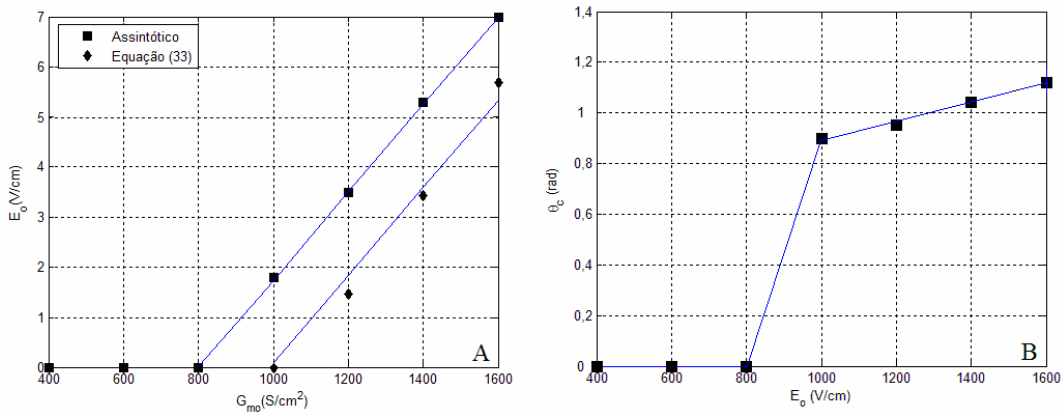


Figura 28 – Efeito da eletroporação na membrana da célula na aplicação de campo elétrico entre 400 a 1600V/cm, $\sigma_o=2,3\text{mS/cm}$, $\sigma_i=6,2\text{mS/cm}$, $h=5\text{nm}$, $a=3,2\mu\text{m}$, em regime. A) Condutância da membrana no pólo da célula ($\theta=0\text{rad}$), os quadrados são os pontos simulados com o modelo assintótico e os losangos os resultados da Equação (34). As linhas representam a equação $E_o=a.G_{mo}-b$. Em ambos os modelos $a=8,75.10^{-3} \text{ V}^2.\text{cm}.\text{A}^{-1}$. Entretanto $b=7\text{V/cm}$ para o modelo assintótico e $b=8,65\text{V/cm}$ para a Equação (34); e B) θ_c é o ângulo no qual a condutância da membrana é desprezível.

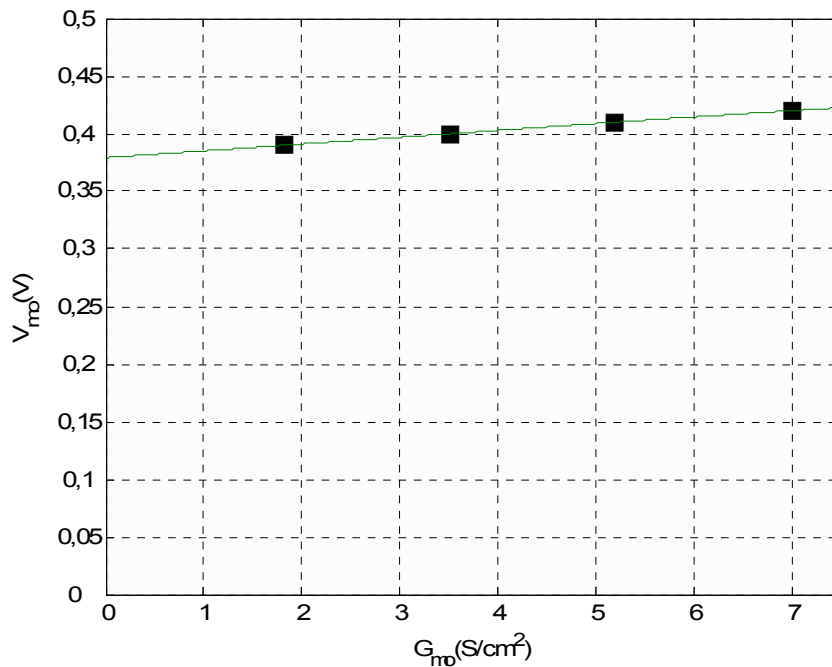


Figura 29 - Potencial transmembrana em $\theta=0\text{rad}$ em função da condutância máxima da membrana em regime.

Experimentos comprovam a assimetria da eletroporação [38, 46, 54, 58, 122-124]. Alguns atribuem esta assimetria ao potencial de repouso da célula (V_{rest}) [46, 120]. A fim de verificar a influência de V_{rest} , adicionou-se na simulação $V_{rest}=80mV$, o resultado desta simulação é apresentado na Figura 30.

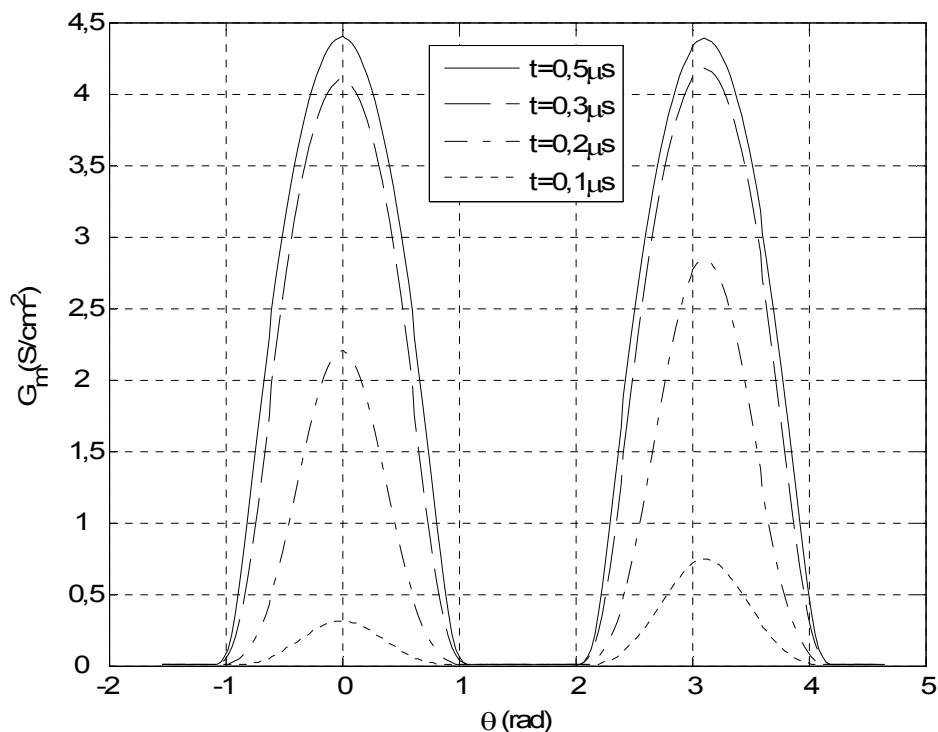


Figura 30 – Distribuição angular da condutância da membrana. O efeito do potencial de repouso (80mV) não afeta, significativamente, a assimetria da eletroporação.

O modelo assintótico descreve o comportamento de criação e destruição dos poros [69, 117]. Propicia a avaliação da dinâmica da condutância da membrana, na aplicação e retirada do pulso de eletroporação (Figura 31).

As influências da variação das condutividades (σ_i e σ_o) (Figuras 32 e 33) e da dimensão das células ('a') (Figura 34) na condutância máxima da membrana eletroporada (G_{m0}) foram estudadas. Foram aplicados pulsos de $1200V/cm$, com $a=3,2\mu m$, $\sigma_i=6,2mS/cm$, $h=5nm$ e $C_m=0,8\mu F/cm^2$.

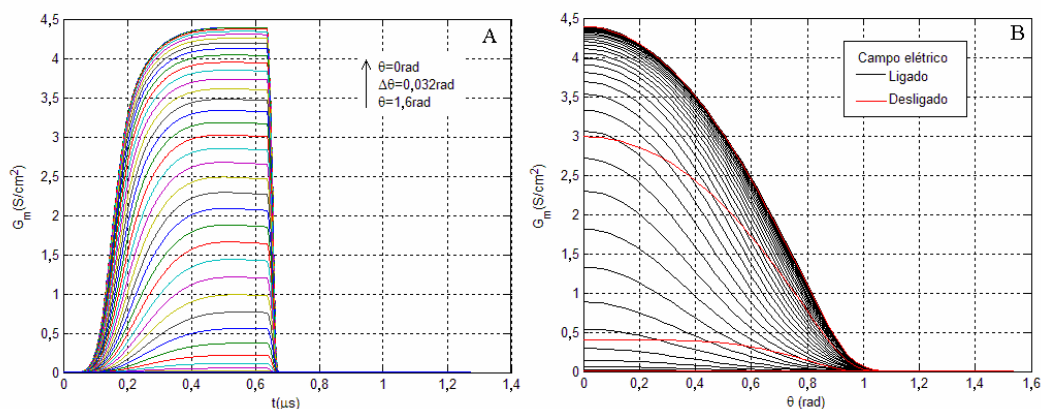


Figura 31 – Dinâmica de abertura e fechamento dos poros. Em $t=0s$, aplicou-se um pulso de 1300V/cm, após 0,65μs o campo elétrico é desligado. A) Condutância da membrana no tempo, para várias ângulos na membrana, $\Delta\theta=0,032\text{rad}$. B) Distribuição angular da condutância da membrana, para alguns instantes de tempo, $\Delta t=1,3\text{ns}$. As linhas pretas representam os instantes de aplicação do campo, e em vermelho o desligamento.

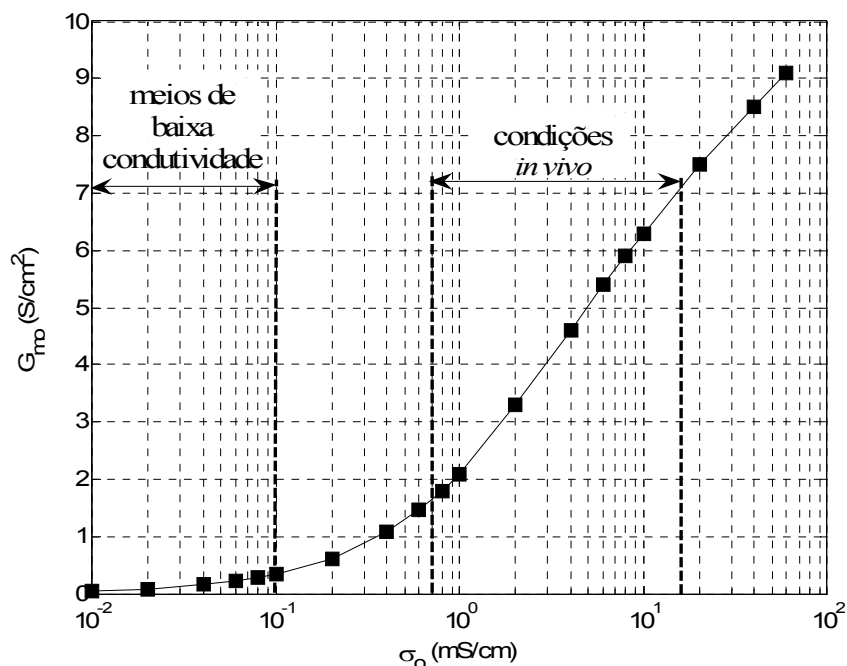


Figura 32 – Influência dos meios externos na condutância máxima da membrana eletroporada em regime (G_{mo}). O pulso aplicado foi de 1200V/cm. G_{mo} dependente da condutividade externa, as condições *in vivo* [19] indicadas pela seta incluem as soluções da Tabela 2. $a=3,2\mu\text{m}$, $\sigma_i=6,2\text{mS/cm}$, $h=5\text{nm}$ e $C_m=0,8\mu\text{F/cm}^2$.

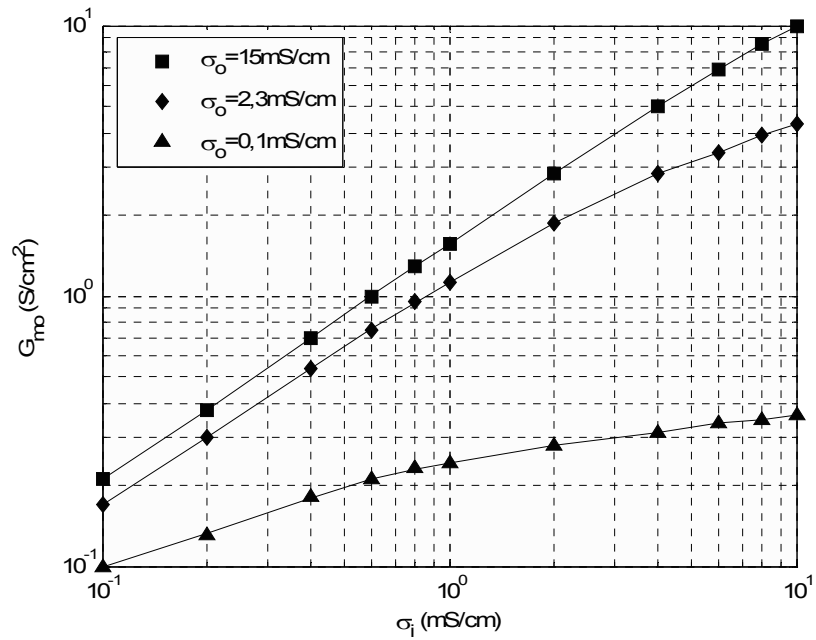


Figura 33 - Dependência da condutividade do citoplasma sobre a condutância máxima da membrana eletroporada ($a=3,2\mu m$, $h=5nm$ e $C_m=0,8\mu F/cm^2$).

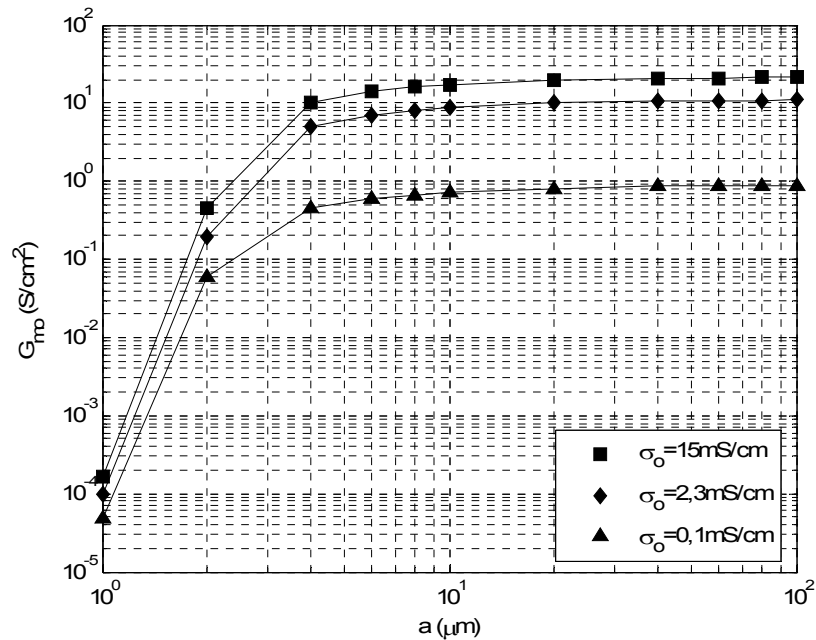


Figura 34 – Efeito da dimensão das células na condutância máxima da membrana eletroporada em regime. O pulso aplicado foi de $1200V/cm$, $\sigma_i=6,2mS/cm$, $\sigma_o=2,3mS/cm$, $h=5nm$ e $C_m=0,8\mu F/cm^2$.

Com os mesmos dados experimentais de σ/σ_0 , existe uma variação nos resultados da condutância máxima da membrana eletroporada entre os modelos cossenoidal e assintótico (Figura 35).

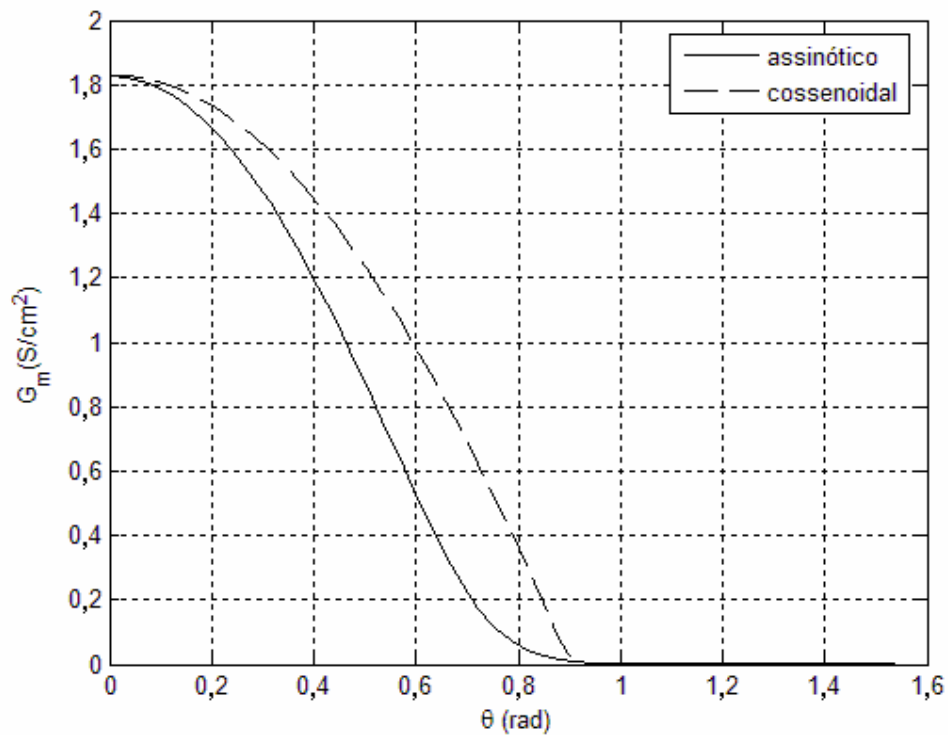


Figura 35 – Diferença de distribuição angular da condutância da membrana provoca diferença de G_{m0} entre os modelos assintótico (linha contínua) e cossenoidal (linha tracejada).

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo são discutidos as opções feitas ao longo da criação da metodologia e os possíveis fatores que afetam nossos resultados. Evidenciou-se que a metodologia desenvolvida permite a leitura da alteração da condutividade de suspensões, provocada pela abertura de poros na membrana plasmática. Mas, em suspensões concentradas a leitura sofre interferências. Também são analisadas as limitações dos modelos matemáticos, os valores quantitativos e a dinâmica da condutância da membrana, as restrições nos resultados obtidos através dos modelos. Buscou-se um entendimento da aplicação prática nos laboratórios das teorias obtidas através de modelos matemáticos desta tese.

Um dos fatores que influenciam a eletroporação é a tensão hipo-osmótica causada pelo inchaço da célula devida à entrada de água imposta pelo gradiente (inchaço hipotônico). Este efeito produz na membrana uma força mecânica lateral que pode reduzir o potencial crítico da eletroporação [38]. A pressão osmótica é proporcional a molaridade da solução e a temperatura (Equação (7)). Na mesma temperatura, a solução hipotônica utilizada tem 67% da pressão osmótica da solução isotônica. Barrau *et al.* (2004) [20] utilizaram uma solução de 43% da solução isotônica e verificaram a permeabilização das células através de citometria de fluxo. Concluíram que houve uma redução de 100mV no potencial crítico de eletroporação das células. Como foi utilizada uma redução de 33% da pressão osmótica, considerou-se para este estudo que a tensão mecânica induzida osmoticamente na membrana pode introduzir uma imprecisão no cálculo do potencial crítico em torno de 50mV.

Na Figura 18, após um certo valor de campo elétrico aplicado, existe um aumento de condução elétrica na suspensão de células. Foi considerado que este aumento ocorre devido à passagem de corrente iônica, entre o meio externo e o citoplasma da célula, através dos eletroporos. Calcula-se, para $p=0,07$, o potencial crítico na membrana da célula (Equação(8)) com sendo $V_c=460\text{mV}$. Para $p=0,35$, $V_c=416\text{mV}$. Estes valores são similares aos encontrados por Pavlin *et al.* (2005) [48]. A condutividade da suspensão não apresentou alteração significativa para potencial crítico mínimo da eletroporação (200mV [39]).

Verifica-se que a derivada no tempo destas curvas aumenta com o campo aplicado e fração volumétrica. Para $p=0,07$, este aumento da derivada deve estar ligado ao aumento da condutância da membrana. No entanto, para $p=0,35$, nota-se que a condutividade da suspensão para 1650V/cm ultrapassa o valor da condutividade do eletrólito (Figura 19). Isso se deve provavelmente à difusão na dupla camada e/ou a movimentação da própria célula (eletroforese). A célula apresenta mobilidade de $0,86-1,48 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ [109], apesar de ser cinco vezes menor que a mobilidade de íons como Na^+ e Cl^- , pode influenciar o aumento de condutividade da solução.

Na Figura 20, para uma pequena concentração de células ($p=0,07$), a leitura da condutividade da suspensão, com pulso de 600V/cm e duração de $500\mu\text{s}$, apresentou resultado compatível com o modelo de Maxwell. Para $p=0,35$, a discrepância entre o valor teórico e experimental foi maior que 20%. No entanto, Pavlin *et al.* (2005) [48] apresentaram resultado similar ao obtido por nosso experimento para uma fração volumétrica de 0,30. Neste mesmo trabalho, os autores apresentam uma dependência da leitura da condutividade normalizada (σ/σ_0) com a condutividade externa. Com a mesma fração volumétrica e $\sigma_0=15,8\text{mS/cm}$, $\sigma/\sigma_0=0,54$ que é um valor próximo ao do modelo de Maxwell. Observou-se que existem efeitos de polarização das células em suspensão que influenciam a leitura da condutividade DC (pulso), pois esta é afetada pela condutividade externa e pela concentração de células. Uma das hipóteses é a eletroforese da célula (mencionada acima), considerou-se que este processo afeta de forma significativa à leitura da condutividade DC das suspensões concentradas.

A segunda hipótese para a adição da condutividade está na movimentação iônica lateral na região interna da dupla camada (dinâmica da camada Stern¹⁰). Carrique *et al.* (2001) [93] sugerem um aumento da condutividade de suspensão quando o potencial induzido na partícula coloidal é maior que 100mV . O efeito da dinâmica da camada Stern na condutividade é importante em altas frações volumétricas ($p>0,20$) e eletrólitos pouco condutivos.

¹⁰ Uma distribuição de íons surge em torno de uma superfície carregada na interface com a solução eletrolítica, esta região é chamada de dupla camada elétrica. O modelo de Gouy-Chapman propõe decaimento exponencial do potencial elétrico da membrana ao eletrólito. No entanto, o modelo encontra limitações quando o potencial na superfície carregada é grande (*e.g.*, $>300\text{mV}$). Para resolver este problema, Stern sugere a adição de uma camada interna (uma camada compacta de acumulação de íons diferente da difusa camada de Gouy), conhecida como camada Stern [111].

O modelo de Maxwell pode ser utilizado para dois casos: partículas não carregadas e dupla camada elétrica muito fina. Neste caso a condutividade torna-se independente do potencial na superfície da célula apenas no caso de suspensões diluídas [92, 110]. Alguns trabalhos sugerem alterações no modelo de Maxwell [92,93], mas poucos trabalhos estendem a teoria da condutividade de partículas coloidais para a aplicação em células biológicas [110]. Estudos para a aplicação das novas teorias da condutividade DC em células biológicas são necessárias.

Verifica-se na Figura 22 que em $100\mu\text{s}$, a variação da condutividade (sem e com eletroporação) para $\Delta\sigma_i(p=0,07)\sim 0,1\text{mS/cm}$ e $\Delta\sigma_i(p=0,35)\sim 0,05\text{mS/cm}$. Em $400\mu\text{s}$, $\Delta\sigma_f(p=0,07)\sim 0,15\text{mS/cm}$ e $\Delta\sigma_f(p=0,35)\sim 0,19\text{mS/cm}$. Como $\Delta\sigma_i(p=0,07) > \Delta\sigma_i(p=0,35)$, e foi possível a entrada de marcadores fluorescentes para $p=0,07$ (Figura 21(D)), pode-se supor que o aumento de condutividade, em $100\mu\text{s}$, ocorreu devido a abertura de poros que permitem a entrada de grandes moléculas. Estudos e experimentos podem ser desenvolvidos para verificar a possível associação de $\Delta\sigma_i$ com a eficiência da transferência de macromoléculas.

Foi observado que apesar da maior diferença entre as variações da condutividade inicial e final para $p=0,35$ ($\Delta\sigma_f - \Delta\sigma_i$), o tamanho dos poros não foi suficiente para a passagem dos marcadores fluorescentes, Tabela 5. Duas hipóteses foram propostas: (1) inicialmente, abriram numerosos pequenos poros (que conduzem pouca corrente), durante a aplicação do pulso, aumentaram significativamente, e causaram a variação da condutividade da suspensão, mas não o suficiente para a entrada dos marcadores; e/ou (2) os fatores de eletroforese e a condução lateral da dupla camada da membrana plasmática afetam, significativamente, a condução de suspensões concentradas.

Existem dificuldades em estimar o número e tamanho dos poros, baseado no tamanho da molécula, por causa das interações elétricas que dependem da geometria, cargas elétricas e forma da molécula [41]. Deve-se considerar que quando uma partícula carregada, na proximidade entre dois materiais com diferentes constantes dielétricas (membrana e água neste caso), sofre uma repulsão eletrostática [82]. Além disso, o processo de passagem da macromolécula para dentro da célula não está completamente esclarecido. Tsong (1990) [112] propõe alguns meios de transferência de macromoléculas: difusão através dos poros da eletroporação; aderência da macromolécula na membrana; e que a macromolécula entra na célula através de

eletroforese, carregando parte da membrana. Sukharev *et al.* (1992) [113] consideram que uma vez aberto os poros, existe um processo que “ajusta” o tamanho do poro mecanicamente, pois a macromolécula é “empurrada” para dentro da célula pela força eletroforética. Esta hipótese explicaria como o DNA ($2\mu\text{m}$ [113]), maior que os diâmetros dos poros (1-10nm [33, 114]), entram na célula. Mesmo grandes poros como os descritos por Chang (1992) [16], não permitiram a passagem direta do DNA. Entretanto, o DNA é flexível e sujeito à orientação e deformação na presença de um campo elétrico [113].

Nos resultados da Figura 24, verifica-se que para valores de θ_c menores que 40° a variação de condutividade conforme mostra o modelo é pequena e não possibilita valores da condutividade normalizada da suspensão maiores que 0,92. No entanto, na Figura 23 verifica-se valores experimentais de σ/σ_0 maiores que 0,95. Portanto, os poros devem cobrir uma área da membrana maior que $\theta_c > 40^\circ$. Analisando as curvas da Figura 24 pode-se concluir que a eletroporação de eritrócitos de ratos com campo aplicado maior que 1500V/cm produz uma intensa alteração da condutância no pólo da célula e afeta uma área considerável da membrana, pois apenas com $G_{mo}=10\text{S/cm}^2$ e $\theta_c=70^\circ$ o modelo teórico fornece valores de condutividade comparáveis com aqueles mostrados na Figura 23.

Na Figura 25, o modelo assintótico apresentou uma boa concordância (erro $<1\%$) com os resultados dos experimentos com suspensões de células isoladas (diluídas). Entretanto, este modelo descreve a criação e destruição dos poros, mas não inclui a evolução dos poros (poros fixos em $0,76\text{nm}$). E, representa apenas os momentos iniciais da eletroporação.

Os parâmetros apresentados na Tabela 6 diferem dos dados apresentados por DeBruin e Krassowska (1999) [67] e Stewart *et al.* (2004) [118]. A tensão característica da eletroporação (V_p) representa a tensão crítica em que os poros permitem a passagem de corrente. Teissié e Rols (1993) [39] determinaram experimentalmente este valor de 200mV para diferentes células. Como os autores não apresentaram uma demonstração matemática para a obtenção de ‘q’, utilizou-se este parâmetro para compensar a diminuição de V_p .

Stewart *et al.* (2004) [118] alteraram o raio do poro ($r_p=20\text{nm}$) para fornecer dados consistentes com os experimentos. No modelo assintótico, a condutância do poro

foi obtida através de estudo experimental, que considera a energia de Born¹¹ (w_o) como uma barreira (trapezoidal) para a passagem de um íon monovalente [66, 69]. Esta barreira de energia tende a diminuir com o aumento do poro e a diminuição da espessura da membrana (Ramos não publicado). Para grandes poros ($r_p > 5\text{nm}$), esta barreira é insignificante, e a representação da condução do poro apresenta características diferentes. Krassowska e Filev (2007) [117] propõem que a condução através de grandes poros é afetada por duas resistências em série (resistência do poro e resistência interna). Dessa forma, a utilização de grandes poros neste modelo apresenta aplicação inadequada. Por este motivo, r_p foi mantido e alterou-se o valor de α para adequar os resultados experimentais ao modelo assintótico.

Quando o pulso elétrico é aplicado, o deslocamento iônico provoca o carregamento da membrana, e o aumento de V_m . Quando $V_m \geq 200\text{mV}$, Figura 26 (A), os pequenos buracos entre as moléculas de lipídios da membrana (poros hidrofóbicos, Figura 4(a)), formados por agitação térmica, sofrem alterações estruturais e tornam-se poros hidrofílicos (Figura 4(b)), permitindo a passagem de íons para dentro da célula [2]. Com a membrana intacta, $G_m = 10^{-3}\text{S/cm}^2$ [19]¹², após a abertura de poros na membrana, G_m aumenta (Figura 26(B)) e V_m sofre um achatamento (Figura 27(A)). Para o campo de 1kV/cm , os poros da membrana estão concentrados em um ângulo de $\theta_c = 0,9\text{rad}$ (Figura 27(B)).

A variação da G_{m0} apresentada no gráfico da Figura 28(A) é consistente com os valores apresentados na literatura ($1-10\text{S/cm}^2$ [37, 73, 115, 121, 122]). A variação angular durante a eletroporação foi de $0,9$ a $1,1\text{rad}$ (51° a 63°) concordando com os dados experimentais com microscopia de fluorescência [115], Figura 28(B). Na Figura 29 foi observado que, em regime, o potencial transmembrana no pólo da célula ($\theta = 0\text{rad}$) não se altera significativamente na aplicação de diferentes campos elétricos. A condutância da membrana aumenta de forma a compensar o maior acúmulo de íons provocado pelo incremento do campo elétrico.

¹¹ Quando um íon se aproxima de uma interface entre dois materiais (com diferentes constantes dielétricas) produz uma distribuição da carga de polarização na interface. Isso ocorre porque a polarização do meio de alta constante dielétrica (água, ~ 80) é maior que o de baixa (membrana plasmática, ~ 2) [119]. Este potencial de polarização fornece uma barreira para a passagem do íon, algumas vezes este potencial barreira é chamado de energia de Born [66, 69].

¹² Utilizamos a conversão $G_m = \sigma_m/h$ [120].

Na Figura 30 observou-se que apenas nos instantes iniciais da eletroporação existe diferença de G_m para $\theta=0$ e $3,14\text{rad}$. No entanto, esta diferença não justifica a assimetria descrita por Hibino *et al.* (1993) [38] de 400%. Este resultado concorda com outros trabalhos que demonstraram experimentalmente que a assimetria da eletroporação é independente de V_{rest} [125]. O trabalho teórico desenvolvido por Debruin e Krassowska [69] confirma que V_{rest} produz variações insignificantes na criação de poros. Alguns autores atribuem a assimetria da eletroporação a uma corrente que passaria por canais de Ca^{2+} do tipo L [125] ou a eletro-osmose [124].

Verifica-se na Figura 31 que as etapas da dinâmica da condutância da membrana podem ser divididas em: ABERTURA dos poros: (1) aumento de G_m , principalmente, nos pólos da célula (indução, Tabela 1); (2) espalhamento dos poros pela membrana, com aumento acentuado nos pólos (expansão); (3) G_m constante, número e distribuição de poros invariável (estabilização); FECHAMENTO dos poros: (4) Diminuição rápida de G_m .

As etapas (1) e (2) apresentam verificação experimental dificultada, pois ocorrem em menos de $1\mu\text{s}$ [2, 3, 38]. A etapa (3) apresenta a limitação do modelo assintótico: através dos dados experimentais obtidos neste trabalho, pode-se verificar que existe uma alteração de G_m durante o pulso de eletroporação. A variação da condutividade da suspensão (Figura 18) e, conseqüentemente, de G_m é proporcional ao número, tamanho e condução dos poros formados na membrana. Portanto, sabe-se que existe uma alteração da dinâmica dos poros, e G_m não permanece constante durante o pulso.

O fechamento dos poros (etapa 4) está de acordo com a rápida relaxação da condutividade da suspensão apresentada pelos experimentos (Figura 17). No entanto, contradiz a hipótese de poros de longa vida que contribuem para a permeabilidade dos íons e moléculas, minutos após a aplicação do pulso [127]. Uma explicação seria que apenas uma pequena parte do aumento da condutividade pode ser atribuída aos poros condutivos, e que a maior parte é resultado de algum processo relacionado (*e.g.*, condução na dupla camada, eletroforese). Apesar destes dois processos estarem relacionadas com a concentração de células na suspensão. Contudo, neste estudo a diluição ($p=0,07$) poderia reduzir o aumento da condutividade da solução causado por esses processos. Outra explicação estaria no fato que os poros de longa vida (40ms após

o pulso) apresentados por Chang (1922) ocorreram pela aplicação de campos muito intensos (4-5kV/cm). Estes valores são muito superiores aos trabalhados nesta tese (máximo de 1,65kV/cm). Provavelmente, estes campos muito intensos superam uma barreira de energia que possibilite a existência destes poros. No entanto, este estado de energia dos poros ainda não é descrita nos modelos atuais (Anexo 1). Supõe-se que as alterações sofridas pela membrana descritas, na Tabela 1 pela etapa Memória, continuem durante um longo período.

Na Figura 32, as condições *in vivo* e meios de baixa condutividade, delimitadas na figura, foram obtidas de Kotnik *et al.* (1997) [19]. As condições *in vivo* foram estendidas para as soluções descritas na Tabela 2. Verificou-se que o aumento da condutividade externa, principalmente para as condições *in vivo*, possibilita maior condutância da membrana. Entretanto, em ambiente de baixa condutividade a variação de G_{mo} é muito baixa em comparação com os valores *in vivo*. Este efeito deve ser mais aparente quando utilizado com células grandes, pois o potencial transmembrana sofre maior influência [19].

Na prática, soluções com condutividades acima de 10mS/cm necessitam, para campos elétricos intensos (1kV/cm), altas correntes. Conseqüentemente, os equipamentos para suprir estes valores de potência são caros. O meio de eletroporação é um importante parâmetro para caracterização da carga do equipamento, bem como as dimensões da cubeta (Equação 23) [95].

As características internas de cada célula diferenciam a condutividade do citoplasma. Dessa forma, existe uma variação da condutividade interna para diferentes tipos de células [19]. Em meios de baixa condutividade o aumento da condutividade interna não sugere alterações significativas, Figura 33. No entanto, para meios de alta condutividade, G_{mo} sofre a influência de σ_i .

A Figura 34 mostra a dependência de G_{mo} com as dimensões das células. Para estas simulações foram consideradas células esféricas. Verifica-se que para células pequenas, $a < 4\mu\text{m}$ (*e.g.*, bactérias [128] e hemácias [33]), variações menores que $1\mu\text{m}$ causam diferenças na condutância da membrana de 10 vezes. Para células maiores (*e.g.*, ovos de ouriço do mar [84]), a variação da condutância é menor, para os meios de eletroporação entre 0,1 e 15 mS/cm.

Em nossos experimentos as células não são afetadas igualmente. A distribuição de G_m apresenta variações entre as células da suspensão do experimento. Verificou-se no Capítulo 3 – Métodos, Item 3.4 - Diâmetro dos Esferócitos que a célula varia entre 2,6 a 3,8 μm . De acordo com a Figura 34 a variação da condutância máxima da membrana, pra $\sigma_i=2,3\text{mS/cm}$, é de 0,5 a 4 S/cm^2 . Este fato demonstra como em uma mesma amostra de células é possível ter células com pequenos poros na membrana (*e.g.*, células com $r=2,6\mu\text{m}$) e grandes poros que permitem a entrada de macromoléculas (*e.g.*, $r=3,8\mu\text{m}$). Com menor frequência, eletroporação irreversível (morte celular) e eletroporação desprezível (poros muito pequenos).

Apesar de não ter sido abordada neste trabalho, a forma não-esférica de algumas células deforma a distribuição cossenoidal do potencial transmembrana e, conseqüentemente, alteram a condutância da membrana [129].

Nas Figuras 28(A) e 35 foram apresentados alguns dados comparativos entre os modelos matemáticos apresentados neste trabalho. O modelo cosseinoial apresenta $G_m=f(V_m^2)$, enquanto o modelo assintótico tem $G_m=f(\exp(V_m^2))$. No entanto, quando os modelos foram ajustados para um mesmo experimento ($p=0,07$ no tempo 100 μs), Figura 23(A) e 25. Verificou-se que o resultado da condutância da membrana apresenta similaridades qualitativas.

6. CONCLUSÕES

Desenvolveu-se uma metodologia de medição dos efeitos da eletroporação em suspensões de célula. As observações que os poros alteram a condutividade da suspensão, quando $V_m \geq 460\text{mV}$ (para $p=0,07$) e 410mV (para $p=0,35$), são consistentes com os resultados de Pavlin *et al.* (2005) [48]. Os resultados dos experimentos realizados, com a inserção de marcadores fluorescentes, mostram que outros efeitos (*e.g.*, eletroforese e condução na dupla camada) além dos eletroporos afetam a leitura da condutividade de suspensões concentradas ($p=0,35$) com pulsos de tensão de grande duração (*e.g.*, $300\mu\text{s}$). Verificou-se que a solução de 67% da solução isotônica e suspensões diluídas apresentam uma imprecisão em torno de 50mV na determinação do potencial crítico.

No modelo cosseinoidal, a boa concordância entre os resultados após ajuste de parâmetros sugere que a condutância varia com o quadrado do potencial de membrana. O ajuste de parâmetros do modelo assintótico resultou em erros menores que 1%. Mas, o modelo não se adequou ao estudo da dinâmica (evolução) dos poros.

Os modelos matemáticos da eletroporação apresentaram diferenças na condutância máxima da membrana (G_{mo}), conforme observado na Figura 28(A). As diferenças nas distribuições de G_{mo} na célula entre os modelos causaram esta discrepância (Figura 35). No entanto, os valores não são maiores que 7S/cm^2 , Figura 28(A), com $65^\circ > \theta_c > 50^\circ$ (Figuras 24 e 28(B)). Estes resultados são coerentes com os dados fornecidos por alguns autores [48, 114, 115]. Estas observações sugerem que os poros não se concentram apenas nos pólos ($\theta=0^\circ$ e $\theta=180^\circ$). Contudo, não são distribuídos uniformemente e afetam em torno de 40% da membrana celular. A distribuição dos poros na membrana interfere na obtenção precisa de G_{mo} , baseado na leitura da condutividade das suspensões de células.

Verifica-se com o modelo cossenoidal da eletroporação que para pulsos de 1650V/cm , $p=0,07$, durante $300\mu\text{s}$, G_{mo} aumentou de 2,3 para $6,9\text{ S/cm}^2$ (Figura 23). Este fato indica que os poros estão aumentando, ou em tamanho ou quantidade ou em ambos. A condutância da membrana é dada por: $G_m = \sum_p G_p N_p$, onde P são os poros em uma determinada área da membrana, G_p é a condutância do poro, e N_p o número de

poros. Através de G_m não se pode obter a dinâmica da evolução dos poros. Contudo, este resultado demonstra que existe uma modificação nos poros da membrana dentro de $300\mu s$ do pulso. Esta observação evidencia a limitação do modelo assintótico da eletroporação, que, entretanto, apresenta bons resultados para a dinâmica de abertura e fechamento dos poros.

Nos momentos iniciais da aplicação do pulso, com o modelo assintótico, verifica-se que os pulsos se concentram no pólo da célula e em seguida se espalham até alcançarem θ_c . O fechamento confirma a rápida relaxação da condutividade da suspensão. Estes resultados têm concordância com o trabalho de Pavlin *et al.* (2005) [48].

Neste trabalho foi demonstrado que a condutividade do meio, a concentração e as dimensões das células têm que ser consideradas na escolha adequada da intensidade e duração dos pulsos de eletroporação. Contudo, para meios de baixa condutividade, contendo células maiores que $7\mu m$ de raio, as dimensões das células não afetam, significativamente, a eletroporação.

Em resumo, pode-se concluir que as principais contribuições deste trabalho estão na metodologia desenvolvida para o estudo da eletroporação em suspensões de células; no estudo da condutância da membrana utilizando dois modelos teóricos da eletroporação, baseado nos dados experimentais gerados neste trabalho; na avaliação quantitativa do efeito da dimensão da célula e da condutividade externa da suspensão na eficiência e caracterização da eletroporação.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho apresenta uma metodologia para a leitura da condutividade da suspensão de células. No entanto, alguns detalhes da análise teórica e experimental necessitam de esforços na pesquisa dos seguintes aspectos:

- Análise teórica da condutividade para suspensões concentradas;
- Estudo da relação da condutividade inicial da suspensão (100 μ s) e a eficiência da transferência genética;
- Melhoria no projeto do eletroporador visando um aumento do potencial aplicado, diminuição da resistência de carga e aplicações de pulsos consecutivos em frequência entre 1-5kHz;
- Estudos da evolução dos poros baseado em métodos estatísticos (*e.g.*, Monte Carlo);
- Análise teórica da dissipação de potencial transmembrana induzido necessária para a estabilização da eletroporação (Tabela 1) na célula;
- Utilização do eletroporador para melhorar a eficiência de aplicações práticas da transferência genética.

ANEXO 1 – Energia e Densidade de Poros

A equação da energia do poro utilizada na simulação da Figura 6 é dada a seguir [71]:

$$W_i = 2.\pi.r.\gamma - 2.\pi.\left[\int_0^r \Gamma_{\text{eff}}.[A_p(r^*, t^*)]r^*.dr^*\right] + \left(\frac{C}{r}\right)^4 - \frac{\pi.(\epsilon_w - \epsilon_m)}{h} V_m^2 \int_0^r \alpha^2(r').r'.dr' \quad (\text{A1.1})$$

onde

$$\Gamma_{\text{eff}}(A_p) = \Gamma_{\text{eff}}(A_p = 0) \frac{1 - \left(\frac{A_o}{A_m - A_o}\right)^2}{1 - \left(\frac{A_o}{A_m}\right)^2} \quad (\text{A1.2})$$

e

$$\alpha(r) = \left[\frac{1 + \pi.k_p(r)}{2.h.\sigma_o} \right]^{-1} \quad (\text{A1.3})$$

$$k_p(r) = \sum_i (e.Z_i)^2 . \mu_i . c_i . H_i(r) . \exp \left(\frac{P \left(\frac{\epsilon_m}{\epsilon_w} \right) . (e.Z_i)^2}{4.k.T.\pi.\epsilon_m} \right) \quad (\text{A1.4})$$

$$H_i(r) = \left(1 - \frac{r_i}{r}\right)^2 \left[1 - 2,104.\left(\frac{r_i}{r}\right) + 2,09.\left(\frac{r_i}{r}\right)^3 - 0,95.\left(\frac{r_i}{r}\right)^5 \right] \quad (\text{A1.5})$$

c_i é a concentração e μ_i a mobilidade do íon 'i', o fator $H_i(r)$ é dado por Renkin (1954) [129]. A_p , A e A_o são a área total dos poros, a área total da membrana e a área de equilíbrio para o ponto de mínima energia interfacial. Utilizou-se $A/A_o=1,0125$ [71].

O método das diferenças finitas foi utilizado para simular a equação da função densidade de poros, Equação (12). Subtraindo a taxa de criação (N_c) e destruição de poros (N_d), tem-se o fluxo de poros para $r=r_{\text{min}}$, então:

$$N_c = \varpi \exp \left[-\frac{W_b}{kT} \left(\frac{V_m}{V_p} \right)^2 \right] \quad (\text{A1.6})$$

$$V_p = \sqrt{\frac{2.h.k.T}{\pi.r^2.(\epsilon_w - \epsilon_m)}} \quad (\text{A1.7})$$

$$N_d = \chi.n.\exp \left(-\frac{W_b}{k.T} \right)$$

No caso de $r=r_{\max}$ e $N_p=n(r_{\max})$, tem-se a seguinte condição de contorno:

$$n(N_p) = n(N_p + 1) \quad (\text{A1.8})$$

O critério de estabilidade para obter estabilidade e precisão no método de diferenças finitas foi dado por [75]:

$$\Delta t \leq \frac{(\Delta r)^2}{D_p} \quad (\text{A1.8})$$

Os dados para a simulação, descrição e valores das variáveis e as referências são apresentadas na Tabela A1.1.

Tabela A1.1 - Parâmetros para a simulação da equação de energia [71] e da equação de Smolushowski. Valores para 298K.

Notação	Descrição	Valor	Ref.
r_{\min}	Raio mínimo do poro	1nm	[130]
r_{\max}	Raio máximo do poro	40nm	[130]
W_b	Barreira de energia para a destruição e criação de poros	2.10^{-19}J	[75]
χ	Taxa pré-fator de criação de poros	5.10^{16}ms^{-1}	[131]
ϖ	Taxa pré-fator de destruição de poros	10^{28}s^{-1}	[131]
ϵ_w	Permissividade relativa da água	80	[71]
ϵ_m	Permissividade relativa da membrana	3	[71]
ϵ_o	Permissividade do vácuo	$8,85.10^{-12}\text{Fm}^{-1}$	
$P\left(\frac{\epsilon_m}{\epsilon_w}\right)$	Função de Parsegian	0,25	[132]

Notação	Descrição	Valor	Ref.
e	Carga elétrica do íon	$1,60 \cdot 10^{-9} \text{Nm}^2 \text{C}^{-2}$	
Δr	Incremento de raio	10^{-2}nm	
Δt	Incremento de tempo	10^{-9}s	
h	Espessura da membrana	5nm	[71]
kT	Constante de Boltzmann e temperatura (298K)	$4,11 \cdot 10^{-21} \text{J}$	
$\Gamma_{\text{eff}}(A_p=0)$	Tensão superficial da membrana	$2 \cdot 10^{-3} \text{Jm}^{-2}$	[133]
γ	Tensão linear da membrana	10^{-11}Jm^{-1}	[131]
C	Repulsão entre as cabeças dos lipídios da membrana plasmática	$9,67 \cdot 10^{-15} \text{J}^{1/4} \text{m}$	[73]
D_p	Constante de difusão	$5 \cdot 10^{-14} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$	[71]
r_{Na^+}	Raio hidratado do íon sódio	$0,358 \text{nm}$	[25]
Z_{Na^+}	Número de elétrons na camada de valência do íon sódio	1	
μ_{Na^+}	Mobilidade do íon sódio	$5,19 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	[134]
c_{Na^+}	Concentração do íon sódio	0,14M	
r_{Cl^-}	Raio hidratado do íon cloro	$0,332 \text{nm}$	[134]
Z_{Cl^-}	Número de elétrons na camada de valência do íon cloro	1	
μ_{Cl^-}	Mobilidade do íon cloro	$7,91 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	[134]
c_{Cl^-}	Concentração do íon cloro	0,14M	
A_m	Área da membrana	$1,45 \cdot 10^{-6} \text{m}^2$	[75]

ANEXO 2 – O Eletroporador

Os estudos da eletroporabilidade da membrana vêm sendo realizados com pulsos mono [33, 135], bipolares [136] e ondas senoidais [137]. Para a realização de estudos das reações do meio biológico com a aplicação de diferentes campos elétricos, foi desenvolvido um sistema para aplicação de potenciais elétricos de alta intensidade. O equipamento e o programa foram desenvolvidos com recursos do Projeto Universal, Processo CNPq 472484/2004-4. O eletroporador é formado por um módulo de programa no PC, uma placa de conversão analógico-digital, um amplificador de potência e por uma cubeta, Figura A2.1.



Figura A2.1 – Eletroporador desenvolvido para estudo da eletroporação. Possibilita a aplicação de formas de onda (pulso, rampa e senóide). O programa gráfico foi desenvolvido em Labview.

O programa no PC foi desenvolvido para sistema operacional Windows XP, e foi utilizada a linguagem de programação gráfica LabVIEW (National Instruments Inc., Austin, Texas, EUA). A Figura A2.2 apresenta a tela de interface com o usuário que possibilita a geração de ondas nas formas: quadrada, rampa e senóide. O usuário especifica amplitude (Volts), frequência (Hertz), nível DC, (Volts), número de amostras e taxa de amostragem (Hertz) de duas ondas que serão seqüencialmente adicionadas. Utilizou-se a placa PCI 6251 (National Instruments Inc., Austin, Texas, EUA) para conversão digital-analógico, com 16-bits e taxa de amostragem máxima de 2,8MHz.

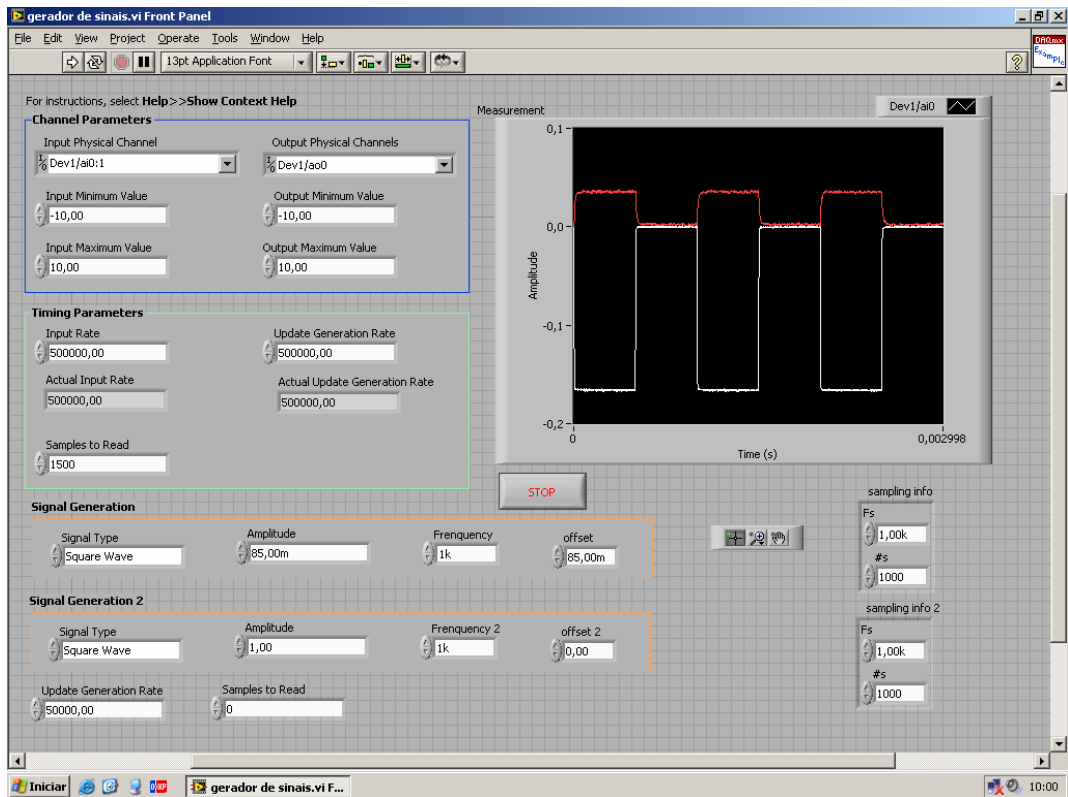


Figura A2.2 – Tela de interface com o usuário do programa do Eletroporador desenvolvido em LabVIEW (National Instruments).

O sinal analógico da placa PCI 6251 é conectado no amplificador do estágio de potência. A Figura A2.3 mostra um esquemático simplificado dos estágios de metade do amplificador de potência do eletroporador.

O estágio de entrada apresenta dois amplificadores de base comum, um para o semiciclo positivo e outro para o semiciclo negativo do sinal. Na amplificação cascode, cada período da onda é amplificado por dois transistores bipolares (tipo PNP – para o positivo e tipo NPN – para o negativo) conectados em cascata. Deve-se ressaltar que transistores complementares devem ser usados (*i.e.*, NPN e PNP que contém características idênticas), caso contrário a simetria de amplificação entre a parte positiva e negativa pode ser comprometida. Após a amplificação cascode, os sinais passam pelo estágio de saída com amplificador de potência *push-pull* classe AB em configuração Darlington NPN e um composto PNP.

O ganho do circuito de amplificação completo em aberto é de 36,90dB. A máxima amplitude de saída em cada metade do estágio de amplificação é de 200V e de tensão diferencial é de 400V. As características do amplificador foram obtidas com uma carga não indutiva de $205 \pm 4 \Omega / 100W$ (multímetro Fluke 179, John Fluke Manufacturing, Everett, Washington, EUA). As medições foram realizadas com o osciloscópio digital (Tektronix THS720A, Beaverton, Oregon, EUA), ponteira de tensão (Tektronix P6117, Beaverton, Oregon, EUA) e ponteira de alta tensão (Tektronix P5102, Beaverton, Oregon, EUA). Dentro da faixa de 100 Hz até 10kHz o ganho do amplificador foi de 28,4dB com desvio máximo de -0,4dB. A defasagem entre a entrada e saída do amplificador (V_i e V_o da Figura A2.3, respectivamente) não foi maior que 10° . A tensão máxima de saída foi de 325V (pico a pico). A distorção da forma da onda (DFO) como [95] (Equação A2.1):

$$DFO = \frac{\int_{t_1}^{t_2} |f_i(t) - f_o(t - \tau)| dt}{\int_{t_1}^{t_2} |f_i(t)| dt} \quad (A2.1)$$

onde $f_i(t)$ é o sinal de entrada, $f_o(t - \tau)$ é o sinal de saída normalizado e sincronizado com sinal de entrada (o valor de τ é obtido da defasagem de fase). E o intervalo t_1 e t_2 foram escolhidos para representar três períodos da onda. DFO(%) é menor que 5% para a faixa de 100Hz a 10kHz, (Figura A2.4).

Pulsos na carga de 100V a 330V e duração de $500 \mu s$ foram aplicados, e verificou-se que para a amplitude variar entre 10% a 90% do seu valor em regime, o tempo de subida (t_s) foi de $3,0 \pm 0,5 \mu s$ e o tempo de descida (t_d) de $3,5 \pm 0,5 \mu s$.

Na Figura A2.5 apresentou-se o aumento da capacitância parasita do eletroporador. A medição foi realizada com a carga resistiva não indutiva, osciloscópio (Tektronix THS720A, Beaverton, Oregon, EUA), ponteira de alta tensão (Tektronix P5102, Beaverton, Oregon, EUA) e a ponteira de corrente (Tektronix A622, Beaverton, Oregon, EUA). Aplicou-se uma tensão de saída de 100V.

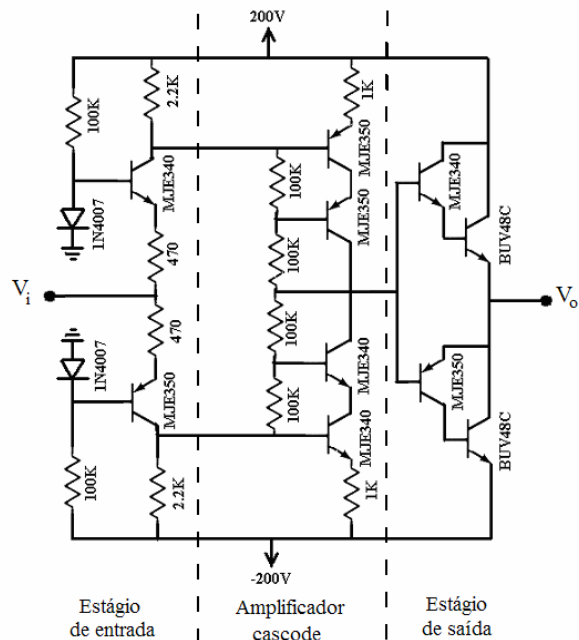


Figura A2.3 – Estágios de metade do esquema do amplificador de alta tensão. Cada metade amplifica o sinal com fase invertida em relação à outra metade. Máxima tensão de saída é de 200V.

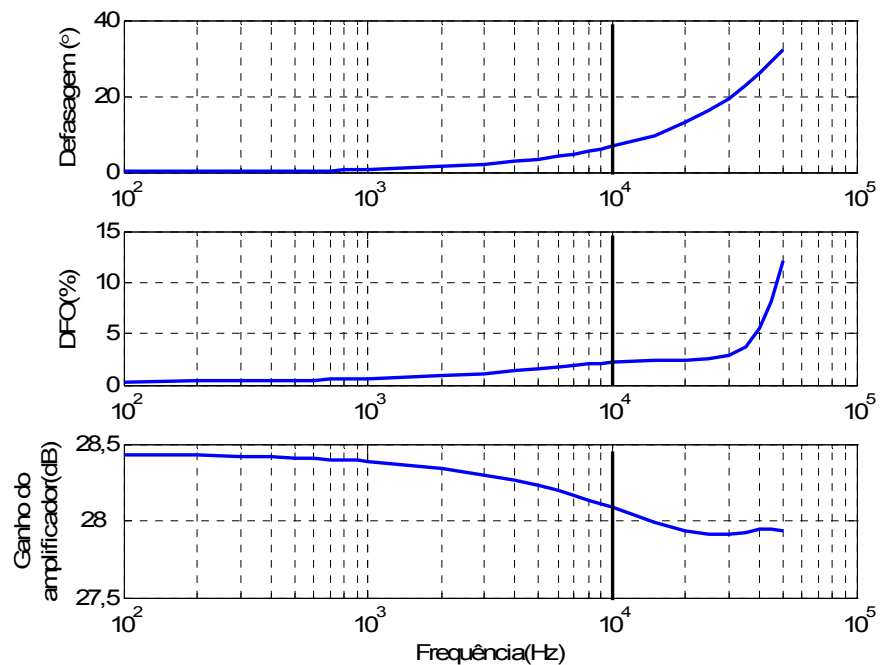


Figura A2.4 – Defasagem de fase, distorção da forma de onda (DFO) e ganho de amplitude do estágio de potência do eletroporador. As linhas verticais largas indicam a banda entre 100Hz a 10kHz onde DFO é menor que 5%.

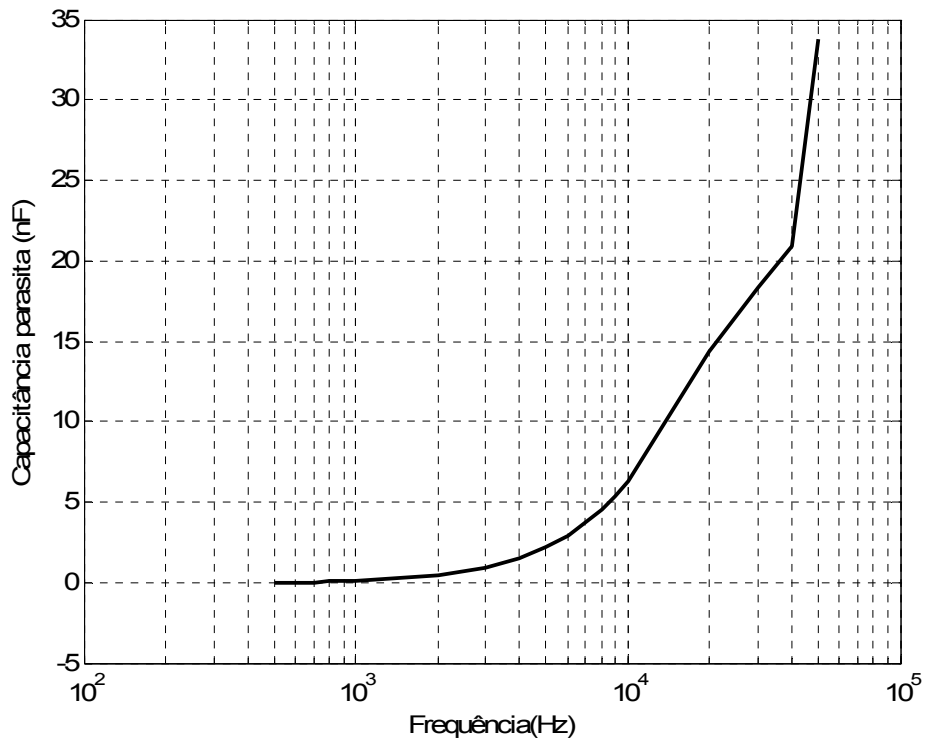


Figura A2. 5 – Capacitância parasita do eletroporador, medida com carga resistiva não indutiva.

Para a banda de 100Hz a 10kHz o valor máximo da capacitância parasita foi de 6nF.

REFERÊNCIAS

- [1] CHANG, D. C.; CHASSY, B. M.; SAUNDERS, J. A.; SOWERS, A. E. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1. ed. San Diego-California: Academic Press, 1992.
- [2] WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry*, v. 41, p. 135-160, 1996.
- [3] TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1724, p. 270-280, 2005.
- [4] MIKLAVČIČ, D.; PUC, M. Electroporation. In:____. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*. New York: John Wiley & Sons Inc., 2006. p. 1-11.
- [5] RICE, J.; OTTENSMEIER, C. H.; STEVENSON, F. K. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*, v.8, p. 108-20, 2008.
- [6] SERSA, G.; MIKLAVČIČ, D.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z., PUCHIHAR, G.; SNOJ, M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 34, p. 232-240, 2008.
- [7] NICKOLOFF, J. A.; 1995. Animal cell electroporation and electrofusion protocols. 1. ed. New Jersey: Humana Press Inc.
- [8] NICKOLOFF, J. A.; 1995. Plant cell electroporation and electrofusion protocols. 1. ed. New Jersey: Humana Press Inc.
- [9] DENET, A.; VANBEVER, R.; PREAT, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Advanced Drug Delivery*, v. 56, p. 659-674, 2004.
- [10] MOUNEIMME, Y.; TOSI, P. F.; BARHOUMI, R.; NICOLAU, C. Electroinsertion: an electrical method for protein implantation into cell membranes. In:____. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1. ed. San Diego-California: Academic Press, 1992, p. 327-346.
- [11] NIKOLSKI, V. P.; EFIMOV, I. R. Electroporation of the heart. *Europeace*, v. 7, p. S146-S154, 2005.
- [12] KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membranes, *Nature*, v. 268, p. 438-443, 1977.

- [13] Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y; Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields, *European Molecular Biology Organization Journal*, v. 1, p. 841-845, 1982.
- [14] Okino, M.; Mohri, H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors, *Japanese Journal of Cancer Research*, v. 78, p. 1319-1321, 1987.
- [15] Mir L. M.; Banoun, H.; Paoletti, C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: direct access to the cytosol, *Experimental Cell Research*, v. 1988, p. 15-25, 1988.
- [16] CHANG, D.C. Structure and dynamics of electric field induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy. In:_____. Guide to Electroporation and Electrofusion. 1. ed. San Diego-California: Academic Press, 1992, p. 9-27.
- [17] JAROSZESKI, M. J.; GILBERT, R.; HELLER, R. Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal delivery: electrically mediated delivery of molecules to cell. 1. ed. Totowa-New Jersey: Humana Press Inc., 1999.
- [18] VALIČ, B.; GOLZIO, M.; PAVLIN, M.; SCHATZ, A.; FAURIE, C.; GABRIEL, B.; TEISSIE, J., ROLS, M. P. MIKLAVČIČ, D. Effect on electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiments. *European Biophysical Journal*, v. 32, p. 519-528, 2003.
- [19] KOTNIK, T.; MIR, L. M.; FLISAR, K.; PUC, M.; MIKLAVČIČ, D. Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part I. Increased efficiency of permeabilization, *Bioelectrochemistry*, v. 54, p. 83-95, 2001.
- [20] BARRAU, C.; TEISSIÉ, J.; GABRIEL, B. Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electropermeabilization, *Bioelectrochemistry*, v. 63, p. 327-332, 2004.
- [21] HUI, S. W. Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency. In:_____. Plant cell electroporation and electrofusion protocols. 1.ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1995. p. 29-40.

- [22] GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research, *Acta Physiologica Scandinavica*, v.177, p. 437-447, 2003.
- [23] TSONG, T. Y. Reviews: Electroporation of cell membranes, *Biophys. J.*, v. 60, p.297-306, 1991.
- [24] ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In:_____. *Biologia molecular da célula*. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, 1997. p. 477-506.
- [25] ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and surface forces*. San Diego: Academic Press Inc, 1985.
- [26] RAMOS, A.; SUZUKI, D.O.H.; MARQUES, J.L.B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells, *Bioelectrochemistry*, V. 68, P. 213-217, 2006.
- [27] FRICKED, H. The electric permittivity of a dilute suspension of membrane covered ellipsoids, *Journal of Applied Physics*, v.24, p. 644-646, 1953.
- [28] NEUMANN, E. The relaxation hysteresis of membrane electroporation. In:_____. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. 1. ed. New York: Plenum Press, 1989, p. 61-82.
- [29] NEUMANN, E; SPRAFKE, A; BOLDT, E; WOLF, H. Biophysical considerations of membrane electroporation. In:_____. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1. ed. San Diego-California: Academic Press, 1992, p. 77-90.
- [30] KOTNIK, T.; BOBANOVIĆ, F.; MIKLAVČIČ, D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric field – a theoretical analysis, *Bioelectrochemistry*, v. 43, p. 285-291, 1997.
- [31] FARKAS, D. L.; KORENSTEIN, R.; MALKIN, S. Electrophotoluminescence and the electric properties of the photosynthetic membrane. I. Initial kinetics and the charging capacitance of membrane, *Biophysical Journal*, v. 45, p. 363-373, 1984.
- [32] KLEE, M.; PLONSEY, R. Stimulation of spheroidal cells – the role of the cell shape, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. BME-23, p. 347-354, 1976.
- [33] GROSSE, C.; SCHWAN, H. P. Cellular membrane potentials induced by alternating fields, *Biophysical Journal*, v. 63, p. 1632-1642, 1992.

- [34] EHRENBERG, B.; FARKAS, D. L.; FLUHLER, E. N.; LOJEWSKA, Z.; LOEW, L. M. Membrane potential induced by external electric field pulse can be followed with a potentiometric dye, *Biophysical Journal*, v. 51, p. 833-837, 1987.
- [35] PAVLIN, M.; SLIVNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. Effective conductivity of cell suspension. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 49, p. 77-80, 2002.
- [36] SUSIL, R.; SEMROV, D.; MIKLAVČIČ, D. Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization, *Electro-Magnetobiol.*, v. 17, p. 391-399, 1998.
- [37] SCHMEER, M.; SEIPP, T.; KAKORIN, S.; NEUMANN, E. Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell-pallets, *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 6, p. 5564-5574, 2004.
- [38] HIBINO, M.; ITOH, H.; KINOSITA Jr, K. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophysical Journal*, v. 64, p. 1789-1800, 1993.
- [39] TEISSIE, J.; ROLS, M. P. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization, *Biophysical Journal*, v. 65, p.409-413, 1993.
- [40] MIKLAVČIČ, D.; ŠEMROV, H.; MEKID, H.; MIR, L. M. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1523, p. 73-83, 2000.
- [41] CHEN, C.; SMYE, S.W.; ROBINSON, M. P.; EVANS, J. A. Membrane electroporation theories: a review, *Medical and Biological Engineering and Computing*, v. 44, p. 5-14, 2006.
- [42] WOLF, H.; ROLS, M. P.; BOLDT, E.; NEUMANN, E.; TEISSIÉ, J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells, *Biophysical Journal*, v. 66, p. 524-531, 1994.
- [43] LEBAR, A. M.; MIKLAVČIČ, D. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters, *Radiology and Oncology*, v. 35, p. 193-202, 2001.
- [44] TEISSIÉ, J.; EYNARD, B.; GABRIEL, B.; ROLS, M. P. Electropermeabilization of cell membranes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 35, p. 3-19, 1999.

- [45] PRAUSNITZ, M. R.; CORBETT, J. D.; GIMM, J. A.; GOLAN, E.; LANGER, R.; WEAVER, J. Millisecond measurement of transport during and after an electroporation pulse, *Biophysical Journal*, v. 68, p. 1864-1870, 1995.
- [46] GABRIEL, B.; TEISSIÉ, J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane, *Biophysical Journal*, v. 73, p. 2630-2637, 1997.
- [47] ROLS, M. P.; TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon, *Biophysical Journal*, v. 58, p. 1089-1098, 1990.
- [48] PAVLIN, M.; MAŠA, K.; REBERŠEK, M.; PUCHIHAR, G.; HART, F. X.; MAGJAREVIĆ, R.; MIKLAVČIČ, D. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension, *Biophysical Journal*, v. 88, p. 4378-4390, 2005.
- [49] FÖRSTER, W.; NEUMANN, E. Gene transfer by electroporation: a practical guide. In: _____. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. 1. ed. New York: Plenum Press, 1989, p. 299-318.
- [50] HOFMANN, G. A. Instrumentation. In: _____. *Plant cell electroporation and electrofusion protocols*. 1. ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1995. p. 41-59.
- [51] KOTNIK, T.; PUCHIHAR, G.; REBERŠEK, M.; MIKLAVČIČ, D. Role of pulse shape in cell membrane electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1614, p. 193-200, 2003.
- [52] KOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells, *Biophysical Journal*, v. 79, p. 670-679, 2000.
- [53] PUCHIHAR, G.; KOTNIK, T.; KANDUŠER, M.; MIKLAVČIČ, D. The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cell in vivo, *Bioelectrochemistry*, v. 54, p. 143-152, 2001.
- [54] DJUZENOVA, C. S.; ZIMMERMANN, U.; FRANK, H.; SUKHORUKOV, V. L.; RICHTER, E.; FUHR, G. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporated myeloma cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1284, p. 143-152, 1996.
- [55] RUSSEL, J. B.; 1994. Química Geral. Volume 1. 2. ed. São Paulo: Makron Books.

- [56] ROLS, M. P.; DELTEIL, C.; SERIN, G.; TEISSIÉ, J. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells, *Nucleic Acids Research.*, v. 22, p. 540, 1994.
- [57] ABIDOR, I. G.; ARAKELYAN, V. B.; CHERNOMORDIK, L. V.; CHIZMADZHEV, Y. A.; PASTUSCHENKO, V. F.; TARASEVICH, M. R. Electric breakdown of bilayer lipid membranes I. The main experimental facts and their qualitative discussion, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 37-52, 1979.
- [58] PATUSHENKO, V. F.; CHIZMADZHEV, Y. A.; ARAKELYAN, V. B. Electric breakdown of bilayer lipid membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 53-62, 1979.
- [59] PATUSHENKO, V. F.; CHIZMADZHEV, Y. A.; ARAKELYAN, V. B. Electric breakdown of bilayer lipid membranes IV. Consideration of the kinetic stage in the case of the single-defect membrane, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 71-79, 1979.
- [60] CHIZMADZHEV, Y. A.; ARAKELYAN, V. B.; PATUSHENKO, V. F. Electric breakdown of bilayer lipid membranes III. Analysis of possible mechanisms of defect origination, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 63-70, 1979.
- [61] ARAKELYAN, V. B.; CHIZMADZHEV, Y. A.; PATUSHENKO, V. F. Electric breakdown of bilayer lipid membranes V. Consideration of the kinetic stage in the case of the membrane containing an arbitrary number of defects, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 81-87, 1979.
- [62] PATUSHENKO, V. F.; ARAKELYAN, V. B.; CHIZMADZHEV, Y. A. Electric breakdown of bilayer lipid membranes VI. A stochastic theory taking into account the processes of defect formation and death: Membrane lifetime distribution function, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 89-95, 1979.
- [63] PATUSHENKO, V. F.; ARAKELYAN, V. B.; CHIZMADZHEV, Y. A. Electric breakdown of bilayer lipid membranes VII. A stochastic theory taking into account the processes of defect formation and death: Statistical properties, *Bioelectrochemistry*, v. 6, p. 97-104, 1979.
- [64] BENZ, R.; BECKERS, F.; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study, *Journal of Membrane Biology*, v. 48, p. 181-204, 1979.

- [65] WEAVER, J. C.; MINTZER, R. A. Decrease bilayer stability due to transmembrane potentials. *Physics Letters A*, v. 86, p. 57-59, 1981.
- [66] GLASER, R. W.; LEIKIN, S. L.; CHERNOMORDIK, L. V.; PASTUSHENKO, V. F.; SOKIRKO, A. I. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 940, p. 275-287, 1988.
- [67] CHERNOMORDIK, L. V. Electropores in lipid bilayers and cell membranes. In: _____. *Guide to electroporation and electrofusion*. 1. ed. San Diego: Academic Press Inc., 1992. p. 63-76.
- [68] SAULIS, G.; VANSLAUSKAS, M. S. Cell electroporation: Part 1. theoretical simulation of the process of pores formation in a cell, *Bioelectrochemistry*, v. 32, p. 221-235, 1993.
- [69] DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling electroporation in a single cell. i. effects of field strength and rest potential, *Biophysical Journal*, v. 77, p. 1213-1224, 1999.
- [70] NEUMANN, E.; KAKORIN, S.; TOENSING, K. Mini-review: Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes, *Bioelectrochemistry*, v. 48, p. 3-16, 1999.
- [71] JOSHI, R. P.; HU, Q.; SCHOENBACK, K. H. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses, *Physical Review E*, v. 65, p. 041920-1-041920-8, 2002.
- [72] LISTER, J. Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes, *Physics Letters A*, v. 53, p. 193-194, 1975.
- [73] NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. *Physical Review E*, v. 59, p. 3471-3482, 1999.
- [74] PASTUSHENKO, V. F.; CHIZMADZHEV, Y. A.; ARAKELYAN, V. B. Stabilization of conducting pores in BLM by electric current, *General Physiology and Biophysics*, v. 1, p. 43-52, 1982.
- [75] BARNETT, A.; WEAVER, J. C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electric breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes, *Bioelectrochemistry*, v. 25, p. 101-117, 1991.

- [76] RAMOS, A., SUZUKI, D. O. H., MARQUES, J. L. B. Numerical simulation of electroporation in spherical cells, *Artificial Organs*, v. 28, p. 357-361, 2004.
- [77] RAMOS, A. Effects of the electroporation in the field calculation in biological tissues, *Artificial Organs*, v. 29, p. 510-513, 2005.
- [78] STEWART, D. A.; GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. Transport lattice approach to describing cell electroporation: use of a local asymptotic model. *IEEE Transactions on plasma science*, v. 32, p. 1696-1708, 2004.
- [79] NEU, J. C.; SMITH, K. C.; KRASSOWSKA, W. Electrical energy required to form large conducting pores, *Bioelectrochemistry*, v. 60, p. 107-114, 2003.
- [80] LEVITT, D. G. Electrostatic calculations for an ion channel. I. Energy and potential profiles and interactions between ions, *Biophysical Journal*, v. 22, p. 209-219, 1978.
- [81] JORDAN, P. C. Electrostatic modeling of ion pores, *Biophysical Journal*, v. 39, p. 157-164, 1982.
- [82] KUYUCAK, S.; HOYLES, M.; CHUNG, S. H. Analytical solutions of poisson's equation for realistic geometrical shapes of membrane ion channels, *Biophysical Journal*, v. 74, p. 22-36, 2003.
- [83] KINOSITA K.; HIBINO, M.; ITOH, H.; SHIGEMORI, M.; HIRANO, K.; KIRINO, Y.; HAYAKAWA, T. Events of membrane electroporation visualize on a time scale from microsecond to seconds. In: _____. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1. ed. San Diego-California: Academic Press, 1992, p. 29-46.
- [84] KINOSITA, K.; ASHIKAWA, I.; SAITA, N.; YOSHIMURA, H.; ITOH, H.; NAGAYAMA, K.; IKEGAMI, A. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope, *Biophysical Journal*, v. 53, p. 1015-1019, 1988.
- [85] PLIQUETT, U.; ELEZ, R.; PIIPER, A.; NEUMANN, E. Electroporation of subcutaneous tumors by rectangular and trapezium high voltage pulses, *Bioelectrochemistry*, v. 62, p. 83-93, 2004.
- [86] DAVALOS, R. V.; RUBINSKY, B.; OTTEN, D. M. A feasibility study for electrical impedance tomography as a means to monitor tissue electroporation for molecular medicine, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 49, p. 400-403, 2002.

- [87] ABIDOR, I. G.; LI, L. -H.; HUI, S. W. Studies of cell pellets: II. Osmotic properties, electroporation, and related phenomena: membrane interactions, *Biophysical Journal*, v. 67, p. 427-435, 1994.
- [88] KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Voltage-induced changes in the conductivity of erythrocyte membranes, *Biophysical Journal*, v. 24, p. 373-375, 1978.
- [89] KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Voltage-induced conductance in human erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 554, p. 479-497, 1979.
- [90] PAVLIN, M.; LEBEN, V.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation in dense cell suspension – theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 12-23, 2007.
- [91] FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P. Dielectric properties of tissues. In:_____. *Handbook of biological effects of electromagnetic fields*. 1. ed. New York: CRC, 1996, p. 25-102.
- [92] OHSHIMA, H. Electrical conductivity of a concentrated suspension of spherical colloidal particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 212, p. 443-448, 1999.
- [93] CARRIQUE, F.; ARROYO, F. J.; DELGADO, A. V. Electrokinetics of concentrated suspensions of spherical colloidal particles: effect of a dynamic Stern layer on electrophoresis and DC conductivity, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 243, p. 351-361, 2001.
- [94] BRAUNSTEIN, J.; ROBBINS G.D. Electrolytic conductance measurements and capacitive balance, *Journal of Chemistry Education*, v. 48, p. 52-59, 1971.
- [95] PUC, M.; ČOROVIĆ S.; FLISAR K.; PETKOVŠEK, M.; NASTRAN, J.; MIKLAVČIČ, D. Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electroporation devices, *Bioelectrochemistry*, v. 64, p. 113-124, 2004.
- [96] KINOSITA, K.; TSONG, T.Y. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 471, p. 227-242, 1977.
- [97] ASAMI, K.; TAKAHASHI, Y.; TAKASHIMA, S. Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1010, p. 49-55, 1989.

- [98] MILANICK, M. A.; HOFFMAN, J. F.; Ion transport and volume regulation in red blood cells. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 488, p. 174-186, 1986.
- [99] KRUSKAL, W. H.; WALLIS, A. W. Use of ranks in one-criterion variance analysis, *Journal of the American Statistical Association*, v. 47, p. 583–621, 1952.
- [100] MOTTA, V. T. *Bioestatística*. 2. ed. Caxias do Sul-RS: EDUCS, 2006.
- [101] ZANG., S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 15, p. 273-282, 2000.
- [102] TEKTRONIX, INC. *Instructions – A622, 100 Amp AC/DC Current Probe*. Beaverton, USA.
- [103] TEKTRONIX, INC. *THS 720 TekScope™ User Manual*. Beaverton, USA.
- [104] ABNT, INMETRO. *Guia para a expressão da incerteza de medição 3ª edição brasileira em língua portuguesa*. Rio de Janeiro, 2003.
- [105] PAVLIN, M.; LEBEN, V.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation in dense cell suspension – Theoretical and experimental analysis of ions diffusion and cell permeabilization, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 12-23, 2007.
- [106] LOSTE, F.; EYNARD, N.; TEISSIÉ, J. Direct monitoring of the field strength during electropulsion, *Bioelectrochemistry*, v. 47, p. 119-127, 1998.
- [107] HEIMBURG, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition, *Biophysical Journal*, v. 78, p. 1154-1165, 2000.
- [108] GIMSA, J.; SCHNELLE, T. H.; ZECHEL, G.; GLASER, R. Dielectric spectroscopy of human erythrocytes: investigations under the influence of nystatin, *Biophysical Journal*, v. 66, p. 1244-1253, 1994.
- [109] YAARI, A. Mobility of human red blood cells of different age group in an electric field, *Blood*, v. 33, p. 159-163, 1969.
- [110] VAN DE WAL, A.; MINOR, M.; NORDE, W.; ZEHNDER, A. J. B.; LYKLEMA, J. Conductivity and dielectric dispersion of gram-positive bacterial cells, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 186, p. 71-79, 1997.
- [111] ADAMSON, A. W.; GAST, A. P.; 1997. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [112] TSONG, T. Y. On electroporation of cell membranes and some related phenomena, *Bioelectrochemistry*, v. 24, p. 271-295, 1990.

- [113] SUKHAREK, S. I.; KLENCHIN, V. A.; SEROV, S. M.; CHERNOMORDIK, L. V.; CHIZMADZHEV, Y. A. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells, *Biophysical Journal*, v. 63, p. 1320-1327, 1992.
- [114] SOWERS, A. E.; LIEBER, M. R. Electropores in individual erythrocytes ghosts: diameters, lifetimes, numbers, and locations, *Fed. Eur. Biochem. Soc. (FEBS) Lett.*, v. 205, p. 179-184, 1986.
- [115] HIBINO, M.; MASAYA, S.; ITOH, H.; NAGAYAMA, K.; KINOSITA, K. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophysical Journal*, v. 58, p. 209-220, 1991.
- [116] PAVLIN, M.; MIKLAVČIČ, D. Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: a theoretical analysis, *Biophysical Journal*, v. 85, p. 719-729, 2003.
- [117] KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell, *Biophysical Journal*, v. 92, p. 404-417, 2007.
- [118] STEWART JR., D. A.; GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. Transport lattice approach to describing cell electroporation: use of local asymptotic model, *IEEE Transactions on Plasma Science*, v. 32, p. 1696-1708, 2004.
- [119] HOYLES, M.; KUYUCAK, S.; CHUNG, S. Energy barrier presented to ions by vestibule of the biological membrane channel, *Biophysical Journal*, v. 70, p. 1628-1642, 1996.
- [120] ARNOLD, W. M.; SCHMUTZLER, R. K.; SCHMUTZLER, A. G.; VAN DER VEN, H.; AL-HASANI, S.; KREBS, D.; ZIMMERMANN, U. Electro-rotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 904, p. 454-464, 1987.
- [121] PUCIHAR G.; KOTNIK T.; KANDUŠER M.; MIKLAVČIČ D. The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro, *Bioelectrochemistry*, v. 54, p. 107-115, 2001.
- [122] KAKORIN S.; NEUMANN E. Ionic conductivity of electroporated lipid bilayer membrane, *Bioelectrochemistry*, v. 56, p.163-166, 2002.

- [123] TEKLE, E.; ASTUMIAN, R. D.; FRIAUF, W. A.; CHOCK, P. B. Asymmetric pore distribution and loss membrane lipid in electroporated DOPC vesicles, *Biophysical Journal*, v. 81, p. 960-968, 2001.
- [124] SOWERS, A. E. Fusion events and nonfusion contents mixing events induced in erythrocyte ghosts by and electric pulse, *Biophysical Journal*, v. 54, p. 619-626, 1988.
- [125] KNISLEY, S. B., GRANT, A. O. Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 27, p. 1111-1122, 1995.
- [126] ASHIHARA, T.; TRAYANOVA, N. A. Asymmetry in membrane responses to electric shocks: insights from bidomain simulations, *Biophysical Journal*, v. 87, p. 2271-2282, 2004.
- [127] CHANG, D. C.; REESE, T. S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophysical Journal*, v. 58, p. 1-12, 1990.
- [128] MILLER, J.; DOWER, W. J.; TOMPKINS, L. S. High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of campylobacter jejuni with plasmid DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, p. 856-860, 1988.
- [129] SUZUKI, D. O. H.; RAMOS, A.; MARQUES, J. L. B. Modeling environment for numerical simulation of applied electric fields on biological cells, *Electromagnetic Biology and Medicine*, v. 26, p. 239-250, 2007.
- [130] RENKIN, E. M. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes, *Journal of General Physiology*, v. 38, p. 225-243, 1954.
- [131] WEAVER, J. C.; BARNETT, A. Progress toward a theoretical model of electroporation mechanism: membrane electrical behavior and molecular transport. In: _____. *Guide to electroporation and electrofusion*. 1. ed. San Diego: Academic Press Inc, 1992. p. 91-117.
- [132] FREEMAN, S. A.; WANG, M. A.; WEAVER, J. C. Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation, *Biophysical Journal*, v. 28, p. 206-223, 1994.
- [133] PARSEGIAN, A. Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solution to four relevant electrostatic problems, *Nature*, v. 221, p. 844-846, 1969.

- [134] VOLKO, A. G.; PAULA, S.; DEAMER, D. W. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers, *Bioelectrochemistry*, v. 42, p. 153-160, 1997.
- [135] BARRY, P.; LYNCH, J. Liquid junction potential and small cells effects in patch-clamp analysis, *Journal of Membrane Biology*, v. 121, p. 101-117, 1991.
- [136] TOVAR, O.; TUNG, L. Electroporation of cardiac cell membranes with monophasic or biphasic rectangular pulses, *Pacing and Clinical Electrophysiology*, v. 14, p. 1887-1892, 1989.
- [137] CHANG, D. C. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field”, *Biophysical Journal*, v. 56, p. 641-652, 1989.