

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 857

**ESTUDO SOBRE ELETROPORAÇÃO DE CÉLULAS BIOLÓGICAS COM PULSOS
DE CURTA DURAÇÃO E ALTA INTENSIDADE**

William Perez Dias de Figueiredo

DATA DA DEFESA: 27/02/2015

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

**ESTUDO SOBRE ELETROPORAÇÃO DE CÉLULAS BIOLÓGICAS
COM PULSOS DE CURTA DURAÇÃO E ALTA INTENSIDADE**

William Perez Dias de Figueiredo

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientador: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Belo Horizonte - MG

Fevereiro de 2015

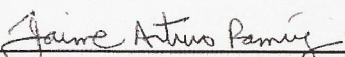
"Estudo Sobre Eletroporação de Células Biológicas Com Pulsos de Curta Duração e Alta Intensidade"

William Perez Dias de Figueiredo


Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015.

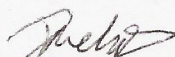
Por:



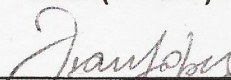
Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez
DEE (UFMG) - Orientador



Prof. Dr. Elizabeth Ribeiro Silva
Departamento de Morfologia (ICB - UFMG)



Prof. Dr. Danilo Barbosa Melges
DEE (UFMG)



Prof. Dr. Ivan José da Silva Lopes
DEE (UFMG)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais Ivo e Shirley e às minhas irmãs Lívian e Liliane, pelo apoio e incentivo que tornaram possível chegar até aqui.

Ao meu orientador, prof. Jaime Arturo Ramírez, pela oportunidade dada, pela dedicação, paciência e colaboração ao me guiar no caminho até a conclusão deste trabalho.

À minha coorientadora, profa. Elizabeth Ribeiro da Silva, pela parceria, dedicação, paciência e oportunidade de aprendizado em biologia para um aluno de engenharia.

À Vanessa Freitas, cujo empenho e dedicação foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos professores que me ajudaram nessa caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Eletromagnetismo Aplicado - LEA - e do laboratório Conceição Machado, pela colaboração e companheirismo, em especial à Maísa Oliveira, Rafael Gomes e Reinaldo Azevedo.

Aos pesquisadores de outros laboratórios que gentilmente me emprestaram materiais e equipamentos.

Aos meus amigos, pelo apoio, companheirismo e momentos de distração e diversão, em especial ao Thiago Machado e Rafael Valentim.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq -, pelo apoio financeiro.

A todos os que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigado.

"Há uma teoria que indica que sempre que qualquer um descobrir exatamente o que, para que e porque o universo está aqui, o mesmo desaparecerá e será substituído imediatamente por algo ainda mais bizarro e inexplicável... Há uma outra teoria que indica que isto já aconteceu."

Douglas Adams

Resumo

Quando células biológicas são expostas a um pulso de elevado campo elétrico e curta duração, suas membranas sofrem perturbações que resultam em um aumento da sua permeabilidade a moléculas para as quais elas são naturalmente impermeáveis. Esse aumento é atribuído à formação de poros na membrana.

Os objetivos desse trabalho foram construir um eletroporador portátil de células biológicas com pulsos na faixa de 100V a 900V de amplitude e $2\mu\text{s}$ a $100\mu\text{s}$ de duração e realizar estudos de viabilidade celular (sobrevivência das células ao tratamento) e avaliação do efeito desses pulsos sobre a entrada de moléculas fluorescentes em células LLC-MK2.

O eletroporador foi concebido em três módulos: gerador de alta tensão c.c., módulo de controle e um módulo de chaveamento em alta tensão. O gerador de alta tensão c.c. foi construído com dobradores capacitivos, o módulo de controle foi construído com um PIC18F4550 e *drivers* para controle de dispositivos semicondutores de potência e o módulo de chaveamento em alta tensão foi construído com capacitores e um IGBT de potência.

O circuito eletroporador foi utilizado para gerar pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$ com duração variável de $2\mu\text{s}$ a $100\mu\text{s}$ e pulsos de $100\mu\text{s}$ com amplitude variável entre $1\text{kV}/\text{cm}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ em testes de viabilidade e eletroporação. Utilizou-se cubetas para eletroporação com distância de 1mm entre os eletrodos para submeter células LLC-MK2 em suspensão aos pulsos gerados.

Os ensaios de viabilidade foram feitos utilizando a técnica colorimétrica com MTT. Nos testes de eletroporação, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo para avaliar a entrada de moléculas de iodeto de propídio e FITC-Dextran de 20kDa (6,6nm de diâmetro) e 2MDa (54nm de diâmetro) no citoplasma das células. As células foram submetidas aos pulsos elétricos em meio no qual as moléculas de teste foram previamente adicionadas. Também foi realizado um experimento no qual as células foram submetidas aos pulsos em meio sem moléculas de teste e, 30 minutos depois, o iodeto de propídio foi adicionado à suspensão de células.

O eletroporador foi capaz de gerar pulsos que causaram diferenças significati-

vas tanto no percentual de células marcadas com fluoróforos quanto na viabilidade celular, com desempenho satisfatório.

Nos testes de viabilidade, observou-se que os pulsos de $100\mu\text{s}$ e $5\text{kV}/\text{cm}$ ou $9\text{kV}/\text{cm}$, ou $50\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ reduziram a viabilidade para valores de até 20%, revelando que esses pulsos são agressivos para o tipo celular estudado.

A proporção de células marcadas com iodeto previamente adicionado ao meio de eletroporação chegou a percentuais de 80% para pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$. Para FITC-Dextran, os percentuais de células marcadas foram menores, variando entre 20% e 30% para o mesmo tipo de pulso, sem diferença entre os tamanhos de 20kDa e 2MDa.

Após um intervalo de 30 minutos, as células continuaram permeáveis ao iodeto de propídio, com diminuição percentual de células marcadas entre 25% e 30% em relação às células que foram expostas aos pulsos com iodeto previamente adicionado à suspensão de células. A falta de significância estatística (p maior que 0,05) no efeito desse intervalo, para pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$, indica que esse pulso teria efeitos mais duradouros.

O aumento da amplitude de pulsos de $100\mu\text{s}$ diminuiu a viabilidade celular e aumentou as médias percentuais de células marcadas com moléculas fluorescentes. Já o aumento da duração de pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$ causou diminuição da viabilidade celular e aumento das médias percentuais de células marcadas com iodeto de propídio, mas não teve efeito sobre as médias percentuais de células marcadas com FITC-Dextran.

Entre os dois tamanhos de FITC-Dextran, os percentuais de células marcadas foram estatisticamente similares, se diferenciando do percentual de células marcadas com iodeto de propídio.

Observou-se que os pulsos utilizados diminuem muito a viabilidade celular ou são ineficientes para permitir a entrada das moléculas de teste no citoplasma das células. Um baixo percentual de células marcadas com FITC-Dextran foi obtido. Assim, os pulsos estudados seriam mais indicados para aplicações nas quais uma alta mortalidade celular associada à inserção de pequenas moléculas no citoplasma das células é desejada.

Palavras-chave: eletroporação, membrana celular, pulso elétrico, citometria de fluxo, transporte molecular.

Abstract

When biological cells are exposed to a high amplitude and short duration electric field, its membranes are disturbed and it results in an increase in the membrane permeability to molecules to which they're naturally impermeable. This change in permeability is currently associated with pores formation in the membrane.

The aim of this work was to build an electroporator of biological cells, capable of generating pulses from $2\mu\text{s}$ to $100\mu\text{s}$ in duration and amplitudes ranging from 100V to 900V, to perform cell viability experiments (cell survival to the treatment) and evaluate the effect of these pulses in the entry of fluorescent molecules in LLC-MK2 cells.

The electroporator consists of three modules: a high voltage d.c. generator, a control module and a high voltage switching module. The high voltage generator was built with capacitor voltage doublers, the control module uses a PIC18F4550 and drivers to control power semiconductor devices and the high voltage switching module was built with capacitors and a power IGBT.

The electroporator circuit was used to generate $1\text{kV}/\text{cm}$ to $9\text{kV}/\text{cm}$ pulses with $100\mu\text{s}$ duration and $2\mu\text{s}$ to $100\mu\text{s}$ pulses with $9\text{kV}/\text{cm}$ amplitude in viability and electroporation tests. Electroporation cuvettes with 1mm distance between the electrodes were used to submit a suspension of LLC-MK2 cells to the pulses.

Viability assays were made using the MTT colorimetric technique. In the electroporation tests, flow cytometry was used to evaluate the amount of propidium iodide and FITC-Dextran of 20kDa (6,6nm diameter) and 2MDa (54nm diameter) into the cells. Cells were submitted to the pulses in culture medium with the fluorescent molecules previously added. There was also a test in which cells were submitted to the pulses in medium without the fluorescent molecules and propidium iodide was added 30 minutes after the pulses.

The electroporator was capable of generating pulses that significantly changed the fractions of permeable or dead cells with satisfactory performance.

In the viability tests, it was observed that $100\mu\text{s}$ pulses with amplitudes of

5kV/cm or 9kV/cm and 9kV/cm pulses with duration of 50 μ s decreased the cell viability up to 20%, revealing that these pulses are aggressive to the type of cell used.

The proportion of labeled cells with propidium iodide previously added to the medium reached 80% for 100 μ s and 9kV/cm pulses. The proportion was smaller for FITC-Dextran, reaching 20% to 30% for the same kind of pulse, with no difference between sizes of 20kDa and 2MDa.

After an interval of 30 minutes, cells kept permeable to propidium iodide with a decrease in labeled cell proportion of 25% to 30% compared to the cells submitted to the pulses with propidium iodide previously added to the cell suspension. The lack of statistical significance (p maior que 0,05) of this 30 minutes interval effect for 100 μ s and 9kV/cm pulses indicates that these have a longer effect.

The increase of amplitude for 100 μ s pulses decreased cell viability and increased the proportion of cells labeled with fluorescent molecules. The increase in pulse duration for 9kV/cm pulses decreased cell viability, increased the proportion of cells labeled with propidium iodide but had no effect over the proportion of cells labeled with FITC-Dextran.

The proportion of labeled cells were statistically similar for the two sizes of FITC-Dextran, and different of the proportion of cells labeled with propidium iodide.

It was observed that the pulses used in this work greatly decrease the cell viability or are inefficient to allow the entrance of molecules into the cytoplasm. A low proportion of cells labeled with FITC-Dextran was obtained. Therefore, the pulses used in this work would be indicated for applications in which a high cell death associated with the insertion of small molecules in the cytoplasm is desired.

Keywords: Electroporation, cell membrane, electric pulse, flow cytometry, molecular transport.

Índice

Resumo	iv
Abstract	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviações e siglas	xiv
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivos específicos	3
1.2 Justificativa	4
1.3 Organização da Dissertação	5
2 Revisão Bibliográfica	7
2.1 Eletroporação	7
2.1.1 Verificação experimental	13
2.1.2 Aplicações	16
2.2 Eletroporador	18
2.2.1 Eletroporadores Comerciais	21
2.3 Conclusão	21
3 Materiais e Métodos	24
3.1 Eletroporador	24
3.1.1 Requisitos do Eletroporador	24

3.1.2	Ferramentas e métodos para verificação experimental da eletroporação	25
3.1.3	Implementação	29
3.1.4	Testes	34
3.2	Eletroporação	35
3.2.1	Fundamentação	35
3.2.2	Experimentos de Eletroporação	39
3.2.3	Iodeto de Propídio e FITC-Dextran	41
3.2.4	Análise estatística	42
3.2.5	Conclusão	43
4	Resultados e Discussão	44
4.1	Funcionamento dos Módulos do Eletroporador e Pulsos Gerados .	44
4.1.1	Fonte de Alta Tensão	44
4.1.2	Circuito de controle para chaveamento baseado em MOSFET	45
4.1.3	Circuito de Chaveamento	45
4.2	Efeitos da Eletroporação	52
4.2.1	Efeitos da Eletroporação na Viabilidade Celular	52
4.2.2	Efeitos dos Pulsos Elétricos na Permeabilidade ao Iodeto de Propídio	55
4.2.3	Efeito dos Pulsos na Permeabilidade ao FITC-Dextran . .	63
4.3	Conclusão	71
5	Conclusões e Perspectivas	74
	Referências	77

Lista de Figuras

2.1	Bicamada lipídica e molécula anfipática. (Modificado de Karp (2013))	8
2.2	Representação de uma célula esférica.	10
2.3	Estágios da eletroporação hipotética. A) Membrana sem poros, B) Membrana com poro estável, C) Membrana com poro instável, D) Membrana com poros irreversíveis (Kotnik et al., 2012).	11
2.4	Cubetas para eletroporação (Eppendorf, 2010).	14
2.5	Lâmina com eletrodos de aço inoxidável (Deng et al., 2003).	15
2.6	Microeletrodos e micropipeta (Pakhomov et al., 2009).	15
2.7	Eletrodos a)placas paralelas, b)agulhas em paralelo, c)agulhas em hexagonal. (Giardino et al., 2006).	16
2.8	Efeitos decorrentes da exposição de células a pulsos de campo elétrico intenso e de curta duração (Matsumi, 2009).	16
2.9	Circuito gerador de pulsos com capacitor e chave.	18
2.10	Eletroporador com dispositivo de chaveamento eletrônico.	19
2.11	Gerador de pulsos Blumlein (modificado de (Angelis et al., 2008)).	20
3.1	a) representação de um MOSFET. b)Característica I-V (Mohan, 2012).	25
3.2	a) Símbolo do IGBT, b) Características i-v (Mohan, 2012).	26
3.3	Dobrador de tensão capacitivo (Boylestad and Nashelsky, 2004).	28
3.4	Dobrador de tensão capacitivo no semi-ciclo positivo (Boylestad and Nashelsky, 2004).	28

3.5	Corrente no dobrador de tensão no semi-ciclo negativo (Boylestad and Nashelsky, 2004).	29
3.6	Módulos do eletropermeabilizador.	29
3.7	Circuito da fonte de alta tensão c.c.	30
3.8	Diagrama de ligação da fonte de alta tensão c.c. por meio de um transformador de isolamento eum autotransformador regulável. . .	31
3.9	Circuito do driver de MOSFET.	32
3.10	Circuito de controle com driver de MOSFET.	32
3.11	Circuito de chaveamento baseado em IGBT.	33
3.12	Circuito de chaveamento e descarregamento baseado em IGBT. .	33
3.13	Eletroporador portátil na bancada do laboratório.	34
3.14	Placa de cultura 96 poços. Adaptada de Freshney (2007)	36
4.1	Pulso de $2\mu s$ e 900V aplicado a uma carga resistiva de 25Ω	45
4.2	Pulso de $50\mu s$ e 900V aplicado em carga resistiva de 25Ω	46
4.3	Pulso de $100\mu s$ e 900V aplicado a carga resistiva de 25Ω	46
4.4	Pulso de $100\mu s$ e 100V aplicado a carga resistiva de 25Ω	47
4.5	Pulso de $100\mu s$ e 500V aplicado a carga resistiva de 25Ω	47
4.6	Pulso de $2\mu s$ - 900V em carga biológica.	48
4.7	Pulso de $50\mu s$ - 900V em carga biológica.	49
4.8	Primeiros $4\mu s$ do pulso de $50\mu s$ e 900V.	49
4.9	Pulso de $100\mu s$ - 900V em carga biológica.	49
4.10	Pulso de $100\mu s$ - 500V em carga biológica.	50
4.11	Pulso de $100\mu s$ - 100V em carga biológica.	51
4.12	Valores do percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle para pulsos unitários de $100\mu s$ e variação da amplitude entre $1kV/cm$ e $9kV/cm$	52
4.13	Valores do percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle para pulsos unitários de $9kV/cm$ e variação da duração entre $2\mu s$ e $100\mu s$	54

4.14	Histograma de grupo controle com iodeto de propídio com regiões de células marcadas e região de células danificadas e histograma de células lisadas com IP.	56
4.15	Histograma de células com iodeto de propídio, pulso de $100\mu s$ - $9kV/cm$ com região de células consideradas marcadas.	56
4.16	Percentuais de células marcadas com iodeto de propídio com pulsos unitários de $100\mu s$ e variação da amplitude entre $1kV/cm$ e $9kV/cm$. IP adicionado antes da exposição aos pulsos. A amplitude de $0kV/cm$ é referente ao grupo controle.	57
4.17	Percentuais de células marcadas com iodeto de propídio com pulsos unitários de $9kV/cm$ e variação da duração entre $2\mu s$ e $100\mu s$. IP adicionado antes da exposição aos pulsos. O tempo de $0\mu s$ é referente ao grupo controle	58
4.18	Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $100\mu s$ e $9kV/cm$	60
4.19	Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $100\mu s$ e $5kV/cm$	61
4.20	Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $50\mu s$ e $9kV/cm$	62
4.21	Histograma do grupo controle com limite de células consideradas marcadas.	63
4.22	Percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de $20kDa$ com pulso de $100\mu s$ e amplitude entre $1kV/cm$ e $9kV/cm$	64
4.23	Percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de $20kDa$ e pulso de $9kV/cm$ e duração entre $2\mu s$ e $100\mu s$	65
4.24	Média dos percentuais de células marcadas com FITC-Dextrano de $2MDa$ com pulsos unitários de $100\mu s$ e amplitude entre $1kV/cm$ e $9kV/cm$ obtidos com três repetições do experimento	67
4.25	Percentual de células marcadas com pulso de $9kV/cm$ e duração variável entre $2\mu s$ e $100\mu s$	68

4.26	Percentuais de células marcadas em relação ao tamanho da molé- cula utilizada, com pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$	69
4.27	Microscopia de fluorescência com FITC-Dextran (Verde) e marca- ção dos núcleos celulares com DAPI (Azul): a) Controle no filtro DAPI. b) Controle no filtro FITC. c) Sobreposição das imagens a e b. d) $100\mu\text{s}$ - $9\text{kV}/\text{cm}$ com filtro DAPI e) $100\mu\text{s}$ - $9\text{kV}/\text{cm}$ com filtro FITC f) Sobreposição das imagens de d e e.	72

Lista de Tabelas

3.1	Relação de tamanhos para FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, 1997) (Consultancy, 2010)	37
3.2	Pulsos utilizados nos experimentos de eletroporação.	39

Lista de Abreviações e Siglas

ANOVA: *Análise de variância*

C.C.: *Corrente contínua*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: *Ácido desoxirribonucleico*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FSC: *Front scatter*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

HeLa: *Linhagem de células de câncer cervical*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

IGBT: *Insulated gate bipolar transistor*

LEA: *Laboratório de Eletromagnetismo Aplicado*

LED: *Light Emmiting Diode*

MIPS: *Milhões de instruções por segundo*

MOSFET: *Metal-Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

MTT-F: *MTT-Formazan*

UFMG: *Universidade Federal de Minas Gerais*

PBS: *Tampão fosfato-salina*

RAM: *Random Access Memory*

ROM: *Read-only memory*

RPM: *Rotações por minuto*

SSC: *Side scatter*

TBJ: *Transistor bipolar de junção*

USB: *Universal Serial Bus*

Capítulo 1

Introdução

A eletroporação consiste em um aumento da permeabilidade de uma membrana lipídica em decorrência da exposição a um campo elétrico intenso e de curta duração. Esse aumento permite a passagem de substâncias para as quais a membrana é naturalmente impermeável (como íons e moléculas grandes) e resulta da formação de poros aquosos na membrana (Stampfli, 1958, Weaver and Chizmadzhev, 1996, Kotnik et al., 2012).

A técnica da eletroporação permite introduzir substâncias no interior das células, como os corantes iodeto de propídio (Pakhomov et al., 2007), amarelo de lúcifer (Kotnik et al., 2010b) e o íon tálio (Pakhomov et al., 2009), ou extrair substâncias, como a enzima β -D-galactosidase (Ramos and Schneider, 2006).

Quando uma célula é exposta a um campo elétrico, o potencial transmembrana de repouso é alterado e, a partir de um certo limite, a membrana se torna permeável. Quando a permeabilidade é temporária, a eletroporação é dita reversível e, cessado o pulso, a célula é capaz de se recuperar, selando novamente a sua membrana e restabelecendo o seu equilíbrio eletroquímico (Kotnik et al., 1997). Pulsos mais intensos levam o potencial de membrana para um nível no qual a eletroporação é permanente, sendo chamada de eletroporação irreversível, resultando na morte da célula. Um pulso não tão intenso, mas demasiadamente longo, pode ter os mesmos efeitos e levar à morte celular, ou seja, tanto a intensidade quanto a duração do pulso podem levar a um processo de eletroporação irreversível (Kotnik et al., 2012).

A técnica da eletroporação se mostra promissora em diversos campos da biologia e da medicina, como por exemplo, na eletroquimioterapia (Belehradek et al., 1993), eletrotransferência de DNA (Hojman, 2010), administração e extração transdérmica de substâncias (Ching et al., 2012), eletroesterilização (Katsuki et al., 2010) e ablação de tecidos (Hong et al., 2009).

Vários fatores podem interferir na passagem de moléculas através da membrana e na mortalidade celular associadas à eletroporação, como o tipo celular, o meio de cultura, a temperatura e pressão, e também características do pulso elétrico, como intensidade, duração, frequência, se unipolar ou bipolar e a sua forma. Assim, estabelecido o tipo celular e o seu ambiente, os fatores de principal influência na eletroporação ficam associados às características do pulso elétrico.

Até o momento, não há relato de observação visual dos poros gerados na membrana celular. No entanto, é possível testar a permeabilidade da membrana ao verificar a entrada ou saída de certas substâncias das células. Entre as moléculas utilizadas, pode-se citar o DNA, que modifica a expressão de proteínas, a bleomicina, que provoca a morte da célula, o iodeto de propídio, que emite fluorescência ao se ligar ao DNA, e FITC-Dextran, um conjugado da molécula FITC fluorescente com um polímero dextran que pode ser produzido em tamanhos distintos, o que permite estimar o tamanho do poro.

Apesar da utilidade da eletroporação na biologia e medicina, não há consenso sobre a correlação entre a amplitude, duração e forma dos pulsos, e os efeitos como o tamanho e a duração do poro, o que motiva a realização de mais estudos sobre o tema.

Dois requisitos são fundamentais para a realização de estudos experimentais sobre eletroporação. O primeiro diz respeito à geração do campo elétrico e o segundo, à verificação experimental do fenômeno.

Em relação à geração do campo elétrico, é necessário que se tenha um equipamento capaz de gerar os pulsos desejados, chamado de eletroporador. A tensão gerada deve resultar em um campo elétrico elevado, capaz de alterar as propriedades elétricas da membrana celular.

Quanto à verificação experimental da eletroporação, podem ser avaliadas as

modificações produzidas por plasmídeos inseridos na célula, a sobrevivência de células sob a ação de fármacos como a bleomicina, ou a passagem de corantes fluorescentes para o citoplasma.

Neste trabalho, estudou-se a relação entre duração e intensidade de pulsos elétricos e o tamanho de poros gerados na membrana de células em suspensão. Para tal, foram escolhidas moléculas fluorescentes de diferentes tamanhos (iodeto de propídio e FITC-Dextran), e foram utilizados microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para a verificação da entrada dessas moléculas em células de uma linhagem epitelial de rim de macaco, LLC-MK2.

1.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo implementar um dispositivo portátil para geração de pulsos na faixa de microssegundos de duração e centenas de volts de amplitude e utilizá-lo para analisar o efeito de pulsos de diferentes durações e amplitudes na passagem de moléculas fluorescentes através da membrana plasmática de células isoladas.

1.1.1 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Implementar um dispositivo portátil capaz de gerar pulsos de $2\mu\text{s}$ a $100\mu\text{s}$ de duração e que resulte em campos elétricos de 1kV/cm a 9kV/cm de amplitude;
- Avaliar a permeabilidade da membrana plasmática ao iodeto de propídio ($1,2\text{nm}$) em células LLC-MK2 (Célula de fibroblasto de rim de macaco Rhesus) isoladas submetidas a pulsos do item anterior;
- Avaliar a permeabilidade da membrana plasmática a FITC-dextran de $6,6\text{nm}$ e 54nm de diâmetro em células LLC-MK2 isoladas submetidas a pulsos descritos no primeiro item;

- Comparar o percentual de células LLC-MK2 permeabilizadas em relação ao tamanho das moléculas utilizadas;
- Analisar a permeabilidade das células LLC-MK2 ao iodeto de propídio trinta minutos após a aplicação dos pulsos descritos no primeiro item;
- Avaliar a viabilidade(sobrevivência) de células LLC-MK2 submetidas a pulsos descritos no primeiro item;

1.2 Justificativa

A inserção de moléculas no interior de células é amplamente utilizada no estudo de fenômenos biológicos. No entanto, a membrana celular oferece uma barreira natural a íons, moléculas polares e moléculas grandes. A eletroporação tem sido amplamente utilizada para permeabilizar a membrana plasmática e facilitar a passagem de fármacos, plasmídeos e outras moléculas.

A eletroporação reversível é uma técnica cujos efeitos finais são dependentes da substância cuja passagem foi facilitada. No tratamento de câncer, por exemplo, deseja-se que os quimioterápicos entrem nas células doentes, matando essas células. Na terapia gênica, insere-se plasmídeos de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) com o objetivo de que as células passem a produzir anticorpos, insulina, moléculas sinalizadoras como GFP (Green Fluorescent Protein), entre outras.

Há aplicações, no entanto, em que se deseja que os próprios pulsos matem as células. Nesses casos, pode-se ajustar as características dos pulsos para que ocorra a eletroporação irreversível. Na ablação de tecidos, por exemplo, deseja-se que células de uma área de um tecido morram, e pode-se obter com a eletroporação os mesmos resultados da ablação térmica sem os efeitos colaterais como bolhas e danos a tecidos vizinhos. A eletroporação irreversível também pode ser uma alternativa para a esterilização química, matando as células e minimizando a alteração do meio que ocorreria com a adição do químico para esterilização.

Nesse contexto, é importante que se estude a relação entre as características dos pulsos elétricos, como duração e amplitude, e poros produzidos na membrana

celular, o que permite ajustar as características do pulso para cada aplicação ou tamanho de molécula desejado.

Existem alguns estudos que estimam o tamanho de poros produzidos na membrana plasmática de células por meio de eletroporação (He et al., 2007, Nesin et al., 2011, Saulis and Saulè, 2012). No entanto, esses estudos utilizam moléculas pequenas, com tamanho máximo de 1nm e pulsos mais curtos ou menos intensos que os utilizados no presente trabalho. A faixa de $2\mu\text{s}$ a $100\mu\text{s}$ de duração é pouco explorada na literatura Weaver et al. (2012), sendo os pulsos mais utilizados mais curtos (ns) ou mais longos (ms). Assim, este estudo pretende contribuir para um melhor entendimento da relação entre as características de pulsos nessa faixa de duração e os efeitos tanto na passagem de moléculas de diferentes diâmetros através da membrana plasmática de células isoladas quanto na viabilidade celular.

A maioria dos eletroporadores disponíveis no mercado oferece pouca flexibilidade quanto às características dos pulsos gerados ou à utilização em diferentes aplicações. Assim, o desenvolvimento de um dispositivo de eletroporação é de interesse do Laboratório de Eletromagnetismo Aplicado (LEA), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), já que o domínio da tecnologia envolvida permite que o dispositivo seja adaptado para diferentes aplicações em pesquisas relacionadas a esse campo do conhecimento.

1.3 Organização da Dissertação

Este trabalho está organizado em cinco capítulos, descritos sucintamente a seguir.

O capítulo 2 apresenta uma revisão sobre eletroporação, abordando as primeiras pesquisas, principais metodologias, aplicações e conclusões de estudos relacionados ao tema. Também aborda os circuitos eletroporadores, discutindo metodologias de construção e suas capacidades, bem como alguns modelos de eletroporadores comerciais.

O capítulo 3, referente a materiais e métodos, consiste de duas seções principais. A primeira delas descreve a implementação do circuito de eletroporação

utilizado neste trabalho. A segunda seção trata da eletroporação e apresenta a descrição dos experimentos executados.

O capítulo 4 apresenta os resultados e discussões referentes ao circuito eletroporador e aos experimentos de eletroporação. Na seção referente ao eletroporador, são apresentados os resultados referentes à implementação dos circuitos e o seu funcionamento, mostrando as formas de ondas geradas. Na segunda seção, são apresentados os resultados dos experimentos com células LLC-MK2, com os histogramas obtidos com citometria de fluxo e imagens de microscopia de fluorescência. Os resultados são discutidos à medida que são apresentados.

O capítulo 5 apresenta as conclusões finais do trabalho e perspectivas para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Este capítulo abrange revisão de bibliografia relacionada a eletroporação. Ele é dividido em duas partes, referentes ao fenômeno da eletroporação e aos circuitos eletroporadores. Na primeira, faz-se uma breve revisão bibliográfica sobre o fenômeno da eletroporação, bem como sua aplicação na área biomédica. Na segunda, descreve-se alguns tipos de eletroporadores e, ao final, faz-se uma descrição de alguns modelos comerciais.

2.1 Eletroporação

A membrana celular é uma estrutura de aproximadamente 5nm de espessura que engloba a células e suas organelas, definindo os limites e estabelecendo ambientes distintos nas organelas, citosol e no meio extracelular. A membrana celular é constituída de proteínas e moléculas lipídicas anfipáticas, ou seja, com uma extremidade polar e uma apolar. Essa característica faz com que esses lipídios, em meio aquoso, se organizem de forma a constituir uma bicamada lipídica de centro apolar e extremidades polares, como a da Figura 2.1 (Karp, 2013).

Devido à natureza hidrofóbica do seu interior, a bicamada lipídica das membranas celulares serve como uma barreira à passagem da maioria das moléculas polares. Essa barreira é importante porque permite que a célula mantenha concentrações diferentes de solutos no citosol, no meio extracelular e em cada organela envolvida por membrana. Quanto menos solúvel em lipídios é uma molécula,

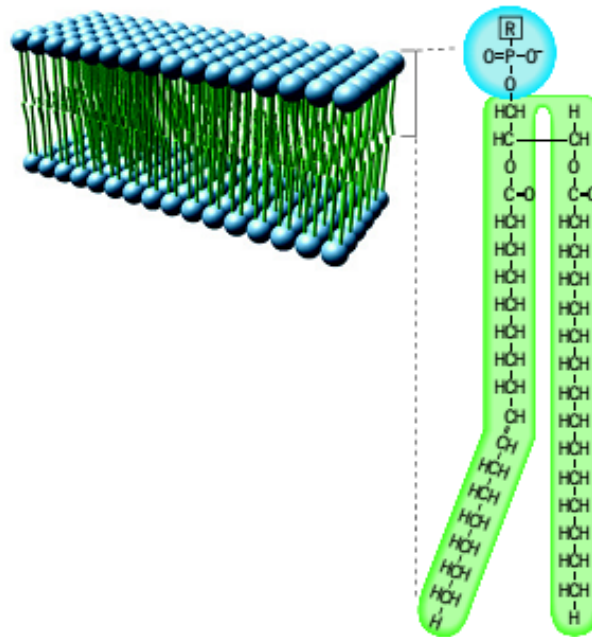


Figura 2.1: *Bicamada lipídica e molécula anfipática. (Modificado de Karp (2013))*

mais difícil será a sua difusão através da bicamada lipídica. Como resultado, pequenas moléculas apolares como O_2 e CO_2 se dissolvem facilmente na bicamada lipídica e, portanto, se difundem facilmente através da mesma. Pequenas moléculas polares sem carga, como água e ureia, também se difundem através da bicamada. Em contraste, as bicamadas lipídicas são fortemente impermeáveis a moléculas carregadas (íons), não importando o seu tamanho (Karp, 2013).

As diferentes concentrações de íons como cálcio, potássio e sódio no citosol, em relação ao meio extracelular, provocam o aparecimento de uma diferença de potencial transmembrana. Esse potencial pode variar de 10mV até pouco mais de 100mV, dependendo do tipo celular e do seu estado fisiológico (Karp, 2013).

Em 1957, Stampfli (1958) observou a diminuição da polarização natural de uma membrana celular submetida a um pulso de elevado campo elétrico, com aumento da sua condutividade. Ao cessar o pulso, a membrana recuperou suas características iniciais. Stampfli registrou que quanto maior o campo elétrico, maior a duração dos efeitos do pulso após o fim do mesmo.

Décadas mais tarde, Sowers and Lieber (1986) observaram a saída de moléculas fluorescentes de fantasmas de eritrócitos expostos a pulsos exponenciais de

700V/mm com tempo de meia-vida de 1,2ms ou sequências de pulsos de 0,6ms de tempo de meia-vida. Independente do tempo do pulso utilizado, foi observado que cada pulso fazia com que a célula perdesse parte de sua fluorescência e pulsos adicionais fizeram com que, eventualmente, a célula perdesse toda a sua fluorescência. Assim, há indícios de que a formação de poros na membrana é reversível.

A partir daí, intensificaram-se os estudos sobre eletropermeabilização, com o desenvolvimento de diversas metodologias para o estudo desse fenômeno, de modelos matemáticos e aplicações em pesquisas e tratamentos médicos.

Devido às características condutoras do citoplasma e meio extracelular, e características isolantes da bicamada lipídica, a membrana celular pode ser modelada eletricamente como um capacitor. Assim, quando a célula é exposta a um campo elétrico, seu potencial de membrana é alterado de acordo com a Equação 2.1, que representa um sistema capacitivo de primeira ordem, onde τ é a constante de tempo da membrana, R é o raio da célula, E é o campo elétrico externo, e θ é o ângulo em relação às linhas de fluxo do campo externo. Nessa equação, considera-se uma célula esférica e desconsidera-se seu potencial de membrana natural (Kotnik et al., 1997).

$$\Delta\Psi_m = 1.5ER \cos(\theta)[1 - e^{-\frac{t}{\tau}}] \quad (2.1)$$

A Figura 2.2 mostra a representação de uma célula esférica de raio R , exposta a um campo elétrico E , com ângulo θ entre o campo elétrico e uma região da membrana.

Para casos em que o pulso elétrico tem duração muito maior que o tempo de carregamento da membrana, a Equação 2.1 pode ser simplificada, resultando na Equação 2.2.

$$\Delta\Psi_m = 1.5ER \cos(\theta) \quad (2.2)$$

Estima-se que a eletroporação ocorra para um potencial de membrana a partir de algumas centenas de mV, se tornando irreversível para campos elétricos cerca

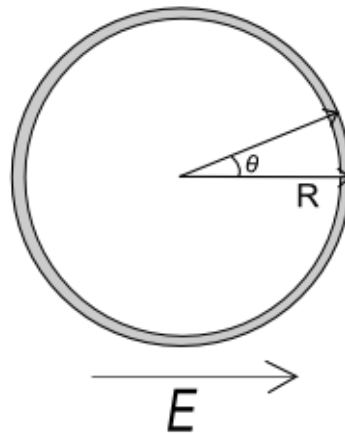


Figura 2.2: Representação de uma célula esférica.

de dez vezes maiores, dependendo do tipo de célula e duração do pulso. Em um estudo para determinação do limite de eletroporação reversível, foi registrado que, para pulsos de 1.5ms e 200 μ s, o limiar de eletroporação foi estimado em 450mV e 650mV, respectivamente, obtidos com campos de 650V/cm e 1kV/cm (Kotnik et al., 2010a). Para obter a eletroporação irreversível, são utilizados campos da ordem de kV/cm e duração da ordem de milissegundos (Bertacchini et al., 2007) ou mesmo dezenas de kV/cm com tempos de duração mais curtos (Ibey et al., 2011).

A Figura 2.3 mostra a membrana celular em quatro estados diferentes, de acordo com a hipótese da eletroporação. Em A, a membrana ainda está intacta, sem formação de poros, em B, houve formação de poros estáveis, que irão regredir e se fechar. Em C, houve a formação de poros instáveis, que podem retornar ao estado inicial ou progredir para D, tamanho para o qual os poros são irreversíveis, resultando na morte celular (Kotnik et al., 2012). Os poros se formam, em sua maioria, em regiões da célula mais próximas aos eletrodos, onde a membrana se encontra mais perpendicular ao campo aplicado (Kotnik et al., 2010b).

O tamanho dos poros parece ser dependente do tempo de duração dos pulsos e da sua amplitude. Em um estudo para determinar parâmetros de eletroporação para substâncias de diferentes pesos moleculares, foi detectado que um aumento no peso molecular aumentava a amplitude ótima para eletroporação da membrana de células de câncer cervical (HeLa), chegando a um limite de 40kDa (9nm de

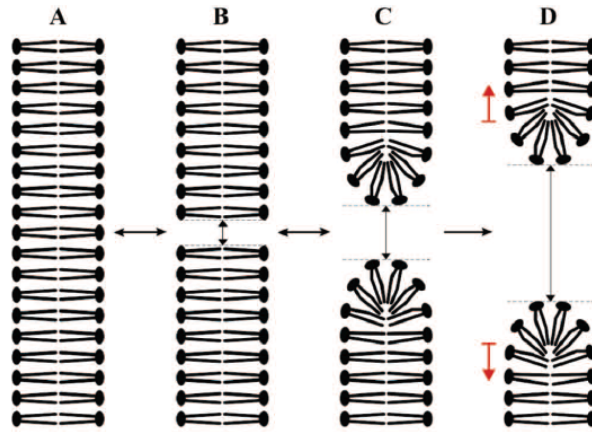


Figura 2.3: *Estágios da eletroporação hipotética. A) Membrana sem poros, B) Membrana com poro estável, C) Membrana com poro instável, D) Membrana com poros irreversíveis (Kotnik et al., 2012).*

diâmetro). O aumento da amplitude do pulso que permitisse a passagem de moléculas de 70KDa (11,6nm de diâmetro) aumentou consideravelmente a morte celular (He et al., 2007). Um outro estudo comparou pulsos de 60ns e 600ns, concluindo que o pulso mais longo abriu poros maiores, chegando a valores de 1.24nm (Nesin et al., 2011). Já quando comparados pulsos de 100 μ s e 2ms, com amplitude variável entre 0,2 e 2,4kV/cm, verificou-se que o pulso mais curto abriu poros menores que moléculas de bleomicina (0,8nm) ou sucrose (0,44 a 0,52nm), e que o pulso mais longo permitiu a passagem dessas substâncias pela membrana celular (Saulis and Saulè, 2012).

Em alguns casos, ao aumentar a intensidade do campo elétrico, a área de membrana eletroporada se torna maior, sem necessariamente aumentar o tamanho dos poros produzidos. O aumento da área eletroporada é previsto pela Equação 2.1, já que quanto maior a intensidade do campo elétrico, maior é a faixa de valores de θ para os quais o potencial necessário para que ocorra a eletroporação é atingido (Kotnik et al., 2010b).

Dentro de uma faixa de 5 a 10 minutos após a aplicação de um pulso de 600ns e 3,6kV/cm, células do tipo CHO (Chinese Hamster Ovary) ainda se encontravam permeáveis ao íon tálcio (Pakhomov et al., 2009). Quando pulsos de 0,7kV/cm - 2ms e 2kV/cm-100 μ s foram comparados, as células expostas ao primeiro pulso precisaram de mais tempo para recuperar o estado inicial de impermeabilidade à

bleomicina, sendo maior que 20 minutos para o primeiro caso e aproximadamente 5 minutos para o segundo (Saulis and Saulè, 2012). Já foi observado que células com menor quantidade de energia disponível precisam de mais tempo para que todos os seus poros se fechem (Teissié et al., 1999), sugerindo a influência de mecanismos celulares nessa etapa. No entanto, há evidências que sugerem o contrário, ou seja, que mecanismos celulares não interferem no tempo de recuperação da membrana celular (Pakhomov et al., 2007). Portanto, a questão sobre a influência de mecanismos celulares na eletroporação se mantém, atualmente, sem resposta clara.

Outro fenômeno observado na eletroporação é o fato de células conectadas se comportarem eletricamente como uma única célula quando expostas a níveis de campo elétrico abaixo do limiar de eletroporação. No entanto, ao serem expostas a pulsos de campo elétrico de maior amplitude, as células se comportam como se estivessem separadas, o que leva a crer que o pulso exerce algum tipo de efeito sobre as estruturas de junção presentes entre as membranas plasmáticas dessas células (Kotnik et al., 2010a).

Para pulsos de alta intensidade, com dezenas de kV/cm, e curta duração, de nanossegundos, os efeitos observados começam a se diferenciar daqueles observados para amplitudes menores que 15kV/cm e durações maiores que 1 μ s. Nesses casos, quando há a formação dos poros, estes se revelam menores que 1nm, e verifica-se uma perturbação na membrana de organelas. Outro fenômeno observado é o de apoptose (Beebe et al., 2003), no qual a célula ativa mecanismos que resultam na sua auto-destruição, o que é diferente da morte celular causada por formação de poros irreversíveis.

Pakhomov et al. (2009) aplicaram pulsos de 600ns e 2,8 a 4,8kV/cm a células GH3 (glândula pituitária) e CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e observaram a formação de poros que permitiram a passagem do íon tálio (com diâmetro menor que 1nm), mas não a do iodeto de propídio, concluindo que houve formação de poros menores que 1nm. Nesse mesmo experimento, também foi observado que os poros tinham comportamento de canais iônicos, sendo seletivos ao tipo de íon e permitindo sua passagem somente em uma direção. Em alguns casos, esses

nanoporos se desmancharam formando poros maiores e permeáveis ao iodeto de propídio.

Quando se utiliza trens de pulsos, o número de pulsos utilizados e a frequência também influenciam no resultado. Em uma revisão da literatura, Jiang et al. (2015) compararam vários estudos de eletroporação irreversível, chegando à conclusão de que uma série grande de pulsos de baixa intensidade pode ter efeitos similares aos de séries menores com pulsos mais intensos na viabilidade celular. Jiang et al. (2015) ainda encontraram alguns estudos cujos resultados indicam que a frequência também influencia nesses resultados. Pucihar et al. (2011) encontraram resultados similares para a eletroporação reversível, concluindo que uma mudança na amplitude ou duração do pulso pode ser compensada com a mudança do número de pulsos utilizados em série.

2.1.1 Verificação experimental

Devido às dimensões reduzidas dos poros produzidos por meio de eletroporação, na faixa de nanômetros, não é possível a sua visualização utilizando microscópios ópticos.

Alguns autores tentaram visualizar tais poros por meio de microscopia eletrônica, como Chang and Reese (1990), que utilizaram congelamento rápido para microscopia eletrônica e observaram estruturas que foram interpretadas como poros em hemácias submetidas a pulsos elétricos. Mais tarde, essas estruturas se revelaram artefatos produzidos pelo inchaço decorrente da eletroporação (Teissie et al., 2005).

Um dos métodos utilizados para verificação experimental da eletroporação, devido à sua simplicidade, consiste em avaliar a penetração de moléculas de tamanhos diferentes no interior das células. Esse método permite determinar a ocorrência do fenômeno, tempo de sua duração e estimar tamanho dos poros ao comparar a penetração de moléculas de diâmetros diferentes. As moléculas podem ser visíveis por meio de microscopia óptica de fluorescência (Pakhomov et al., 2009) ou percebida pela diferença da viabilidade das células (Saulis and Saulè, 2012).

Pode-se ainda utilizar da osmolaridade das moléculas presentes no meio de suspensão das células, seja para avaliar a quantidade de hemoglobina sobrenadante, resultante da hemólise de eritrócitos devido à entrada de água causada pela eletroporação (Saulis and Saulè, 2012), ou mesmo para verificar o inchaço provocado pela entrada de moléculas osmoticamente ativas nas células (Nesin et al., 2011).

Para a eletroporação de células *in vitro*, pode-se utilizar cubetas como as da Figura 2.4, com distância mais comum entre as placas de 2mm e 1mm (Li et al., 2011), microeletrodos, como os da Figura 2.6, com distância entre os mesmos da ordem de centenas ou dezenas de μm (Pakhomov et al., 2007) (Ibey et al., 2009) (Pakhomov et al., 2009), lâminas de microscópio às quais são coladas finas camadas de material condutor, como na Figura 2.5 (Deng et al., 2003) e até *chips* com microcanais dentro dos quais as células passam e podem ser eletroporadas em um curto espaço de tempo, diminuindo o tempo de experimentação para um número grande de células (He et al., 2007).



Figura 2.4: *Cubetas para eletroporação (Eppendorf, 2010).*

Para eletroporação de células *in-situ*, Stolwijk et al. (2011) utilizaram placas de 8 poços com eletrodos de ouro, nos quais as células foram plaqueadas e aderiram antes da exposição aos pulsos elétricos.

Para estudos *in vivo*, pode-se utilizar eletrodos de placas paralelas (Figura 2.7-a), ou de agulhas, que podem ser colocadas em fileiras paralelas (Figura 2.7-b) ou em formato hexagonal (Figura 2.7-c). Nesses casos, a distância entre os eletrodos

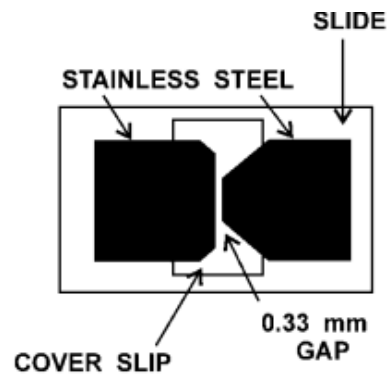


Figura 2.5: *Lâmina com eletrodos de aço inoxidável (Deng et al., 2003).*

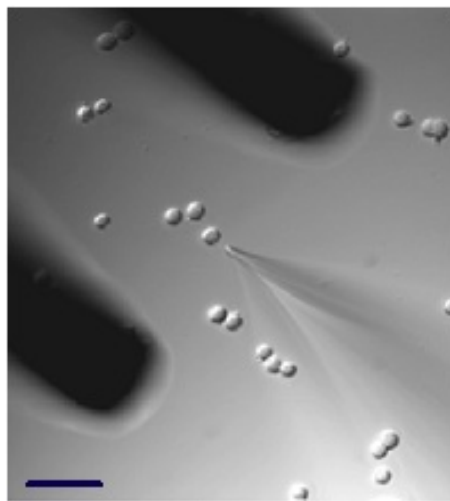


Figura 2.6: *Microeletrodos e micropipeta (Pakhomov et al., 2009).*

fica entre 5mm e 1cm e são utilizados campos com valores entre 1100V/cm e 1300V/cm (Belehradek et al., 1993).



Figura 2.7: Eletrodos a) placas paralelas, b) agulhas em paralelo, c) agulhas em hexagonal. (Giardino et al., 2006).

2.1.2 Aplicações

Devido aos efeitos de alteração da membrana celular, como mostrados na Figura 2.8, os pulsos de campo elétrico intenso e de curta duração podem ser usados em diversas aplicações, desde algumas que preservam as células após a aplicação, como eletroquimioterapia (Belehradek et al., 1993) e eletrotransferência (Hojman, 2010), até outras em que os pulsos utilizados são intensos o suficiente para romper a membrana celular permanentemente, ocasionando a morte das células, como na eletroesterilização (Kabuki et al., 2002).

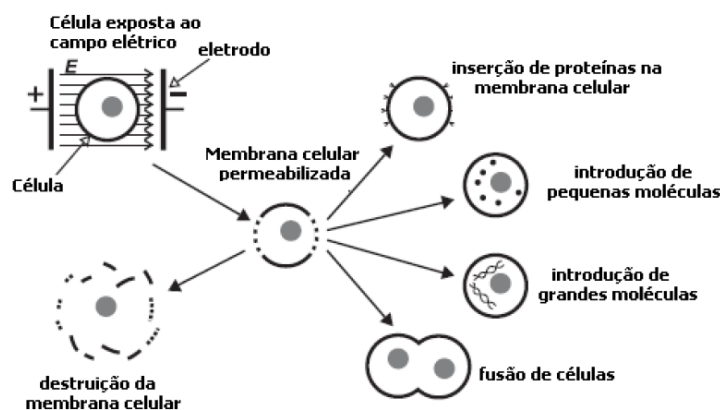


Figura 2.8: Efeitos decorrentes da exposição de células a pulsos de campo elétrico intenso e de curta duração (Matsumi, 2009).

Na eletroquimioterapia é feita uma associação de quimioterápicos com pulsos de eletroporação aplicados localmente. Após a aplicação do fármaco, pulsos são

aplicados no tumor com intuito de tornar o seu tecido mais permeável, aumentando a eficiência do tratamento (Belehradek et al., 1993). Há relatos de regressão de tumores cutâneos e subcutâneos que, com esse tratamento, conservaram o tecido adjacente e não levaram à inflamação ou qualquer outra consequência de uma destruição desordenada das células. No entanto, o tratamento não é eficaz para tumores mais profundos e não altera o tempo de progressão da doença. No geral, a técnica é capaz de fazer regredir tumores superficiais, resultando numa melhora de saúde e qualidade de vida de pacientes (Campana et al., 2009).

A eletrotransferência genética consiste em utilizar pulsos elétricos para a transferência de plasmídeos de DNA para dentro da célula, o que resulta na sua expressão gênica a longo prazo. A técnica pode ser utilizada para propósitos de vacinação, administração sistêmica de proteínas terapêuticas e expressão local de proteínas (Hojman, 2010), com desempenho que pode chegar a ser 200 vezes maior que o do método de injeção de DNA (Mir et al., 1999). Para a ocorrência de transferência genética, pulsos de amplitude em torno de 100V/cm, com duração de cerca de 1ms são utilizados (Gehl and Mir, 1999). Para que a transferência ocorra, é preciso que a molécula de DNA se acumule e migre através da membrana, que aconteça o seu transporte intracelular e, finalmente, a sua expressão (Hojman, 2010).

A eletroesterilização consiste na aplicação de pulsos de campo elétrico intenso e tempo longo o suficiente para que resulte numa ruptura da membrana de bactérias. Há ainda evidências de que pulsos muito intensos, com componentes de alta frequência, possam alterar estruturas internas da célula, sendo mais um fator que possa levá-la à morte (Kabuki et al., 2002). Apesar da variedade de pulsos utilizados, eles são mais intensos ou tem duração mais longa que os utilizados na eletroporação reversível.

A eletroporação também pode ser utilizada para ablação de tecidos, ao utilizar configurações que resultem na morte celular, sem os efeitos colaterais da ablação térmica. Hong e colaboradores desenvolveram eletroporadores baseados em desfibriladores, conseguindo bons resultados em ablação de tecido cardíaco (Hong et al., 2009).

2.2 Eletroporador

Um eletroporador é um equipamento capaz de gerar pulsos elétricos de alta intensidade e curta duração. A tensão deve resultar em um campo elétrico elevado, capaz de alterar as propriedades elétricas da membrana celular a que serão aplicados.

O conceito fundamental para a construção de um eletroporador é a conversão de um pulso longo de baixa tensão em um pulso de alta tensão e curta duração (Mankowski and Kristiansen, 2000). É desejável também que o dispositivo ofereça opções de controle eficiente da forma de onda, nível de tensão, duração, frequência e número de pulsos, e que também seja simples, robusto e de baixo custo (Matsumi et al., 2008).

A técnica mais simples para a construção de um eletroporador consiste em um capacitor em série com uma chave. O capacitor é primeiramente carregado com uma fonte, como na Figura 2.9-a. O pulso se inicia quando a chave é acionada, como na Figura 2.9-b e termina quando o capacitor descarrega sua energia na carga. A forma do pulso será exponencial e a duração dependerá do valor do capacitor escolhido e da impedância sobre a qual é feita a descarga. Assim, pode-se controlar o tempo de descarga do capacitor adicionando um resistor em paralelo com a carga biológica. Este resistor deve ter impedância aproximadamente dez vezes menor que a impedância da carga biológica para que seu efeito seja dominante sobre o tempo de descarga do capacitor.

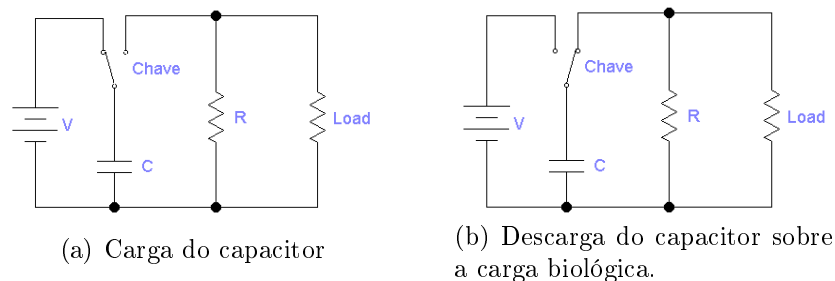


Figura 2.9: Circuito gerador de pulsos com capacitor e chave.

Apesar da simplicidade, esse tipo de eletroporador é extremamente inflexível quanto às características da onda gerada. Pode-se ainda utilizar *gaps* de ar como

chaveamento e modificar as características do pulso de acordo com a distância e a forma dos eletrodos.

Em um aperfeiçoamento do eletroporador com chave e capacitor pode-se utilizar dispositivos semicondutores de chaveamento, como na Figura 2.10. Apesar de ser uma mudança simples, o uso desses dispositivos pode permitir o controle do início e do fim dos pulsos, o que resulta no controle do tempo de duração e permite também a geração de trens de pulsos de frequências variáveis. As características dos pulsos gerados, geralmente quadrados ou exponenciais, dependerão do controle utilizado e da capacidade dos dispositivos semicondutores quanto à tensão máxima suportada e banda de passagem.

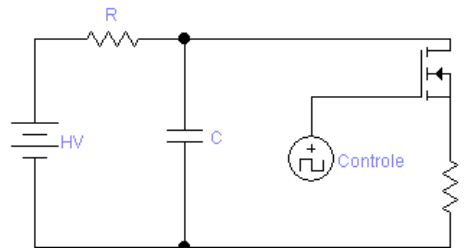


Figura 2.10: *Eletroporador com dispositivo de chaveamento eletrônico.*

Chaney e Sundararajan utilizaram um oscilador Schmitt Trigger como controle em conjunto com MOSFET de potência, e alcançaram pulsos de 400V de amplitude e 75ns de duração (Chaney and Sundararajan, 2004). Mais tarde, Grenier e Kazerani utilizaram um circuito similar, controlado por microcontrolador e utilizando MOSFETs em série, tendo chegado a pulsos de 3kV com 100 μ s de duração (Grenier and Kazerani, 2008).

Merla e colaboradores desenvolveram um eletroporador para cargas de baixa impedância (10 Ω) utilizando linhas de transmissão com dispositivos fotocondutores disparados a laser e conseguiram pulsos unipolares de 1,6kV e 2ns ou bipolares de 1,5kV e 4ns (Merla et al., 2010).

Mais recentemente, Ching e colaboradores produziram um eletroporador para uso em transporte transdérmico de substâncias que gera pulsos de 2 a 300V com duração de 1 ou 3ms, forma de onda unipolar ou bipolar para pulsos unitários ou sequenciais, para cargas da ordem de 1k Ω (Ching et al., 2012).

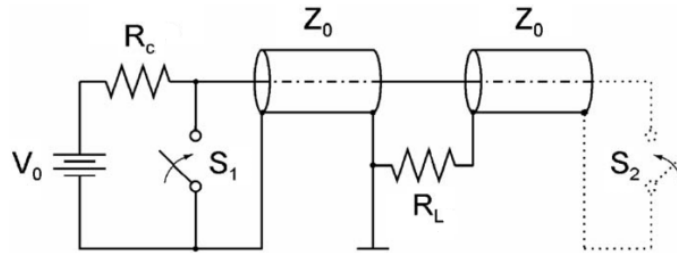


Figura 2.11: Gerador de pulsos Blumlein (modificado de (Angelis et al., 2008)).

Alguns eletroporadores utilizam um circuito com linhas de transmissão para geração dos pulsos, chamados linhas de Blumlein, utilizando os fenômenos de propagação de reflexão de ondas nas linhas. Os pulsos gerados são quadrados e a amplitude do pulso será resultado da capacidade da fonte geradora de alta tensão, enquanto a duração do pulso depende do tamanho da linha. Nesses casos, deve haver um bom casamento de impedância entre a linha e a carga. Deng e Schoenbach utilizaram linhas de transmissão em cabo coaxial para gerar pulsos na escala de ns, chegando a pulsos de 60ns e 150kV/cm (Deng et al., 2003).

A Figura 2.11 mostra um gerador Blumlein típico com a carga entre as linhas de transmissão. Ao fechar a chave S_1 é gerada uma onda que percorre a linha de transmissão, a carga e reflete no final da linha. Quando o pulso refletido alcança a carga novamente, o pulso chega ao fim. Angelis e colaboradores modificaram o circuito básico adicionando uma segunda chave no final da linha de transmissão que, quando acionada, provoca o fim do pulso mesmo que seja antes da onda refletida alcançar a carga (Angelis et al., 2008).

Um dos tipos mais complexos de eletroporador utiliza um gerador de sinais com um amplificador de potência. Assim, pode-se gerar uma forma de onda arbitrária e amplificar sua tensão e corrente para que seja aplicada à carga biológica. Esse eletroporador, apesar da sua complexidade, é o mais flexível quanto às características da onda gerada, dependendo das capacidades do gerador de sinal e da banda de passagem do amplificador construído. Matsumi e colaboradores construíram um eletroporador capaz de gerar formas de onda arbitrárias de até 500V utilizando placas de aquisição juntamente com amplificadores baseados em TBJ (Transistor Bipolar de Junção), tendo conseguido pulsos de $150\mu\text{s}$ de duração

(Matsumi et al., 2008).

2.2.1 Eletroporadores Comerciais

Há, no mercado, alguns modelos de eletroporadores disponíveis, que variam quanto à forma, duração, amplitude e número de pulsos gerados em sequência, para várias aplicações, seja *in-vitro*, passando por eletroporação reversível *in-vivo*, até ablação de tecidos.

O modelo Eporator da Eppendorf, por exemplo, é um eletroporador para bactérias e leveduras *in-vitro*, capaz de gerar pulsos de decaimento exponencial com constante de tempo de 5ms e com amplitude de 200V a 2500V (Eppendorf, 2014). O modelo EMC830, da BTX, é capaz de gerar pulsos quadrados de 10V a 3000V, de 10 μ s a 999 μ s, com intervalo entre pulsos de 100ms a 10ms, e pode ser utilizado tanto para eletroporação *in-vitro* quanto *in-vivo* (BTX, 2010).

Algumas empresas fabricam modelos mais direcionados para aplicações médicas, como o NanoKnife, fabricado pela *Angiodynamics*, que se baseia no conceito de eletroporação irreversível, oferecendo uma alternativa atérmica para ablação de tecidos (Staal and Gilbert, 2011). A empresa Ichor fabrica o eletroporador TriGrid, indicado para administração intramuscular de DNA com pulsos de 250V/cm, 40ms e trem de pulsos de 400ms (Staal and Gilbert, 2011). O Cliniporator foi desenvolvido para uso em tratamentos de eletroquimioterapia, indicado para tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos (IGEA, 2013).

As informações disponíveis sobre esses aparelhos são escassas, se limitando aos pulsos gerados e às aplicações, sem informar, na maioria dos casos, impedância de saída da fonte, impedâncias aceitas como carga e corrente máxima suportada. Além disso, não se sabe qual o princípio de funcionamento adotado na construção (chave, blumlein ou amplificador).

2.3 Conclusão

O fenômeno da eletroporação tem atraído a atenção tanto da comunidade científica, que desenvolve metodologias e eletroporadores para o seu estudo, quanto

da indústria, que já oferece equipamentos capazes de eletroporar células tanto *in-vivo* quanto *in-vitro* para aplicações na saúde ou em laboratórios de pesquisa.

A eletroporação reversível ocorre quando um campo elétrico externo altera o potencial de membrana celular de forma a ultrapassar um certo limite estimado em algumas centenas de milivolts. Quando esse potencial ultrapassa valores cerca de dez vezes maiores, a célula não se recupera e a eletroporação é dita irreversível.

Alguns estudos mostram uma relação entre as características do pulso e o tamanho dos poros. Pulsos mais longos ou mais intensos tendem a produzir poros maiores. No entanto, o aumento da intensidade ou duração do pulso também aumenta a mortalidade celular.

Na eletroporação reversível, o tempo estimado para o fechamento dos poros, após o fim do pulso, é de algumas dezenas de minutos, dependendo das características do pulso.

Células conectadas eletricamente reagem à aplicação de um campo elétrico externo como se fossem uma única célula. No entanto, quando o campo causa eletroporação, as células reagem isoladamente, revelando alguma influência do campo aplicado em estruturas de conexão das células.

Os poros são muito pequenos e de difícil visualização, assim, a maioria dos estudos verifica a entrada ou não de certas moléculas no citoplasma, utilizando microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou técnicas colorimétricas.

A exposição das células em suspensão ao campo elétrico pode ser feita através de cubetas, eletrodos em lâminas, eletrodos em microchips ou com o uso de microeletrodos.

O eletroporador pode ser construído para gerar pulsos elétricos de diferentes formas, sendo as mais comuns o chaveamento de capacitores e o uso de linhas de transmissão. Assim, os circuitos utilizados em diferentes trabalhos variam, em sua maioria, na forma como chaveiam a tensão sobre a carga, o que resulta em diferentes formas de onda, intensidades e durações.

Apesar do aumento do uso da técnica de eletroporação, percebe-se que não há, ainda, respostas claras para os mecanismos de funcionamento desse fenômeno, e que certas faixas de características de pulsos são menos estudadas e exploradas.

Para análise de tamanhos de moléculas que podem atravessar a membrana devido à eletroporação, há alguns estudos com moléculas pequenas, como iodeto de propídio e íons como cálcio ou tálio. Já para macromoléculas, de diâmetro na faixa de nanômetros, há poucos estudos.

Percebe-se, portanto, que o fenômeno da eletroporação é um campo que necessita de mais estudos, o que permitirá compreender melhor o seu funcionamento e o seu potencial, além de otimizar as características dos pulsos de acordo com as aplicações desejadas.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Este capítulo é dividido em duas seções principais que contêm informações sobre a metodologia utilizada na implementação do eletroporador e nos experimentos de eletroporação, respectivamente. Em cada seção é feita uma breve fundamentação, seguida da descrição da implementação dos circuitos do eletroporador e dos procedimentos para verificar a ocorrência da eletroporação.

3.1 Eletroporador

3.1.1 Requisitos do Eletroporador

O eletroporador construído nesse trabalho deve obedecer aos seguintes requisitos:

- A tensão máxima deve ser, no mínimo, 90% do valor nominal;
- Durante a aplicação do pulso, a queda de tensão deve ser de, no máximo, 10% do valor máximo do pulso;
- O eletroporador deve portátil:
 - O eletroporador deve poder ser colocado sobre uma bancada de laboratório;
 - O eletroporador deve funcionar sem a utilização de fontes de tensão externas além da tomada que o alimenta.

3.1.2 Ferramentas e métodos para verificação experimental da eletroporação

Nessa seção serão apresentados os fundamentos teóricos utilizados para a construção do gerador de pulsos, como dispositivos de chaveamento, multiplicador de tensão e microcontrolador.

3.1.2.1 MOSFET

Os MOSFETs, ou transistores de efeito de campo MOS, são dispositivos de chaveamento controlados por tensão. Na Figura 3.1 é possível ver o símbolo do MOSFET juntamente com as suas curvas de corrente x tensão.

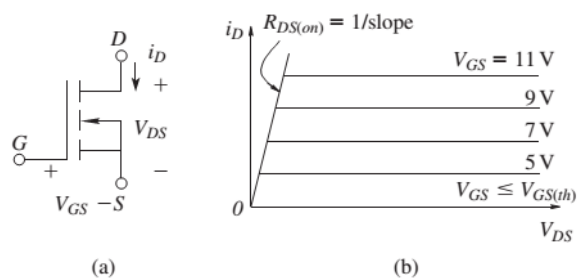


Figura 3.1: a) representação de um MOSFET. b) Característica I-V (Mohan, 2012).

Normalmente, o MOSFET se comporta como uma chave aberta, apresentando uma grande impedância entre os terminais de dreno e fonte. Ao aplicar uma tensão entre porta e fonte de magnitude apropriada há a formação de um canal de portadores entre dreno e fonte, diminuindo a resistência entre esses dois terminais e sendo possível considerá-lo uma chave fechada. Para mantê-lo conduzindo, é necessário manter a tensão de porta. No entanto, só há passagem de corrente de porta durante as transições de estado, em que é necessário carregar a capacitância da porta, ou seja, estando no estado de corte ou condução a porta não drena corrente.

Além da baixa corrente necessária para a manter o MOSFET num dado estado, este dispositivo ainda permite uma alta velocidade de chaveamento, com frequências em torno de centenas de kHz, chegando em alguns casos à casa dos MHz. No entanto, este dispositivo não suporta uma alta dissipação de potência,

ou seja, dispositivos que bloqueiam altas tensões apresentarão limites baixos de corrente e dispositivos com altos limites de corrente apresentarão baixos limites de tensão.

O MOSFET ainda apresenta coeficiente positivo de variação da resistência de condução com a temperatura, facilitando a paralelização dos dispositivos. Quando um dispositivo do conjunto conduz mais corrente que os outros, sua resistência de condução aumenta, forçando a passagem de corrente pelos outros dispositivos e mantendo o equilíbrio entre as correntes de cada MOSFET (Mohan et al., 1995).

3.1.2.2 IGBT

Os IGBTs -Insulated Gate Bipolar Transistor- são dispositivos semicondutores de chaveamento que unem boas características do MOSFET, como baixa potência de acionamento, com o suporte a altas correntes. O acionamento é bastante similar ao do MOSFET, ou seja, aplica-se uma tensão positiva entre os terminais de porta e emissor para que seja possível conduzir corrente entre os terminais de coletor e emissor.

Quando acionado somente com pulsos de tensão positiva, os IGBT's tendem a exibir um comportamento de descida lento, caracterizado pelo tempo de cauda, sendo este o tempo necessário para remover os portadores do canal. Uma solução que pode ser utilizada são tensões positivas para o seu acionamento e tensões negativas para o bloqueio (Mohan et al., 1995). A Figura 3.2 mostra o símbolo utilizado para a representação do IGBT, bem como a curva característica i-v.

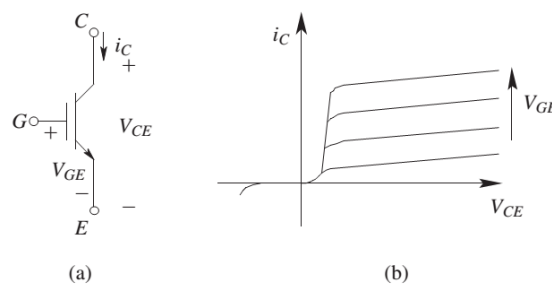


Figura 3.2: a) Símbolo do IGBT, b) Características i-v (Mohan, 2012).

3.1.2.3 PIC18F4550

Microcontroladores, também chamados de computadores embutidos, são dispositivos que apresentam, assim como os computadores pessoais, um processador, memória RAM (Random Access Memory), memória para armazenamento (ROM-Read-Only Memory) e interfaces para entrada e saída de dados. No entanto, tem processamento e memória limitados, para que tenham tamanho e custo reduzidos. As entradas e saídas podem ser tanto analógicas quanto digitais, podendo controlar dispositivos e luzes de sinalização, ou lendo sinais externos por meio de transdutores ou botões acionados pelo usuário (Tanenbaum, 2007).

O PIC18F4550 é um microcontrolador fabricado pela *Microchip*. A seguir serão listadas uma série de características desse dispositivo, como encontradas na folha de dados do dispositivo (Microchip, 2004):

- Frequência de operação de até 48MHz, com velocidade de processamento de até 12MIPS;
- Conectividade USB 2.0;
- Quatro módulos de temporização;
- Módulo conversor A/D de até 13 canais e 10 bits;
- Auto-programável sob controle de *software*, permitindo o uso de *bootloader*;
- 32Kb de memória flash;

3.1.2.4 Multiplicador de tensão

Para produzir a tensão necessária para a geração dos pulsos, pode-se utilizar um multiplicador de tensão. Tal dispositivo consiste de módulos de dobradores capacitivos conectados em cascata, cujo funcionamento será descrito a seguir.

Na Figura 3.3 pode-se ver um dobrador de tensão capacitivo, que consiste de dois capacitores C1 e C2 e dois diodos D1 e D2, que formam dois retificadores de meia-onda, C1-D1 e C2-D2. O circuito é alimentado com tensão alternada, podendo ser uma senoide ou uma onda alternada quadrada, para o caso de alimentação com circuitos conversores.

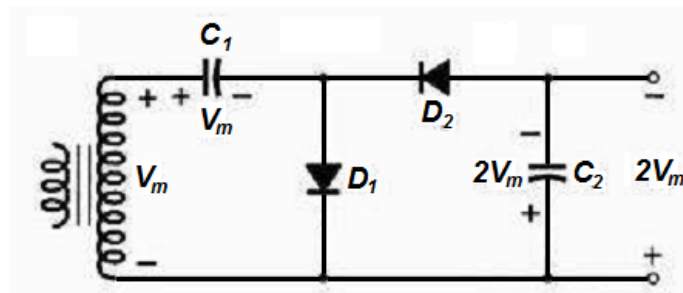


Figura 3.3: Dobrador de tensão capacitivo (Boylestad and Nashelsky, 2004).

Quando a tensão é positiva no transformador, o diodo D_1 fica diretamente polarizado e D_2 fica bloqueado, carregando o capacitor C_1 com o valor da amplitude da tensão de entrada, V_m , como mostra a Figura 3.4. Quando a tensão se inverte, o diodo D_2 conduz e D_1 bloqueia, resultando sobre o capacitor C_2 a tensão previamente carregada em C_1 mais a tensão de entrada, carregando o capacitor com o valor de $2V_m$, como mostra a Figura 3.5 (Boylestad and Nashelsky, 2004).

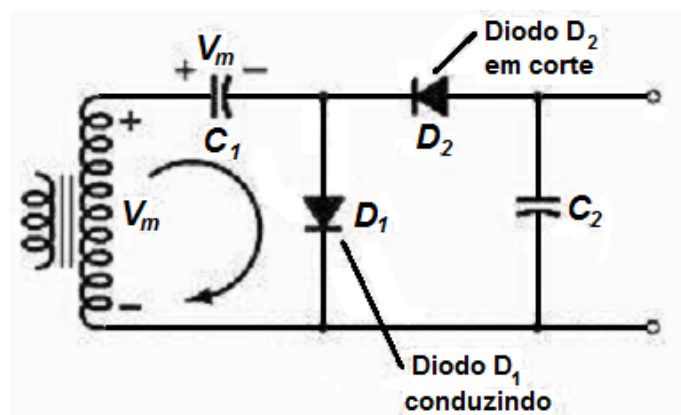


Figura 3.4: Dobrador de tensão capacitivo no semi-ciclo positivo (Boylestad and Nashelsky, 2004).

Para obter valores maiores de tensão, pode-se conectar mais módulos dobradores de tensão em série com os já existentes, obtendo uma tensão de saída de

$$V_o = 2 \cdot n \cdot A$$

em que n é o número de módulos dobradores utilizados e A é a amplitude da tensão de entrada do multiplicador.

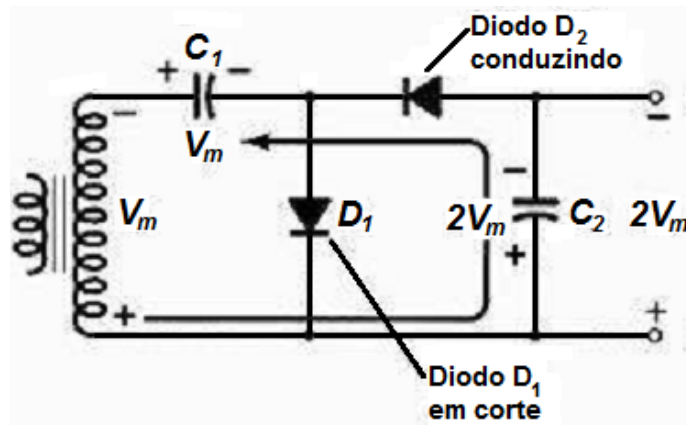


Figura 3.5: Corrente no dobrador de tensão no semi-ciclo negativo (Boylestad and Nashelsky, 2004).

3.1.3 Implementação

O eletroporador contruído no LEA (Laboratório de Eletromagnetismo Aplicado) é formado por três módulos, mostrados no esquema da Figura 3.6. O primeiro deles é uma fonte de alta tensão c.c., o segundo é um módulo de controle e o terceiro é o módulo de armazenamento de energia e chaveamento em alta tensão que, de acordo com os sinais do módulo de controle, aplica sobre a carga a tensão gerada na fonte c.c. e armazenada nos capacitores.

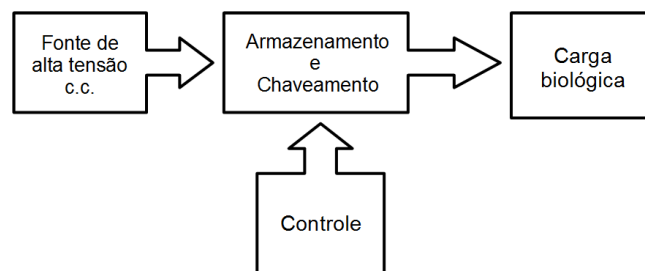


Figura 3.6: Módulos do eletropermeabilizador.

A fonte geradora de 1kV c.c., que pode ser vista na Figura 3.7, utiliza três estágios de dobradores capacitivos construídos com o diodo MUR1560, que suporta nível de tensão de até 600V e corrente de até 15A (Inc., 1996) e capacitores de $330\mu\text{F}$.

A fonte é ligada à rede elétrica por meio de um transformador variável, podendo chegar a uma tensão de saída de 1050V com uma tensão de entrada de 176V de amplitude. O uso do transformador variável permite que níveis interme-

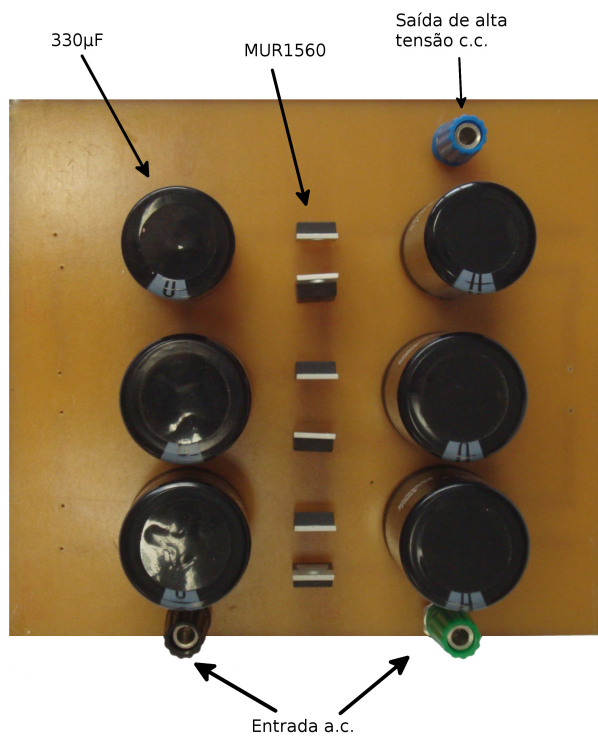


Figura 3.7: *Circuito da fonte de alta tensão c.c.*

diários de tensão sejam obtidos e evita altas correntes de carga dos capacitores no início da operação do circuito. O transformador variável consiste de um autotransformador que não oferece isolamento do circuito com a rede elétrica e, por isso, foi utilizado ainda um transformador de isolamento entre a rede e o transformador variável. Um esquema de ligação da fonte de alta tensão c.c. à rede elétrica pode ser visto na Figura 3.8.

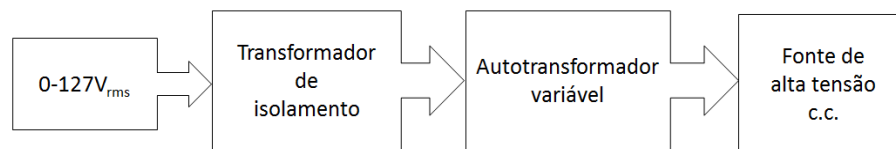


Figura 3.8: Diagrama de ligação da fonte de alta tensão c.c. por meio de um transformador de isolamento e um autotransformador regulável.

Para a geração dos sinais de controle, um PIC18F4550 foi utilizado. Esse microcontrolador oferece velocidade de processamento de 12 MIPS, o que teoricamente poderia resultar em pulsos de até 85ns, e comunicação USB, o que torna a sua programação mais fácil (Microchip, 2004).

O microcontrolador é alimentado com uma pequena fonte c.c. regulada para 5V com o regulador LM7805, e suas saídas digitais foram utilizadas para o controle do circuito de chaveamento, descarga de capacitores e LED's (Diodo Emissor de Luz) de sinalização.

Primeiramente, o programador ICD2BR foi utilizado para programar o PIC com um software de *bootloader*, disponibilizado em um conjunto de ferramentas do fabricante (Microchip Inc.). O código para geração dos pulsos foi escrito em C, no MPLab 8.92, e o PIC foi programado por meio da porta USB, via interface de *bootloader*. O microcontrolador foi programado de forma a permitir escolher entre três durações diferentes e ainda acionar a descarga do capacitor.

O nível de tensão produzido pelo PIC é inapropriado para o controle do dispositivo de potência, e portanto, um *driver*, mostrado na Figura 3.9, foi construído utilizando os MOSFETs ZVP2106A e ZVN2106A para que o dispositivo de potência fosse acionado com uma tensão de 15V. A alimentação de 15V do *driver* também é feita por meio de uma fonte c.c. regulada com regulador LM7815. A

conexão entre o *driver* e o dispositivo de potência é feita por meio de um resistor de 2Ω para limitar os valores de corrente de saída do circuito.

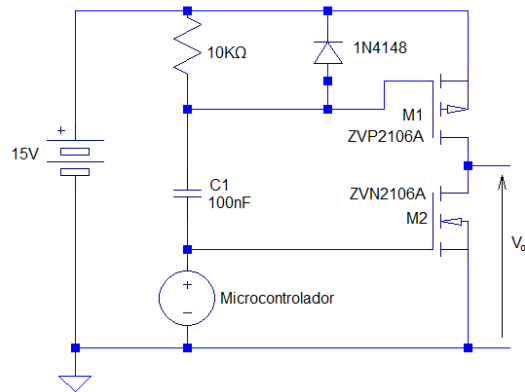


Figura 3.9: *Circuito do driver de MOSFET.*

No início do funcionamento, a saída do microcontrolador, aqui representado por uma fonte de pulsos quadrados, é 5V, e o capacitor C1 se carrega com a tensão de 10V e aplica 15V no gate de M1 (5V do microcontrolador mais 10V do capacitor). Assim, M1 está bloqueado e M2 conduz gerando uma saída no driver de 0V. Quando a saída do microcontrolador passa a ser 0V, é aplicada uma tensão de apenas 10V em M1, e agora M1 conduz e M2 está bloqueado, e a saída do driver passa a ser 15V.

A Figura 3.10 mostra o circuito de controle com o PIC18F4550 mais os circuitos de driver de MOSFET.

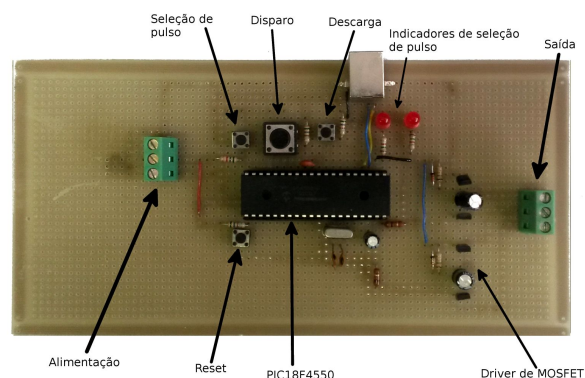


Figura 3.10: *Circuito de controle com driver de MOSFET.*

Para o chaveamento em alta tensão utilizou-se o IGBT IRGPS60B120KD

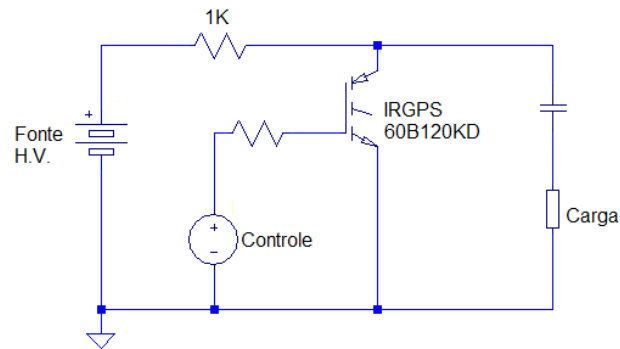


Figura 3.11: *Circuito de chaveamento baseado em IGBT.*

como elemento de chaveamento, em um circuito baseado no layout proposto em (Chaney and Sundararajan, 2004), podendo ser visto na Figura 3.11. O IGBT escolhido suporta picos de 240A e é capaz de bloquear uma tensão de 1200V, tem tempo de subida de 45ns e descida de 58ns. Apresenta ainda um tempo morto de acionamento de 72ns e de bloqueio de 400ns.

O circuito de chaveamento implementado pode ser visto na Figura 3.12, em que foi utilizado um IGBT e três capacitores de $220\mu\text{F}$ em série, devido à alta tensão utilizada, resultando em uma capacitância de $73,3\mu\text{F}$. Em paralelo com cada capacitor, existe um resistor de $100\text{k}\Omega$, para equalizar a tensão entre os capacitores. O circuito ainda utiliza um MOSFET 2SK1119 para descarga dos capacitores por meio de uma resistência de $1\text{k}\Omega$.

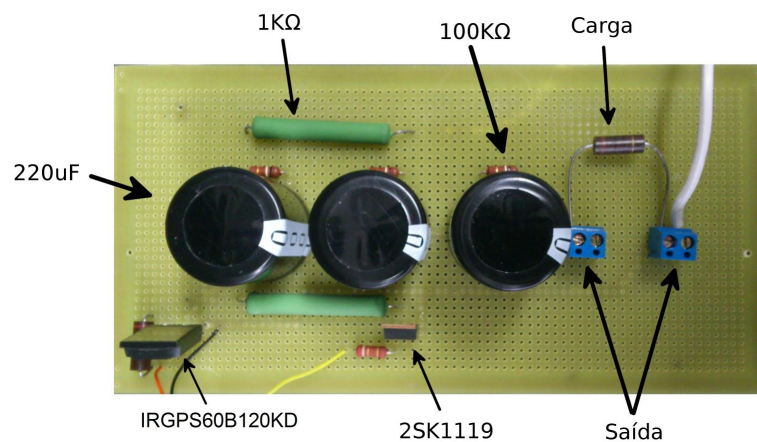


Figura 3.12: *Circuito de chaveamento e descarregamento baseado em IGBT.*

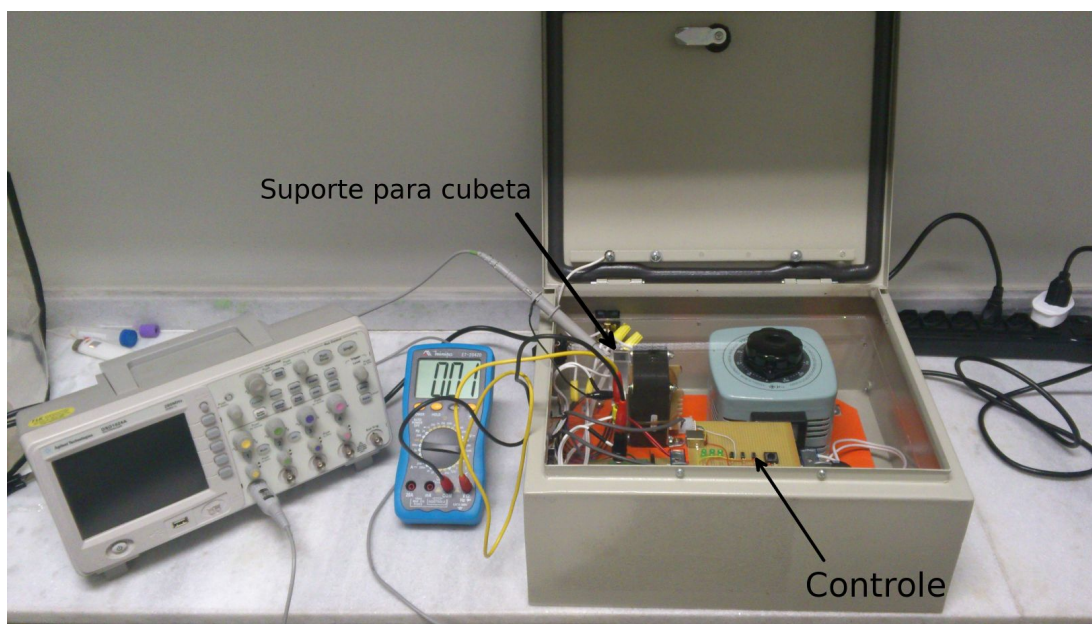


Figura 3.13: *Eletroporador portátil na bancada do laboratório.*

A Figura 3.13 mostra o eletroporador portátil construído. As placas foram acomodadas em uma caixa metálica e cobertas com uma placa de acrílico. Acima da placa de acrílico ficaram o controle da tensão de entrada da fonte de alta tensão c.c., a placa de controle, os conectores para medida da tensão da fonte de alta tensão c.c. e o suporte para cubeta.

3.1.4 Testes

Um modelo elétrico de células em suspensão em cubetas com 1mm de distância entre os eletrodos foi obtido por Grenier (2006) como sendo equivalente a uma resistência de 50Ω em paralelo com uma capacitância de 35pF . Assim, após o carregamento da capacitância, a carga se comporta como um resistor de 50Ω .

Neste trabalho, os testes foram feitos com uma carga resistiva de 25Ω de forma a testar o funcionamento mesmo se a carga biológica apresentar menor impedância que o modelo proposto por Grenier (2006). Após o teste com resistor, o eletroporador foi utilizado com carga biológica.

3.2 Eletroporação

3.2.1 Fundamentação

As seções seguintes fazem uma breve descrição de algumas ferramentas utilizadas para verificação experimental da eletroporação, para que se possa compreender melhor os experimentos realizados.

3.2.1.1 Ensaio de viabilidade com MTT

O ensaio de viabilidade celular é um ensaio que permite analisar a sobrevivência de células expostas a diferentes tratamentos. O tratamento pode ser a exposição a alguma substância ou mesmo algum procedimento efetuado com as células.

O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) é um sal amarelo, solúvel em água, utilizado para ensaios de viabilidade celular. No interior das células vivas, essa substância é reduzida, pelas mitocôndrias, em MTT-F (Formazan), de cor azulada, aumentando sua absorbância no comprimento de onda de 570nm. A viabilidade celular, portanto, é proporcional ao aumento de absorbância no comprimento de onda de 570nm. (Freshney, 2010). A leitura da absorbância é feita em equipamento automatizado para leitura de placas de 96 poços como a da Figura 3.14.

A leitura do comprimento de onda de 650nm também é feita para corrigir alterações no caminho da luz devido a fatores como propriedades ópticas da placa ou deposição de restos de células e proteínas no poço (Vásquez et al., 2012). Para o cálculo do percentual de viabilidade utiliza-se a equação 3.1. Nessa equação, V é o percentual de viabilidade, A_{590} e A_{650} são as absorbâncias medidas nos comprimentos de onda de 590nm e 650nm, respectivamente. A_0 é a absorbância de poços que continham somente o meio de cultura, sem células e A_c é a absorbância do grupo controle.

$$V(\%) = 100 \frac{\frac{A_{590}}{A_{650}} - \frac{A_{590_0}}{A_{650_0}}}{\frac{A_{590_c}}{A_{650_c}} - \frac{A_{590_0}}{A_{650_0}}} \quad (3.1)$$



Figura 3.14: *Placa de cultura 96 poços. Adaptada de Freshney (2007)*

O ensaio de MTT permite que grandes quantidades de células sejam avaliadas em um curto espaço de tempo, já que a leitura dos valores de absorbâncias é feito por equipamentos automatizados (Freshney, 2010).

A técnica de MTT já foi utilizada para avaliar a sobrevivência de células após a exposição a pulsos de 10ns a $9\mu\text{s}$, tendo também sido empregada para verificar a sensibilidade diferencial de tipos celulares distintos aos pulsos (Ibey et al., 2011). Em um outro estudo, a técnica foi utilizada para avaliar a viabilidade de células neoplásicas (câncer de bexiga), onde se utilizou pulsos elétricos associados a quimioterápicos (Vásquez et al., 2012).

3.2.1.2 FITC-Dextran

O FITC-Dextran é um conjugado de um polímero dextran marcado com FITC (Isotiacianato de Fluoresceína), com excitação máxima no comprimento de onda de 493nm, e fluorescência máxima em 518nm. O corante apresenta baixa toxicidade, sendo bem tolerado em animais e é largamente utilizado em estudos de permeabilidade e transporte molecular em células e tecidos (Consultancy, 2010).

Para um peso molecular acima de 5kDa, a molécula de FITC-Dextran apresenta-se espiralada, tendo seu raio dado pela Tabela 3.1.

Peso molecular (kDa)	Raio de Stokes (nm)
10	2,36
20	3,3
40	4,45
70	5,8
100	6,9
150	8,5
500	14,7
2000	27

Tabela 3.1: *Relação de tamanhos para FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, 1997) (Consultancy, 2010)*

FITC-Dextran de diferentes pesos moleculares já foram utilizados para avaliação da eletroporação. Stolwijk et al. (2011) utilizaram moléculas de 4kDa, 250kDa e 2MDa com pulsos de até 500ms, e visualizaram, por meio de microscopia de fluorescência, a entrada de moléculas maiores no citoplasma e de moléculas menores no citoplasma e núcleo celular. Já com pulsos exponenciais com τ de 640 μ s a 3,88ms e amplitude de até 2kV/cm, He et al. (2007) visualizaram a entrada de moléculas de até 40kDa, sendo que o aumento da duração ou amplitude do pulso para entrada de moléculas de 70kDa diminuíram demasiadamente a viabilidade celular.

3.2.1.3 Iodeto de Propídio

O iodeto de propídio é uma molécula que, ao formar ligações com o DNA, emite luz de comprimento aproximado de 610nm quando excitado com luz de comprimento de onda na faixa do UV (Ultra Violeta). Devido à impermeabilidade da membrana plasmática de células saudáveis a essa molécula, ela é largamente utilizada em ensaios de viabilidade por exclusão, nos quais deduz-se que as células com iodeto de propídio tiveram suas membranas danificadas e por isso morreram ou ainda morrerão (Johnson et al., 2013).

Essas características o tornam uma molécula que pode ser utilizada para verificar o estado de permeabilidade da membrana, o que normalmente significa

que a célula foi danificada e morreu. No entanto, em estudos de permeabilidade, a marcação de uma célula pode significar tanto a morte da célula quanto um aumento temporário da permeabilidade da membrana celular.

Há na literatura alguns exemplos de utilização de iodeto de propídio para verificar a permeabilidade de células eletroporadas (Pakhomov et al., 2009) (He et al., 2007).

3.2.1.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica para análise de características físicas de células isoladas, tais como tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Após a aquisição desses dados, pode-se selecionar populações que se diferenciam em suas características físicas e intensidade de fluorescência

Nesse equipamento, as células são direcionadas por um fino tubo, para serem expostas a um feixe de laser de comprimento de onda que excite os fluoróforos. Quando a célula é exposta, um dos dados coletados é referente ao tamanho das partículas detectadas, já que quanto maior a partícula, maior o desvio do feixe de luz da sua trajetória retilínea até o sensor. Essa característica é chamada de *Front Scatter* (FSC). Ao mesmo tempo, a granulosidade da célula exposta faz com que a luz seja desviada perpendicularmente, característica chamada de *side scatter* (SSC), e essa característica também é quantificada e registrada para cada célula (Ormerod, 2000).

O feixe de laser a que as células são expostas excita os fluoróforos, que emitirão luz em comprimentos que dependerão do fluoróforo utilizado. Essa luz passa por filtros, que selecionam certos comprimentos de onda que incidirão sobre cada fotodetector, tornando-os detectores de luminosidade para comprimentos de onda específicos (Ormerod, 2000).

As informações de FSC, SSC e luminosidade de corantes são armazenadas para cada célula detectada. Assim, pode-se analisar as populações e selecioná-las, separando por luminosidade, tamanho ou granulosidade, o que permite diferenciar diferentes tipos de células na mesma amostra ou diferentes fases de um ciclo celular de um mesmo tipo de célula (Ormerod, 2000).

3.2.2 Experimentos de Eletroporação

Para os experimentos de eletroporação, foram escolhidas as células LLC-MK2 (Linhagem epitelial de rim de macaco). Esse tipo celular foi escolhido devido à experiência do laboratório parceiro na cultura desse tipo de célula e à robustez das células, o que facilita a sua cultura.

Células do tipo LLC-MK2 (Linhagem de fibroblastos de rim de macaco) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de SFB (Soro fetal bovino) em estufa a 37°C e 5% de CO_2 até atingirem aproximadamente 90% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS (Phosphate Buffer Saline) e retiradas das garrafas de cultura com 1.5ml de tripsina a 0.05% por dois minutos seguido da adição de 8ml de meio DMEM com 10% de SFB, obtendo uma suspensão de células.

A concentração das células em suspensão foi determinada por meio de contagem em câmara de Neubauer após coloração com corante vital azul de tripano. As células foram então centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e ressuspendidas em meio DMEM contendo tampão HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) a uma concentração de $7,5 \times 10^6$ células/ml.

Em seguida, 200 μ L da solução de células em suspensão foram colocados em cubetas para eletroporação e mantidas em gelo por cerca de 20 minutos.

Cada amostra de células LLC-MK2 foi exposta a um pulso unitário dentre os descritos na tabela 3.2 e, em seguida, mantidas em gelo por cerca de 15 minutos. Os pulsos utilizados permitem a análise dos efeitos da amplitude e duração isoladamente. A inclusão de mais pulsos, que permitissem análise desses dois fatores simultaneamente, foi inviabilizada pelo tempo adicional que seria requerido nos experimentos.

Amplitude (kV/cm)	Duração (μ s)
1	100
5	100
9	100
9	50
9	2

Tabela 3.2: Pulsos utilizados nos experimentos de eletroporação.

Os pulsos foram aplicados em ordem aleatória e foram feitos grupos controle dependentes do tipo de experimento: viabilidade ou permeabilidade com moléculas fluorescentes.

Vale ressaltar que os experimentos de eletroporação foram planejados de acordo com algumas limitações existentes, como o tempo necessário para que a cultura de células atingisse a quantidade de células desejada, em torno de uma semana, limitando o número de repetições dos experimentos, o tempo de preparo das células, fazendo os experimentos durarem um ou dois dias e os horários de uso dos equipamentos de leitura de placas e citometria de fluxo, que limitaram o número de pontos analisados no experimento, visto que um número maior de pontos aumentaria a duração do experimento e este deveria terminar a tempo de utilizar tais equipamentos.

3.2.2.1 Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade das células após a exposição aos pulsos elétricos, foram feitos ensaios colorimétricos de MTT, com preparo das células conforme descrito anteriormente e o uso de um grupo controle com células que não receberam o pulso.

Após a exposição, células do grupo controle foram recontadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em triplicata ¹ em placas de 96 poços a uma quantidade de 2×10^4 células por poço. Para plaquear as células dos grupos que receberam pulsos, foi utilizado o mesmo volume de células em suspensão utilizado para plaquear as células dos grupo controle. Os poços foram preenchidos com meio DMEM-10% até atingir $200\mu\text{l}$ e as células foram mantidas em estufa a 37° e 5% de CO_2 por 18 horas.

As células foram retiradas da estufa e o meio de cada poço foi trocado por $140\mu\text{l}$ de meio DMEM sem SFB e foram adicionados $10\mu\text{l}$ de solução estoque de MTT a 5mg/ml . As células foram incubadas por mais quatro horas e o meio foi retirado. Foi adicionado $100\mu\text{l}$ de isopropanol com ácido clorídrico em cada

¹Nesse tipo de plaqueamento, o conteúdo de cada cubeta é plaqueado em três poços e a média dos valores obtidos é utilizada como o resultado. Isso visa diminuir a influência da variabilidade do processo de plaqueamento no resultado final.

poço para solubilizar os cristais de formazan formados durante a incubação. Finalmente, as células foram colocadas no agitador por 1 hora e as placas foram levadas para o leitor de placas Epoch da marca Biotek.

As medidas de absorbância foram feitas nos comprimentos de onda de 590nm e 650nm.

3.2.3 Iodeto de Propídio e FITC-Dextran

Para os experimentos com IP ou FITC-Dextran, as células foram preparadas conforme descrito anteriormente, com adição das moléculas de teste no meio de ressuspensão.

Para o ensaio com IP (Sigma-Aldrich P4170), foi utilizada a concentração final de $50\mu\text{g/ml}$. Para os experimentos com FITC-Dextran, foram utilizados os tamanhos de 20kDa(Sigma-Aldrich FD20S) e 2MDa(Sigma-Aldrich FD20000S) a uma concentração final de 4mg/mL .

Os seguintes grupos controle foram utilizados: I) sem moléculas fluorescentes e sem exposição a pulso; II) com moléculas fluorescentes e sem exposição a pulso; e III) células com moléculas fluorescentes lisadas, ou seja, mortas com um detergente.

Para a lise das células com detergente, foram adicionados $200\mu\text{l}$ de triton 1x aos $200\mu\text{l}$ de células em suspensão, resultando em um volume de $400\mu\text{l}$.

Após a etapa de exposição aos pulsos elétricos e passado do intervalo de 15 minutos nos quais as células foram mantidas em gelo, adicionou-se $200\mu\text{l}$ de PBS na cubeta. A suspensão foi retirada da cubeta e centrifugada a 2000 RPM por 8 minutos e ressuspensas em 1ml de PBS. Nos experimentos com iodeto, as células foram levadas para a leitura no citômetro de fluxo FacScan, da fabricante Beckton Dickinson, após a ressuspensão e filtragem em filtro com poros de $44\mu\text{m}$. Nos experimentos com FITC-Dextran, as células foram novamente lavadas e centrifugadas a 2000RPM por 8 minutos e ressuspensas em 1ml de PBS, para então serem filtradas e levadas para leitura no citômetro de fluxo.

Um outro teste ainda foi feito com IP, com um intervalo de 30 minutos entre a aplicação dos pulsos e a adição de IP à suspensão de células.

O preparo de células seguiu o que já foi descrito. No entanto, as células foram expostas aos pulsos elétricos em meio sem IP. A suspensão de células foi mantida em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos após a aplicação dos pulsos e, em seguida, o iodeto de propídio foi adicionado à suspensão de células.

Foram feitos dois grupos controle, sendo um controle negativo de células que não receberam pulso e um controle positivo de células lisadas com um detergente fraco. A lise das células permeabiliza a membrana e causa a morte das células.

Após a adição de IP, a suspensão de células foi mantida em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 2000 RPM por 8 minutos, ressuspensas em PBS e filtradas em filtro com poros de $40\mu\text{m}$ para leitura no citômetro de fluxo.

A células com FITC-Dextran de 20kDa e expostas a pulsos de $100\mu\text{s}$ e 9kV/cm foram observadas no microscópio de fluorescência. Após a aplicação dos pulsos em meio contendo FITC-Dextran em uma concentração de 4mg/ml , as células foram centrifugadas a 8000RPM e ressuspensas em 1ml de PBS com DAPI, um fluoróforo para o qual a membrana celular é permeável e que marca o núcleo das células, na proporção de 250:1. Em seguida, as células foram colocadas no gelo e, após 5 minutos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1ml de PBS. $20\mu\text{l}$ de suspensão de células foram colocados em uma lâmina para observação no microscópio de fluorescência.

3.2.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos percentuais encontrados nos experimentos executados, utilizou-se o software estatístico "R". Em todos os casos, foram feitos os testes ANOVA. Para os experimentos nos quais o teste ANOVA revelou diferença entre os pontos analisados, foi realizado o teste "Tukey HSD" para analisar os pontos dois a dois. Para os dois testes, o resultado foi considerado diferente quando ($p \leq 0,05$). O teste "Tukey HSD" foi escolhido por ser um teste conservador (exige maior diferença que os outros testes para que ρ seja menor que 0,05) e que suporta diferenças no número de amostras entre os pontos comparados. Transformações dos dados foram realizadas, quando necessário, para que os

dados atendessem às premissas para uso dos testes Montgomery (2013).

3.2.5 Conclusão

Para a construção do eletroporador portátil, optou-se pela utilização de um multiplicador capacitivo para geração de alta tensão, devido à sua simplicidade. Para o controle da temporização dos pulsos, optou-se pelo uso de um microcontrolador PIC18F4550 devido à sua velocidade de processamento e facilidade de programação através de conexão USB. Para o chaveamento em alta tensão, optou-se pelo uso do IGBT IRG6S60B120KD devido à sua velocidade de chaveamento aliada à alta capacidade de corrente.

Os testes do circuito eletroporador foram feitos utilizando carga resistiva de 50Ω e 25Ω .

Para a exposição das células ao pulso elétrico, optou-se pelo uso de cubetas de eletroporação, devido à simplicidade do uso.

Para o estudo da viabilidade celular optou-se pelo MTT, que se baseia na transformação de MTT, de cor amarela, em cristais de MTT-Formazan, de cor azul, pelas células vivas. A verificação da alteração de cor devido à produção de MTT-Formazan é feita por meio de leitura em equipamento automatizado.

Para o estudo da eletroporação, optou-se por realizar experimentos utilizando fluoróforos com análise da luminosidade em um citômetro de fluxo. Os fluoróforos escolhidos foram o iodeto de propídio, devido ao pequeno tamanho (1.2nm) e FITC-Dextran produzidos em diferentes tamanhos (6nm e 52nm de diâmetro).

Foram feitos testes com IP adicionado antes da aplicação dos pulsos e com IP adicionado depois de 10 minutos da aplicação dos pulsos.

Com esses experimentos, é possível ter uma estimativa da viabilidade celular, do número de células marcadas pelos corantes, da variação percentual de células marcadas em relação ao tamanho da molécula fluorescente utilizada e do tempo de duração dos poros que permitem a passagem de IP.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Assim como os capítulos anteriores, o capítulo 4 também é dividido em duas partes principais, referentes ao eletroporador e aos experimentos de eletroporação, respectivamente. Seguem, portanto, as seções que apresentam os resultados, discussões e comparações com outros trabalhos da área.

4.1 Funcionamento dos Módulos do Eletroporador e Pulsos Gerados

Um protótipo foi implementado conforme descrito no capítulo anterior e serão apresentados os resultados obtidos juntamente com uma discussão dos mesmos.

4.1.1 Fonte de Alta Tensão

A fonte de alta tensão consegue gerar tensão de saída de 1050V, maior que a necessária para a geração dos pulsos desse trabalho. O valor de saída pode ser alterado tanto no carregamento dos capacitores, ao controlar a saída do variac, quanto utilizando o botão de descarregamento, diminuindo a carga e consequentemente a tensão já existente.

4.1.2 Circuito de controle para chaveamento baseado em MOSFET

O circuito de controle implementado gera pulsos de $1,8\mu\text{s}$ a $100\mu\text{s}$, sendo capaz de controlar o IGBT de potência da placa de chaveamento em alta tensão, como poderá ser visto na seção seguinte. Assim, para gerar pulsos de durações intermediárias, basta programá-los no microcontrolador.

4.1.3 Circuito de Chaveamento

Os pulsos utilizados nos experimentos com células biológicas foram aplicados a uma carga resistiva de 25Ω . O pulso de $2\mu\text{s}$ é mostrado na Figura 4.1. O pulso tem $1,7\mu\text{s}$ de duração e existe um tempo de cauda de aproximadamente $0,5\mu\text{s}$, necessário para deligamento do IGBT.

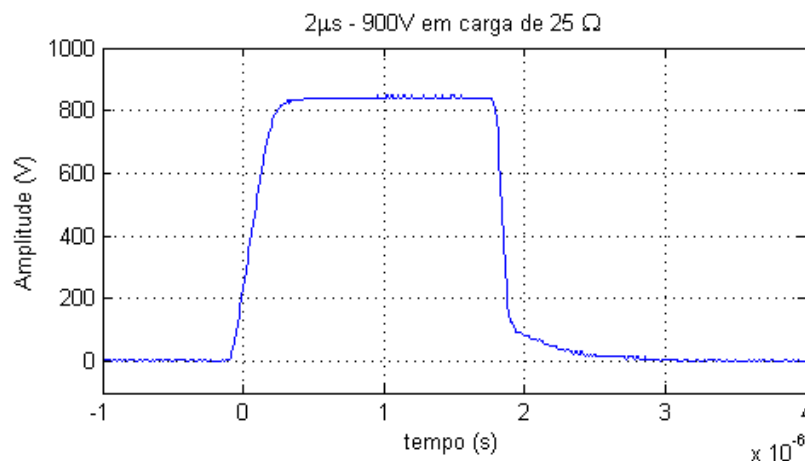


Figura 4.1: Pulso de $2\mu\text{s}$ e 900V aplicado a uma carga resistiva de 25Ω .

Para pulsos mais longos, o tempo de cauda se torna desprezível, e obtém-se formas de ondas quadradas, como mostram as Figuras 4.2 e 4.3.

Os pulsos apresentados até agora alcançam uma amplitude máxima de, em média, 850V. Essa queda pode ser explicada pelo modo de operação do gerador de pulsos: ao final da carga do capacitor, o variac é colocado na posição de saída de 0V. Este tempo de retorno mais o tempo até o início do disparo do pulso na carga é suficiente para que ocorra a queda de tensão.

Ao variar a tensão de entrada do multiplicador de tensão, obtém-se diferentes

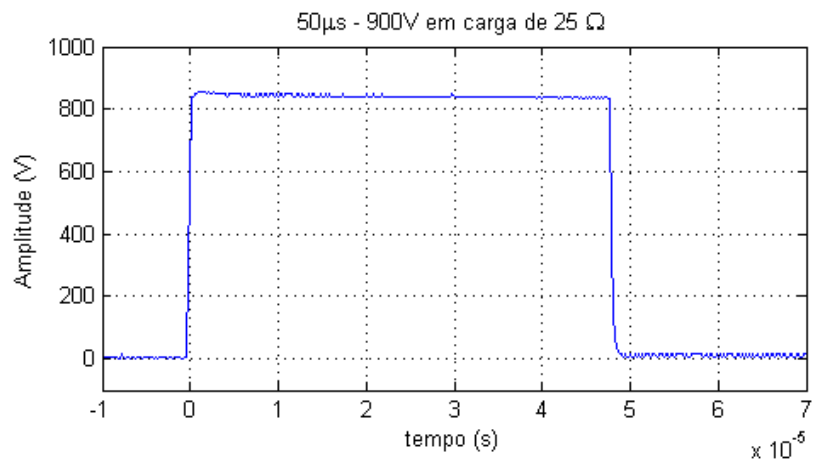


Figura 4.2: Pulso de 50µs e 900V aplicado em carga resistiva de 25Ω.

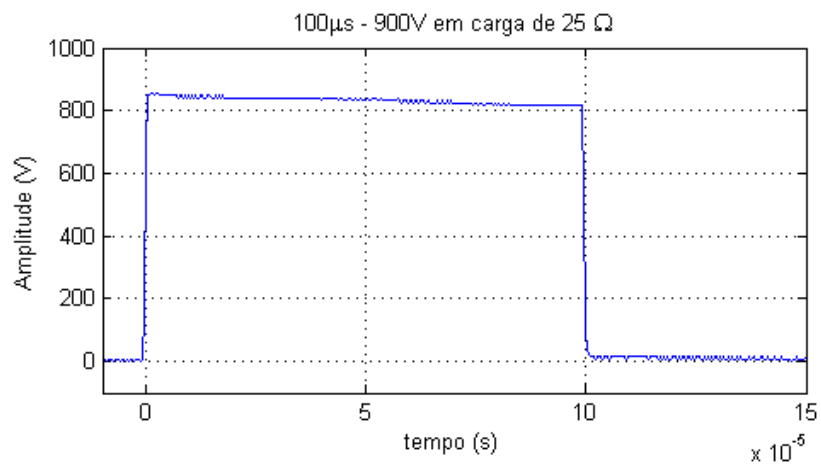


Figura 4.3: Pulso de 100µs e 900V aplicado a carga resistiva de 25Ω.

tensões de saída, podendo, portanto, gerar pulsos de diferentes amplitudes, como os da Figura 4.4 e 4.5, de $100\mu\text{s}$ e amplitudes de 100V e 500V , respectivamente.

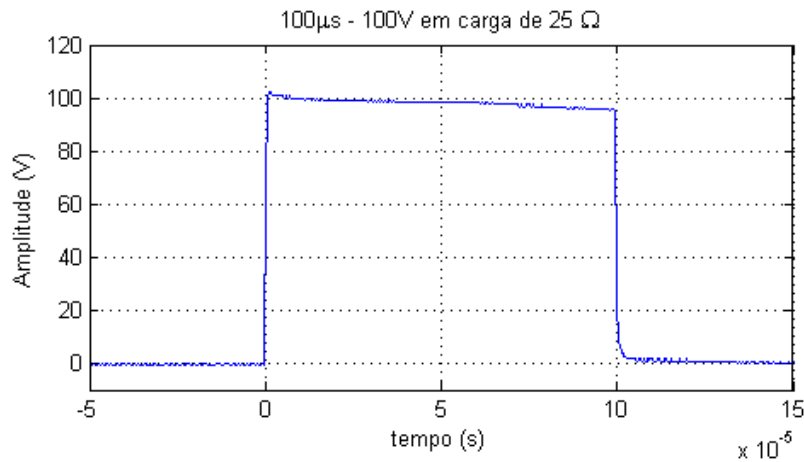


Figura 4.4: Pulso de $100\mu\text{s}$ e 100V aplicado a carga resistiva de 25Ω .

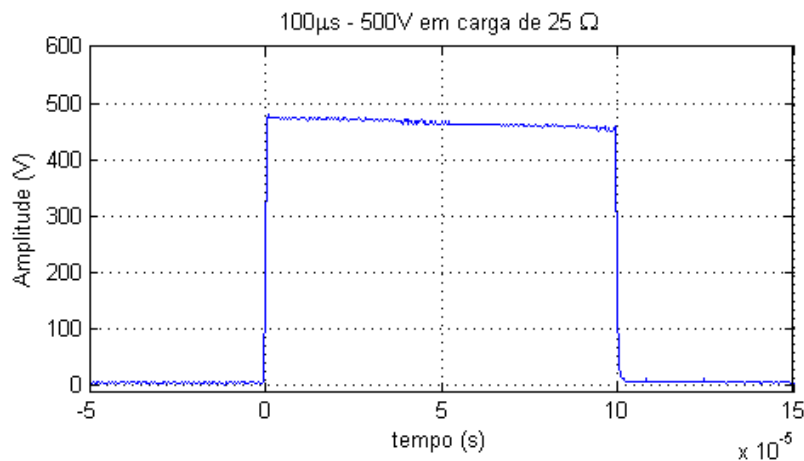


Figura 4.5: Pulso de $100\mu\text{s}$ e 500V aplicado a carga resistiva de 25Ω .

4.1.3.1 Carga Biológica

Durante a execução dos experimentos de eletroporação, as formas de onda geradas foram armazenadas para que pudessem ser analisadas. O espaço entre os eletrodos das cubetas utilizadas foi de 1mm . Assim, considera-se que os eletrodos são placas infinitas e que o campo a que as células foram expostas é o valor aplicado multiplicado por 10 para que se obtenha o campo em volts por centímetro.

Com a aplicação de um pulso de $2\mu\text{s}$ e 900V , obteve-se a forma de onda da Figura 4.6. Percebe-se que no intervalo de tempo em que a tensão de saída é maior que 90% da tensão máxima, a tensão sobe. Assim, há evidência de que a carga tem uma grande componente capacitiva, e o tempo de $2\mu\text{s}$ não é suficiente para carregar essa capacitância.

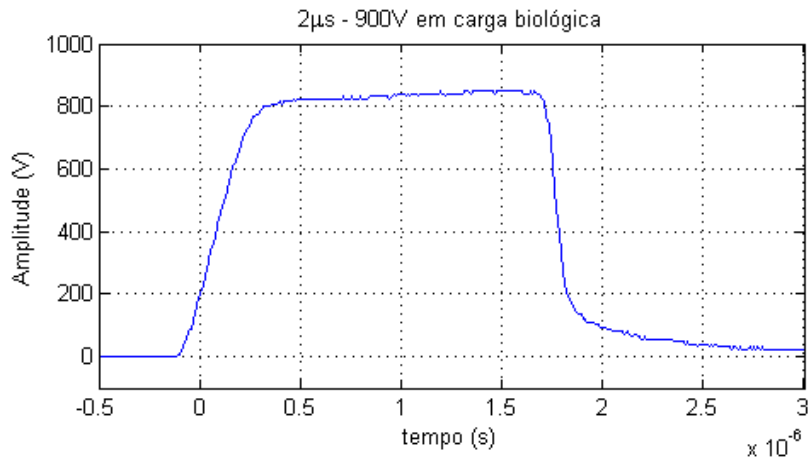


Figura 4.6: Pulso de $2\mu\text{s}$ - 900V em carga biológica.

Com a aplicação de um pulso de $50\mu\text{s}$ e 900V , obteve-se a forma de onda da Figura 4.7. Dessa vez, há uma queda de tensão no intervalo em que a tensão de saída é maior que 90% da tensão máxima, o que permite deduzir que $50\mu\text{s}$ é tempo suficiente para que a capacitância da carga seja carregada. A tensão máxima atingida é de 840V , o que decorre da baixa impedância da carga e do modo de operação do eletroporador, como já citado. Comparando os resultados obtidos com os testes feitos com resistores, pode-se perceber que a carga tem uma impedância menor que 25Ω .

Para verificar se o comportamento da tensão no pulso de $50\mu\text{s}$ e 900V é semelhante ao do pulso de $2\mu\text{s}$ e 900V , o intervalo dos primeiros $4\mu\text{s}$ do pulso de $50\mu\text{s}$ e 900V foi plotado no gráfico da Figura 4.8. Nesse gráfico, pode-se ver que o comportamento de subida da tensão acima de 800V por $2\mu\text{s}$ não se repete. Assim, pode-se investigar se essa subida é algo ligado à curta duração do pulso.

Para $100\mu\text{s}$ e 900V , obteve-se a forma de onda da Figura 4.9. A tensão máxima é de 880V e a tensão final é de 808V , uma queda menor que 10% do valor máximo durante o pulso.

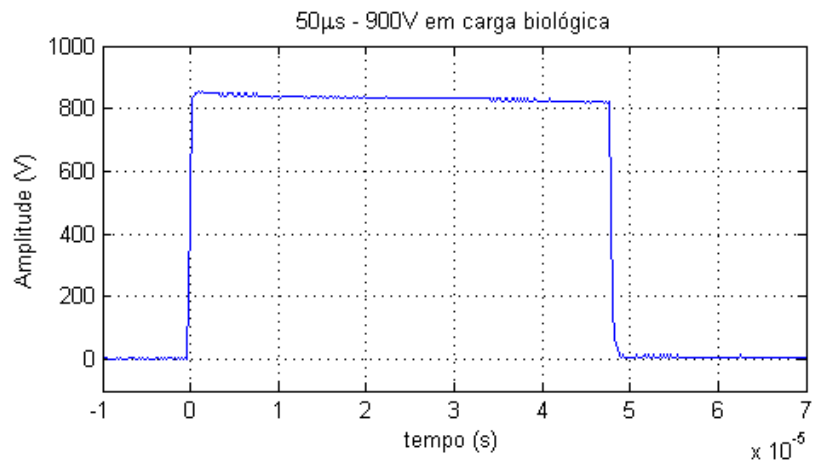


Figura 4.7: Pulso de 50µs - 900V em carga biológica.

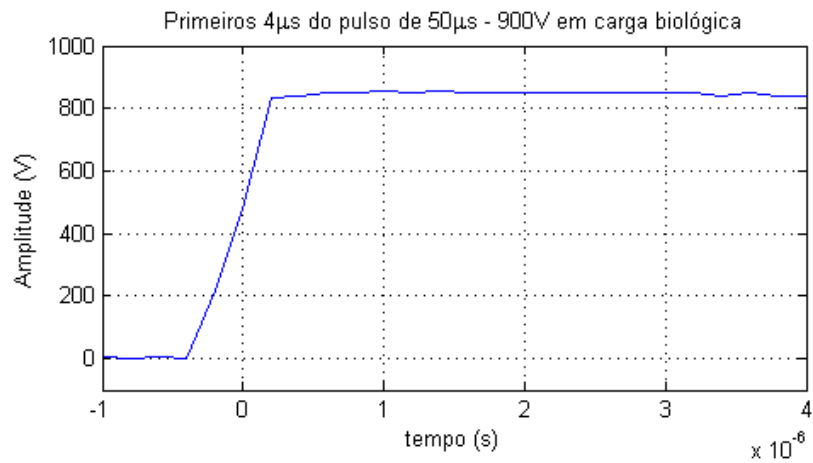


Figura 4.8: Primeiros 4µs do pulso de 50µs e 900V.

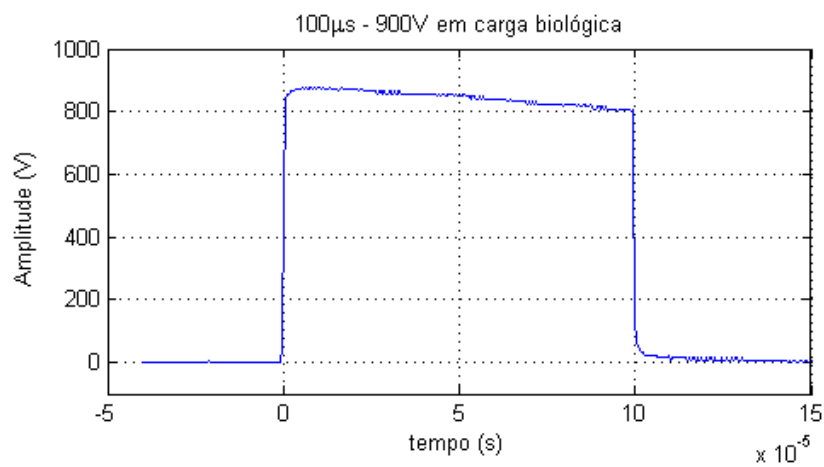


Figura 4.9: Pulso de 100µs - 900V em carga biológica.

Considerando a queda média de 9% da tensão durante a aplicação do pulso de $100\mu\text{s}$, pode-se utilizar a equação 4.1 para chegar a um valor aproximado da resistência elétrica da carga biológica.

$$V_f = V_0 e^{-\frac{t}{RC}} \quad (4.1)$$

Com os valores conhecidos da capacitância (C) de $73\mu\text{F}$, do tempo (t) de $100\mu\text{s}$, do valor inicial (V_0) de 880V, do valor final (V_f) de 808V, chega-se a um valor de resistência vista pelo capacitor de aproximadamente 14Ω . Considerando a resistência série da associação de capacitores do circuito de chaveamento igual a $2,2\Omega$ (EPCOS, 2010), chega-se a uma resistência da carga biológica de aproximadamente 12Ω . Os cálculos foram repetidos para outros pulsos, obtendo valores semelhantes.

Tensões intermediárias foram utilizadas e pulsos de $100\mu\text{s}$ e amplitudes de 500V e 100V podem ser vistos nas Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente. Como a saída do variac é zerada antes de acionar o circuito de pulsos, há uma queda de tensão até que o pulso seja, de fato, aplicado à carga. Essa queda se mostra mais acentuada para pulsos de 900V, visto que para 100V e 500V, há maior liberdade para que se aplique uma tensão superior à pretendida para compensar tal queda.

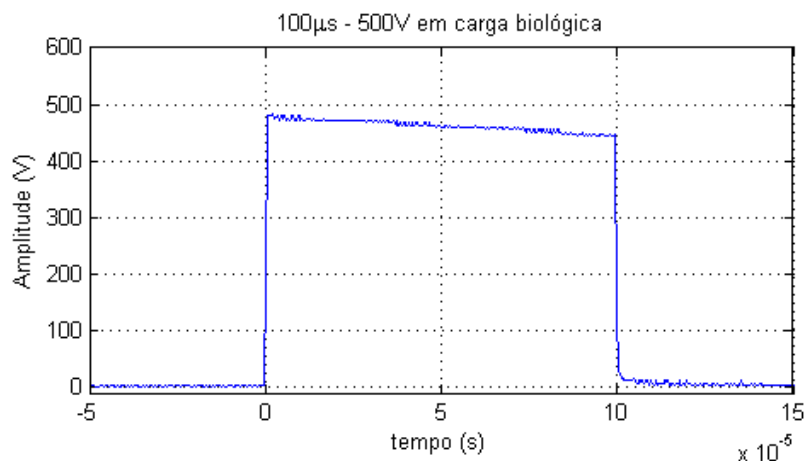


Figura 4.10: Pulso de $100\mu\text{s}$ - 500V em carga biológica.

Chaney and Sundararajan (2004) desenvolveram um eletroporador utilizando o mesmo layout do circuito utilizado no presente trabalho. No entanto, a carga

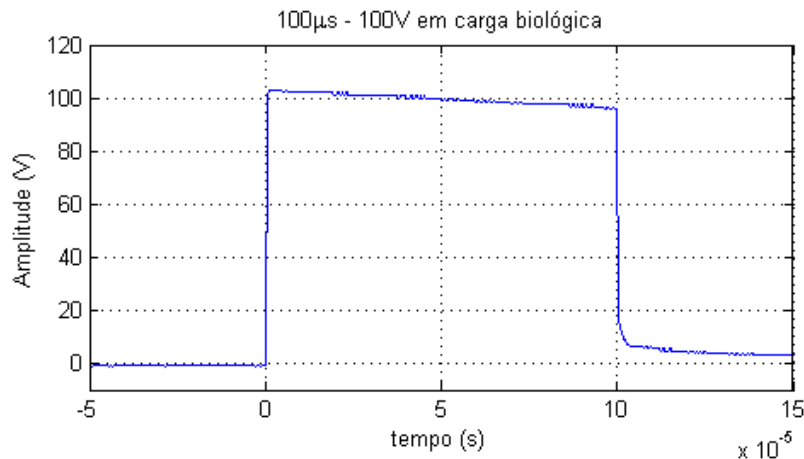


Figura 4.11: Pulso de 100µs - 100V em carga biológica.

de maior impedância (50Ω) permitiu que se utilizassem capacitores menores e MOSFET de potência ao invés do IGBT, resultando também em menor queda de tensão durante o pulso. Grenier and Kazerani (2008) utilizaram o mesmo layout e chegaram a pulsos de 3kV. Novamente, com carga de maior impedância, foi possível produzir pulsos com tensão mais constante.

Merla et al. (2010) desenvolveram um eletroporador para cargas de até 10Ω . Com tempo de duração dos pulsos de nanossegundos, o eletroporador teve que ser construído com capacitor em *stripline*, o que resultou em um circuito extremamente compacto.

Ao unir o uso de pulsos mais longos com cargas de baixa impedância, surgiu o problema de quedas de tensão máxima e queda de tensão durante o pulso. Ambas as quedas de tensão foram aceitáveis de acordo com os requisitos do projeto. A duração do pulso e a alta corrente necessária fez com que fosse utilizado IGBT ao invés de MOSFET, o que aumentou o tempo de descida do pulso devido ao aparecimento de um tempo de cauda, que fica mais evidente quando se utiliza pulsos curtos, como $2\mu s$, ou cargas de alta impedância. Existem estudos que analisam os efeitos da forma de onda na eletroporação (Kotnik et al., 2003) e, embora o tempo de cauda possa influenciar no fenômeno, a sua influência não foi estudada nesse trabalho, visto que todos os pulsos a que as células foram submetidas continham o mesmo tempo de cauda.

4.2 Efeitos da Eletroporação

4.2.1 Efeitos da Eletroporação na Viabilidade Celular

Após a leitura dos valores de absorbância, foram obtidos percentuais de viabilidade celular em relação ao grupo controle.

Inicialmente, apresenta-se, na Figura 4.12, o resultado do teste de MTT para pulsos unitários de $100\mu\text{s}$ e variação da amplitude entre $1\text{kV}/\text{cm}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$. Os valores no gráfico correspondem à média de valores da atividade metabólica em relação ao grupo controle para três experimentos diferentes.

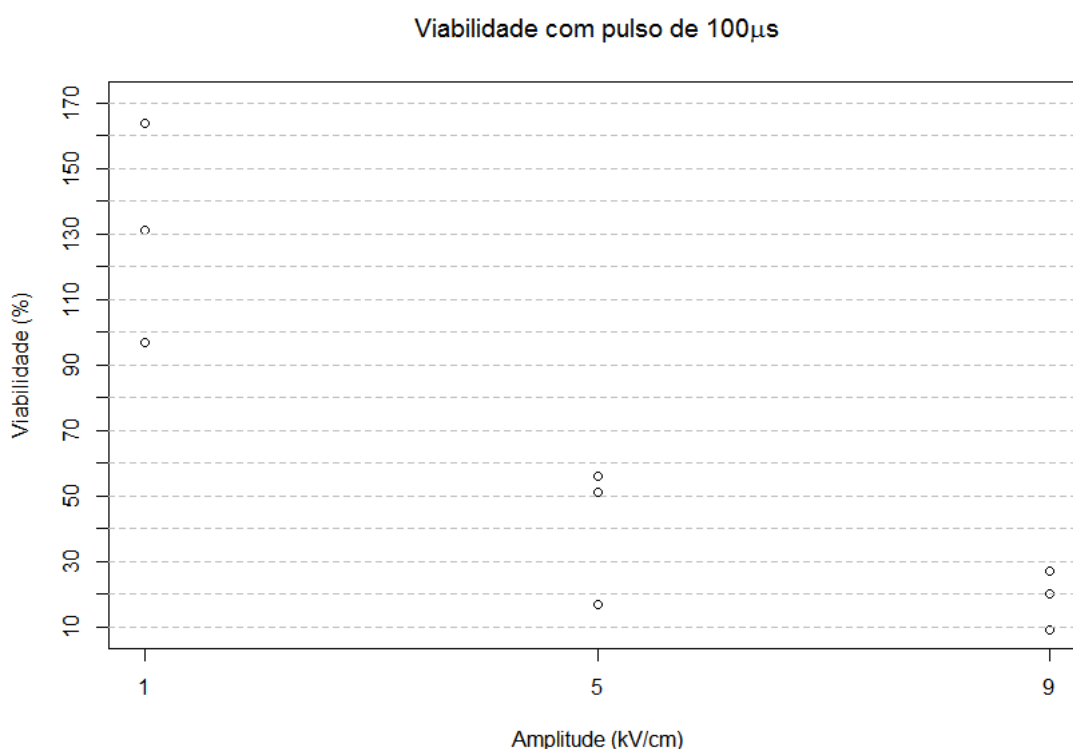


Figura 4.12: Valores do percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle para pulsos unitários de $100\mu\text{s}$ e variação da amplitude entre $1\text{kV}/\text{cm}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$.

O aumento da amplitude do pulso de $100\mu\text{s}$ diminuiu significativamente a viabilidade celular, de aproximadamente 130% para $1\text{kV}/\text{cm}$ de amplitude a cerca de 20% para $9\text{kV}/\text{cm}$. Para o pulso de $100\mu\text{s}$, a amplitude tem um efeito importante na viabilidade celular.

O teste "Tukey HSD" revelou que, enquanto o pulso de 1kV/cm produz efeitos estatisticamente diferentes dos demais pulsos, os pulsos de 5kV/cm e 9kV/cm não produzem resultados estatisticamente diferentes entre si.

A diminuição da viabilidade com o aumento da amplitude já era esperada. No entanto, não era esperado que, mesmo para pulsos de baixa intensidade, a transformação de MTT em formazan fosse maior que o grupo controle. Este dado sugere que o pulso pode ter alterado a taxa de metabolismo celular, resultando em um maior processamento de MTT em formazan, ou aumentado a taxa de reprodução celular, resultando em mais células no poço que transformaram mais MTT em formazan.

Não há entre as referências pesquisadas, qualquer menção a um eventual aumento de atividade celular ou reprodução celular devido a pulsos de eletroporação.

O aumento da amplitude do pulso produziu resultados diferentes entre pulsos de 1kV/cm e 5kV/cm, o que não ocorreu entre os pulsos de 5kV/cm e 9kV/cm. Assim, há evidências de que, a partir de 5kV/cm, aumentos maiores que 4kV/cm seriam necessários para produzir resultados estatisticamente diferentes.

Para pulsos unitários de 9kV/cm e duração de pulso variável entre $2\mu\text{s}$ e $100\mu\text{s}$, os valores do percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle, obtidos com o ensaio de MTT, podem ser vistos no gráfico da Figura 4.13.

O aumento da duração do pulso de 9kV/cm resultou em diminuição da viabilidade celular, de aproximadamente 90%, para $2\mu\text{s}$ de duração, a aproximadamente 20% para $100\mu\text{s}$ de duração.

O teste "TukeyHSD" revelou que o pulso de $2\mu\text{s}$ só produz resultados estatisticamente diferentes dos produzidos pelo pulso de $100\mu\text{s}$, enquanto os resultados produzidos pelo pulso de $50\mu\text{s}$ não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos demais pulsos.

Há evidências, portanto, de que tanto a amplitude quanto a duração dos pulsos afetam a viabilidade celular na faixa de pulsos estudada.

Em um estudo de viabilidade com séries de pulsos de 10ns, Ibey et al. (2011) encontraram significativa queda de viabilidade quando aumentaram o número de pulsos utilizando campos elétricos desde 2.25kV/cm até 290kV/cm, partindo de

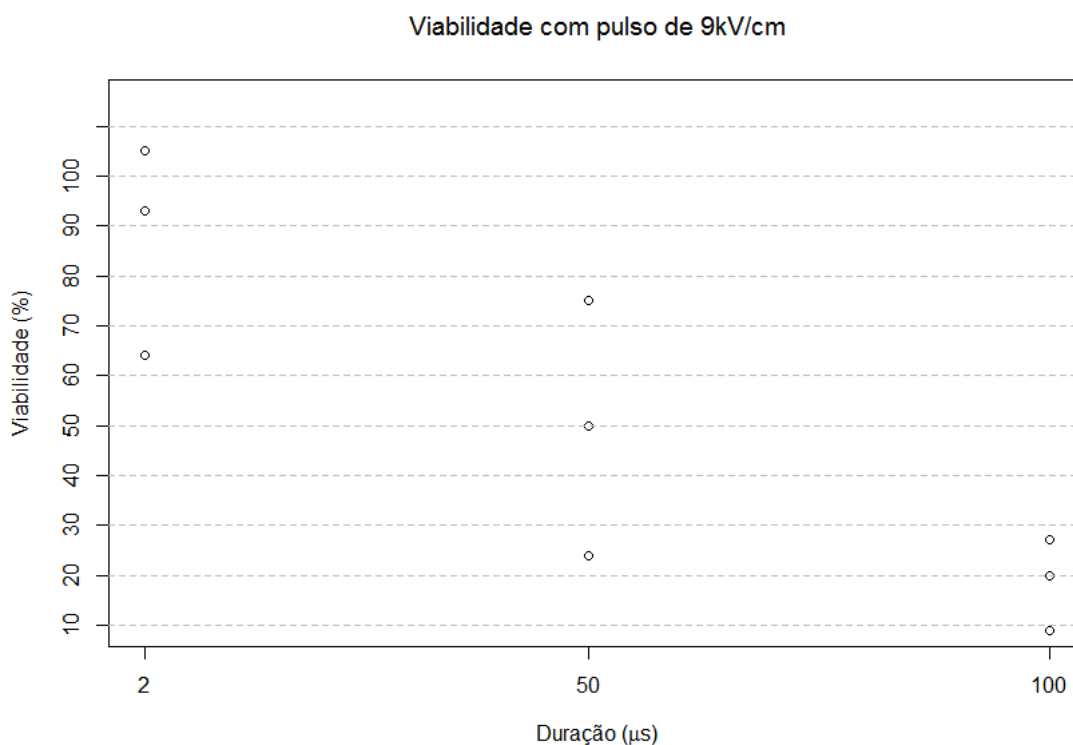


Figura 4.13: Valores do percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle para pulsos unitários de 9kV/cm e variação da duração entre 2 μs e 100 μs .

viabilidades próximas de 100% até sequências de pulsos de viabilidade aproximada de 5%.

Vásquez et al. (2012) realizaram testes de MTT em células neoplásicas, juntamente com administração de quimioterápicos. Os autores utilizaram uma sequência de 6 pulsos de 99 μs e concluíram que as sequências de pulsos sem os quimioterápicos não afetaram significativamente a viabilidade celular. No presente trabalho, os pulsos parecidos com os que foram utilizados no trabalho de Vásquez (1kV/cm e 100 μs) tiveram um efeito de aumento do metabolismo celular, com resultados de viabilidade superiores aos do grupo controle. Esse fato poderia ser esclarecido com estudos específicos sobre os efeitos dos pulsos de eletroporação sobre o metabolismo deste tipo celular.

Percentuais de viabilidade celular ainda menores que os encontrados neste trabalho poderiam ser alcançados utilizando pulsos em série. Um grande número de pulsos de baixa intensidade ou uma série com poucos pulsos de alta

intensidade poderiam alcançar uma viabilidade próxima de 100%, como sugere a revisão de Jiang et al. (2015), tornando possível o seu uso para técnicas como a eletroesterilização e eletroquimioterapia.

4.2.2 Efeitos dos Pulsos Elétricos na Permeabilidade ao Iodeto de Propídio

Os dados obtidos por citometria de fluxo nos experimentos de eletroporação com iodeto de propídio adicionado antes da eletroporação foram analisados no software Flowjo v10.0, obtendo-se histogramas das células analisadas em relação à intensidade do brilho.

No grupo controle, que recebeu iodeto de propídio mas não recebeu o pulso, as células exibiram uma fluorescência de baixa intensidade. Assim, para a análise do percentual de células marcadas, foi estabelecido que as células são consideradas marcadas se apresentarem brilho superior a 99.5% das células do controle.

Histogramas do grupo controle e das células lisadas são apresentados na Figura 4.14. É possível ver que o grupo controle (em cinza) apresenta duas populações distintas, uma de menor fluorescência e outra de maior fluorescência. A região de maior fluorescência do grupo controle se encontra quase na mesma região das células lisadas (vermelho). Assim, as células de alta fluorescência do grupo controle foram consideradas danificadas e excluídas no momento de estabelecer a região de células negativas para iodeto de propídio.

O limite entre células positivas e negativas para iodeto de propídio foi utilizado nos histogramas referentes a grupos expostos a pulsos e as células na região positiva foram consideradas marcadas por IP por meio de eletroporação. A Figura 4.15 mostra um histograma em que as células foram expostas ao pulso de $100\mu\text{s}$ e 9kV/cm . Esse histograma mostra que 76,6% das células estão na região considerada positiva para iodeto de propídio.

Essa análise foi feita para células que receberam os outros pulsos, em todas as repetições dos experimentos, e para cada repetição do experimento, foi estabelecida uma nova região de células marcadas baseada nas células de controle.

A Figura 4.16 mostra um gráfico dos percentuais de células marcadas em

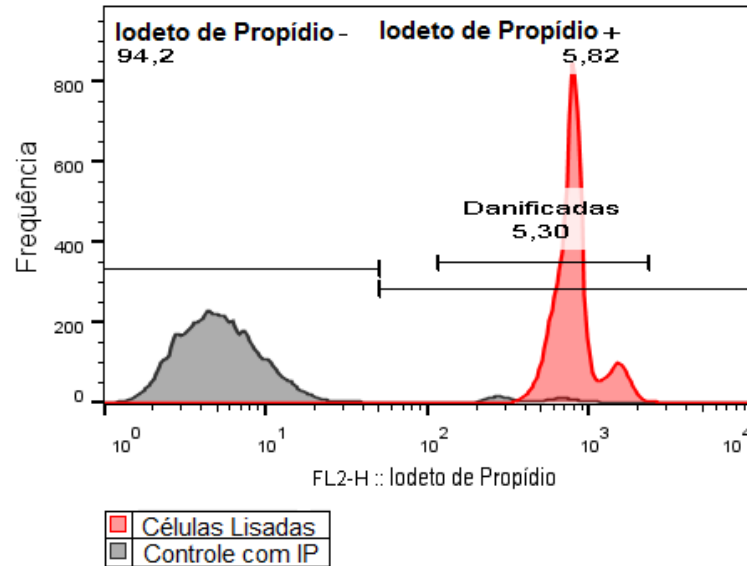


Figura 4.14: *Histograma de grupo controle com iodeto de propídio com regiões de células marcadas e região de células danificadas e histograma de células lisadas com IP.*

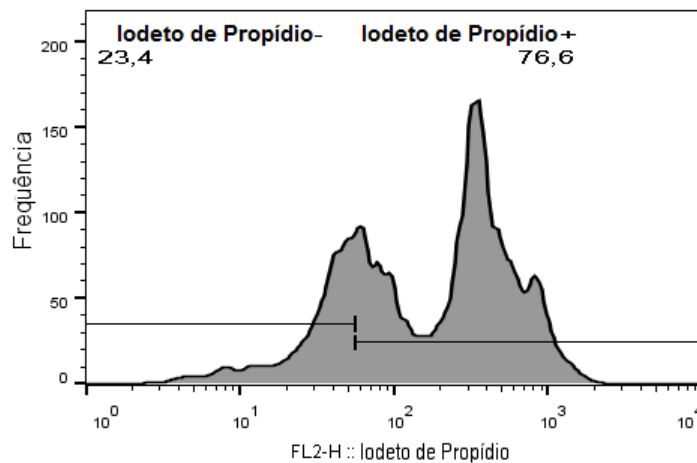


Figura 4.15: *Histograma de células com iodeto de propídio, pulso de 100µs - 9kV/cm com região de células consideradas marcadas.*

quatro experimentos, para pulsos de $100\mu\text{s}$, com variação da amplitude entre $1\text{kV}/\text{cm}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$, na qual pode-se ver o crescimento do percentual de células marcadas com o aumento da amplitude do pulso.

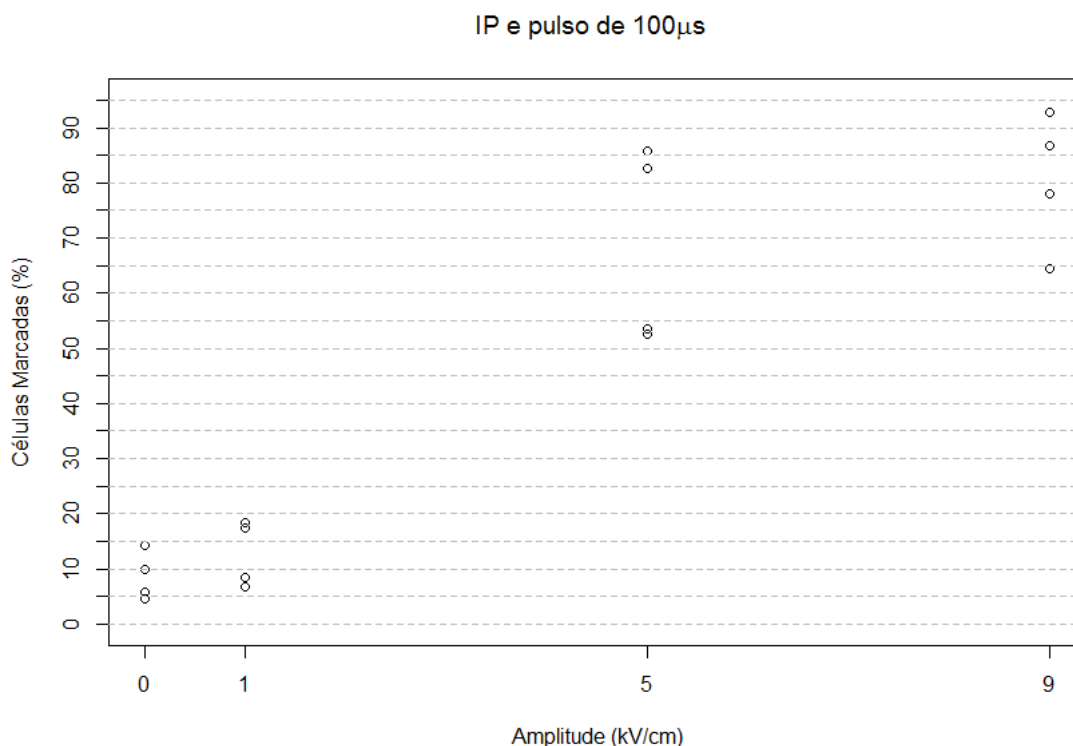


Figura 4.16: Percentuais de células marcadas com iodeto de propídio com pulsos unitários de $100\mu\text{s}$ e variação da amplitude entre $1\text{kV}/\text{cm}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$. IP adicionado antes da exposição aos pulsos. A amplitude de $0\text{kV}/\text{cm}$ é referente ao grupo controle.

Para pulsos de $100\mu\text{s}$ de duração, a amplitude de $1\text{kV}/\text{cm}$ foi pouco efetiva na marcação de células com IP, alcançando cerca de 10% de células marcadas, enquanto $9\text{kV}/\text{cm}$ chega a um percentual aproximado de 80% de células marcadas, mostrando que a amplitude tem um papel importante na entrada de moléculas de iodeto de propídio na faixa de pulsos estudada.

O teste "TukeyHSD" revelou que há diferenças estatísticas entre os resultados produzidos pelo pulso de $1\text{kV}/\text{cm}$ e os demais pulsos, mas não há diferença entre esse resultado e o grupo controle. Já o pulso de $5\text{kV}/\text{cm}$ não produziu resultados estatisticamente diferentes do pulso de $9\text{kV}/\text{cm}$. Há, portanto, evidência de que aumentos maiores que $4\text{kV}/\text{cm}$ são necessários a partir de $5\text{kV}/\text{cm}$ para

que os resultados sejam diferentes.

A Figura 4.17 mostra um gráfico dos percentuais de células marcadas em quatro experimentos, para pulsos unitários de 9kV/cm, com variação do tempo de duração entre $2\mu\text{s}$ e $100\mu\text{s}$, na qual pode-se ver o crescimento do percentual de células marcadas com o aumento da duração do pulso.

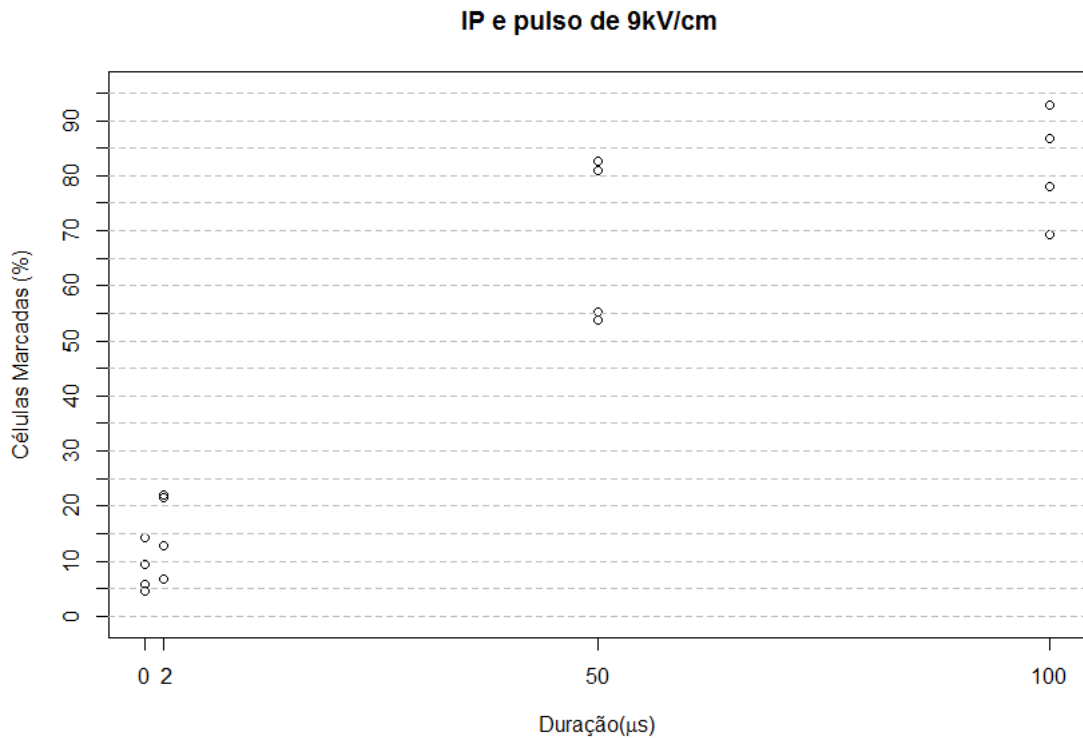


Figura 4.17: Percentuais de células marcadas com iodeto de propídio com pulsos unitários de 9kV/cm e variação da duração entre $2\mu\text{s}$ e $100\mu\text{s}$. IP adicionado antes da exposição aos pulsos. O tempo de $0\mu\text{s}$ é referente ao grupo controle

Para pulsos unitários de 9kV/cm, o tempo de $2\mu\text{s}$ de duração foi ineficiente para promover a entrada de iodeto de propídio nas células, marcando aproximadamente 15% das mesmas. Já a duração de $100\mu\text{s}$ resultou na marcação de aproximadamente 80% das células, demonstrando que a duração do pulso também tem um papel importante na entrada de moléculas de iodeto de propídio nas células na faixa de pulsos estudados.

O teste "TukeyHSD" revelou que, para amplitudes de 9kV/cm, o pulso de $2\mu\text{s}$ produziu resultados diferentes dos demais pulsos, mas que não foram esta-

tisticamente diferentes do grupo controle. Não houve diferença estatística entre os resultados produzidos pelo pulso de $50\mu s$ e $100\mu s$. Portanto, para resultados diferentes a partir da duração de $50\mu s$, aumentos de $50\mu s$ ou menos na duração do pulso seriam insuficientes para produzir resultados estatisticamente diferentes.

Pode-se perceber que tanto a amplitude quanto a duração do pulso desempenham papéis importantes na entrada de moléculas de iodeto de propídio, na faixa de pulsos estudada. Assim, espera-se que se possa controlar o percentual de células permeáveis a moléculas de tamanho similar ao IP ao manipular essas duas características do pulso.

He et al. (2007) utilizaram pulsos exponenciais de $400\mu s$ e conseguiram um percentual de células marcadas com iodeto de propídio de cerca de 90% com campos elétricos de $5kV/cm$. Com pulso de $1kV/cm$, a média de células consideradas eletroporadas foi de aproximadamente 10%. Comparando esses resultados com o do presente trabalho, há similaridades no percentual de células marcadas para pulsos de baixa amplitude. Quando se aumenta a amplitude, o tempo de duração parece desempenhar um papel maior no processo, já que He et al. (2007) obtiveram cerca de 90% das células eletroporadas, enquanto no presente trabalho obteve-se cerca de 80%. A explicação mais plausível das diferenças de marcação de células, além das diferenças metodológicas, se baseia na duração do pulso, maior no trabalho de He et al. (2007), e que poderia explicar o alcance de 90% de células eletroporadas com campo elétrico entre 5 e $6kV/cm$, enquanto que no presente trabalho foi alcançado um percentual de aproximadamente 80% com amplitude de $9kV/cm$.

Para os experimentos em que o iodeto de propídio foi adicionado 30 minutos após a aplicação dos pulsos, foram obtidos histogramas e os dados foram analisados da maneira como foi descrita para o experimento com IP adicionado antes da eletroporação.

O pulsos de $2\mu s$ com $9kV/cm$ de amplitude e $100\mu s$ com $1kV/cm$ não apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo controle para eletroporação com iodeto de propídio adicionado antes da aplicação dos pulsos. Portanto, esses pulsos não serão analisados para iodeto de propídio adicionado trinta minutos

após a aplicação dos pulsos.

Para o pulso de $100\mu\text{s}$ com $9\text{kV}/\text{cm}$ de amplitude, os percentuais de células marcadas com IP adicionado trinta minutos após a aplicação do pulso, juntamente com os percentuais de células marcadas com IP adicionado antes da aplicação do pulso podem ser vistos na Figura 4.18.

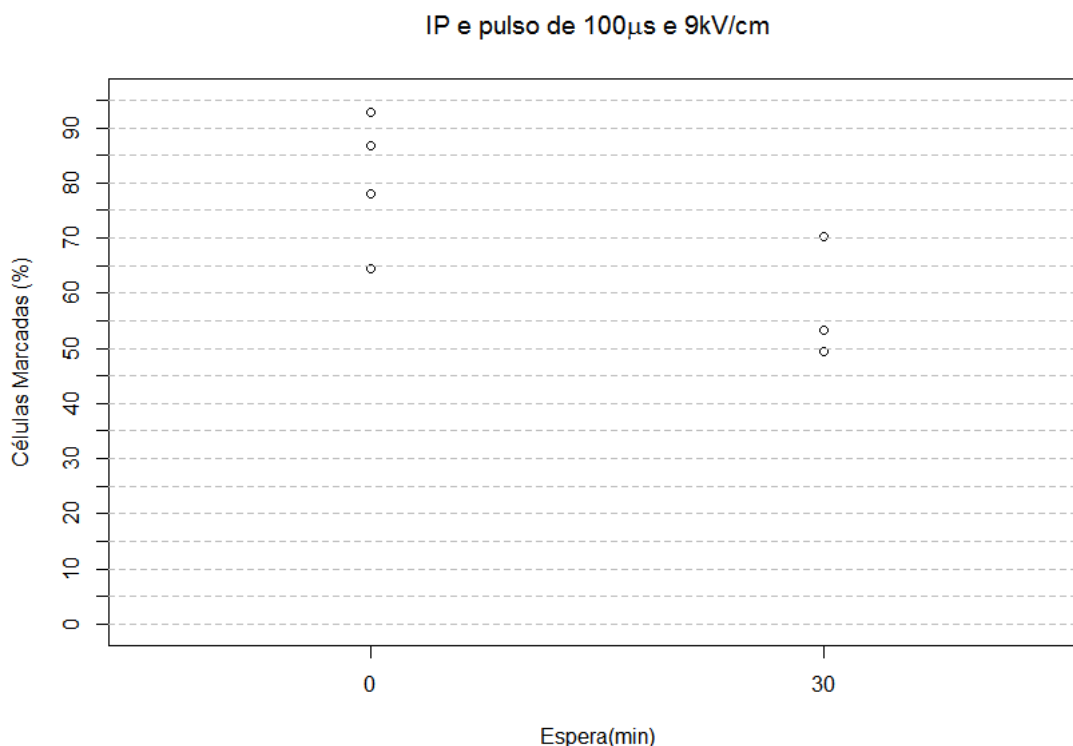


Figura 4.18: Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$.

Para o pulso de $100\mu\text{s}$ com $5\text{kV}/\text{cm}$ de amplitude, os percentuais de células marcadas com IP adicionado trinta minutos após a aplicação do pulso, juntamente com os percentuais de células marcadas com IP adicionado antes da aplicação do pulso podem ser vistos na Figura 4.19.

O teste "Tukey HSD" revelou que as quedas provocadas pela espera de trinta minutos após a aplicação dos pulsos são estatisticamente diferentes apenas para o pulso de $5\text{kV}/\text{cm}$ e $100\mu\text{s}$. Assim, não se pode afirmar que, para os demais pulsos a permeabilidade das células, trinta minutos após a aplicação dos pulsos, diminui. A diminuição das médias percentuais indica que um tempo de espera

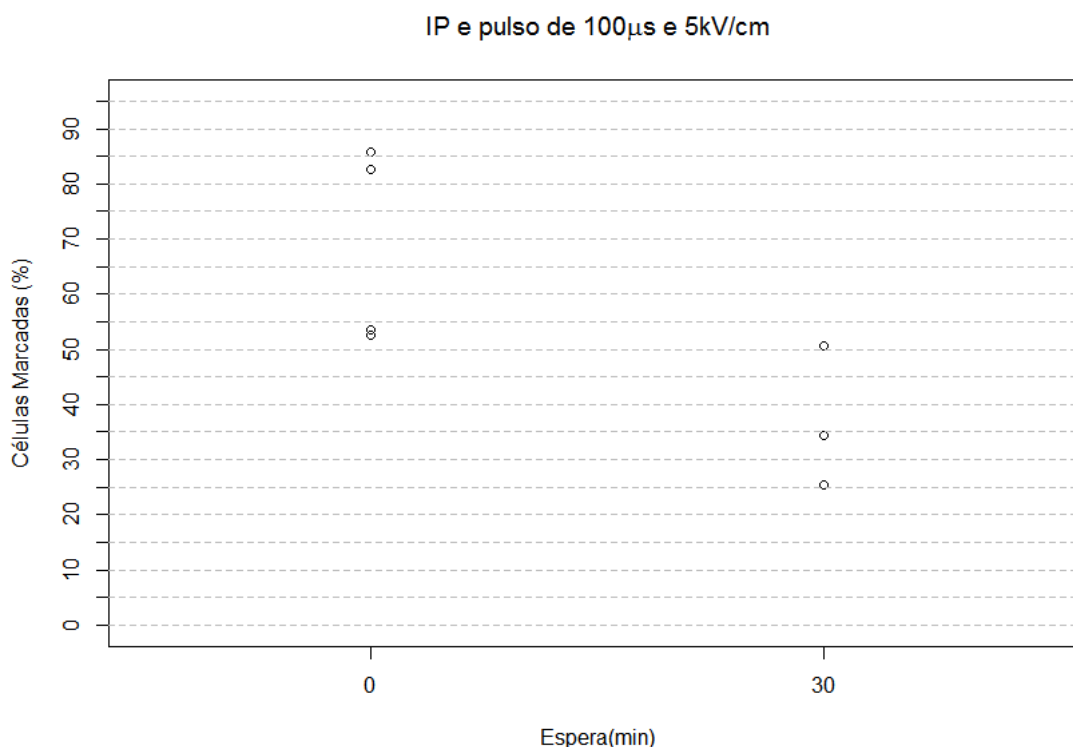


Figura 4.19: Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $100\mu\text{s}$ e $5\text{kV}/\text{cm}$.

mais longo poderia resultar diferenças estatisticamente significativas.

Para pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$ e $50\mu\text{s}$ de duração, os percentuais de células marcadas com IP adicionado trinta minutos após a aplicação do pulso, juntamente com os percentuais de células marcadas com IP adicionado antes da aplicação do pulso, podem ser vistas na Figura 4.20.

Para a realização dos testes com o pulso de $50\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$, foi necessária uma transformação dos dados. A transformação utilizada foi a de raiz quadrada.

O teste "Tukey HSD" revelou que as quedas provocadas pela espera de trinta minutos após a aplicação dos pulsos são estatisticamente diferentes apenas para o pulso de $9\text{kV}/\text{cm}$ e $50\mu\text{s}$. Assim, não se pode afirmar que, para os demais pulsos a permeabilidade das células, trinta minutos após a aplicação dos pulsos, diminui. A diminuição das médias percentuais indicam que um tempo de espera mais longo poderia resultar diferenças estatisticamente significativas.

Observou-se que, trinta minutos após a aplicação dos pulsos, houve uma queda

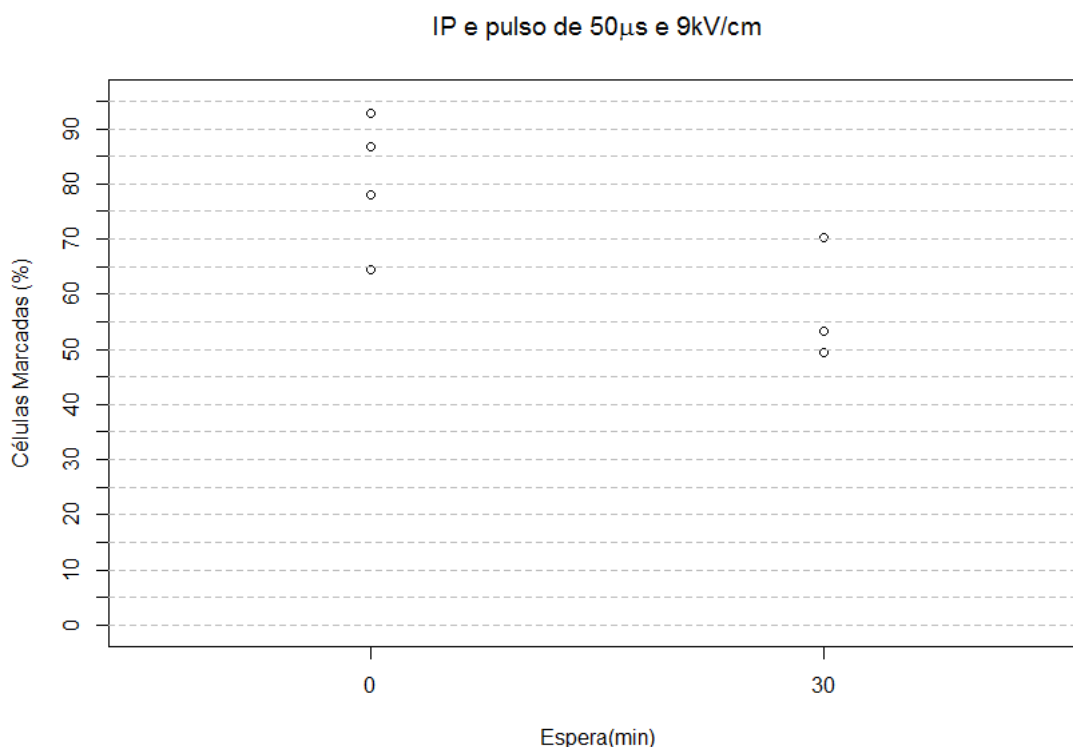


Figura 4.20: Percentuais de células marcadas com IP adicionado antes e trinta minutos após a aplicação do pulso de $50\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$.

de aproximadamente 30% na média percentual de células permeáveis ao iodeto de propídio para o pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$. Com o pulso de $100\mu\text{s}$ e $5\text{kV}/\text{cm}$ a queda da média percentual foi de aproximadamente 25% e para o pulso de $50\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ a queda foi aproximadamente 25%. O fato de não existir diferença estatística nos resultados do pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ indica que a maior amplitude e duração afetam a permeabilidade das células por mais tempo.

Pakhomov et al. (2009) realizaram testes de permeabilidade de células CHO e observaram que essas células continuavam permeáveis ao íon tálcio cerca de 10 minutos após a aplicação dos pulsos de 600ns e $3.6\text{kV}/\text{cm}$. Saulis and Saulè (2012) aplicaram pulsos de $0.7\text{kV}/\text{cm}$ - 2ms e $2\text{kV}/\text{cm}$ - $100\mu\text{s}$ a células CHO e observaram que o pulso mais longo produziu poros que tornaram a membrana plasmática permeável por mais tempo. Neste trabalho, o uso de pulsos de duração similar com amplitudes maiores pode ter sido responsável pela baixa queda do número de células permeáveis ao IP mesmo com tempo de espera maior que os

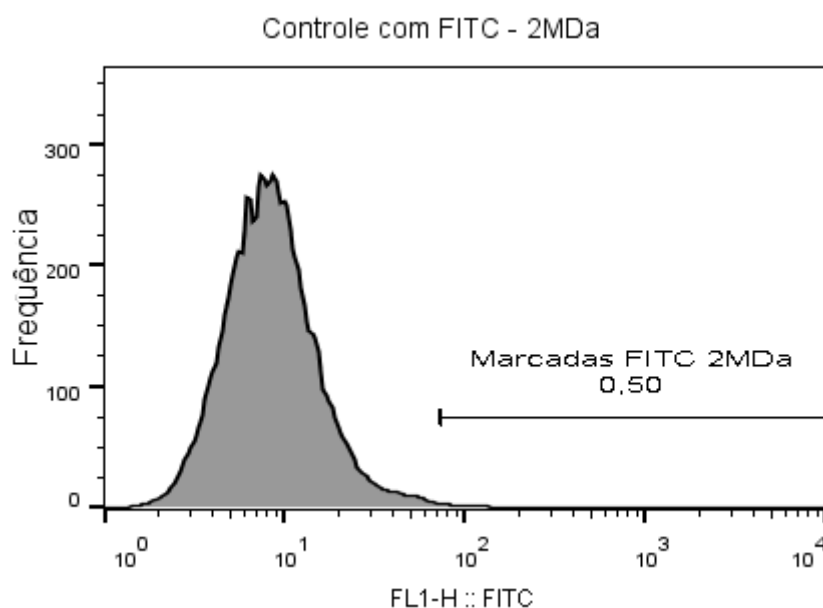


Figura 4.21: *Histograma do grupo controle com limite de células consideradas marcadas.*

trabalhos aqui citados.

4.2.3 Efeito dos Pulsos na Permeabilidade ao FITC-Dextran

Os histogramas de citometria de fluxo para experimentos com FITC-dextran de 2MDa e 20kDa foram analisados da mesma forma descrita na análise com iodeto de propídio.

Para FITC-dextran, o controle exibiu uma baixa fluorescência, provavelmente decorrente de moléculas presas à membrana, ou mesmo devido à internalização de algumas moléculas. Novamente, foi utilizado o grupo controle para delimitar uma região de células consideradas marcadas, mostrada na Figura 4.21. Foi marcada a região de luminosidade superior a 99,5% das células do grupo controle.

A Figura 4.22 mostra os percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de 20KDa, com pulso de $100\mu\text{s}$ e amplitude variável de $1\text{kV}/\text{cm}$ a $9\text{kV}/\text{cm}$.

O aumento da amplitude do pulso de $100\mu\text{s}$ resultou em um aumento das médias percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de 20kDa, de aproximadamente 0% para pulsos de $1\text{kV}/\text{cm}$ a 20% para pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$.

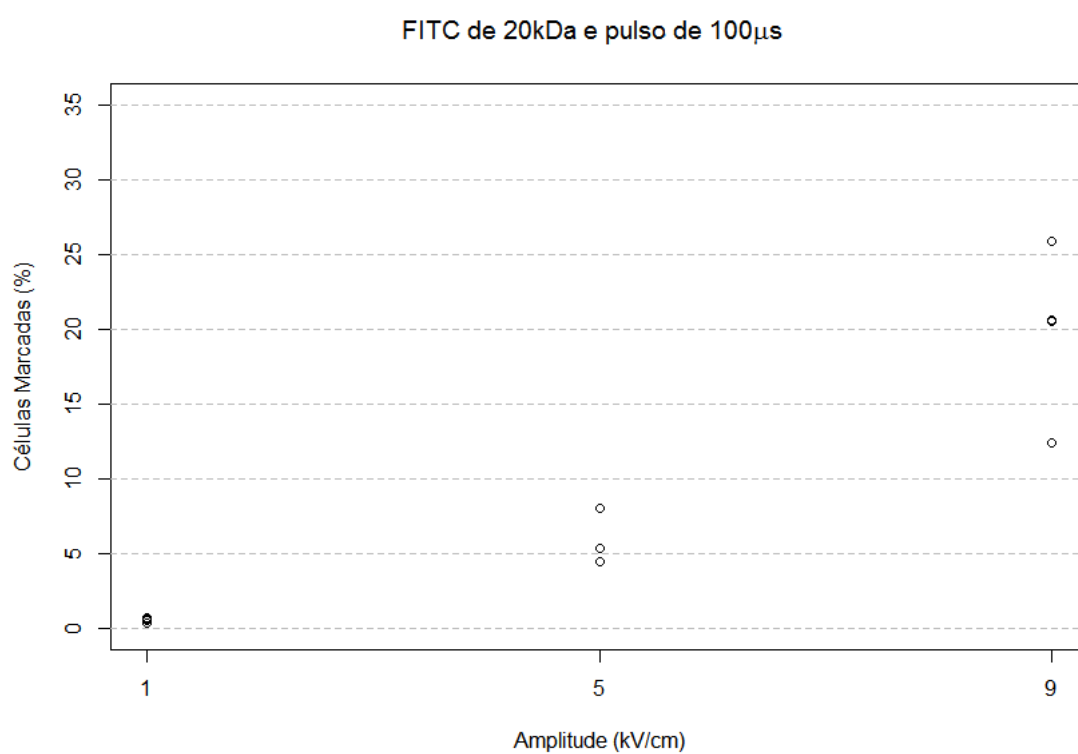


Figura 4.22: Percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de 20kDa com pulso de 100 μ s e amplitude entre 1kV/cm e 9kV/cm.

O teste "Tukey HSD" revelou que não houve diferença estatística entre os pulsos de 1kV/cm e 5kV/cm. Já o pulso de 9kV/cm produziu resultados estatisticamente diferentes dos demais pulsos. Enquanto um aumento de 4kV/cm inicialmente não produziu efeitos estatisticamente significativos, o mesmo aumento em relação ao pulso de 5kV/cm foi suficiente para produzir efeitos significativos.

Ao comparar a curva obtida com a curva de He et al. (2007), tem-se a impressão de que com pulsos de 100 μ s, o percentual ficou limitado à porção crescente da curva correspondente ao percentual de células marcadas com FITC-Dextran de 20kDa, alcançando um máximo de 20%, enquanto a curva de He vai além desse limite, se estabilizando em torno de 60%.

As médias dos percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de 20kDa obtidos com três repetições do experimento com pulsos unitários de 9kV/cm e duração entre 2 μ s e 100 μ s podem ser vistos na Figura 4.23. Existe um leve comportamento crescente das médias.

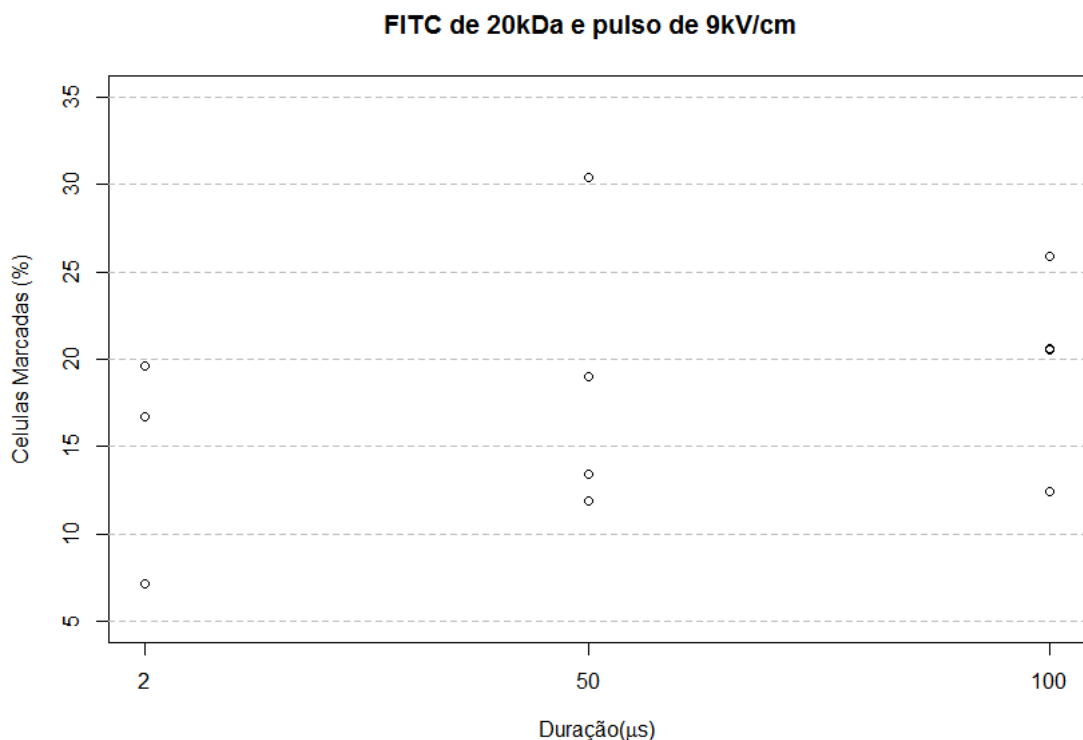


Figura 4.23: Percentuais de células marcadas com FITC-Dextran de 20kDa e pulso de 9kV/cm e duração entre 2 μ s e 100 μ s.

O teste ANOVA revelou que não houve diferença estatística entre os resultados produzidos pelos de 9kV/cm com as durações utilizadas, sendo um indício de que, para pulsos de 9kV/cm, a duração do pulso não desempenha um papel importante na eletroporação com pulsos de duração na faixa estudada.

Os pulsos estudados se revelaram ineficientes para permitirem a entrada de FITC-Dextran de 20kDa (6,6nm de diâmetro) nas células, sendo que a variação da amplitude causou diferença no percentual de células marcadas, enquanto a variação da duração com a maior amplitude não causou diferenças significativas nos percentuais de células marcadas.

A mesma análise dos experimentos anteriores foi feita com os dados obtidos nos experimentos com FITC-Dextran de 2MDa.

Para pulsos unitários de 100 μ s e amplitude variável entre 1kV/cm e 9kV/cm, obteve-se o gráfico da Figura 4.24, que mostra os percentuais de células marcadas em relação à amplitude.

Para a realização dos testes, foi necessária uma transformação dos dados. A transformação utilizada foi a de transformação logarítmica.

Existe uma tendência de crescimento do número de células marcadas com o aumento da amplitude de pulsos de 100 μ s, de aproximadamente 0%, com um pulso de 1kV/cm, a aproximadamente 30% de células marcadas com um pulso de 9kV/cm.

O teste "Tukey HSD" revelou que, para pulsos de 100 μ s de duração, o pulso de 1kV/cm produz resultados estatisticamente diferentes dos demais, enquanto pulsos de 5kV/cm e 9kV/cm produzem resultados semelhantes. Assim, a partir de 5kV/cm, um aumento de 4kV/cm foi insuficiente para produzir resultados estatisticamente diferentes.

Para pulsos de 9kV/cm com duração variável entre 2 μ s e 100 μ s, as médias dos percentuais de células marcadas de três experimentos podem ser vistos na Figura 4.25. Assim como no caso de FITC-Dextran de 20kDa, o tempo não desempenhou papel importante na marcação das células. Apesar da diferença das médias para pulsos de 2 μ s e os outros pulsos, o teste ANOVA revelou que os resultados são estatisticamente semelhantes.

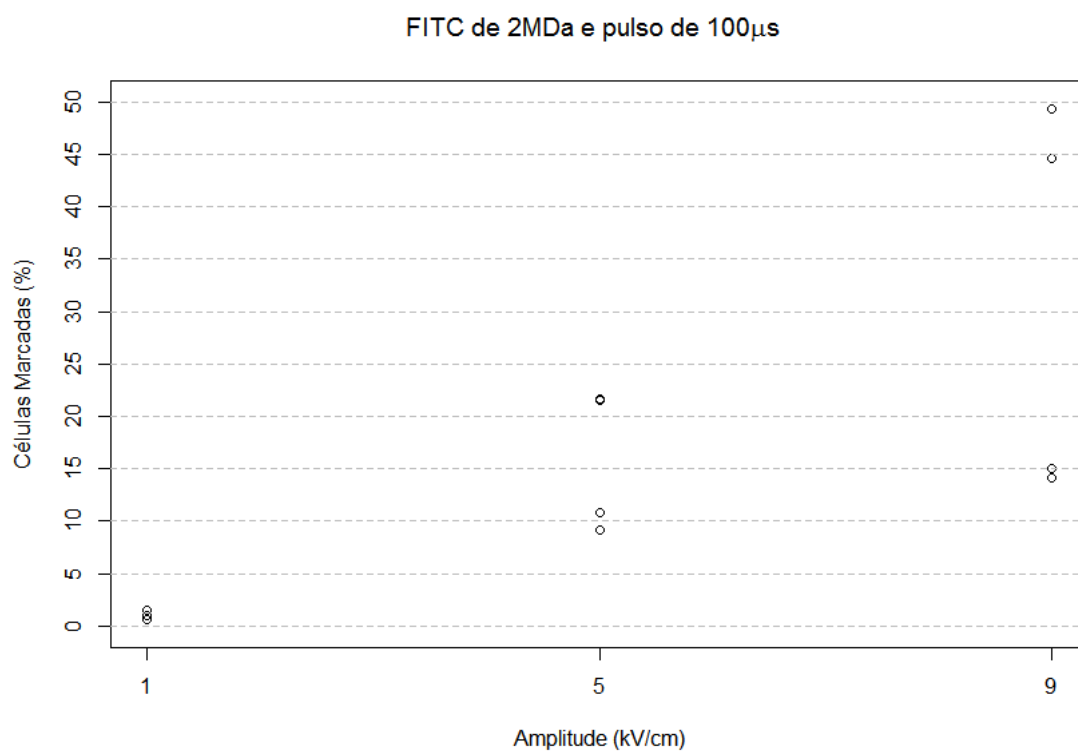


Figura 4.24: Média dos percentuais de células marcadas com FITC-Dextrano de 2MDa com pulsos unitários de 100 μ s e amplitude entre 1kV/cm e 9kV/cm obtidos com três repetições do experimento

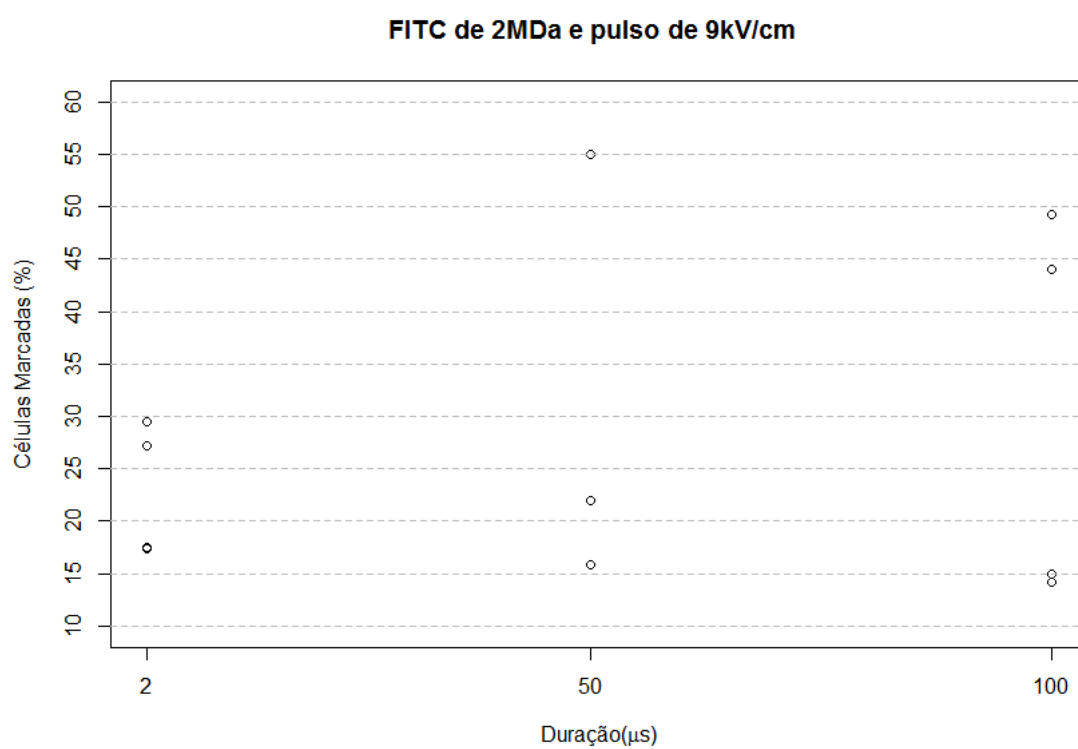


Figura 4.25: Percentual de células marcadas com pulso de 9kV/cm e duração variável entre 2 μs e 100 μs .

Assim como nos experimentos com FITC-Dextran de 20KDa, nos experimentos com FITC-Dextran de 2MDa um percentual baixo de células foi marcado, chegando a aproximadamente 30% com pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ de amplitude, o pulso mais longo e mais intenso. Para pulsos de $100\mu\text{s}$, a variação da amplitude causou variação significativa nos percentuais de células marcadas. Já para pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$, a variação do tempo não causou mudança significativa nos percentuais de células marcadas. Portanto, na faixa de pulsos estudada, a variação da amplitude causou mais mudanças que a variação da duração dos pulsos.

Para uma análise do experimento com relação ao tamanho das moléculas utilizadas, os percentuais de células marcadas com cada molécula, IP(1,2nm de diâmetro), FITC-Dextran de 20kDa (6,6nm de diâmetro) e FITC-Dextran de 2MDa (56nm de diâmetro) com pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ foram utilizados para plotar o gráfico da Figura 4.26. Esse pulso foi escolhido por ter sido o pulso que marcou o maior percentual de células em todos os experimentos.

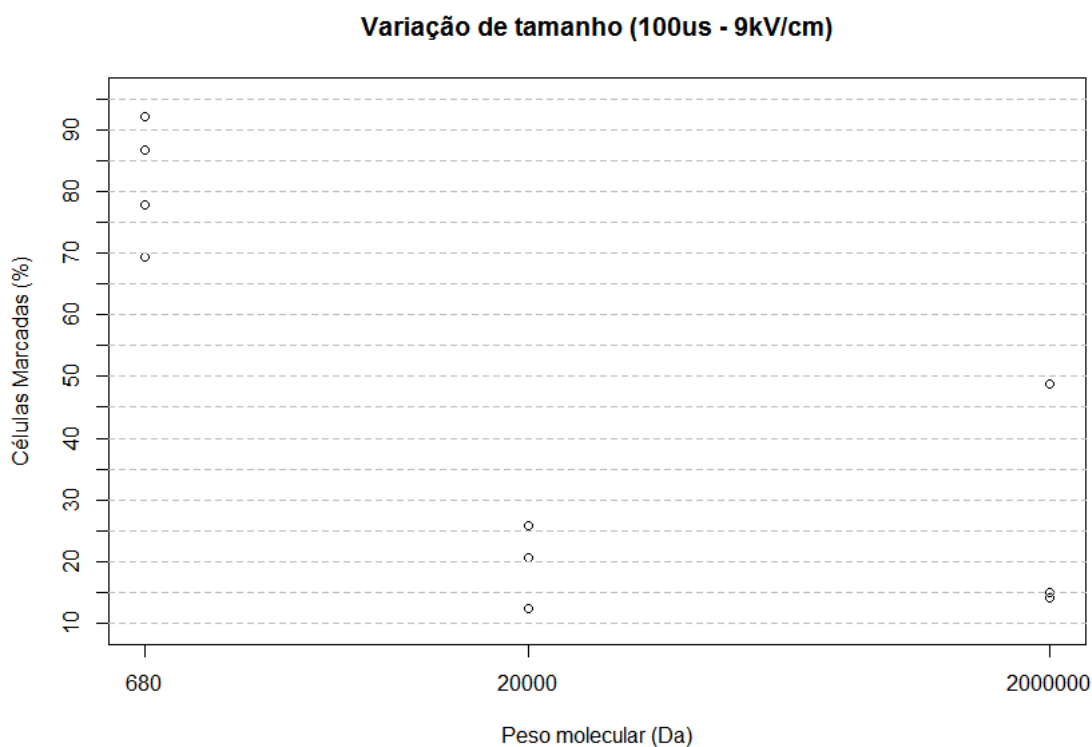


Figura 4.26: Percentuais de células marcadas em relação ao tamanho da molécula utilizada, com pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$.

A média de células marcadas com FITC-Dextran de 2MDa foi equivalente à média obtida com o uso de FITC-Dextran de 20KDa. Enquanto o percentual de células marcadas com iodeto de propídio fica em torno de 80%, a média de células marcadas com FITC-dextran fica em torno de 20%, com pequena diferença entre os dois tamanhos. O teste "Tukey HSD" confirmou que os resultados com a utilização de IP foram estatisticamente diferentes dos demais, e que os resultados com o uso de FITC-Dextran foram semelhantes entre si. Esses fatos indicam que os pulsos estudados produzem poros grandes o suficiente para permitirem a passagem de FITC-Dextran em poucas das células expostas.

No gráfico de He et al. (2007), é possível ver que de 20kDa para 70kDa, por exemplo, houve grande diferença. No entanto esse trabalho não avalia a variabilidade do processo e, portanto, não há como saber se os resultados são estatisticamente diferentes.

Esperava-se que com o aumento do tamanho das moléculas, o percentual de células marcadas diminuísse He et al. (2007). No entanto, mesmo com a diferença entre 20KDa (6.6nm) e 2MDa (52nm) essa diferença não apareceu. Assim, deve-se investigar mais profundamente para que se explique esse fato.

Proton et al. (1995) conseguiram inserir moléculas de FITC-Dextrano em protoplastos de arroz, com alguns casos de percentual de viabilidade maior que o número de células marcadas por FITC-Dextran, utilizando pulsos de 1ms ou sequências de pulsos de $250\mu\text{s}$ e amplitude de 260 a $1040\text{V}/\text{cm}$. Essa comparação dá indícios de que pulsos mais longos e de menor intensidade seriam mais indicados para eletroporação com moléculas grandes (centenas de kDa) em situações nas quais se deseja que as células permaneçam viáveis após o processo.

Bartoletti et al. (1989) utilizaram pulsos de $8\text{kV}/\text{cm}$ e $50\mu\text{s}$ de duração em células de levedura para que estas internalizassem moléculas de FITC-Dextranos de 70kDa. As informações de viabilidade são citadas de um outro trabalho, de Weaver et al. (1988), no qual células do mesmo tipo são eletroporadas e um alto percentual de viabilidade é obtido para pulsos de até $5\text{kV}/\text{cm}$ e uma viabilidade de 50% é obtida para pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$. A diferença entre resultados poderia ser explicada pelas diferenças metodológicas como tipo de células utilizadas ou a

concentração de FITC-Dextrano.

Pucihar et al. (2011) concluíram que além da amplitude e duração do pulso, o número de pulsos utilizados em série também afeta a eletroporação das células. Assim, mais estudos poderiam ser feitos para esclarecer se séries de pulsos com as características dos pulsos unitários deste trabalho poderiam aumentar o percentual de células eletroporadas.

A Figura 4.27 apresenta as imagens de microscopia de fluorescência para células expostas a um pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ com FITC-Dextran de 20kDa. Nas imagens do controle não é possível visualizar a fluorescência do FITC-Dextran. Nas imagens de células que receberam o pulso é possível ver regiões marcadas em verde. Há a presença de vestígios de células marcadas com FITC-Dextran no campo analisado, correspondendo provavelmente a células que morreram em decorrência da exposição ao pulso elétrico. A presença desses vestígios em grande quantidade é mais um indício da baixa viabilidade para pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$. As imagens de microscopia são, portanto, mais uma evidência de que o pulso de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$ permitiu a entrada de FITC-Dextran de 20kDa nas células.

4.3 Conclusão

O eletroporador construído foi capaz de gerar pulsos que alteraram significativamente o percentual de células marcadas e a viabilidade celular. A baixa impedância da carga provocou quedas de tensão máxima aplicada e quedas de tensão acentuadas durante a aplicação dos pulsos. A diferença entre os valores finais e iniciais dos pulsos foram menores que 10%, o que foi considerado aceitável. A diferença entre o valor nominal e o valor máximo do pulso também foi menor que 10%.

Os ensaios de viabilidade com MTT revelaram uma queda acentuada da viabilidade com o aumento da intensidade de pulsos de $100\mu\text{s}$ ou da duração de pulsos de $9\text{kV}/\text{cm}$.

Nos experimentos de eletroporação com IP, obteve-se maior média de percentual de células marcadas para o pulso de $100\mu\text{s}$ - $9\text{kV}/\text{cm}$, estatisticamente seme-

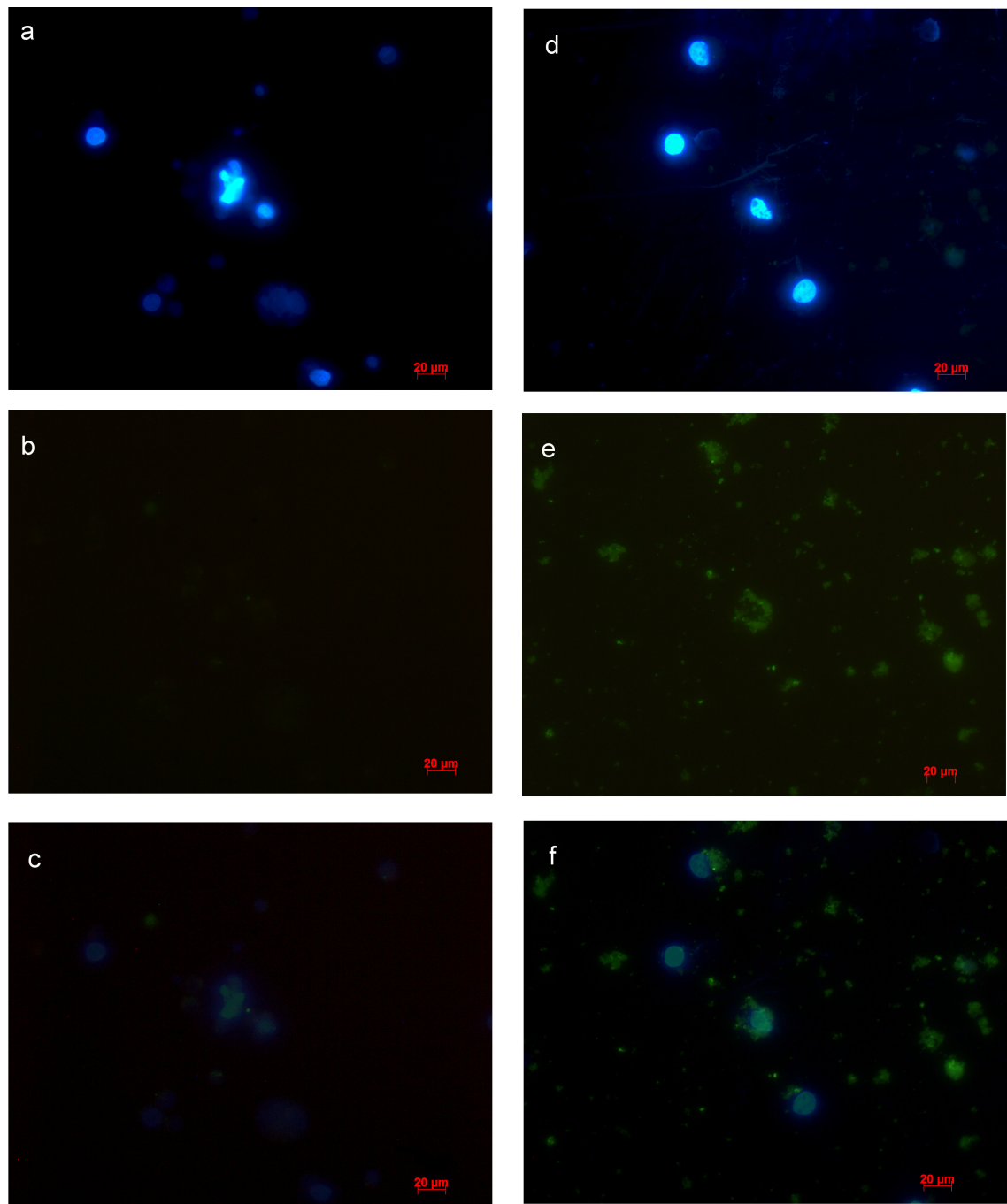


Figura 4.27: *Microscopia de fluorescência com FITC-Dextran (Verde) e marcação dos núcleos celulares com DAPI (Azul): a) Controle no filtro DAPI. b) Controle no filtro FITC. c) Sobreposição das imagens a e b. d) 100μs - 9kV/cm com filtro DAPI e) 100μs - 9kV/cm com filtro FITC f) Sobreposição das imagens de d e e.*

lhante ao percentual obtido com pulsos de $100\mu\text{s} - 5\text{kV}/\text{cm}$ ou $50\mu\text{s} - 9\text{kV}/\text{cm}$. A média do percentual de células marcadas diminui acentuadamente quando diminui-se a sua intensidade ou duração.

Trinta minutos após a aplicação dos pulsos, houve uma queda de 20% a 30% do percentual de células marcadas com IP. Essa queda não foi estatisticamente significativa para pulsos de $100\mu\text{s}$ e $9\text{kV}/\text{cm}$, indicando que para esses pulsos, os efeitos do pulso são mais duradouros.

Nos experimentos de eletroporação com FITC-Dextran, não houve diferenças entre os tamanhos de 6nm e 52nm. Em ambos os casos, a média percentual máxima de células marcadas variou de 20% a 30% e a variação do tempo não modificou significativamente o número de células marcadas.

Os pulsos utilizados neste trabalho se revelaram agressivos para as células LLC-MK2, provocando baixo percentual de viabilidade para pulsos que resultaram em uma maior marcação de células com IP ou FITC-Dextran. Os pulsos também se revelaram ineficientes para produzir poros que permitissem a passagem de FITC-Dextran através da membrana plasmática.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

O eletroporador construído no LEA foi capaz de gerar os pulsos elétricos de $2\mu s$ a $100\mu s$ e de 100V a 900V de amplitude. Devido às características da carga e à necessidade de portabilidade, foi feito um compromisso entre a queda de tensão durante o pulso aplicado e o volume necessário para maior armazenamento de energia, resultando em uma queda de tensão menor que 10% da tensão máxima aplicada durante o pulso.

O circuito ainda se encontra basicamente manual, com um microcontrolador exclusivamente para controle da temporização dos pulsos, com carregamento manual da tensão a ser aplicada. Assim, em um trabalho futuro, o circuito poderia ser atualizado para que a tensão aplicada também fosse controlada por microcontrolador, o que provavelmente diminuiria os erros entre a tensão nominal e a tensão real aplicada.

Para a obtenção de alta tensão em corrente contínua, foi utilizado um autotransformador em série com um transformador de isolamento para alimentar um multiplicador capacitivo. Uma fonte em alta frequência diminuiria o tamanho do transformador de isolamento e eliminaria a necessidade de um autotransformador, tornando o circuito mais leve e portátil.

Os ensaios de viabilidade celular com MTT revelaram que para pulsos de $100\mu s$, a viabilidade foi maior que a do grupo controle para amplitude de 1kV/cm. A viabilidade cai com o aumento da amplitude, chegando a aproximadamente 25% para pulsos de 9kV/cm. Já para pulsos de 9kV/cm com duração de $2\mu s$, a

viabilidade ficou em torno de 90%, caindo com o aumento do pulso e chegando a aproximadamente 25% para o pulso de 100 μ s. Assim, para os pulsos na faixa estudada, tanto a amplitude quanto a duração do pulso têm influências na viabilidade celular.

Para pulsos de 100 μ s e 1kV/cm, o resultado dos testes de MTT causou surpresa, pois esperava-se que a viabilidade de células expostas a pulsos elétricos sempre fosse igual ou menor que o grupo controle e, no entanto, o teste de MTT revelou maior atividade metabólica para o pulso de 100 μ s e 1kV/cm. Assim, mais um tema para ser estudado seria o efeito dos pulsos elétricos no metabolismo das células.

Os resultados dos testes de eletroporação com IP indicam que tanto a variação da amplitude de pulsos de 100 μ s quanto a variação da duração de pulsos de 9kV/cm afetam o percentual de células marcadas, chegando a 80% com pulsos de 100 μ s e 9kV/cm. Não houve diferença estatística significativa entre o pulso de 100 μ s e 9kV/cm e pulsos de 50 μ s e 9kV/cm ou 100 μ s e 5kV/cm, no entanto, a tendência de crescimento das médias indica que a diferença poderia surgir para pulsos mais longos ou mais intensos.

Os testes nos quais o IP foi adicionado 30 minutos após a aplicação dos pulsos revelaram que após esse intervalo, as células continuaram permeáveis aos pulsos. O intervalo provocou a queda de 30% na média percentual de células marcadas para pulsos de 100 μ s e 9kV/cm e 5kV/cm e cerca de 25% para pulsos de 50 μ s e 9kV/cm. A falta de significância estatística para o pulso de 100 μ s e 9kV/cm indica que os efeitos desse pulso seriam mais duradouros.

Os resultados dos ensaios de eletroporação com moléculas de FITC-Dextran de 20kDa (6,6nm de diâmetro) e 2MDa (56nm de diâmetro) foram similares. Enquanto pulsos de 100 μ s com duração de 1kV/cm resultaram na marcação de quase nenhuma célula, pulsos de 9kV/cm marcaram em torno de 30% das células. Já os pulsos de 9kV/cm com variação da duração entre 2 μ s e 100 μ s marcaram em torno de 25% das células. Houve pequenas diferenças entre as médias, no entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Futuramente, pode-se estudar os efeitos da amplitude e duração simultanea-

mente. Para isso, é necessário aperfeiçoar as metodologias para que seja possível terminar os experimentos a tempo de usar os equipamentos ou fixar as células para que sejam utilizadas posteriormente, cuidando para que fluoróforos não percam sua fluorescência.

Os pulsos utilizados nesse trabalho se revelaram pulsos agressivos para o tipo celular utilizado (LLC-MK2). Os experimentos revelaram um baixo percentual de viabilidade celular para que se obtivesse células marcadas com iodeto de propídio. Ao utilizar FITC-Dextran, obteve-se percentuais menores de células marcadas.

Portanto, os pulsos utilizados nesse trabalho seriam mais indicados para aplicações com o objetivo de provocar morte celular associada à inserção de pequenas moléculas nas células, como por exemplo, na eletroquimioterapia ou ablação de tecidos. Para aplicações como inserção de DNA ou eletroesterilização, pulsos diferentes devem ser estudados para que se otimize a entrada de substâncias ou a mortalidade celular.

Os pulsos desse trabalho poderiam ser utilizados em sequências de pulsos e, assim, estudar a variação da viabilidade e do percentual de células marcadas com o número e a frequência dos pulsos, além da amplitude e duração. Com isso, uma diversidade maior de efeitos poderia ser atingida mesmo com as limitações de $100\mu\text{s}$ e 9kV/cm .

O tempo em que as células permanecem permeáveis também poderia ser alvo de mais estudos, permitindo melhorar os conhecimentos sobre a janela de tempo na qual a membrana celular permite a passagem de moléculas para o citoplasma.

Estudos futuros poderiam abranger o efeito da temperatura na recuperação das células, o que ajudaria a otimizar os protocolos com relação à temperatura de conservação das células durante o experimento.

As cubetas utilizadas nesse trabalho ofereceram uma forma rápida e prática de exposição das células aos pulsos elétricos. No entanto, em trabalhos futuros, pode-se utilizar outras formas de exposição que permitam a observação da ocorrência da eletroporação no microscópio ou que utilizem células aderidas, aumentando as capacidades de análise morfológica e proporcionando que se localize as regiões da membrana nas quais ocorreu a permeabilização.

A eletroporação pode ser uma boa ferramenta para a manipulação da permeabilidade celular. No entanto, é preciso estudar o efeito de diferentes tipos de pulsos, com relação à amplitude e duração, bem como número de pulsos em sequência e intervalo entre os pulsos, para que a técnica seja otimizada para cada aplicação. Outros equipamentos de eletroporação poderiam ser desenvolvidos para que se pudesse gerar pulsos mais curtos e mais intensos, e assim investigar o efeito desses pulsos nas células biológicas.

Referências

- Angelis, A. D., Kolb, J. F., Zeni, L., and Schoenbach, K. H. (2008). Kilovolt Blumlein pulse generator with variable pulse duration and polarity. *Review of Scientific Instruments*, pages 1–4.
- Bartoletti, D. C., Harrison, G. I., and Weaver, J. C. (1989). The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *FEBS letters*, 256(1-2):4–10.
- Beebe, S. J., Fox, P. M., Rec, L. J., Willis, E. L. K., and Schoenbach, K. H. (2003). Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB*.
- Belehradek, M., Domenge, C., Luboinski, B., Orłowski, S., Behraderk, J., and Mir, L. M. (1993). Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. first clinical phase i-ii trial. *Cancer*, 72.
- Bertacchini, C., Margotti, P. M., Bergamini, E., Lodi, A., Ronchetti, M., and Cadossi, R. (2007). Design of an irreversible electroporation system for clinical use. *Technology in cancer research & treatment*, 6(4):313–20.
- Boylestad, R. L. and Nashelsky, L. (2004). *Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos*. Prentice Hall, 8^a edition.
- BTX (2010). Btx electroporation catalog.
- Campana, L. G., Mocellin, S., Basso, M., Puccetti, O., de Salvo, G. L., Chiarion-Sileni, V., Vechiato, A., Corti, L., Rossi, C. R., and Nitti, D. (2009). Bleomycin-based electrochemotherapy: Clinical outcome from a single institution’s experience with 52 patients. *Annals of Surgical Oncology*, 16.

- Chaney, A. and Sundararajan, R. (2004). Simple mosfet-based high-voltage nanosecond pulse circuit. *IEEE Transactions on Plasma Science*, Vol.32.
- Chang, D. C. and Reese, T. S. (1990). Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophysics Journal*, 58.
- Ching, C. T.-S., Sun, T.-P., Huang, W.-T., and Chin-Sung Hsiao, S.-H. H., and Chang, K.-M. (2012). A circuit design of a low-cost portable and programmable electroporation device for biomedical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166-167:292–300.
- Consultancy, T. (2010). FITC-Dextran.
- Deng, J., Schoenbach, K. H., Bluescher, E. S., Hair, P. S., Fox, P. M., and Beebe, S. J. (2003). The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophysical Journal*, 84.
- EPCOS (2010). Datasheet capacitor b43304.
- Eppendorf (2010). Website eppendorf.
- Eppendorf (2014). Página de especificação eporator.
- Freshney, R. I. (2007). *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Wiley-Blackwell, 6^a edition.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Techniques and Specialized Applications*. Wiley-Blackwell, 6^a edition.
- Gehl, J. and Mir, L. M. (1999). Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Giardino, R., Fini, M., Bonazzi, V., Cadossi, R., Nicolini, A., and Carpi, A. (2006). Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60.

- Grenier, J. R. (2006). Design of a MOSFET-Based Pulsed Power Supply for Electroporation by. Master's thesis, University of Waterloo.
- Grenier, J. R. and Kazerani, M. (2008). Mosfet-based pulse power supply for bacterial transformation. *IEEE Transactions on Industry Applications*, Vol.44, no.1.
- He, H., Chang, D. C., and Lee, Y.-K. (2007). Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in hela cells. *Bioelectrochemistry*, 70.
- Hojman, P. (2010). Basic principles and clinical advancements of muscle electrotransfer. *Current Gene Therapy*.
- Hong, J., Stewart, M. T., Cheek, D. S., Francischelli, D. E., and Kirchhof, N. (2009). Cardiac ablation via electroporation. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, 2009:3381–4.
- Ibey, B. L., Pakhomov, A. G., Gregory, B. W., Khorokhorina, V. A., Roth, C., Rassokhin, M. A., Bernhard, J. A., Wilmlink, G. J., and Olga, N. (2011). Selective cytotoxicity of intense nanosecond-duration electric pulses in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1800(11):1210–1219.
- Ibey, B. L., Xiao, S., Schoenbach, K. H., Murphy, M., and Pakhomov, A. G. (2009). Plasma membrane permeabilization by 60 and 600ns electric pulses is determined by absorbed dose. *Bioelectromagnetics*, 30.
- IGEA (2013). Cliniporator technical sheet.
- Inc., M. (1996). Mur1520/1540/1560 datasheet.
- Jiang, C., Davalos, R. V., and Bischof, J. C. (2015). A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 62(1):4–20.

- Johnson, S., Nguyen, V., and Coder, D. (2013). Assessment of cell viability. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]*, Chapter 9(April):Unit9.2.
- Kabuki, S., Moreira, K., Dobbs, F., Joshi, R., , and Schoenbach, K. H. (2002). Bacterial decontamination with nanosecond pulsed electric fields. *Conference Record of the Twenty-Fifth International Power Modulator Symposium, 2002 and 2002 High-Voltage Workshop*.
- Karp, G. (2013). *Cell and molecular biology - Concepts and experiments*. John Wiley and Sons, seventh edition.
- Katsuki, S., Moreira, K., Dobbs, F., Joshi, R., and Schoenbach, K. (2010). Bacterial decontamination with nanosecond pulsed electric fields. *Current gene therapy*, pages 648–651.
- Kotnik, T., Bobanovic, F., and Miklavcic, D. (1997). Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields - a theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and ...*, 43(I 997):285–291.
- Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavcic, D., and Tarek, M. (2012). Cell membrane electroporation - part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28.
- Kotnik, T., Pucihar, G., and Miklavcic, D. (2010a). Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *The journal of membrane biology*, 236(1):3–13.
- Kotnik, T., Pucihar, G., and Miklaveie, D. (2010b). Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *J Membrane Biol*, 236.
- Kotnik, T., Pucihar, G., Reberšek, M., Miklavčič, D., and Mir, L. (2003). Role of pulse shape in cell membrane electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614(2):193–200.

- Li, C., Yao, C., Sun, C., Guo, F., Zhou, W., and Xiong, Z. (2011). Dependence on electric field intensities of cell biological effects induced by microsecond pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 18.
- Mankowski, J. and Kristiansen, M. (2000). A review of short pulse generator technology. *Transactions on Plasma Science*, vol 28.
- Matsumi, C. T. (2009). Projeto e construção de um eletropermeabilizador de células biológicas.
- Matsumi, C. T., Rusczac, J. R., Ramos, A., Suzuki, D. O. H., and Marques, J. L. B. (2008). Desenvolvimento de um eletroporador de células biológicas. *21^o Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*.
- Merla, C., Amari, S. E., M. Kenaan, M. L., Apollonio, F., Arnaud-Cormos, D., Courdec, V., and Leveque, P. (2010). A $10\text{-}\omega$ high voltage nanosecond pulse generator. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, Vol. 58.
- Microchip (2004). Pic18f4550 datasheet.
- Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., and Rangara, R. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Applied Biological Sciences*.
- Mohan, N. (2012). *Power electronics: a first course*. John Wiley and Sons.
- Mohan, N., Undeland, T. M., and Robbins, W. P. (1995). *Power Electronics Converter, Application and Design*. John Wiley and Sons.
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & sons, 8^a edition.
- Nesin, O. M., Pakhomova, O., Xiao, S., and Pakhomov, A. G. (2011). Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60 and 600ns electric pulses. *Biochimica and Biophysica Acta*.

- Ormerod, M. G. (2000). *Flow Cytometry- A Practical Approach*. Oxford University Press, 3^a edition.
- Pakhomov, A. G., Bowman, A. M., Ibey, B. L., Andre, F. M., Pakhomova, O. N., and Schoenbach, K. H. (2009). Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385.
- Pakhomov, A. G., Shevin, R., White, J. A., Kolb, J. F., and Pakhomova, O. N. (2007). Membrane permeabilization and cell damage by ultra-short electric field shocks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Proton, A., Blackhall, N. W., Finch, R. P., Power, J. B., Cocking, E. C., and Davey, M. R. (1995). Flow cytometric quantification of electroporation-mediated uptake of macromolecules into plant protoplasts. *Protoplasma*, pages 50–56.
- Pucihar, G., Krmelj, J., Robersek, M., Napotnik, T. B., and Miklavcic, D. (2011). Equivalent pulse parameters for electroporation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58.
- Ramos, A. and Schneider, A. L. (2006). Electroporation of *kluveromyces marxianus* and β -d-galactosidase extraction. In *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*, chapter 18, pages 417 – 434. Intech Open.
- Saulis, G. and Saulè, R. (2012). Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 1818:3032–3039.
- Sigma-Aldrich (1997). Fluorescein Isothiocyanate-Dextran Product Information.
- Sowers, A. E. and Lieber, M. R. (1986). Electropore diameters, lifetimes, numbers, and locations in individual erythrocyte ghosts. *Federation of European Biochemical Societies*, 205:179 – 184.
- Staal, L. G. and Gilbert, R. (2011). Generators and applicators: Equipment for electroporation. In *Clinical Aspects of Electroporation*, chapter 18, pages 45 – 65. Springer.

- Stampfli, R. (1958). Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a ranvier node. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 30(1):2709–2714.
- Stolwijk, J. a., Hartmann, C., Balani, P., Albermann, S., Keese, C. R., Giaever, I., and Wegener, J. (2011). Impedance analysis of adherent cells after in situ electroporation: non-invasive monitoring during intracellular manipulations. *Biosensors & bioelectronics*, 26(12):4720–7.
- Tanenbaum, A. S. (2007). *Organização Estruturada de Computadores*. Pearson Prentice Hall, 5^a edition.
- Teissié, J., Eynard, N., Gabriel, B., and Rols, M. P. (1999). Electroporabilization of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35.
- Teissie, J., Golzio, M., and Rols, M. P. (2005). Mechanisms of cell membrane electroporabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et biophysica acta*, 1724(3):270–80.
- Vásquez, J. L., Gehl, J., and Hermann, G. G. (2012). Electroporation enhances mitomycin C cytotoxicity on T24 bladder cancer cell line: a potential improvement of intravesical chemotherapy in bladder cancer. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 88:127–33.
- Weaver, J., Harrison, G., and Bliss, J. (1988). Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FEBS letters*, 229(1):30–34.
- Weaver, J. C. and Chizmadzhev, Y. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41:135–160.
- Weaver, J. C., Smith, K. C., Esser, A. T., Son, R. S., and Gowrishankar, T. R. (2012). A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: a region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 87:236–43.