



SIMULAÇÃO DO EFEITO DE CAMPOS ELÉTRICOS NA MEMBRANA CELULAR

Giulia Tucci

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Rio de Janeiro
Junho de 2011

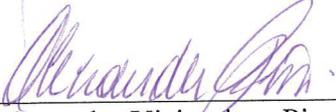
SIMULAÇÃO DO EFEITO DE CAMPOS ELÉTRICOS NA MEMBRANA
CELULAR

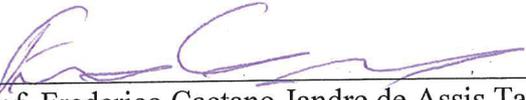
Giulia Tucci

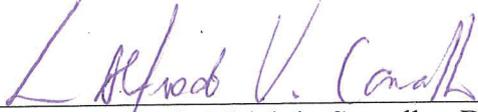
DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:


Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.


Prof. Alexandre Visintainer Pino, D.Sc.


Prof. Frederico Caetano Jandre de Assis Tavares, D.Sc.


Prof. Luis Alfredo Vidal de Carvalho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2011

Tucci, Giulia

Simulação dos efeitos de campos elétricos na membrana celular / Giulia Tucci. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XIV, 96 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 66-75.

1. Eletroporação. 2. Modelagem. 3. Membrana celular.
I. Souza, Marcio Nogueira de, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica.

Agradecimentos

Essa dissertação é resultado de intenso trabalho e pesquisa. Durante o tempo investido na realização deste trabalho, tive a oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas que contribuíram de diversas formas para a pesquisa, o trabalho prático e a síntese desta dissertação. É um prazer fazer menção e agradecer a todas essas pessoas.

Em primeiro lugar, registro minha gratidão ao Professor Marcio Nogueira de Souza pela atenção, orientação, supervisão, apoio e encorajamento, desde o início e durante todo o trabalho. Unindo sua personalidade tranquila, cordial e amigável ao seu surpreendente conhecimento técnico e faro científico, contribuiu para minha formação como estudante e como pessoa e é inspiração para mim e para muitos de seus alunos.

Expresso minha gratidão ao Professor Alexandre Visintainer Pino pela sua orientação, incentivo e pela enorme atenção aos detalhes. Seu marcante conhecimento sobre programação e seus conselhos na revisão do código computacional foram imprescindíveis e me proporcionaram muito aprendizado.

Agradeço a todos os professores do Programa de Engenharia Biomédica (PEB), que tanto contribuíram para minha formação acadêmica e que dividiram comigo um pouco do seu vasto conhecimento. Agradeço, em especial, ao Professor Frederico Caetano Jandre pelo acompanhamento e comentários sobre o trabalho, ao Professor Fernando Catelli Infantosi pela atenção, pelas agradabilíssimas aulas de Neurociência e pelo incentivo, e, finalmente, mas não menos importante, à Professora Rosimary Almeida pelo aconselhamento e pela gentileza constante.

Muito obrigada a todos os meus colegas do Laboratório de Instrumentação Biomédica pelas conversas, conselhos, troca de conhecimento e convivência. Obrigada em especial aos colegas: Danielle Polato, Daniel Morim, Madjer Martins, Fernanda

Catelani, Mariana Dias da Silva, Juliana Coronel, Fernando Monteiro, Raquel Vaz e Fernanda Barbosa.

Agradeço também a todos os funcionários do PEB, sempre muito atenciosos e prestativos.

Sou muito grata à minha família por todo apoio e incentivo durante todo o trabalho. Meu pai, Eugênio Tucci, minha mãe, Suzana Cardoso, minha avó Janette Schechter Cardoso, minha bisavó Laura Schechter, meu padrasto Leoncio Feitosa, minhas tias Tatiana e Luciana Cardoso, meus tios Paulo Szarvas e Pedro Bento e minhas primas Laura e Clara Szarvas.

Faltam-me palavras para agradecer ao meu marido Pedro Luiz Raposo Ebert, cuja dedicação, amor e paciência foram indispensáveis para que esse trabalho fosse concluído.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, foram importantes para a conclusão dessa dissertação.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

SIMULAÇÃO DO EFEITO DE CAMPOS ELÉTRICOS NA MEMBRANA CELULAR

Giulia Tucci

Junho/2011

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Programa: Engenharia Biomédica

Este trabalho desenvolve um modelo teórico para o experimento de eletroporação, método de envio de substâncias para o meio intracelular. O trabalho foi motivado pela possibilidade de tratar doenças cardíacas isquêmicas usando células-tronco e, também, pelo fato de ser promissor o uso da eletroporação na indução da diferenciação em cardiomiócitos. Além disso, o modelo é usado para simular experimentos de eletroporação, visando o planejamento e conhecimento de variáveis do processo, para reduzir custos com experimentos práticos. Foi realizada uma simulação de um protocolo de pulso único de campo elétrico para comparação com o modelo referência. Foram simulados protocolos de dois pulsos para a análise do controle do raio do poro pela manipulação do padrão de aplicação dos pulsos. A comparação dos resultados da simulação de pulso único com os resultados do modelo usado como referência corrobora o simulador desenvolvido neste trabalho. Os resultados da simulação de pulso duplo permitem avaliar a influência de algumas variáveis do sistema no controle do tamanho dos raios dos poros formados na membrana celular. Entretanto, ainda é necessário continuar trabalhando no aprimoramento do modelo, embora o modelo já possa ser usado para guiar experimentos de eletroporação.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

SIMULATION OF EFFECTS OF ELECTRIC FIELDS ON CELL MEMBRANES

Giulia Tucci

June/2011

Advisors: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Department: Biomedical Engineering

This work presents a theoretical model for an electroporation experiment, method for substances delivery into the intracellular medium. The motivation of this work was the possibility of treating ischemic cardiac diseases using stem cells, and because electroporation is a promising way to induct stem cells to differentiate in cardiomyocytes. In addition, this work uses this model to simulate electroporation experiments, aiming increase the knowledge about the process and its variables, in order to reduce operational costs with practical experiments. A simulation was run with a single electric field pulse protocol concerning the comparison to the reference model; this comparison validates the simulator developed on this work. Two-pulse protocols were simulated in the interest of analyzing the control of the pore radius size. The single-pulse protocol simulation results agree with the model of electroporation used as reference, and show that is necessary to continue working on the model development. The two-pulse protocol results allow seeing the influence of some variables to control pore radius size. However, it is necessary keep working on the development of the model, although it already can be used to guide electroporation experiments.

Sumário

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Símbolos.....	xiii
Capítulo 1	
Introdução	1
1.1. Objetivo.....	3
Capítulo 2	
Fundamentos teóricos	5
2.1. Conceitos básicos fundamentais	5
2.2. Uso da Eletroporação na diferenciação de CTs	12
Capítulo 3	
Eletroporação	21
3.1. Princípios da eletroporação	22
3.2. Modelo base da eletroporação.....	24
3.3. Modelando a eletroporação	31
Capítulo 4	
Metodologia de Pesquisa	35
4.1 Protocolos de pulso único.....	39
4.2 Protocolos de pulso duplo	40
Capítulo 5	
Resultados	43
5.1 Protocolo de pulso único	43
5.2 Protocolo de pulso duplo	46
Capítulo 6	
Discussão dos Resultados.....	55
6.1 Protocolo de pulso único	55
6.2 Protocolos de pulso duplo	57
Capítulo 7	
Conclusão.....	63
Referências.....	66

Anexo I.....	76
Anexo II.....	90

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas seguidas no estudo da eletroporação e no desenvolvimento do simulador.	4
Figura 2. Ilustração esquemática de uma célula eucariótica animal...	6
Figura 3. Distribuição de cargas na membrana	7
Figura 4. Equivalente elétrico da bicamada fosfolipídica	8
Figura 5. Plasticidade de CTs adultas	10
Figura 6. Resumo dos eventos abertura e fechamento de poros induzidos por eletroporação.	15
Figura 7. Variação de energia livre associada com a criação de um único poro hidrofílico, de raio r , em uma membrana	23
Figura 8. Representação esquemática da eletroporação	25
Figura 9. Membrana celular durante a eletroporação.....	26
Figura 10. Circuito elétrico que retrata o comportamento da membrana durante o processo de eletroporação.	31
Figura 11. Fluxograma da rotina computacional.	44
Figura 12. Campo elétrico aplicado em função do ângulo.	39
Figura 13. Tensão de membrana e número de poros em função do tempo	44
Figura 14. Raio médio e raio máximo do poro em função do tempo	45
Figura 15. Variáveis importantes em função do ângulo da célula ...	46
Figura 16. Número de poros em função do ângulo da célula do modelo referência.....	46
Figura 17. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 1	47
Figura 18. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 2.....	48
Figura 19. Raio máximo e raio médio dos poros em função do	

tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 3.....	49
Figura 20. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 4.....	49
Figura 21. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 5.....	50
Figura 22. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 6.....	51
Figura 23. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 7.....	51
Figura 24. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 8.....	52
Figura 25. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 9.....	53
Figura 26. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 10.....	53
Figura 27. Tipos celulares e terapias propostas para o tratamento de cardiopatias.....	78
Figura 28. Desafios para o uso da terapia de células-tronco em doenças cardíacas	79
Figura 29. Estudo multicêntrico randomizado de terapia celular em cardiomiopatias (MiHeart).	81
Figura 30. Fatores considerados na indução da diferenciação de células-tronco	84

Lista de tabelas

Tabela 1. Definição dos termos da equação do circuito.....	32
Tabela 2. Valores das constantes usadas nas simulações.....	39
Tabela 3. Protocolos de Pulso duplo. Característica dos pulsos..	40
Tabela 4. Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação do intervalo entre os pulsos	41
Tabela 5. Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do primeiro pulso	41
Tabela 6. Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do segundo pulso	42
Tabela 7. Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da duração do primeiro pulso	42
Tabela 8. Resultados numéricos da simulação com um único pulso, para a parte simulada da célula (0° a 180°).....	43
Tabela 9. Resultados numéricos de importantes variáveis para cada protocolo considerando a parte simulada da célula (0° a 180°)	54
Tabela 10. Características de populações de células-tronco usadas na terapia cardíaca.	82
Tabela 11. Materiais usados em modelos de matriz extracelular	87
Tabela 12. Fatores de crescimento iniciadores da cardiogênese.....	89

Lista de Símbolos

A	Área superficial da célula [m^2]
A_p	Área total dos poros [m^2]
C_m	Capacitância superficial da membrana [A m^{-2}]
D	Coefficiente de difusão do raio do poro [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
E	Campo elétrico [V m^{-1}]
F_{\max}	Força elétrica máxima para $V_m = 1 \text{ V}$ [N V^{-2}]
G_{ei}	Condutância devido à diferença nas condutividades intra e extracelular [S m^{-2}]
g_m	Condutância da membrana [S m^{-2}]
G_p	Condutância superficial devida ao aparecimento dos poros [S m^{-2}]
h	Espessura da membrana [m]
I_p	Corrente total da eletroporação [A m^{-2}]
i_p	Corrente em um único poro [A]
k	Constante de Boltzmann
L	Distância entre as placas do eletroporador [m]
N	Densidade de poros [m^{-2}]
N_0	Densidade de poros de equilíbrio para $V_m = 0 \text{ V}$ [m^{-2}]
N_{eq}	Densidade de poros de equilíbrio [m^{-2}]
r	Raio do poro [m]
r^*	Raio crítico de transição de hidrofóbico para hidrofílico [m]
R_{ap}	Resistência através do poro [Ω]
R_c	Resistência dos canais proteicos da membrana [Ω]
r_{cel}	Raio da célula [m]
R_e	Resistência do <i>setup</i> experimental [Ω]

R_{ent}	Resistência de entrada no poro [Ω]
R_m	Resistência superficial da membrana [$\Omega \text{ m}^2$]
r_{min}	Raio do mínimo local de energia [m]
s	Condutividade da solução no poro [S m^{-1}]
s_e	Condutividade da solução extracelular [S m^{-1}]
s_i	Condutividade da solução intracelular [S m^{-1}]
T	Temperatura absoluta [K]
U	Tensão entre as placas do eletroporador [V]
V_{ep}	Tensão característica da eletroporação [V]
V_m	Tensão transmembrana [V]
V_{rep}	Tensão de repouso da membrana celular [V]
W	Energia livre [J]
α	Coefficiente de taxa de formação de poros [$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$]
β	Energia de repulsão estérica [J]
θ	Ângulo entre as linhas de campo elétrico e a superfície da célula
ρ	Distância a partir do centro da célula [m]
σ'	Energia por unidade de área da interface hidrocarboneto-água [J m^{-2}]
σ_0	Tensão da membrana sem poros [J m^{-2}]
σ_{ef}	Tensão superficial efetiva da membrana [J m^{-2}]
τ_N	Constante de tempo do fechamento dos poros [s]
ϕ_e	Potencial elétrico extracelular [V]
ϕ_i	Potencial elétrico intracelular [V]

Capítulo 1

Introdução

Essa pesquisa foi motivada pelo incrível potencial das células-tronco, pelo excelente trabalho feito por pesquisadores brasileiros com pacientes com insuficiência cardíaca, pelo desafio na diferenciação específica de células-tronco, pelo desconhecimento das características do fenômeno da eletroporação e, finalmente, pelo potencial uso da eletroporação para diferenciar células-tronco.

Células-tronco (CTs) são células não especializadas capazes de se dividir, renovar e se diferenciar em diferentes linhagens celulares. Tais propriedades destas células as conferem aplicações interessantes; como, por exemplo, o tratamento de pacientes com isquemia cardíaca.

Como a morte por doenças isquêmicas do coração é uma das principais causas de morte no mundo (LOPEZ *et al.*, 2006, SEGERS e LEE, 2008), o estudo de novas técnicas que possam curar ou minimizar a isquemia cardíaca torna-se importante e necessário. Neste sentido, pesquisas estão sendo realizadas em relação ao tratamento com CTs não diferenciadas em pacientes com doenças cardíacas isquêmicas (ANVERSA e NADAL-GINARD, 2002, DOHMANN *et al.*, 2005). Embora tenha sido verificado algum progresso neste tipo de terapia, ainda é desejável e necessário estudarem-se técnicas que possam aumentar a eficiência do processo.

Tem sido reportado que a probabilidade de sucesso dessa forma de terapia será maximizada com a diferenciação das células *in vitro*, isto é, anterior ao seu reimplante no paciente (JACKSON *et al.*, 2008, SEGERS e LEE, 2008).

Muitas técnicas têm sido usadas na tentativa de se induzir a diferenciação de CTs. Estímulos físicos têm sido usados com o intuito de se mimetizar a situação natural de desenvolvimento da célula. Dentre esses estímulos podem ser citados: eletroestimulação (GENOVESE *et al.*, 2008, RADISIC *et al.*, 2004, XIA *et al.*, 1997, HOLT *et al.*, 1997), carregamento mecânico (SHIMKO e CLAYCOMB, 2008, HWANG *et al.*, 2007, ORR *et al.*, 2006) e variação de temperatura (FLANDERS *et al.*, 1993). Além de tais agentes físicos exógenos, é necessário também otimizar as condições de cultura das CTs, ou seja, é necessário o uso de uma matriz extracelular, onde devem ser adicionados fatores de crescimento e agentes químicos que favorecem a diferenciação.

O estímulo físico que mais tem apresentado resultados significativos na indução da diferenciação de CTs é o estímulo elétrico (XIA *et al.*, 1997, RADISIC *et al.*, 2004, GENOVESE *et al.*, 2008, ROURA *et al.*, 2010). A aplicação de campos elétricos externos em células-tronco causa o efeito denominado eletroporação, e há evidências dos benefícios do seu uso na diferenciação (XIA *et al.*, 1997; HOLT *et al.*, 1997; RADISIC *et al.*, 2004).

A eletroporação pode ser definida como um método de criação de poros em membranas celulares por meio da aplicação de campos elétricos de intensidade, duração e frequência controlados. Os eventos microscópicos da eletroporação envolvem processos complexos, que não estão completamente elucidados. De um modo geral, sabe-se que na presença da energia fornecida pelo campo elétrico um poro hidrofóbico de raio r , previamente formado por variações estruturais da bicamada fosfolipídica causadas pelo efeito térmico da temperatura ambiente, alcança um valor crítico de raio e se transforma em um poro hidrofílico (aquoso) por meio de rearranjo das moléculas lipídicas para um estado energeticamente mais favorável.

Diante da dificuldade de se determinar microscopicamente as etapas da eletroporação, muitos grupos estudam, há mais de 30 anos, modelos matemáticos que possam representar o processo de criação de poros em membranas (ZIMMERMANN *et al.*, 1974, CHERNOMORDIK *et al.*, 1983, GLASER *et al.*, 1988, DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999, KRASSOWSKA e FILEV, 2007). O uso desses modelos pode, além de auxiliar no melhor entendimento do próprio fenômeno da eletroporação, guiar experimentos de eletroporação, tornando-os mais eficientes e menos custosos.

O uso de simuladores de eletroporação tem o potencial de minimizar custos com futuros experimentos práticos, permitindo que o conjunto de parâmetros testado na prática seja avaliado e validado previamente, economizando assim reagentes, meios de cultivo, e, principalmente, tempo. É favorável ter a possibilidade de usar um simulador para conhecer e compreender o comportamento das variáveis do sistema antes de realizar testes de bancada.

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um simulador de eletroporação, com base no modelo de KRASSOWSKA e FILEV (2007), que permitisse estudar a formação dos poros, sua evolução e seu fechamento. O modelo utilizado no simulador considera uma célula esférica e a aplicação de pulsos retangulares de campo elétrico, cuja duração, intensidade e espaçamento interpulsos são variados.

1.1.1 Objetivos específicos:

- Equacionar os fenômenos da eletroporação;
- Desenvolver o simulador que permite a análise da evolução temporal e

da distribuição espacial do raio dos poros criados na membrana celular durante a eletroporação;

- Fazer uma simulação com perfil equivalente à realizada no estudo de KRASSOWSKA e FILEV (2007) para comparação e validação do modelo.
- Simular e analisar perfis de simulação com pulsos duplos para estudar e compreender o controle do raio dos poros formados na membrana celular.

A Figura 1 apresenta etapas seguidas no estudo da eletroporação e no desenvolvimento do simulador.

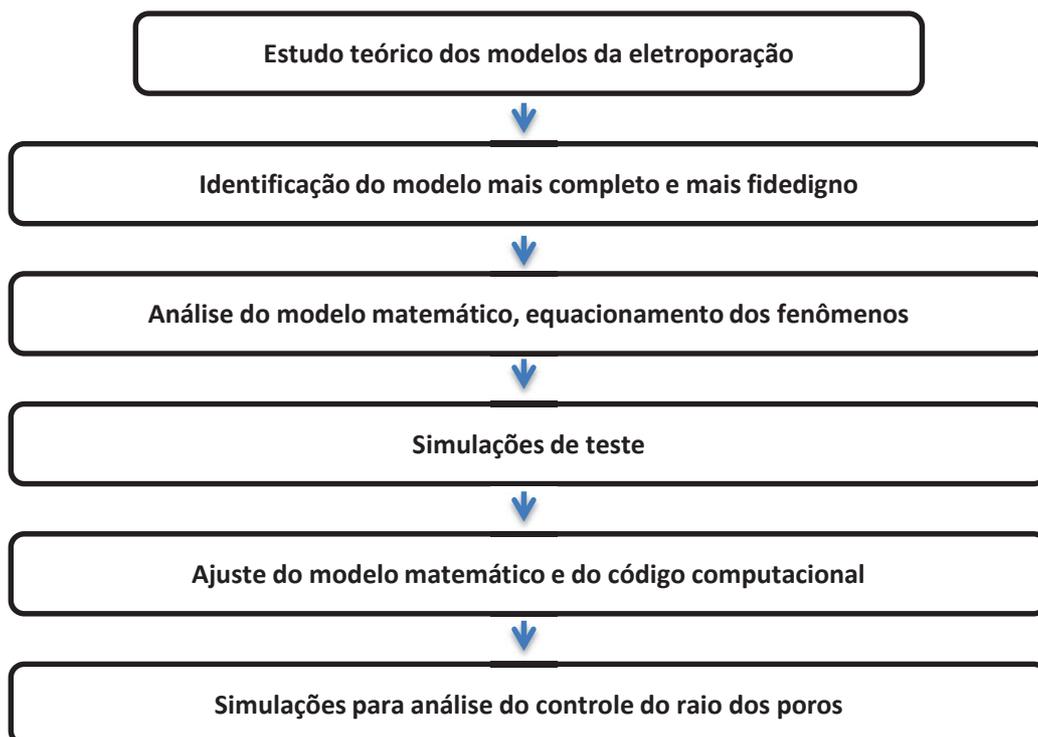


Figura 1: Etapas seguidas no estudo da eletroporação e no desenvolvimento do simulador.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

A primeira seção deste Capítulo apresenta conceitos fundamentais para a compreensão do objeto de estudo deste trabalho: a dinâmica da membrana celular sobre o efeito de um campo elétrico externo. Na segunda seção, a eletroporação, criação de poros na membrana celular por meio da aplicação de campos elétricos, é apresentada como técnica para a diferenciação de células-tronco. São apresentados os princípios básicos e uma retrospectiva da modelagem matemática deste complexo fenômeno.

2.1 Conceitos básicos fundamentais

2.1.1 Célula

A célula é a menor unidade necessária para que haja vida. Os menores e mais simples organismos vivos são unicelulares. Os maiores e mais complexos são pluricelulares, e suas células se organizam em tecidos especializados, os quais desempenham diferentes funções.

Mesmo as células que possuem diferentes funções, e conseqüentemente estruturas distintas, têm características em comum. O esquema geral de uma célula

eucariótica (aquela que possui núcleo celular) animal é apresentado na Figura 2, na qual é possível observar as organelas celulares, o núcleo com o material genético e a membrana celular, que separa o citoplasma do meio externo.

As organelas são estruturas supramoleculares (estruturas complexas compostas por aglomerados moleculares) executoras de funções necessárias para o metabolismo celular. A presença de maior ou menor quantidade de determinadas organelas varia de acordo com a função da célula analisada. As células do músculo cardíaco, por exemplo, são muito ricas em mitocôndrias, tendo aproximadamente uma por fibra muscular.

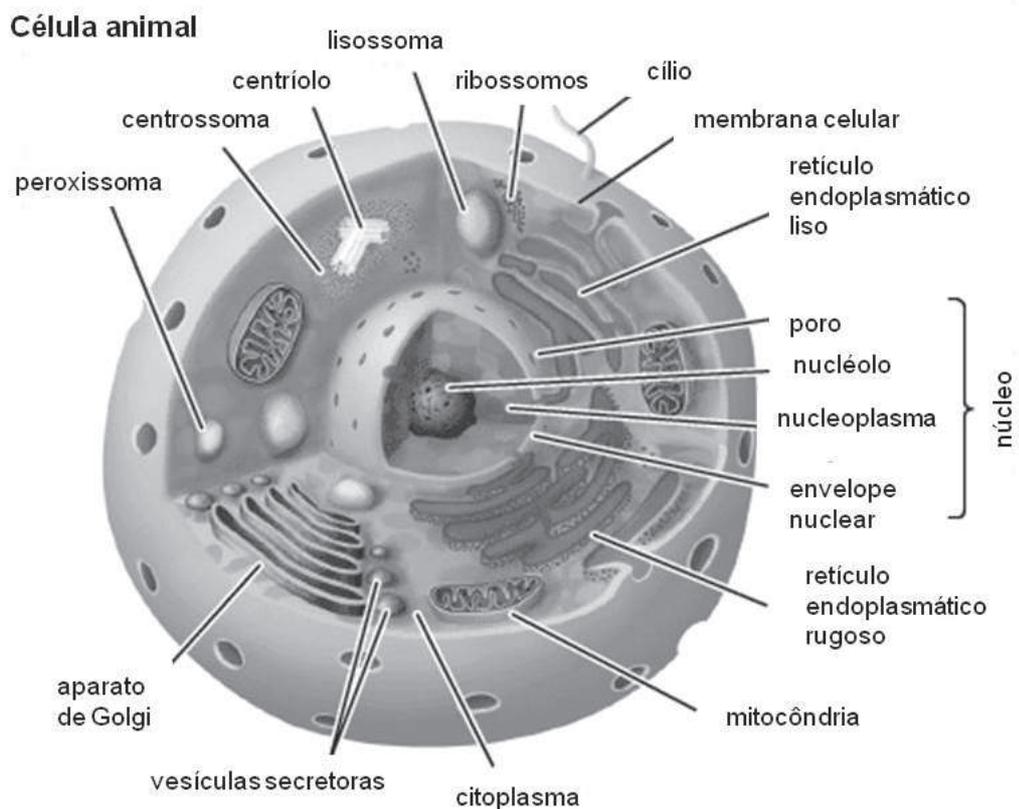


Figura 2: Ilustração esquemática de uma célula eucariótica animal. Figura adaptada da Enciclopédia Britânica. *By courtesy of Encyclopedia Britannica, Inc., copyright 2008; used with permission.*

A mitocôndria é a produtora de energia da célula. Conforme a grande descoberta de Eugene Kennedy e Albert Lehninger (1948), ela é a responsável pela respiração celular, sítio da fosforilação oxidativa (NELSON e COX, 2006). Estruturalmente, é composta por duas membranas (membrana externa e membrana interna mitocondrial), o que possibilita o eficiente processo da cadeia respiratória (cadeia de transferência de elétrons) e a produção de energia na forma de adenosina tri-fosfato (ATP), mediada pela enzima ATP-sintase.

Interface da célula com o meio externo, a membrana celular controla o influxo e efluxo de substâncias na célula. É composta por lipídios e proteínas, que formam uma barreira fina e hidrofóbica ao redor da célula. Proteínas de transporte inseridas na bicamada lipídica permitem a passagem de alguns íons e moléculas. O transporte de substâncias ocorre por meio de canais iônicos, bombas, difusão, ou vesículas transportadoras. Como os componentes da membrana não são ligados covalentemente, toda a estrutura é altamente flexível, o que permite mudanças na conformação e tamanho da célula.

De acordo com a distribuição de cargas e de concentrações iônicas através da membrana, pode ser feita uma analogia entre a bicamada e um capacitor (Figura 3).

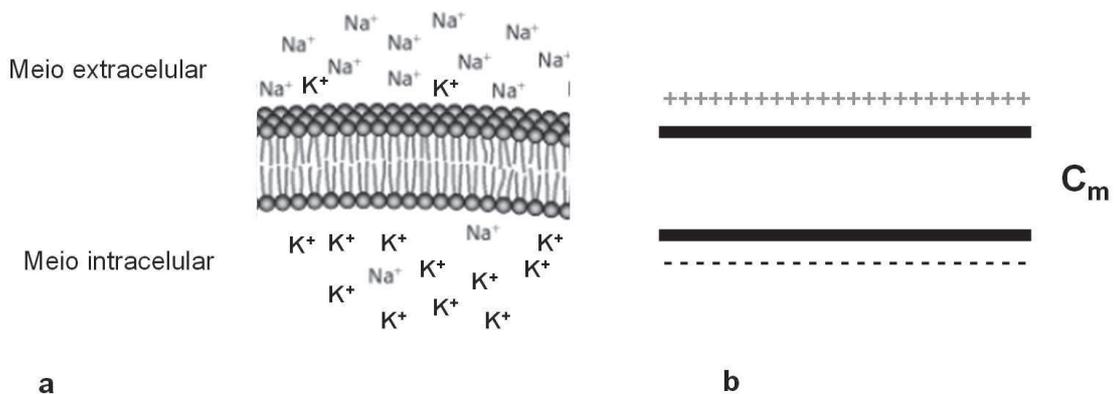


Figura 3: Distribuição de cargas na membrana celular. a) Distribuição iônica através da membrana celular. b) Distribuição de cargas análoga em um capacitor de placas paralelas com capacitância C_m .

O circuito elétrico apresentado na Figura 4 é um análogo mais completo da membrana celular. Neste circuito, cada elemento representa uma característica morfológica da membrana. A resistência R_m é o recíproco da condutância (g_m) associada aos canais iônicos presentes na membrana; o componente E_m é a diferença de potencial (DDP) associada ao gradiente de concentração iônica entre os meios intra e extracelulares; a capacitância C_m é a capacitância ilustrada na Figura 3.

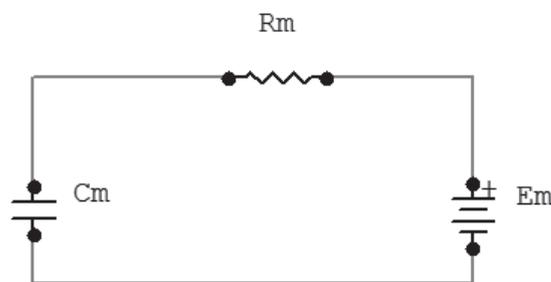


Figura 4: Equivalente elétrico da bicamada fosfolipídica. C_m representa a capacitância da membrana. R_m é uma resistência que representa o recíproco da condutância associada aos canais iônicos presentes na membrana. E_m é a DDP que representa o gradiente de concentração iônica.

2.1.2 Células-tronco

Células-tronco são células não especializadas capazes de se dividir, renovar e se diferenciar em diferentes linhagens celulares. As células-tronco podem ser divididas em duas categoriais principais – células-tronco embrionárias e células-tronco não embrionárias:

- Células-tronco embrionárias (CTEs): são derivadas da massa celular interna de um blastocisto, o qual é formado dias após a fertilização de um óvulo. São células pluripotentes, pois podem se diferenciar em qualquer linhagem celular *in*

vivo (HWANG *et al.*, 2007, JIANG *et al.*, 2008, TUCH, 2006).

- Células-tronco não embrionárias (CTnEs): são consideradas CTnEs as células-tronco adultas, retiradas de voluntários adultos; células de cordão umbilical; células de placentas e células de tecidos fetais. Embora não sejam células pluripotentes, são multipotentes, isto é, podem se diferenciar em diversas linhagens celulares *in vivo* (ANVERSA e NADAL-GINARD, 2002, ASSMUS *et al.*, 2002, BELTRAMI *et al.*, 2003, PERIN *et al.*, 2003, SCHÄCHINGER *et al.*, 2004, DOHMANN *et al.*, 2005) e *in vitro* (DIMARAKIS *et al.*, 2006a, DIMARAKIS *et al.*, 2006b, FUKUDA, 2008, LIN *et al.*, 2010).

As CTs adultas possuem, além da diferenciação, a propriedade de plasticidade, ou seja, células de um tecido podem se diferenciar em células de outro tecido. A Figura 5 ilustra a plasticidade de células-tronco adultas.

Pelo grande poder de diferenciação e desenvolvimento de diversos tecidos, são diversas as aplicações visualizadas para as células-tronco, embrionárias e não embrionárias. No entanto, ainda há problemas de segurança relacionados ao uso de CTEs (HWANG *et al.*, 2007, NOVOTNY *et al.*, 2008), o que explica o uso exclusivo de CTnEs em tratamentos com pacientes. Em adicional, existem questões éticas relacionadas a CTEs que limitam, em diversos países, experimentos e testes clínicos.

Uma aplicação de CTnEs potencialmente promissora é o uso para terapias de substituição celular e na medicina regenerativa (HWANG *et al.*, 2007). As terapias são atualmente utilizadas para o tratamento de leucemias, mielomas, linfomas, e deficiências genéticas (TUCH, 2006).

Há também estudos sobre CTs relacionados ao tratamento de doenças cardíacas isquêmicas (ANVERSA e NADAL-GINARD, 2002, ANVERSA *et al.*, 2007, ASSMUS *et al.*, 2002, BELTRAMI *et al.*, 2003, KAJSTURA *et al.*, 2005, PERIN *et al.*, 2003, PERIN *et al.*, 2004, STAMM *et al.*, 2003, TUCH, 2006, LIN *et al.*, 2010, LI *et al.*, 2011), lesões de medula espinhal (TUCH, 2006, SYKOVÁ *et al.*, 2006), fraturas em

ossos (LE BLANC *et al.*, 2005, TUCH, 2006) e doença de Parkinson (BJÖRKLUND e LINDVALL, 2000, TUCH, 2006).

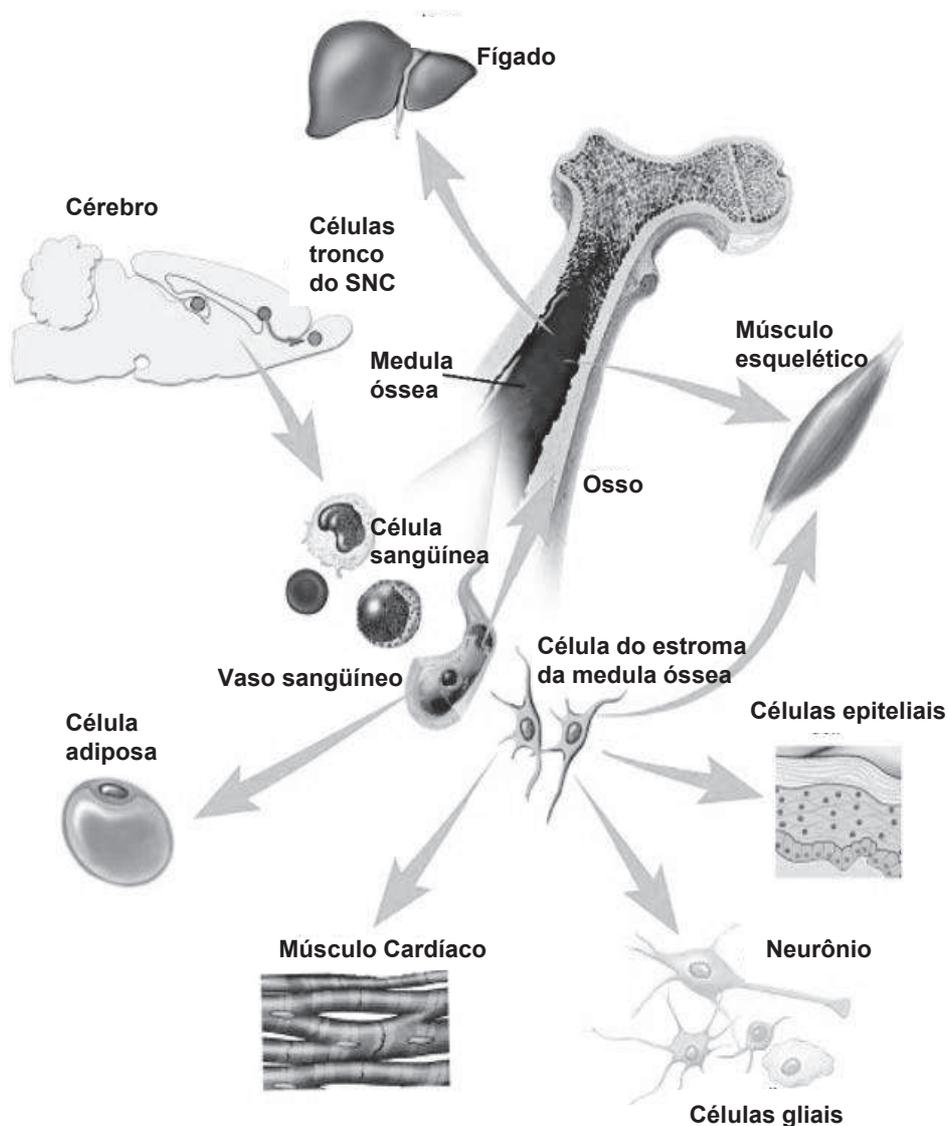


Figura 5: Plasticidade de CTs adultas. Figura adaptada de *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. Bethesda, MD: *National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009* [cited Saturday, October 24, 2009]. Disponível online em <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report>.

Mesmo com o grande número de estudos sobre aplicações de CTs é essencial o aprofundamento do conhecimento sobre ferramentas indutoras da diferenciação de CTs em linhagens celulares de interesse e na otimização das propriedades dos meios

de cultivo.

Este trabalho foi motivado por estudos realizados com células-tronco em pacientes com problemas no coração. No ANEXO I são apresentados métodos de diferenciação de células-tronco e estudos que usam CTs para tratar doenças isquêmicas cardíacas.

2.1.3 Estímulos físicos para a diferenciação de células-tronco

Durante o desenvolvimento natural do tecido a célula é exposta a diversos estímulos físicos. Deste modo, tratamento térmico, forças mecânicas e pulsos elétricos têm sido utilizados como estímulos físicos exógenos na tentativa de se mimetizar as condições originais de diferenciação das CTs.

O choque térmico pela exposição a altas temperaturas estimulou a regulação da expressão de TGF- β em células cardíacas de ratos, o que foi relatado por FLANDERS *et al.* (1993). Esse fato indica potencial influência da temperatura na regulação deste importante indutor da diferenciação na linhagem cardiomiogênica. Assim, é possível que a temperatura possa exercer algum efeito na diferenciação.

Estímulos mecânicos são convertidos pela célula em respostas bioquímicas por meio do mecanismo de mecanotransdução (ORR *et al.*, 2006, HWANG *et al.*, 2007). A pressão sanguínea, por exemplo, é regulada intrinsecamente por barorreceptores, que atuam sinalizando variações na pressão e disparando mecanismos de controle (vasoconstrição e função renal) (BERNE e LEVY, 1990). O estiramento de células vasculares do músculo liso abre canais de cátions não específicos, causando despolarização da membrana. Essa resposta pode ser bloqueada pelo elemento químico gadolínio, inibidor de canais sensíveis ao estiramento (ORR *et al.*, 2006). Pesquisadores alemães estudaram o efeito da tensão mecânica na iniciação da

diferenciação de CTEs em células cardíacas e concluíram que estímulos mecânicos induzem a cardiomiogênese (SCHMELTER *et al.*, 2006).

Diversos estudos evidenciam a grande influência da estimulação elétrica na diferenciação de CTs na linhagem cardiomiogênica. Um grupo formado por pesquisadores da *NW University Medical School* e da *University of Texas Medical School* mostrou, através de experimentos em 1997, que a aplicação de campos elétricos em cardiomiócitos de neonatos aumenta o conteúdo de mitocôndrias nas células (XIA *et al.*, 1997). No mesmo ano, foi publicado um artigo no qual foram investigadas propriedades mecânicas e a resposta ao cálcio em cardiomiócitos após estimulação elétrica (HOLT *et al.*, 1997). O trabalho mostrou que ocorre aumento nas propriedades mecânicas e nos transientes de cálcio após aplicação de campo elétrico, induzindo contração ritmada, em comparação às células não estimuladas. Assumindo que o acoplamento excitação-contração determina o desenvolvimento e função do miocárdio, pesquisadores do MIT verificaram que com a estimulação por campo elétrico (mimetizando o coração) houve indução de alinhamento e acoplamento celular, resultando em um nível alto de organização estrutural (RADISIC *et al.*, 2004).

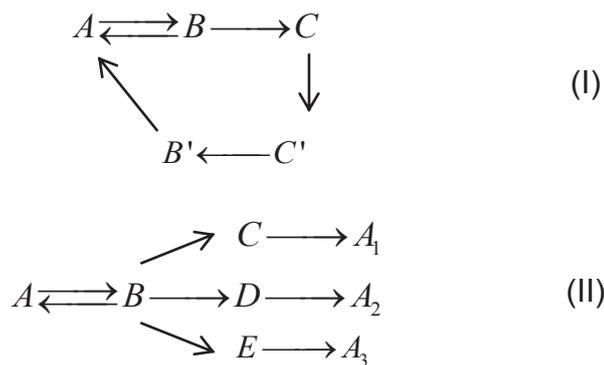
2.2 Uso da Eletroporação na diferenciação de CTs

2.2.1 Conceitos básicos de eletroporação

A eletroporação é um método de criação de poros em membranas celulares por meio da aplicação de campos elétricos de intensidade, duração e frequência controlados.

Mecanismo molecular geral da eletroporação:

Há duas propriedades da bicamada lipídica que são influenciadas pela aplicação de um campo elétrico (TSONG, 1991): os dipolos elétricos das moléculas lipídicas e a pequena permeabilidade da membrana a íons. Dois esquemas (I e II) podem ser usados para descrever o efeito do campo elétrico na membrana (TSONG, 1991). Um deles descreve a eletroporação reversível (I) e o outro (II) a eletroporação causada por pulsos elétricos mais intensos, causando o rompimento e a formação de novas vesículas lipídicas.



Nos esquemas I e II a transição de A para B é reversível e representa a etapa de início da formação dos poros. Se o campo elétrico aplicado é maior que a constante dielétrica da membrana (I), há uma etapa de expansão do poro (B para C). A expansão do poro é considerada irreversível, pois o fechamento leva um tempo relativamente grande (segundos), após o fim dos pulsos, para acontecer. B' é equivalente a B, mas no estado B' não há a presença do campo elétrico, assim como C' é equivalente a C.

Se o campo elétrico é muito maior que a constante dielétrica da membrana, a célula pode ser fragmentada (II) em vesículas lipídicas polarizadas (C, D e E), que darão origem a pequenas vesículas lipídicas (A_1 , A_2 , A_3).

Apesar do potencial elétrico necessário para a abertura de canais proteicos, que é 50 mV, ser menor que o potencial de ruptura da membrana, que é na faixa de 150 a 500 mV (equivalente a um campo elétrico de 300 a 1.000 kV/cm, para uma membrana com espessura de 5 nm), pode haver lise durante a eletroporação; pois, quando estes canais estão abertos a corrente pode aumentar para um valor muito além do desejado (TSONG, 1991). Nesse caso, esses canais podem ser danificados pelo aquecimento (efeito Joule) ou pela modificação elétrica de seus grupos funcionais.

A Figura 6 mostra um resumo dos principais eventos da eletroporação e do fechamento de poros na membrana celular. É possível observar dois caminhos para o envio de moléculas ao meio intracelular. No primeiro caminho (superior), não há balanceamento osmótico e as pequenas moléculas ou íons em solução presentes no meio extracelular passam para o meio intracelular, impulsionadas pela pressão osmótica das macromoléculas intracelulares, o que torna possível a ruptura da célula. Entretanto, pode ocorrer o fechamento do envelope celular e, nesse momento, pode haver o envio de macromoléculas para o meio intracelular. A célula, nesse caso, pode não ser biologicamente viável ao final do processo. No segundo caminho (inferior), há moléculas maiores que os poros formados na solução extracelular, o que torna os meios intra e extracelular balanceados osmoticamente. Não há inchamento celular e o fechamento dos poros ocorre após o envio das macromoléculas de interesse para o meio intracelular.

De um modo geral, a eletroporação é discutida no artigo de TSONG (1991). Já eventos microscópicos da eletroporação não são abordados, sendo complexos e ainda não completamente elucidados.

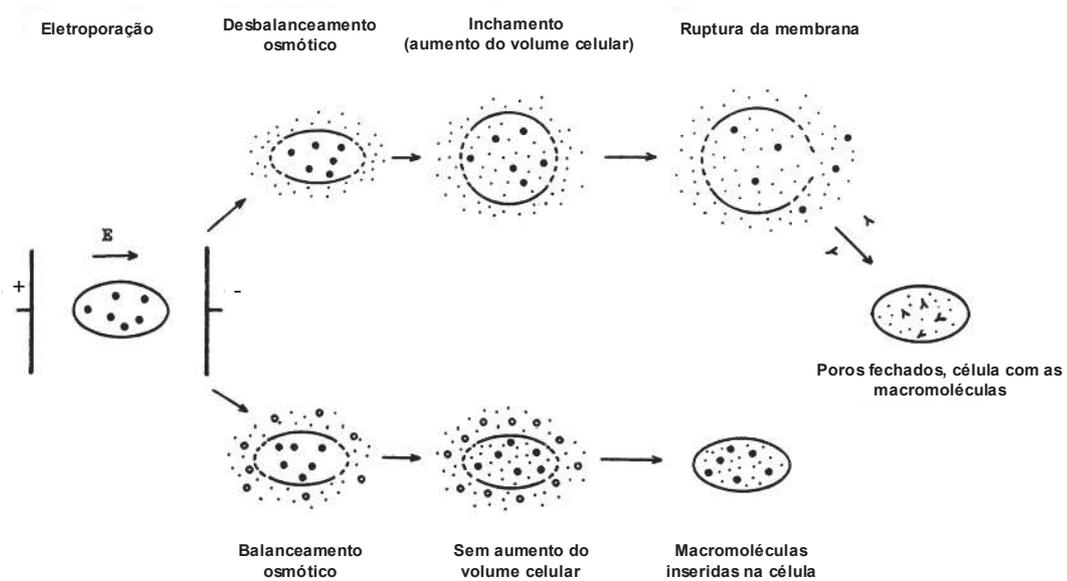


Figura 6: Resumo dos eventos abertura e fechamento de poros induzidos por eletroporação. Adaptada de Biophysical Journal, 60/2, TSONG, T.Y., *Electroporation of cell membranes*, pp. 297-306, Copyright(1991), com permissão de Elsevier.

As prováveis etapas nas quais se desdobram esses eventos poderiam ser sintetizadas em (TEISSIE *et al.*, 2005):

- 1) Indução: o campo elétrico induz o aumento da diferença de potencial através da membrana, o que, a partir de um valor crítico causa pequenos defeitos (poros).
- 2) Expansão: os poros aumentam na presença de campo elétrico maior que o campo elétrico crítico.
- 3) Estabilização: Se o campo elétrico é menor que certo limiar há a estabilização, que transforma a membrana em permeável a pequenas moléculas. Dura alguns milésimos de segundos.
- 4) Fechamento dos poros formados: Ocorre lentamente, podendo durar segundos ou até minutos.

- 5) Efeito memória: Algumas mudanças nas propriedades da membrana permanecem, mas a célula resiste ao processo (e os poros se fecham).

2.2.2 Uso da eletroporação como ferramenta para estimular a diferenciação

Em 1972, Neumann e Rosenheck descobriram a importância da eletropermeabilização, ou eletroporação (NEUMANN e ROSENHECK, 1972). Eles verificaram a liberação de catecolaminas de vesículas lipídicas após sua estimulação por campos elétricos. A partir daí, foram feitos muitos estudos com o objetivo de entender melhor o processo de geração de poros por campos elétricos aplicados a vesículas lipídicas. Poucos anos depois, Kazuhiko e Tsong publicaram dois trabalhos importantes: um deles mostrava que a formação de poros na membrana de eritrócitos, por aplicação de campos elétricos, poderia ocorrer de forma reversível (KAZUHIKO e TSONG, 1977); e o outro evidenciava a possibilidade do uso de eritrócitos carregados com medicamentos (processo feito por eletroporação) como um reservatório intravenoso de droga, o qual liberaria lentamente seu conteúdo (KAZUHIKO e TSONG, 1978).

Estimulados pelos resultados, outros cientistas começaram a verificar experimentalmente o efeito de campos elétricos induzidos em células-tronco. Um professor do departamento de ciências biológicas da *Purdue University*, nos EUA, publicou uma revisão intitulada *The responses of cells to electrical fields: a review* (ROBINSON, 1985). Nesse trabalho foram examinados estudos realizados com células nervosas, musculares, neurais e epiteliais. Entre os trabalhos referidos no estudo estão: uma pesquisa que mostra um exemplo de galvanotaxia, ou seja, a

influência fisiológica de um campo elétrico de corrente contínua (DC) na direção da migração, orientação e forma celular (ERICKSON e NUCCITELLI, 1984) e outro que concluiu que a orientação de células nervosas e musculares, *in vivo*, é influenciada por campos elétricos de pequena intensidade (HINKLE *et al.*, 1981).

Em 1999, Sauer e colaboradores conseguiram verificar, usando campos elétricos de 250 e 500 V/m, o aumento do número de corpos embrionários que se diferenciaram em cardiomiócitos (SAUER *et al.*, 1999). Nesse trabalho foi usado um pulso único de campo elétrico aplicado por 90 segundos em células embrionárias. Mais adiante, será comentado que a manutenção da aplicação de um pulso campo elétrico da ordem de grandeza usada nas simulações realizadas neste trabalho (40 kV/m) durante aproximadamente 10 ms pode causar rompimento irreversível da célula. No caso dos experimentos realizados por SAUER *et al.* (1999) esse rompimento não é observado devido à relativamente baixa magnitude do pulso de campo elétrico aplicado.

Para usar células-tronco adultas em terapias para isquemia cardíaca, ou para outras terapias, é indicado estimular a diferenciação destas células *in vitro*. A eletroporação é o método mais promissor, como discutido no Anexo I, e muitos estudos têm mostrado a eficiência do uso de pulsos de campo elétrico para estimular a diferenciação de células-tronco em cardiomiócitos (ROURA *et al.*, 2010, GENOVESE *et al.*, 2008, RADISIC *et al.*, 2004, XIA *et al.*, 1997, HOLT E *et al.*, 1997).

A realização de testes experimentais com o objetivo de quantificar os parâmetros necessários do eletroporador (equipamento utilizado para gerar o campo elétrico para a realização experimental da eletroporação), as condições experimentais necessárias para o processo de diferenciação, dentre outras variáveis, é tarefa que demanda custo e tempo elevados. Seria necessário usar um grande número de combinações de parâmetros para encontrar a combinação apropriada. Logo, o desenvolvimento de modelos que possam ser usados para simular computacionalmente a eletroporação torna-se desejado e necessário para minimizar o

número de experimentos realizados.

Como a eletroporação abre poros na membrana celular, e é sabido que a presença de determinadas macromoléculas no meio intracelular é necessária para diferenciar CTs em células específicas (Anexo I), o desenvolvimento de um protocolo de aplicação de campos elétricos, na presença de uma solução com as macromoléculas indicadas, que abra poros na membrana que, por sua vez, permitam a passagem dessas macromoléculas para o meio intracelular, é desejado. Logo, a modelagem matemática da eletroporação, o conhecimento de todas as etapas do processo e a avaliação da evolução temporal das variáveis de interesse, como, por exemplo, o raio dos poros formados, são desejados.

2.2.3 Histórico da modelagem matemática dos eventos da eletroporação

Diante da possibilidade de usar campos elétricos para criar poros nas membranas celulares e da importância de suas aplicações surgiu a necessidade de se estudar e modelar matematicamente os eventos e etapas do processo de formação e fechamento dos poros.

Muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a investigar a influência de diversas variáveis no processo de eletroporação, tais como, por exemplo, raio dos poros, número de poros, intensidade e duração do estímulo elétrico. Como a eletroporação é um processo muito complexo, não foi possível deduzir equações teóricas que descrevessem o fenômeno e o comportamento da membrana celular durante o mesmo. Assim, os experimentos realizados permitiram que equações empíricas fossem desenvolvidas a partir dos registros e armazenamento de dados das variáveis de interesse. As constantes utilizadas nas equações do modelo matemático da eletroporação foram obtidas e normalizadas a partir desses mesmos experimentos,

que são citados a seguir.

Pastushenko e colaboradores publicaram, em 1979, uma série de sete artigos intitulada *Electric breakdown of bilayer lipid membranes*. Em um desses artigos (PASTUSHENKO *et al.*, 1979) foi estudada a relação quantitativa entre o tempo de vida da membrana, o potencial elétrico aplicado e outras variáveis do sistema, baseando-se na aproximação de difusão no estado estacionário.

Em 1980, Benz e Zimmermann apresentaram evidências de que a membrana celular da alga *Valonia Utricularis* pode sofrer rompimento elétrico (estado de altíssima condutância) com a polarização causada por tensões de aproximadamente 1 V (BENZ e ZIMMERMANN, 1980). Os autores mostraram, adicionalmente, que, no caso de uma membrana sintética, a tensão de ruptura é função do tempo necessário para carregar a membrana. No trabalho, os resultados obtidos foram comparados com um modelo eletromecânico de balanço de forças proposto em trabalho anterior (ZIMMERMANN *et al.*, 1974), e foi desenvolvida uma equação para o campo elétrico através da membrana depois de atingida a tensão de ruptura (o que causa movimento de íons pela membrana).

Em 1983, cientistas soviéticos estudaram experimentalmente o comportamento de uma membrana lipídica sintética durante a exposição a um pulso elétrico (CHERNOMORDIK *et al.*, 1983). Eles concluíram, a partir dos resultados, que a redução significativa da resistência da membrana pode ser observada não só em altas tensões (1 V) e tempos curtos (menos de 10 μ s), mas também em tempos longos (10 ms) e voltagens menores.

Em 1987 foi desenvolvido um trabalho no qual foi estudado experimentalmente o mecanismo de rompimento elétrico reversível de uma membrana lipídica (GLASER *et al.*, 1988). A conclusão foi que o aumento da condutividade durante a ruptura é consequência da formação de poros hidrofílicos (que evoluem a partir de poros hidrofóbicos) e que a formação destes poros é dependente do quadrado da tensão através da membrana. Foram apresentadas equações para a energia dos poros

hidrofóbicos e hidrofílicos e para a condutividade do poro; sendo que um pesquisador do MIT (BARNETT, 1990), anos depois, corrigiu uma das equações propostas no trabalho de Glaser, Pastushenko e Chernomordik. O artigo corrigido (GLASER *et al.*, 1988) usa uma equação para a condutância de uma membrana plana com um único poro, válida apenas para o cálculo unidimensional, e foi aplicada considerando um poro tridimensional.

Em 1996 foi publicada uma revisão sobre eletroporação por Weaver e Chizmadzhev (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996). O trabalho apresenta um resumo dos mecanismos estudados e dos modelos teóricos propostos até então, sendo analisados, caso a caso, as falhas e sucessos de cada modelo.

As pesquisadoras Wanda Krassowska e Katherine A. DeBruin desenvolveram um modelo computacional para uma célula única sofrendo eletroporação (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999). No estudo, elas investigaram o quanto a intensidade do estímulo elétrico influencia a tensão através da membrana e a densidade de poros na célula. Foi declarado que “o processo da eletroporação ainda não era bem entendido”. A conclusão obtida foi que a eletroporação altera o potencial transmembrana, diminuindo-o e mudando sua distribuição pela célula, e que há aumento da densidade de poros com o aumento da intensidade do pulso elétrico. Dando continuidade ao estudo, DeBruin analisou o modelo descrito no primeiro trabalho considerando a influência da presença de quatro íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , e Cl^-) (DEBRUIN, 1999).

Em 2004 foi publicado um trabalho pelo grupo da Professora Wanda Krassowska que modela o uso de protocolos de pulso duplo para permitir a entrada de fragmentos de DNA no meio intracelular (SMITH *et al.*, 2004). Este trabalho afirma que o uso de protocolos de pulso duplo são indicados para enviar macromoléculas para o meio intracelular, o que é necessário na indução da diferenciação.

Em 2005 um grupo de Toulouse, na França, publicou uma revisão (TEISSIE *et al.*, 2005) das principais etapas da eletropermeabilização, envolvendo as principais equações, as durações médias e uma proposta do mecanismo molecular de cada

evento.

Em 2007, Wanda Krassowska e Petar D. Filev desenvolveram um novo modelo computacional de eletroporação de célula única exposta a campo elétrico externo (KRASSOWSKA e FILEV, 2007). O trabalho analisa as seguintes variáveis na presença do campo elétrico externo: potencial transmembrana, número de poros e distribuição do raio do poro como função do tempo e da posição na célula, permitindo a análise temporal e espacial dos eventos da eletroporação.

2.2.4 O uso de protocolos de pulso duplo

O uso de protocolos de um único pulso pode causar o rompimento da célula (SMITH *et al.*, 2004), o que ocorre por meio da formação de um poro gigante, que, quando o pulso é mantido pelo tempo necessário para permitir a entrada das macromoléculas na célula, pode crescer indefinidamente e alcançar um tamanho que compromete integridade celular.

Há evidências de sucesso no envio de macromoléculas para o meio intracelular com o uso de protocolos de dois ou mais pulsos de campos elétricos (BARKER *et al.*, 2009, ZIZZI *et al.*, 2010).

Neste trabalho são avaliados, durante a simulação, protocolos de pulso duplo para avaliar o efeito de algumas variáveis no controle do raio dos poros. As variáveis analisadas são apresentadas no Capítulo 4.

Capítulo 3

Teoria da Eletroporação

Esse capítulo apresenta a fundamentação teórica para a compreensão do complexo fenômeno da eletroporação. A sequência de equações usada para a elaboração do modelo matemático e da rotina computacional é descrita e o modelo elétrico usado para conduzir este estudo é ilustrado.

3.1 Princípios da eletroporação

A estrutura de bicamada da membrana celular faz com que poros hidrofóbicos sejam formados espontaneamente de acordo com o rearranjo das moléculas fosfolipídicas (GLASER *et al.*, 1988). Quando, sob a ação de algum estímulo externo (o processo necessita de energia, a qual pode ser proveniente de um campo elétrico), o raio de um poro hidrofóbico alcança um valor crítico, há uma reorientação das moléculas lipídicas para um estado energeticamente mais favorável, sendo formado um poro hidrofílico (GLASER *et al.*, 1988). A Figura 7 ilustra a variação da energia livre na formação de um poro em uma membrana (A e B) e a representação esquemática da transição de um poro hidrofóbico para um poro hidrofílico (C). A Figura 7 (A) é uma versão simplificada da variação energia de criação de um poro hidrofílico em função do raio para a tensão transmembrana (V_m) nula e para a tensão transmembrana com

um valor elevado (caso no qual a energia, W , é menor). A curva (B) ilustra a variação da energia de criação do poro apresentando a curva do poro hidrofóbico (W_2) e a curva do poro hidrofílico (W_1) para os casos de $V_m = 0$ e V_m maior que zero. Em (C) é possível observar os dois tipos de poro: hidrofílico (em cima) e hidrofóbico (embaixo).

Com o aumento da tensão transmembrana, a barreira de energia cai e a probabilidade de aparecerem poros com raio maior que o raio crítico para aquele V_m aumenta. O máximo da barreira de energia é associado ao raio crítico de formação do poro hidrofílico.

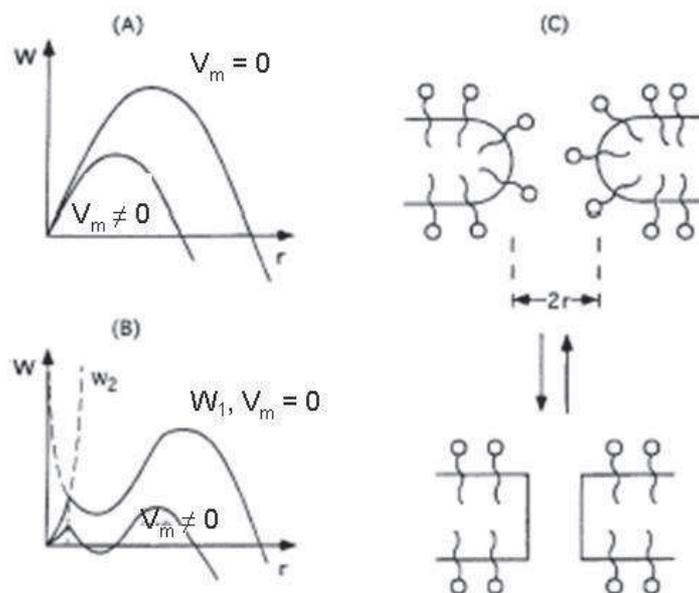


Figura 7: Variação de energia livre (W) associada à criação de um único poro hidrofílico de raio r em uma membrana, plotados em unidades arbitrárias. A: Variação da energia para um poro hidrofílico, para tensão transmembrana nula ($V_m = 0$) e para uma tensão transmembrana elevada ($V_m \neq 0$). B: Energia do poro. A curva W_1 corresponde ao poro hidrofílico e a curva W_2 ao poro hidrofóbico. Também apresenta os casos de $V_m = 0$ e V_m elevada. C: Ilustração esquemática da transição do poro hidrofóbico (embaixo) para o poro hidrofílico (em cima). Figura reimpressa de *Biochemistry and Bioenergetics*, WEAVER J.C. e CHIZMADZHEV Y.U. , *Theory of electroporation: a review*, 41/2, pp. 135-160, Copyright(1996), com permissão de Elsevier.

3.2 Modelo base da eletroporação

O modelo para simulação computacional de eletroporação que será desenvolvido terá como base inicial as equações do modelo de Wanda Krassowska e Peter Filev (KRASSOWSKA e FILEV, 2007).

3.2.1 Considerações teóricas

A aplicação do campo elétrico é supostamente realizada com um eletroporador programável, cujos parâmetros frequência, duração, intensidade e espaçamento dos pulsos podem ser controlados. O dispositivo aplica ao meio extracelular uma diferença de potencial U por meio de duas placas paralelas com distância L , de tal modo que a intensidade do campo elétrico pode ser aproximada por $|\vec{E}| = U \times L^{-1}$.

A Figura 8 ilustra o experimento típico de eletroporação. A célula esférica de raio r_{cel} está contida em uma casca esférica, seu envoltório, de raio $2 r_{cel}$. As linhas de campo elétrico emitidas pelo dispositivo de placas paralelas fazem um ângulo θ com a superfície da célula. As regiões de interesse, regiões analisadas nas simulações realizadas neste trabalho, estão indicadas. São elas: o polo despolarizado (D) é onde $\theta = 0^\circ$, o polo hiperpolarizado (H), onde $\theta = 180^\circ$, o equador (E), onde $\theta = 90^\circ$ e as regiões nas bordas entre o polo despolarizado e o equador (D_b) e a bordas entre o polo hiperpolarizado e o equador (H_b). O meio intracelular possui condutividade s_i e potencial elétrico ϕ_i e o meio extracelular possui condutividade s_e e potencial elétrico ϕ_e .

Durante a eletroporação a membrana celular submetida ao campo elétrico

(Figura 9) dá origem à formação de poros hidrofílicos (neste trabalho, a partir daqui, poros hidrofílicos são chamados livremente de poros).

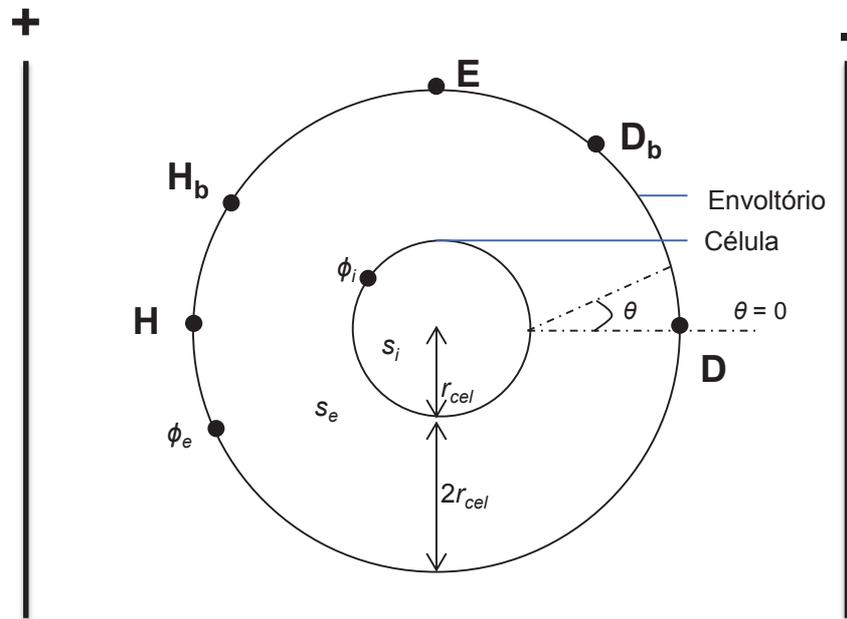


Figura 8: Representação esquemática do experimento de eletroporação de uma célula esférica de raio r_{cel} num envoltório com raio $2r_{cel}$. O campo elétrico é aplicado por um dispositivo de placas paralelas. σ_i , σ_e , ϕ_i e ϕ_e são as condutividades e os potenciais elétricos dos meios intra e extracelular, respectivamente. θ é o ângulo polar que determina a posição ao longo da célula. Estão identificados os pontos de interesse na superfície da célula: H (polo hiperpolarizado), H_b (borda entre o polo hiperpolarizado e o equador), E (equador), D_b (borda entre o equador e o polo despolarizado) e D (polo despolarizado).

Os potenciais elétricos intra e extracelular da célula eletroporada são governados pela equação de Laplace (KRASSOWSKA e FILEV, 2007):

$$\begin{cases} \nabla\phi_i = 0 & \text{intracelular} \\ \nabla\phi_e = 0 & \text{extracelular.} \end{cases} \quad (1)$$

O potencial no meio extracelular (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999, KRASSOWSKA e FILEV, 2007) é dado por:

$$\phi_e(t, \rho, \theta) = E\rho \cos \theta \quad \text{com } \rho \rightarrow \infty, \quad (2)$$

onde ρ é a distância a partir do centro da célula e θ o ângulo de medida com relação à

direção do campo elétrico E .

Para $t < 0$, o campo aplicado é nulo e os potenciais assumem os valores:

$$\begin{cases} \phi_i(t, \rho, \theta) = V_{rep} & \text{intracelular} \\ \phi_e(t, \rho, \theta) = 0 & \text{extracelular,} \end{cases} \quad (3)$$

onde V_{rep} é a tensão transmembrana de repouso.

A eletroestimulação da membrana implica numa variação de estado (estado intacto para estado porado) que é acompanhada por uma variação de energia. Essa variação de energia é função do raio dos poros formados e da tensão transmembrana (Figura 7). O tempo de vida da membrana é dependente da taxa de formação de poros supracríticos, poros instáveis, que podem causar a lise da membrana.

O comportamento da membrana durante a eletroporação, quando a membrana é atingida por campos elétricos (Figura 9), pode ser modelado como um circuito resistivo e capacitivo. Esse circuito é apresentado na Figura 10.

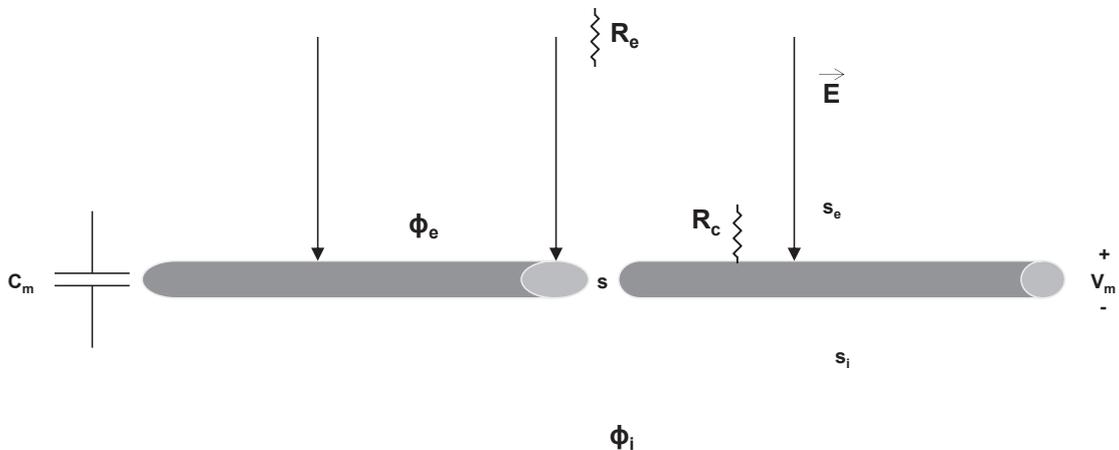


Figura 9: Membrana celular durante a eletroporação. O campo elétrico, E , gera uma corrente na membrana, causada pela formação de poros (conversão de poros hidrofóbicos em poros hidrofílicos). σ_i e σ_e são as condutividades dos meio intra e extracelular, respectivamente, ϕ_i e ϕ_e os potenciais elétricos intra e extracelular, respectivamente, R_e é a resistência do *setup* experimental, R_c é a resistência dos canais proteicos da membrana, C_m é a capacitância superficial da membrana e V_m é a tensão transmembrana.

A equação diferencial (4) governa o circuito elétrico da Figura 10, o qual modela o arranjo experimental da Figura 8 e que será estudado mais a frente.

$$\frac{U}{R_e} = C_m \frac{dV_m}{dt} + (V_m - V_{rep}) \times \left(\frac{1}{R_c} + \frac{1}{R_e} \right) + I_p, \quad (4)$$

onde R_e é a resistência do *setup* experimental, R_c é a resistência dos canais proteicos da membrana, C_m é a capacitância superficial da membrana, que é considerada constante, o que é uma aproximação válida, pois foi verificada experimentalmente uma variação de apenas 2% no seu valor (CHERNOMORDIK, *et al.*, 1983, KRASSOWSKA e FILEV, 2007). O termo $(R_c^{-1} + R_e^{-1})$ equivale à condutância da membrana $g_m = R_m^{-1} = (R_c^{-1} + R_e^{-1})$, que, neste trabalho, é considerada constante.

3.2.2 Equacionamento dos fenômenos da eletroporação

O modelo apresentado na subseção anterior apresenta relações de interdependência entre a tensão transmembrana (V_m) e a corrente total nos poros formados pela eletroporação (I_p), resultando em uma equação diferencial não linear (4), que não pode ser resolvida analiticamente. Como anteriormente mencionado, consideraremos constante a resistência dos canais proteicos da membrana (R_c).

Nesta subseção cada termo da equação (4) será mais bem definido, uma vez que outras variáveis importantes, que não aparecem explicitamente no modelo elétrico também serão definidas. Será apresentado o conjunto de equações acopladas (KRASSOWSKA e FILEV, 2007) que deve ser usado para simular os eventos da eletroporação na membrana celular, de acordo com o modelo elétrico definido.

O potencial transmembrana é equivalente a

$$V_m(t, \theta) \equiv \phi_i(t, r_{cel}, \theta) - \phi_e(t, r_{cel}, \theta). \quad (5)$$

A corrente nos poros, I_p , é a soma das correntes individuais de cada um dos n poros

(6).

$$I_p(t, \theta) = \sum_{j=1}^n i_p(r_j^\theta, V_m), \quad (6)$$

sendo a corrente em cada poro dada por

$$i_p(r_j^\theta, V_m) = \frac{V_m}{(R_{ap} + R_{ent})}. \quad (7)$$

A resistência através de cada poro e a resistência de entrada em cada poro são dadas por (8) e (9) e devem ser calculadas para cada r_j^θ . O índice j é usado para indicar o raio de cada poro, índice que varia de um até n , o número total de poros em cada ângulo θ .

$$R_{ap} = \frac{h}{(\pi r^2 s)}, \quad (8)$$

$$R_{ent} = \frac{1}{(2sr)}, \quad (9)$$

onde h é a espessura da membrana celular e s é a condutividade da solução que está em contato com o poro. As equações (7), (8) e (9) mostram uma relação não linear entre o raio dos poros e a condutância gerada pela eletroporação da membrana.

De forma sucinta, o processo da eletroporação modelado por KRASSOWSKA e FILEV (2007) pode ser descrito pelas seguintes etapas:

1. Início da formação de poros:

Antes da aplicação da tensão do eletroporador, U , a tensão transmembrana de repouso é $V_m = V_{rep} = -80$ mV, sendo que com o início da aplicação do campo elétrico há variação dessa tensão. A criação de poros hidrofílicos na membrana é iniciada a partir de poros hidrofóbicos dos quais os raios evoluem para um raio maior que certo raio crítico, r^* , que é o raio crítico de transição do poro de hidrofílico para hidrofóbico. Outro valor importante do raio é r_{min} , que é o valor do raio quando a energia do poro é mínima.

A equação usada para definir a taxa de formação de poros na membrana é a

equação diferencial ordinária desenvolvida no trabalho de DEBRUIN e KRASSOWSKA (1999):

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\frac{V_m^2}{V_{ep}}} \times \left(1 - \frac{N}{N_{eq}(V_m)} \right), \quad (10)$$

onde N é a densidade de poros, α é o coeficiente da taxa de formação de poros, V_{ep} é uma constante característica da eletroporação e N_{eq} é a densidade de poros de equilíbrio, que por sua vez é dependente da tensão transmembrana (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999):

$$N_{eq}(V_m) = N_0 e^{q \left(\frac{V_m}{V_{ep}} \right)^2}, \quad (11)$$

onde N_0 é a densidade de poros de equilíbrio para $V_m = 0$ e $q = (r_{min} r^{*-1})^2$.

A equação (12) é uma redução da relação de Smoluchowski (ABIDOR *et al.*, 1979, POWELL e WEAVER, 1986, VASILKOSKI *et al.*, 2006), que é a equação que representa a difusão de partículas para o interior da célula:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_p \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{n}{kT} \frac{\partial W_{ap}}{\partial r} \right) \quad (12)$$

onde n é o número de poros, D_p é o coeficiente de difusão no espaço do raio do poro, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e W_{ap} é a energia de formação poro aquoso.

2. Evolução dos poros:

Os poros são formados inicialmente com o raio crítico da transição de poro hidrofóbico para hidrofílico, r^* . Há um rearranjo na estrutura dos poros causado pela busca da membrana celular por um estado energeticamente mais favorável. Para uma célula com n poros em cada região representada pelo ângulo θ , a evolução dos raios desses poros obedece a seguinte equação:

$$\frac{dr_j}{dt} = v(r_j, V_m, \sigma_{ef}), \quad j = 1, 2, \dots, n, \quad (13)$$

onde σ_{ef} é a tensão superficial efetiva da membrana.

Em (13), v é a velocidade de advecção para cada r_j^θ , que é dada por (14). A equação da velocidade de advecção (KRASSOWSKA e FILEV, 2007) tem quatro termos. O primeiro corresponde à força elétrica induzida por V_m ; o segundo à repulsão pelo efeito estérico (efeito de orientação) das cabeças polares dos lipídios da membrana; o terceiro à tensão mecânica linear agindo no perímetro do poro e o quarto, a tensão superficial efetiva da membrana, que é uma função da soma das áreas de todos os poros. Esta equação só pode ser aplicada quando o raio r atinge um valor igual ou maior que r^* , caso contrário, não há poros para evoluir.

$$v(r, V_m, \sigma_{ef}) = \frac{D}{kT} \left\{ \frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_t)} + 4\beta \left(\frac{r^*}{r}\right)^4 \frac{1}{r} - 2\pi\gamma + 2\pi\sigma_{ef}r \right\} \quad (14)$$

em $r \geq r^*$,

onde D é o coeficiente de difusão do raio do poro, β é a energia de repulsão estérica, γ é a energia de borda, F_{max} é a força elétrica máxima para $V_m = 1$ V e r_h e r_t são constantes da velocidade de advecção. A tensão superficial efetiva da membrana é dada por (15).

$$\sigma_{ef} = 2\sigma' - \frac{2\sigma' - \sigma_0}{(1 - A_p/A)}, \quad (15)$$

onde σ' é a energia por unidade de área da interface hidrocarboneto-água, σ_0 é a tensão mecânica da membrana sem poros, $A_p = \sum_{j=1}^n \pi r_j^2$ e A é a área da superfície da célula. O volume, a forma e o tamanho da célula são considerados constantes.

3. Fechamento dos poros:

O fechamento dos poros ocorre em uma taxa normalmente mais lenta que a taxa de criação, cuja constante de tempo pode ser derivada da equação da taxa de formação de poros na membrana (10).

$$\tau_N = \frac{N_0}{\alpha} e^{(q-1)(V_m/V_{rep})^2}. \quad (16)$$

3.3 Modelando a eletroporação

O circuito da Figura 10 é descrito pela equação (4), que pode ser reescrita como:

$$J_e = V_m G_{ei} + C_m \frac{dV_m}{dt} + g_m (V_m - V_{rep}) + V_m G_p, \quad (17)$$

onde J_e é a densidade de corrente gerada pelo campo elétrico externo ($J_e = U/R_e$) e G_p é a condutância devida aos poros na membrana ($I_p = G_p V_m$) e G_{ei} é a condutância devida à diferença nas condutividades intra e extracelular.

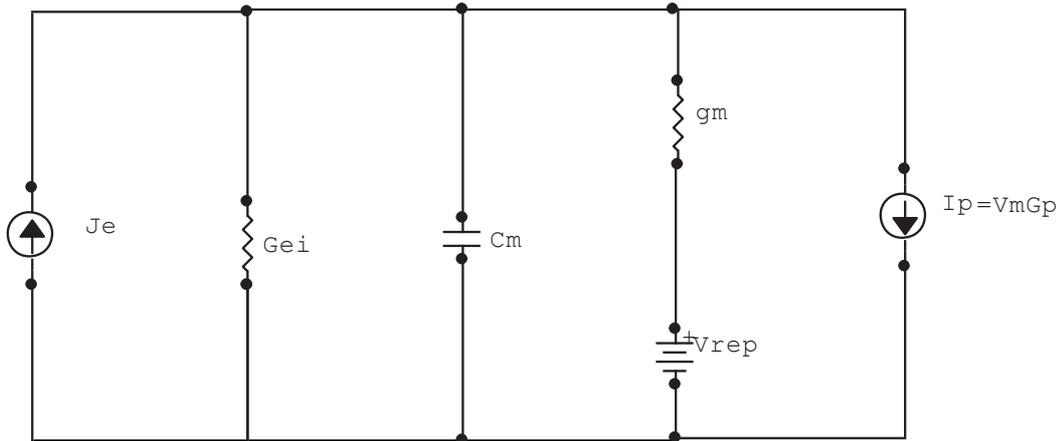


Figura 10: Circuito elétrico que retrata o comportamento da membrana durante o processo de eletroporação. O circuito esquematiza o experimento apresentado na Figura 8. Cada elemento do circuito representa um parâmetro característico da membrana. J_e representa a corrente gerada pelo campo elétrico, G_{ei} é a condutância devida à diferença nas condutividades intra e extracelular, C_m é a capacitância de membrana, V_{rep} o potencial de repouso, g_m a condutância dos canais da membrana, e I_p representa a corrente através dos poros.

Esta equação descreve o comportamento da tensão transmembrana na presença de um campo elétrico externo. Todos os termos representam densidades de corrente e são dados em $[A\ m^{-2}]$. A equação é escrita em termos da densidade de corrente, pois as constantes referidas na literatura, como capacitância e condutância, são normalizadas em função da área, porque assim, a aplicação da constante independe da dimensão da célula estudada. O significado de cada termo é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Definição dos termos da equação do circuito

Termo	Origem da densidade de corrente
J_e	Aplicação do campo elétrico externo
$V_m G_{ei}$	Diferença na condutância dos meios intra e extracelular
$C_m (dV/dt)$	Capacitância superficial da membrana
$g_m (V_m - V_{rep})$	Condutância dos canais iônicos da membrana
$V_m G_p$	Criação dos poros na eletroporação

Todas as simulações realizadas neste trabalho consideraram a condutância da membrana (g_m) constante. Além disso, a capacitância superficial da membrana (C_m), a área e o volume da célula também foram consideradas constantes. O parâmetro G_{ei} é uma constante que representa a condutância equivalente associada às condutividades intra e extracelulares por unidade de área:

$$G_{ei} = \frac{1}{r_{cel} \left(\frac{1}{s_i} + \frac{2}{s_e} \right)} \quad (18)$$

A densidade de corrente externa associada ao campo elétrico aplicado pode ser representada por:

$$J_e = \frac{3}{2} r_{cel} G_{ei} E \cos \theta. \quad (19)$$

A solução numérica para o sistema de equações foi obtida considerando-se uma célula de raio $r_{cel} = 50 \mu\text{m}$ imersa numa solução com condutividade s_e (Figura 8). Esse valor de raio celular foi escolhido para facilitar a comparação dos resultados com os resultados do modelo referência (KRASSOWSKA e FILEV, 2007) e permitir assim a validação do modelo. Essa célula, exposta a uma densidade de corrente, J_e , gerada por um campo elétrico aplicado por um dispositivo de placas paralelas, foi discretizada em coordenadas polares, sendo o passo de discretização $\Delta\theta = \pi/128$. Neste trabalho a referência a cada região de discretização da célula é feita por meio do uso do nome do respectivo ângulo, por exemplo, para indicar a região entre $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 1,41^\circ$ é usado o termo $\theta = 0^\circ$. A sequência de equações (5) até (15) foi resolvida para cada passo de tempo, sendo que os valores obtidos foram usados para determinar V_m no próximo passo de tempo.

Algumas aproximações foram usadas para se aumentar a eficiência computacional. Os poros foram separados em duas populações, poros pequenos e poros grandes. Foi arbitrado que todos os poros pequenos criados possuíam o mesmo raio (r^*). Já os poros grandes criados evoluíam um a um. Os poros criados no mesmo passo de tempo tiveram o mesmo valor de raio e evoluíam em conjunto.

A simulação, então, acontece como descrita a seguir. Para cada ângulo θ é determinada a intensidade da densidade de corrente externa e , de acordo com a equação (10), os poros são criados. Todos os poros são criados inicialmente como poros grandes e se mantêm nessa população até que atinjam tamanho menor que o limite (r_{min}). O vetor do raio dos poros criados é atualizado de acordo com as equações (13), (14) e (15) e, se necessário, é realizada a troca entre a população de poros. Se o raio do poro é menor que o limite, há aumento na densidade de poros (variável que leva em conta apenas a população de poros pequenos) e diminuição do número de

poros (variável que leva em conta apenas os poros grandes). É então calculada a densidade de corrente em todos os poros (I_p). Com esse valor é calculada a tensão transmembrana do próximo passo temporal. Esse procedimento é repetido para cada um dos ângulos θ . Então, são calculados os parâmetros totais da célula, a área total dos poros e a tensão efetiva da membrana. O procedimento é repetido até o tempo final determinado.

Capítulo 4

Metodologia de pesquisa

Esse capítulo apresenta a metodologia de pesquisa seguida para a realização das simulações feitas. Um fluxograma da rotina de solução de equações é apresentado para facilitar a compreensão do leitor. O propósito das simulações de pulso único e de pulso duplo é explicado.

O modelo elétrico apresentado no Capítulo 3 foi usado para realizar simulações com o objetivo de estudar o comportamento de formação de poros na membrana e a influência de características do estímulo externo.

A área e o volume da célula foram considerados constantes, assim como a condução de corrente através dos canais proteicos presentes na membrana. Foi simulado o comportamento de um hemisfério da célula, pois o comportamento do outro foi considerado análogo. Como mencionado, esta metade foi dividida em 128 partes, de 0° até 180° , resultando em um incremento angular $\Delta\theta = 1,41^\circ$. Cada $\Delta\theta$ foi incluído no cálculo e os resultados para certas regiões de interesse foram registradas para posterior análise gráfica. De modo a propiciar comparação com trabalhos similares da literatura, foram consideradas regiões de interesse: o polo despolarizado (D), o equador (E), algum ponto na borda entre E e D (D_b), o polo hiperpolarizado (H) e um ponto na borda entre H e D (H_b). Os pontos de interesse podem ser observados na Figura 8.

Para simular o modelo computacionalmente, as equações foram discretizadas

no tempo, com o uso do método de Euler com uma resolução de 2 ns, e resolvidas de forma conjugada, permitindo a computação das variáveis de interesse nos tempos discretos. Conhecidos os valores iniciais das variáveis, foi feita a atualização e foram computados os valores das iterações seguintes, a partir da aplicação de um campo elétrico externo. Em todas as simulações, foi considerado somente aplicação de um pulso retangular de campo elétrico externo, não sendo computados efeitos de campos gerados por pulsos com frequência variável. A Tabela 2 apresenta os valores das constantes usadas na simulação do modelo.

Foram executados dois perfis de simulação: protocolo de pulso único e protocolo de pulso duplo. O objetivo do pulso único é comparar o modelo gerado com o modelo de referência (KRASSOWSKA e FILEV, 2007), analisar as variáveis de interesse, e avaliar o simulador. As simulações de protocolos de pulso duplo foram conduzidas com o propósito de mostrar a possibilidade de se controlar o raio dos poros formados pela manipulação de algumas variáveis: intervalo de tempo entre os pulsos, magnitude do primeiro pulso, magnitude do segundo pulso, entre outras.

A rotina computacional usada para realizar a simulação foi escrita em Matlab 7.0 (MathWorks, USA) e é apresentada no Anexo II. As simulações foram feitas em um processador Intel® Core 2 Duo 2.0 GHz 3 GB, com sistema operacional Windows XP. A Figura 11 apresenta o fluxograma da rotina computacional utilizada na simulação.

Tabela 2: Valores das constantes usadas nas simulações. Adaptada de *Biophysical Journal*, 92 /2, Wanda Krassowska e Petar D. Filev, *Modeling Electroporation in a Single Cell*, pp. 404-417, Copyright (2007), com permissão de Elsevier.

Símbolo	Valor	Definição
r_{cell}	$50,000 \times 10^{-6} \text{ m}$	Raio da célula
G_{ei}	$8,704 \times 10^3 \text{ S/m}^2$	Condutividade equivalente entre os meios intra e extracelular
s_i	$0,455 \text{ S/m}$	Condutividade intracelular
s_e	$5,000 \text{ S/m}$	Condutividade extracelular
E	$4,000 \times 10^4 \text{ V/m}$	Campo elétrico externo
α	$1,000 \times 10^9 \text{ m}^2/\text{s}$	Coefficiente de taxa de criação de poros
N_0	$1,500 \times 10^9 \text{ m}^{-2}$	Densidade de poros de equilíbrio para $V_m = 0$
r_m	$0,800 \times 10^{-9} \text{ m}$	Raio mínimo de energia para $V_m = 0$
r^*	$0,510 \times 10^{-9} \text{ m}$	Raio mínimo do poro hidrofílico
V_{ep}	$0,258 \text{ V}$	Voltagem característica da eletroporação
D	$5,000 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$	Coefficiente de difusão do raio do poro
k	$1,380 \times 10^{-23}$	Constante de Boltzmann
T	$310,000 \text{ K}$	Temperatura absoluta
F_{max}	$0,700 \times 10^{-9} \text{ N/V}^2$	Força elétrica máxima para $V_m = 1 \text{ V}$
r_h	$0,970 \times 10^{-9} \text{ m}$	Constante da velocidade de advecção
r_t	$0,310 \times 10^{-9} \text{ m}$	Constante da velocidade de advecção
β	$1,400 \times 10^{-19} \text{ J}$	Energia de repulsão estérica
γ	$1,800 \times 10^{-11} \text{ J/m}$	Energia de borda
σ'	$2,000 \times 10^{-2} \text{ J/m}^2$	Tensão na interface hidrocarboneto-água
σ_0	$1,000 \times 10^{-6} \text{ J/m}^2$	Tensão da bicamada sem poros
A	$1,570 \times 10^{-8}$	Área da célula
C_m	$1,000 \times 10^{-2} \text{ F/m}^2$	Capacitância superficial da membrane
g_m	$2,000 \text{ S/m}^2$	Condutância superficial da membrane

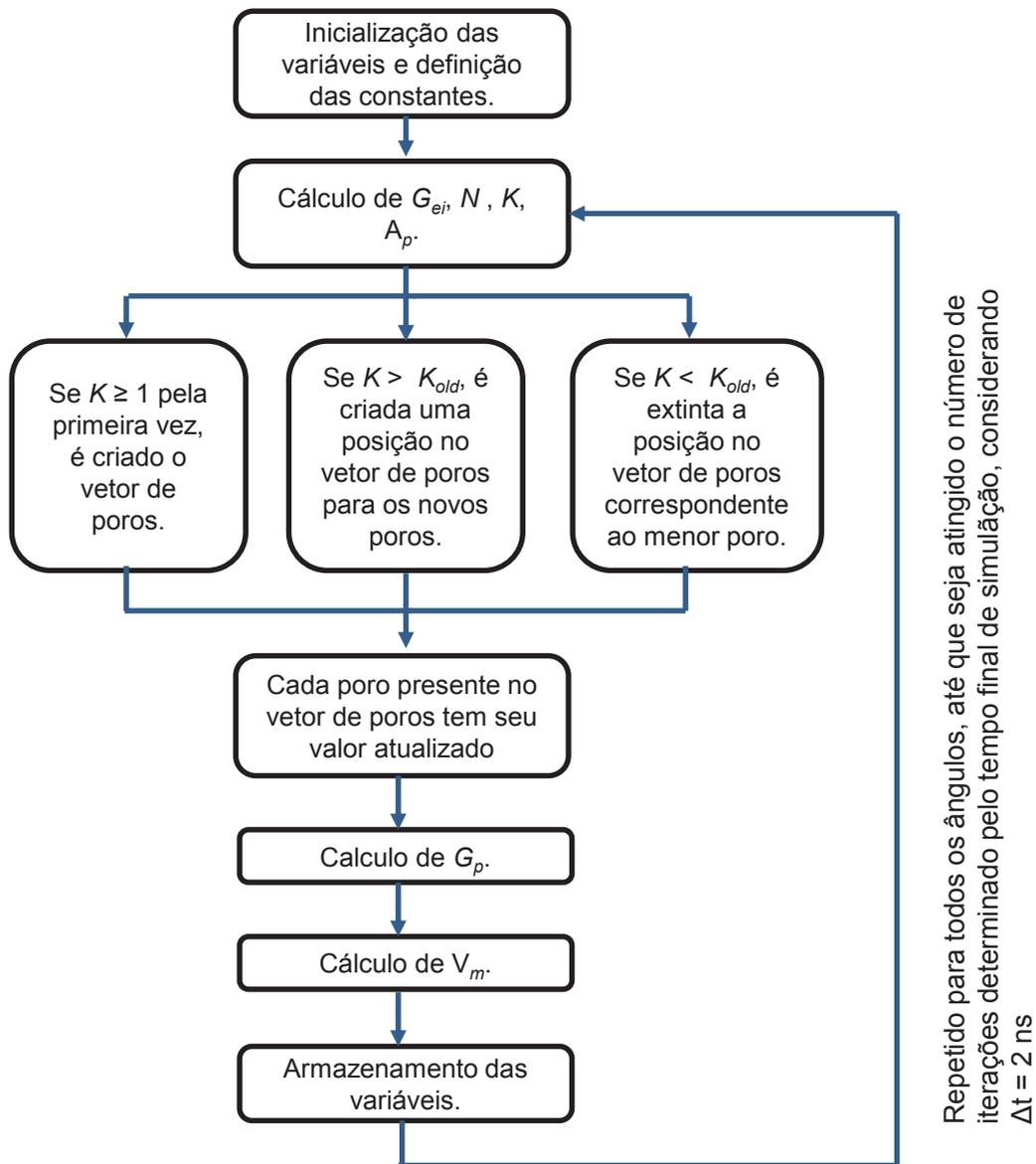


Figura 11: Fluxograma da rotina computacional. K_{old} é a variável que armazena o número de poros (K) na iteração anterior.

4.1 Protocolos de pulso único

Foi realizada uma única simulação com pulso único. Essa simulação foi usada com o objetivo de se verificar o equacionamento e resolução computacional do modelo, comparando os resultados com os do modelo de referência (KRASSOWSKA e FILEV, 2007). O tempo total de simulação foi 1,1 ms e o campo elétrico aplicado de 40 kV/m. A duração do pulso de excitação foi de 1 ms; sendo que a simulação foi conduzida por mais 0,1 ms com o objetivo de se verificar o comportamento dos raios dos poros após o desligamento do pulso, assim como feito por Krassowska e colaboradores (KRASSOWSKA e FILEV, 2007).

Na Figura 12 o perfil do campo elétrico aplicado é apresentado. O campo varia em função do ângulo (θ) que as linhas do campo fazem com a superfície da célula (Figura 8).

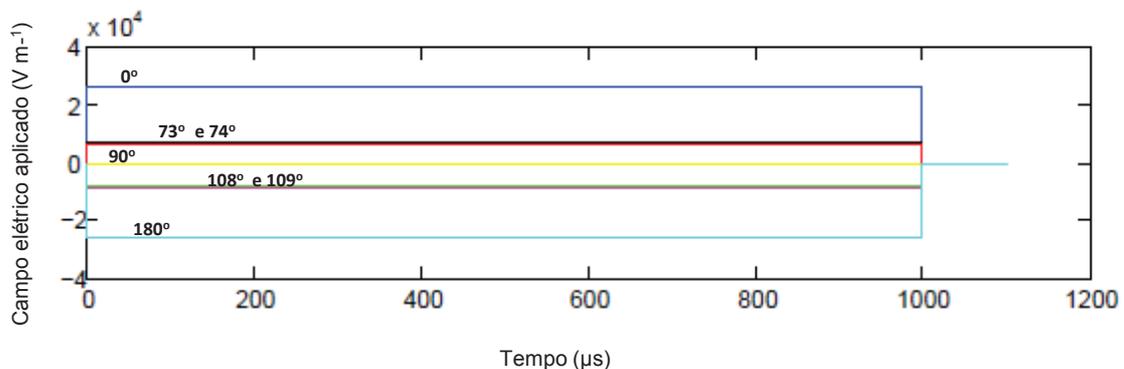


Figura 12: Campo elétrico aplicado em função do ângulo. O efeito do campo em cada região da membrana depende do cosseno do ângulo que a respectiva região faz com as linhas do campo elétrico.

4.2 Protocolos de pulso duplo

Foram realizadas dez simulações de dois pulsos para análise do controle dos raios dos poros. As variáveis de interesse foram: duração do primeiro e do segundo pulso, magnitude do primeiro e do segundo pulso, intervalo de tempo entre os pulsos. A Tabela 3 apresenta os protocolos utilizados na simulação.

Tabela 3: Protocolos de Pulso duplo. Característica dos pulsos.

Protocolo	Altura pulso 1	Duração pulso 1	Intervalo	Altura pulso 2	Duração pulso 2	Tempo de simulação
1	40 kV/m	0,40 ms	0,60 ms	25 kV/m	0,50 ms	1,50 ms
2	40 kV/m	0,40 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,60 ms	1,10 ms
3	40 kV/m	0,40 ms	0,25 ms	25 kV/m	0,60 ms	1,25 ms
4	40 kV/m	0,40 ms	1,00 ms	25 kV/m	0,60 ms	2,00 ms
5	40 kV/m	0,10 ms	1,00 ms	25 kV/m	0,60 ms	1,70 ms
6	37 kV/m	0,40 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,60 ms	1,10 ms
7	40 kV/m	0,40 ms	2,00 ms	25 kV/m	0,60 ms	3,00 ms
8	40 kV/m	0,40 ms	0,10 ms	20 kV/m	0,60 ms	1,10 ms
9	40 kV/m	0,40 ms	0,10 ms	35 kV/m	0,60 ms	1,10 ms
10	35 kV/m	0,40 ms	0,10 ms	30 kV/m	0,60 ms	1,10 ms

Os protocolos apresentados na Tabela 3 foram escolhidos de acordo com os objetivos apresentados a seguir, para analisar as possibilidades de controle do raio.

1. Controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos:

Na Tabela 4 são apresentados os protocolos utilizados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação do intervalo entre os pulsos. É esperado encontrar alguma diferença no tamanho dos raios máximos e dos raios médios para cada protocolo. Essa diferença seria causada pela diminuição do número de poros na membrana, que seria originada pelo *resealing* de alguns poros.

Tabela 4: Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação do intervalo entre os pulsos

Protocolo	Altura pulso 1	Duração pulso 1	Intervalo	Altura pulso 2	Duração pulso 2
1	40 kV/m	0,4 ms	0,60 ms	25 kV/m	0,5 ms
2	40 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,6 ms
3	40 kV/m	0,4 ms	0,25 ms	25 kV/m	0,6 ms
4	40 kV/m	0,4 ms	1,00 ms	25 kV/m	0,6 ms
7	40 kV/m	0,4 ms	2,00 ms	25 kV/m	0,6 ms

2. Controle por meio da variação da magnitude do primeiro pulso

Na Tabela 5 são apresentados os protocolos utilizados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do primeiro pulso. É esperado encontrar alguma diferença no número de poros formados entre os dois protocolos. Essa diferença seria causada pela diferença entre a quantidade de energia aplicada sobre a membrana. Com um campo elétrico mais forte, é esperada a formação de um número maior de poros e, conseqüentemente, raios menores.

Tabela 5: Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do primeiro pulso

Protocolo	Altura pulso 1	Duração pulso 1	Intervalo	Altura pulso 2	Duração pulso 2
2	40 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,6 ms
6	37 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,6 ms

3. Controle por meio da variação da magnitude do segundo pulso:

Na Tabela 6 são apresentados os protocolos utilizados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do segundo pulso. Não é esperado encontrar alguma diferença no número de poros formados entre os dois protocolos, pois estes são formados durante o primeiro pulso. É esperado

que os raios que recebem mais energia durante o segundo pulso evoluam para tamanhos maiores.

Tabela 6: Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da magnitude do segundo pulso

Protocolo	Altura pulso 1	Duração pulso 1	Intervalo	Altura pulso 2	Duração pulso 2
2	40 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	25 kV/m	0,6 ms
8	40 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	20 kV/m	0,6 ms
9	40 kV/m	0,4 ms	0,10 ms	35 kV/m	0,6 ms

4. Controle por meio da variação da duração do primeiro pulso:

Na Tabela 7 são apresentados os protocolos utilizados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da duração do primeiro pulso. É esperado que se forme um número menor de poros no protocolo 5, que possui um primeiro pulso com duração menor.

Tabela 7: Protocolos usados para analisar o controle do raio dos poros por meio da variação da duração do primeiro pulso

Protocolo	Altura pulso 1	Duração pulso 1	Intervalo	Altura pulso 2	Duração pulso 2
4	40 kV/m	0,4 ms	1,00 ms	25 kV/m	0,6 ms
5	40 kV/m	0,1 ms	1,00 ms	25 kV/m	0,6 ms

Capítulo 5

Resultados

5.1 Protocolo de pulso único

Na célula de raio 50 μm exposta a um campo elétrico de 40 kV/m são formados 420.340 poros após a estabilização (célula inteira). Em algumas regiões, nas quais V_m não passa do limiar, não há formação de poros, como por exemplo, entre 74° e 105° , no polo despolarizado, e entre 254° e 285° , no polo hiperpolarizado. Há pequenas regiões na célula nas quais há apenas um poro: em 70° , 73° , 106° , 108° e 109° .

A Tabela 8 apresenta o resultado de variáveis consolidam os resultados da simulação, em 1,1ms de simulação.

Tabela 8: Resultados numéricos da simulação com um único pulso, para a parte simulada da célula (0° a 180°)

Raio máximo	195,01 nm
Área total de poros	$4,49 \times 10^{-13} \text{ m}^2$
Numero total de poros (1/2 célula)	210.152
Tempo de aparecimento do primeiro poro na parte despolarizada	0,580 μs
Tempo de aparecimento do primeiro poro na parte hiperpolarizada	0,518 μs
Tempo de aparecimento do último poro (73°)	215,450 μs
Tempo real de simulação	824,500 minutos

A célula apresenta um número muito grande de poros. Grande parte destes poros são poros muito pequenos, e não permitem a entrada de macromoléculas na célula. É importante observar o tempo de aparecimento do último poro, o que ocorre na região de 73° , e este é o maior poro formado na célula. Nas regiões citadas anteriormente, nas quais há apenas um poro, o raio deste único poro evolui para um tamanho consideravelmente grande, quando comparado com os poros formados em outras regiões (regiões onde há a formação de mais que um poro). A área total de metade da célula ($5 \times 10^{-9} \text{ m}^2$) tem uma área de $4,49 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ coberta por poros. O longo tempo real de simulação, que foi de aproximadamente 13 horas e 45 minutos, também deve ser observado. A Figura 13 e a Figura 14 mostram os resultados da simulação realizada com um único pulso de 40 kV/m durante 1,1ms.

A Figura 13 ilustra o comportamento da tensão transmembrana e do número de poros, em cada região (representada pelo respectivo ângulo) nos primeiros 15 μs de simulação. Há apenas um poro nas regiões de 108° (verde) e 109° (magenta). Em 73° ainda não há poros, pois a formação de poros acontece depois (Tabela 8).

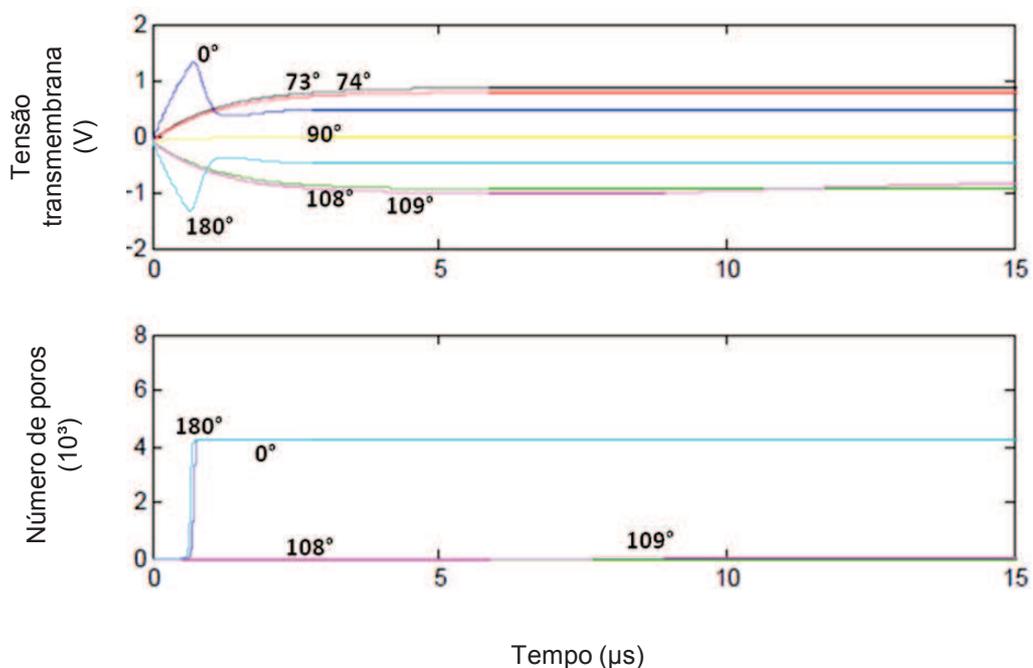


Figura 13: Tensão transmembrana e número de poros em função do tempo . O gráfico apresenta os primeiros 15 μs de simulação.

A Figura 14 apresenta a evolução do raio dos poros durante o tempo de simulação que o campo elétrico permanece sendo aplicado (1ms). O poro localizado em 73° é formado com 215,14 μ s de simulação e na região de 74° não há poros.

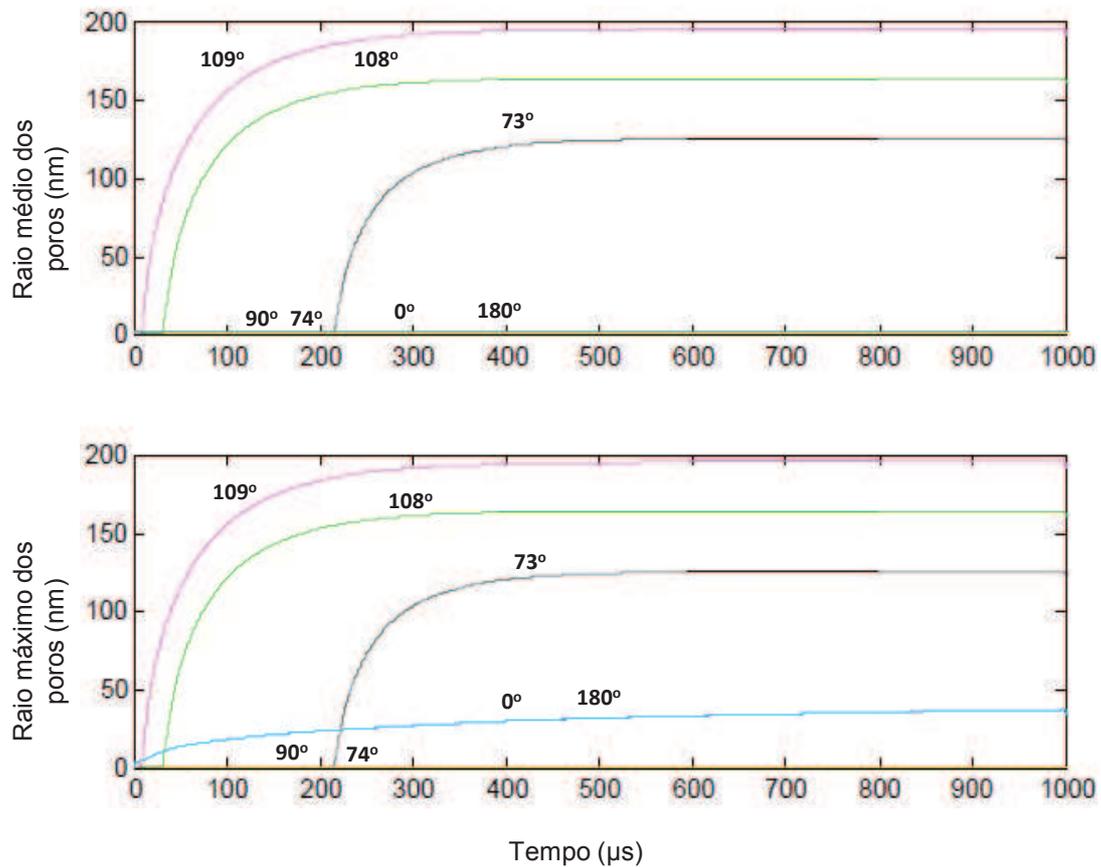


Figura 14: Raio médio e raio máximo do poro em função do tempo. O gráfico apresenta 1 ms de simulação.

A Figura 15 mostra a distribuição de poros na membrana celular em função do ângulo em 1 ms de simulação. A morfologia da curva desta figura deve ser comparada com a da Figura 16, que é a figura apresentada no artigo referência. A figura do artigo referência faz distinção entre os poros pequenos (K^{θ}) e os poros grandes (K^{θ}_{lg}).

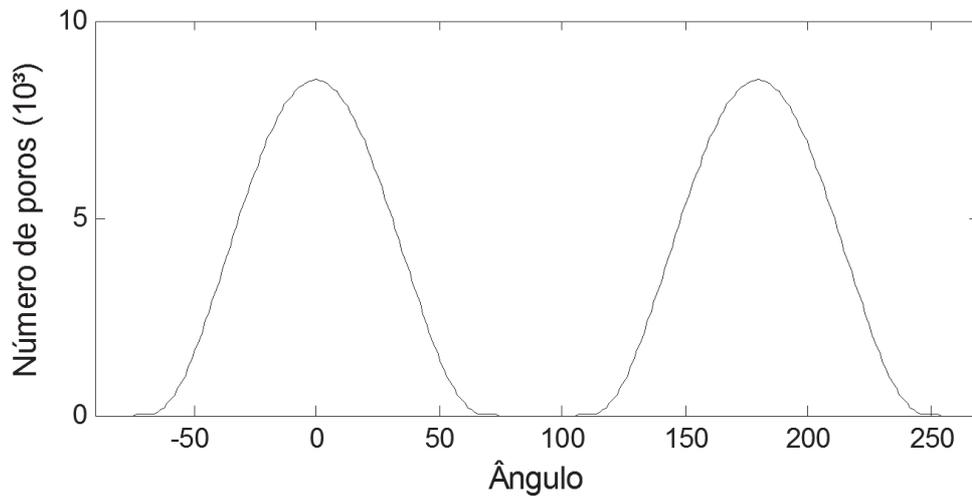


Figura 15: Número de poros em função do ângulo da célula.

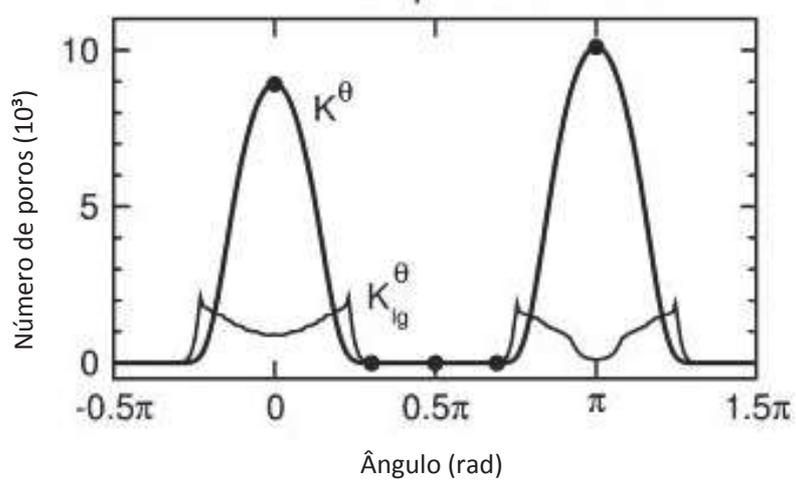


Figura 16: Número de poros em função do ângulo da célula do modelo referência. O modelo considera meia célula. Há distinção entre os poros pequenos (K^θ) e os poros grandes (K_{lg}^θ).

5.2 Protocolo de pulso duplo:

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 1 é apresentada na Figura 17. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos. Após o desligamento do pulso, os raios levam cerca de 150 ms para voltar ao tamanho com que são criados. O fechamento destes poros não acontece, eles se mantêm com o raio mínimo até o momento que o segundo pulso é ligado, quando os raios dos poros evoluem até tender à estabilização.

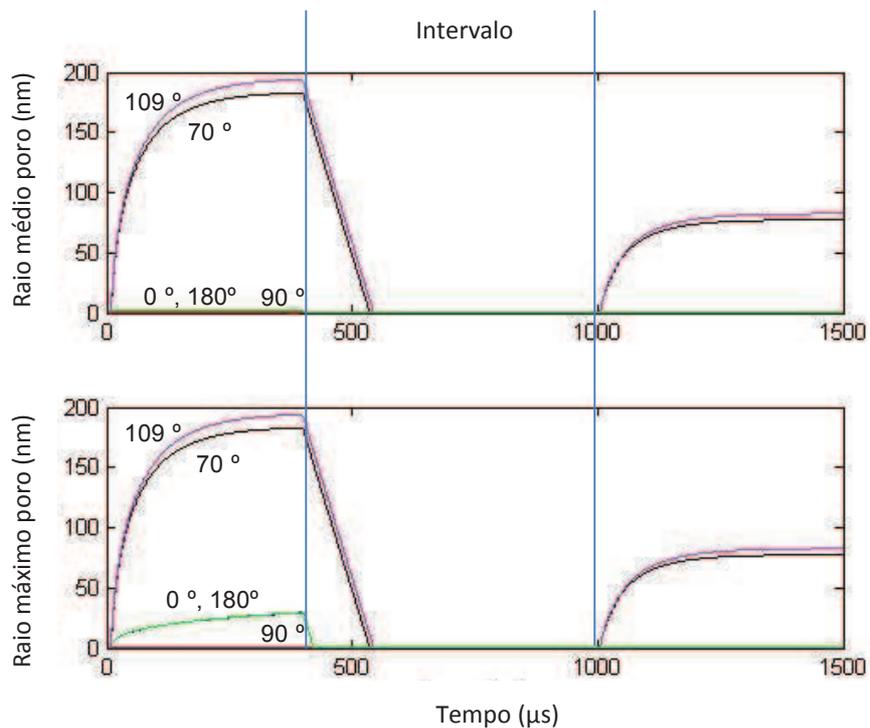


Figura 17: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 1.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 2 é ilustrada na Figura 18. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos, por meio da variação da magnitude do primeiro e por meio da variação do segundo pulso. Como o intervalo do pulso é de apenas 100 ms, os poros *não* tem tempo de diminuir até o tamanho com que foram criados, e assim que o segundo pulso é ligado, evoluem até a estabilização.

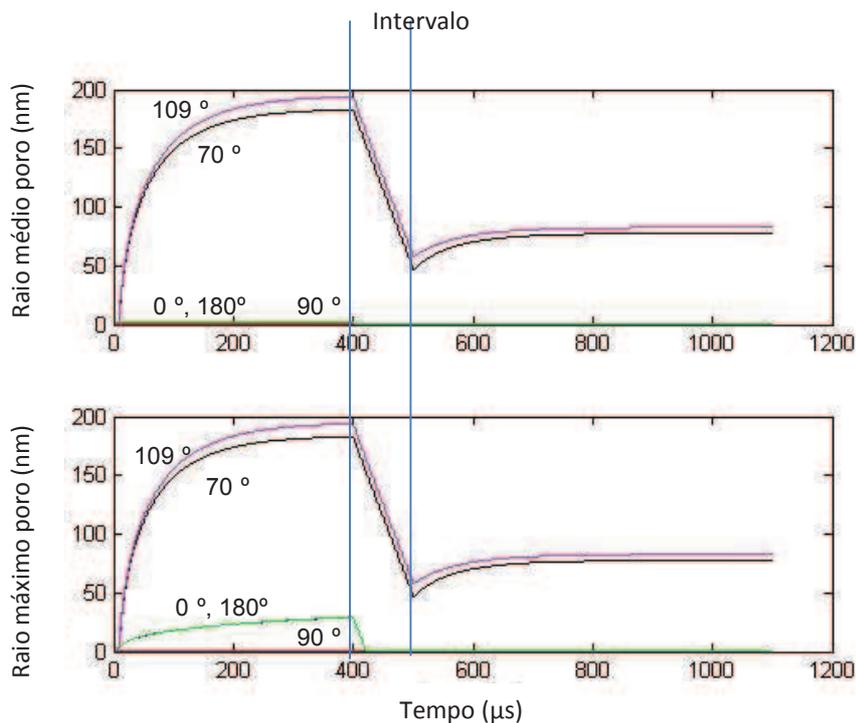


Figura 18: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 2.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 3 é mostrada na Figura 19. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos. Após o desligamento do pulso, os raios dos poros diminuem até tamanho com que são criados. Quando o segundo pulso é ligado, os raios evoluem até ficarem estáveis.

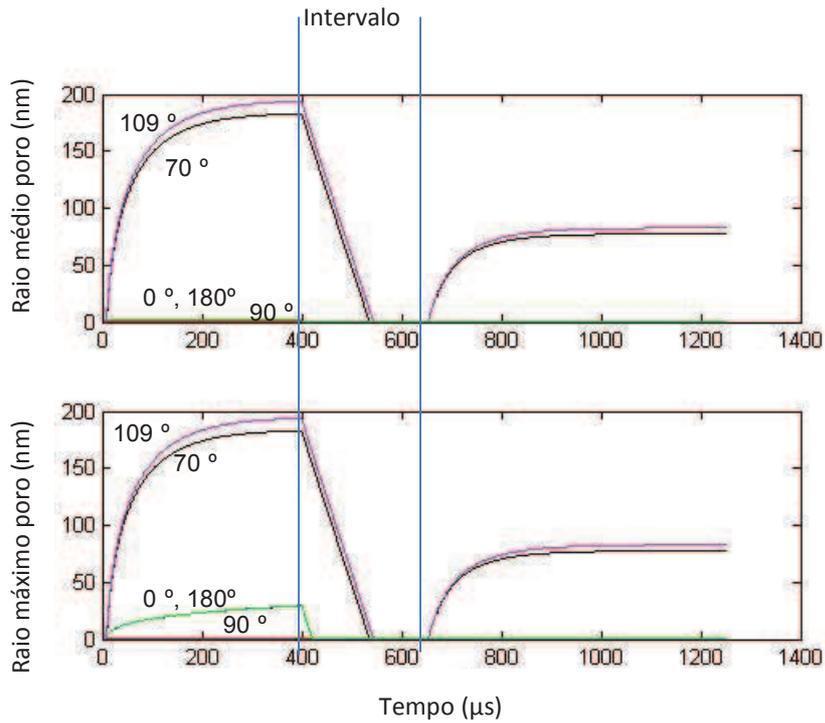


Figura 19: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 3.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 4 é mostrada na Figura 20. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos e da duração do primeiro pulso.

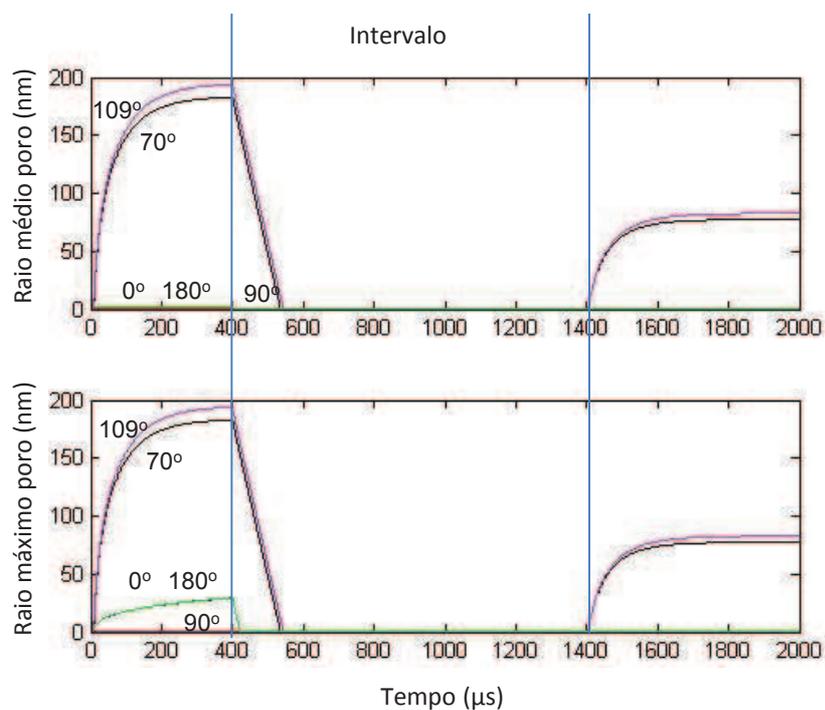


Figura 20: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 4.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 5 é ilustrada na Figura 21. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação da duração do primeiro pulso.

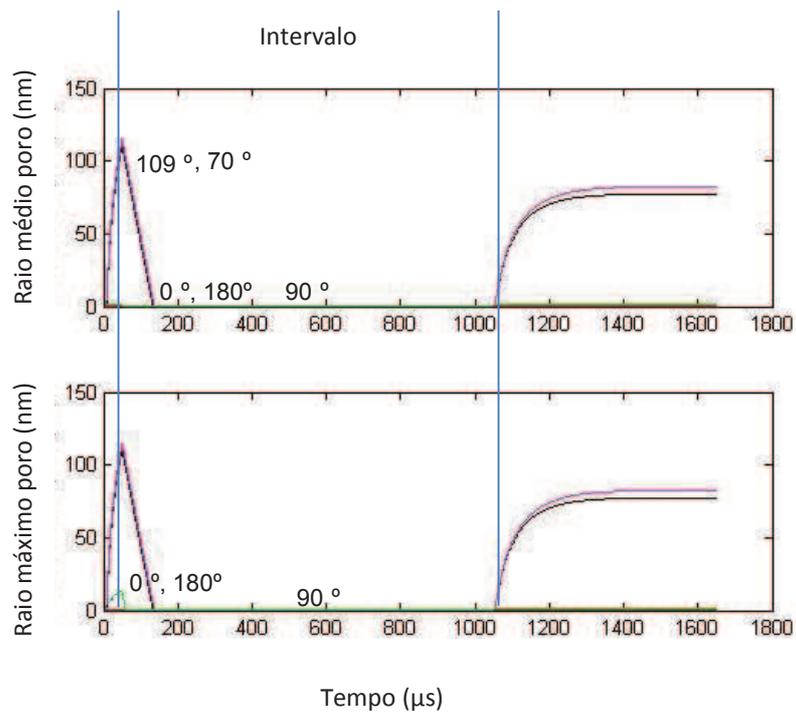


Figura 21: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 5.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 6 é apresentada na Figura 22. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação da magnitude do primeiro pulso.

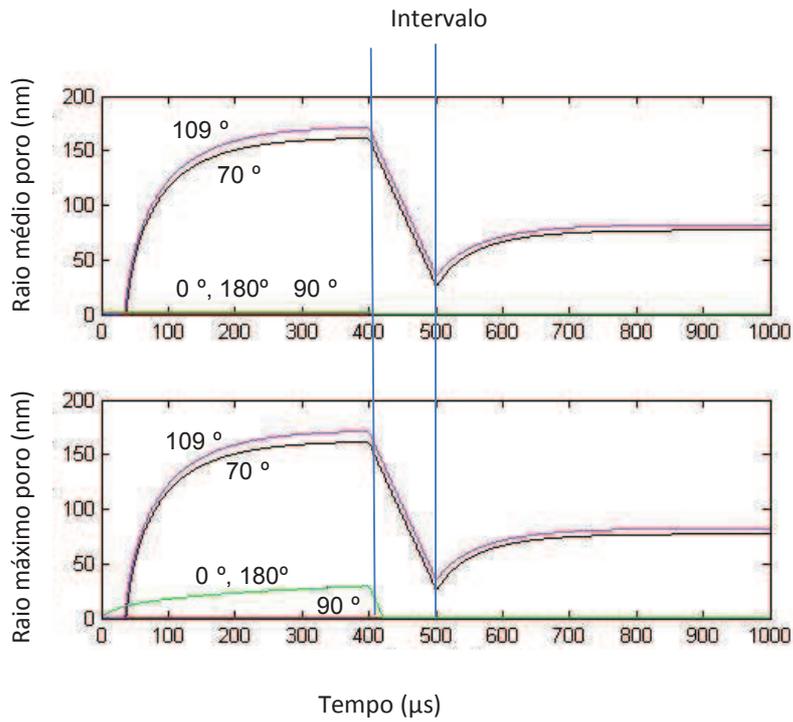


Figura 22: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 6.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 7 é mostrada na Figura 23. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação do intervalo entre os pulsos.

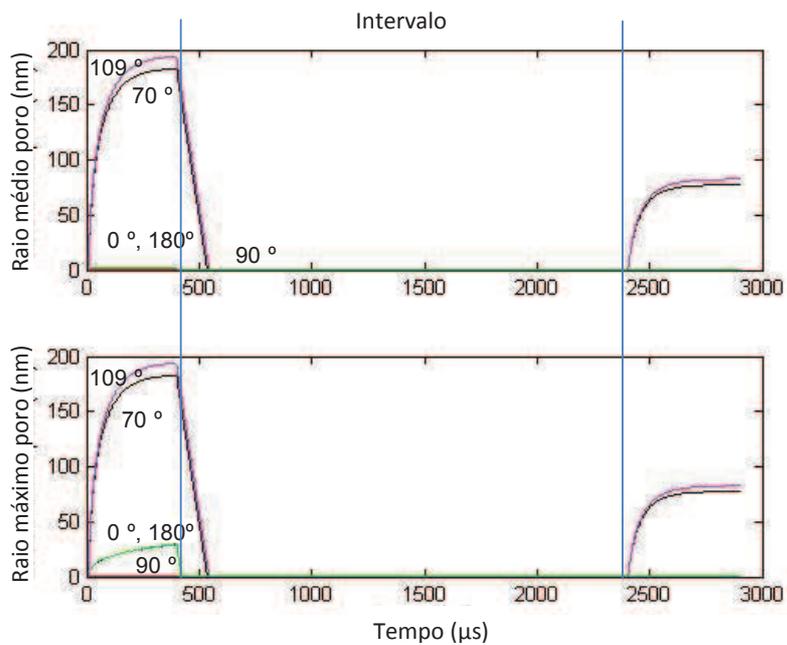


Figura 23: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 7.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 8 é apresentada na Figura 24. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação da magnitude do segundo pulso. Os raios não tem tempo para retornar ao tamanho que são criados durante o intervalo. O segundo pulso não fornece energia suficiente para que os poros aumentem de tamanho, apenas mantém os raios com o tamanho eu estavam no momento que o pulso é ligado.

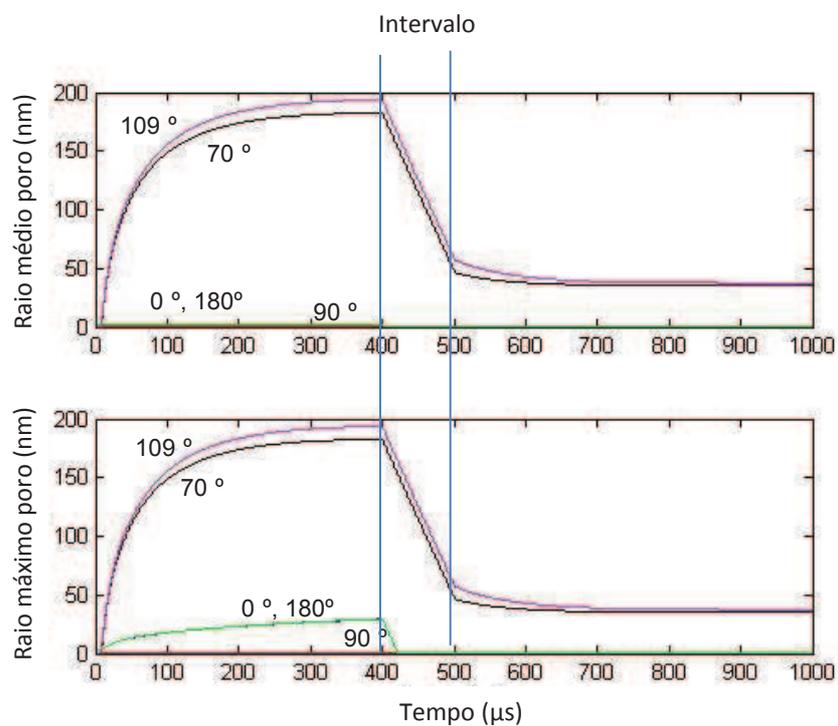


Figura 24: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 8.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 9 é ilustrada na Figura 25. Esta figura deve ser observada para avaliar o controle por meio da variação da magnitude do segundo pulso.

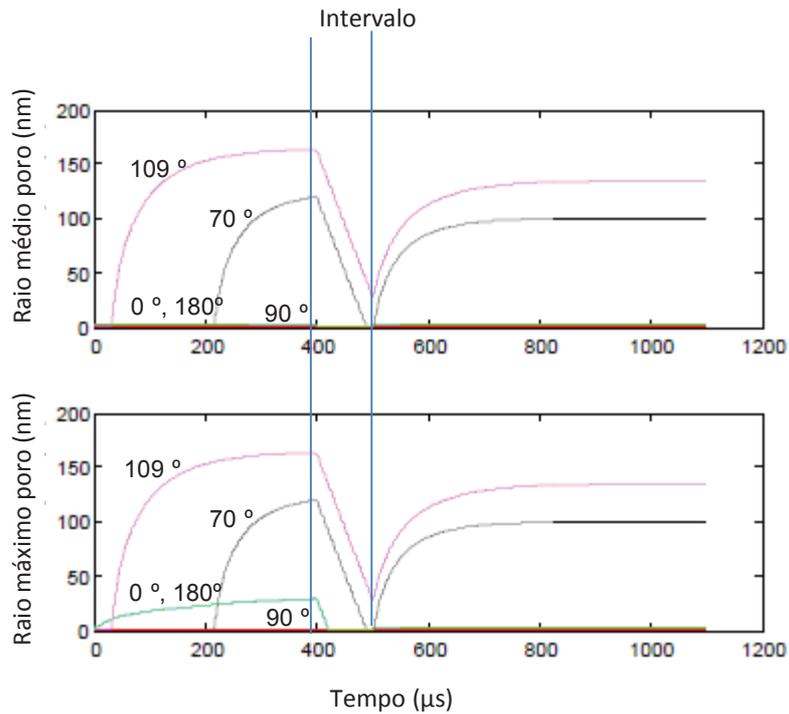


Figura 25: Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 9.

A evolução do raio dos poros em função do tempo do protocolo 10 é apresentada na Figura 26.

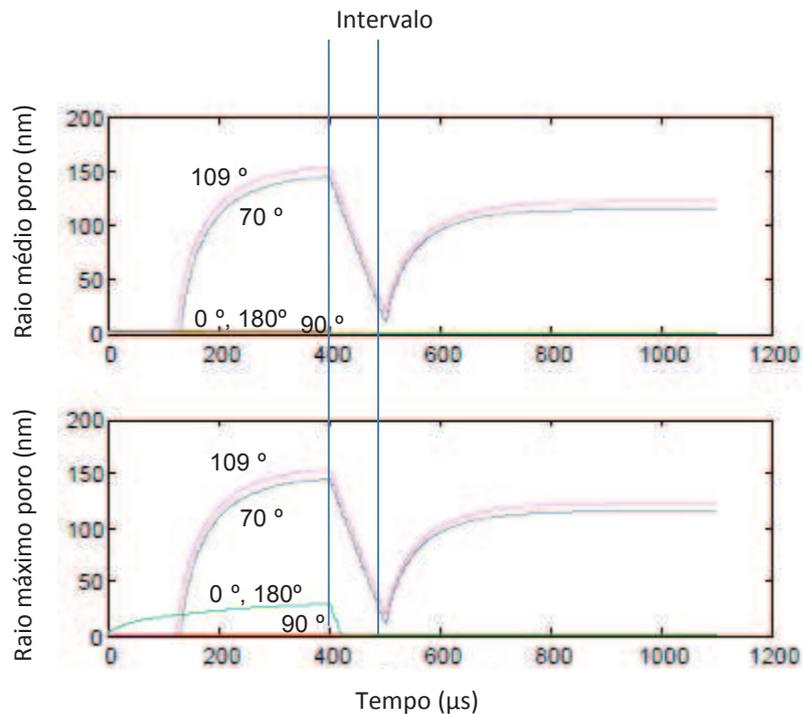


Figura 26. Raio máximo e raio médio dos poros em função do tempo. O período no qual não há aplicação de campo elétrico é indicado pelas barras azuis. Protocolo 10.

Estão listados (Tabela 9) para cada protocolo o raio máximo dos poros no final do segundo pulso, a área total dos poros, o número total de poros no final do primeiro pulso e do segundo pulso e o tempo real de simulação. O longo tempo real de simulação deve ser observado.

Tabela 9: Resultados numéricos das simulações de protocolo de pulso duplo, para a parte simulada da célula (0° a 180°). Ntot1 é o número total de poros ao fim do primeiro pulso, Ntot2 é o número total de poros ao fim do segundo pulso, Atot2 é a área total de poros durante o segundo pulso e Rmax2 é o raio máximo durante o segundo pulso.

Protocolo	Rmax2 (nm)	Atot2 ($\times 10^{-12} \text{ m}^2$)	Ntot1	Ntot2	Tempo real de simulação (minutos)
1	82,73	1,1321	210170	210132	1070,4
2	82,75	1,1321	20170	210155	752,7
3	82,73	1,1320	210170	210132	1033,0
4	82,73	1,1320	210170	210025	1412,2
5	82,76	1,2030	210169	210023	1470,0
6	103,55	1,2400	170701	170691	749,4
7	82,65	1,1320	210170	209890	2400,6
8	37,66	7,6910	210170	210155	800,3
9	163,30	2,2250	210170	210153	863,2
10	175,00	2,1020	159903	145504	871,9

Capítulo 6

Discussão dos Resultados

6.1 Protocolo de pulso único

A simulação com pulso único foi conduzida com o objetivo de analisar o comportamento e a distribuição dos poros na membrana, e de comparar os resultados com os do trabalho de KRASSOWSKA e FILEV (2007).

Na simulação realizada com um campo elétrico de 40 kV/m foram formados 420.340 poros após a estabilização e no trabalho de KRASSOWSKA e FILEV (2007) são formados 340.000 poros.

Nas regiões que há apenas um poro, cada poro evolui para um tamanho muito grande, quando comparado a outros poros na célula. Na Figura 14 é possível ver a evolução temporal de três destes poros. Existe também uma região próxima ao equador (entre 74° até 105°) onde não há poros na célula, pois V_m não varia, sendo sempre igual à tensão de repouso. Na Figura 15 é apresentado o número de poros em função da posição na célula. As regiões que possuem o menor número de poros têm poros com raios maiores. Regiões com maior número de poros têm poros menores. É possível ver, analisando a Figura 15 e a Figura 16, a semelhança da morfologia da distribuição dos poros e do número destes poros na membrana celular quando se compara esse trabalho com o trabalho de KRASSOWSKA e FILEV (2007). Embora no

trabalho de referência não haja simetria na curva, o que ocorre neste trabalho, a morfologia da curva é semelhante, assim como a distribuição de poros ao longo da superfície da membrana.

No trabalho de KRASSOWSKA e FILEV (2007) os poros são formados no polo despolarizado e no polo hiperpolarizado em 0,65 μs e 0,51 μs , respectivamente; e o último poro, entre o polo despolarizado e o equador, é formado em 320 μs . Na simulação apresentada nesse trabalho, a formação dos mencionados poros ocorre em 0,58 μs , 0,518 μs e 215,45 μs , respectivamente. Essa diferença ocorre provavelmente por algum problema numérico durante a execução da rotina computacional.

A rotina computacional usada nesta pesquisa para simular o comportamento da membrana durante a eletroporação segue o mesmo conjunto de equações usado pelo modelo de KRASSOWSKA e FILEV (2007). Como o simulador desenvolvido não é estatístico, mas sim determinístico, os resultados encontrados deveriam ser idênticos, o que não aconteceu.

O motivo da diferença encontrada é, provavelmente, relacionado ao código computacional do simulador. A rotina computacional do modelo referência (KRASSOWSKA e FILEV, 2007) foi escrito na linguagem C, o que neste trabalho foi feito em Matlab. Foram feitas tentativas de desenvolver o simulador em linguagem C, mas devido a problemas de estabilidade numérica este simulador não foi concluído. Estes problemas mostram que o modelo é sensível, e diferentes formas de implementação podem levar a erros numéricos como os que foram encontrados.

Apesar dos resultados não serem idênticos como deveriam, a distribuição dos poros e do raio destes poros ao longo da superfície da membrana é equivalente e a ordem de grandeza do número de poros formados e dos raios destes poros é a mesma. Assim, isto não invalida o modelo e pode-se dizer que os resultados obtidos com a simulação do protocolo de pulso único mostram que o simulador gerou resultados de acordo com o modelo referência (KRASSOWSKA e FILEV, 2007). Logo, a ferramenta pode ser usada para análise do controle dos raios

dos poros, o que deve ser feito por meio de simulações de protocolo de pulso duplo.

6.2 Protocolos de pulso duplo

O uso de protocolo de pulso duplo é indicado para a estabilização do tamanho dos raios, o que é importante para facilitar o envio de substâncias para o interior de células (SMITH *et al.*, 2004, ZIZZI *et al.*, 2010). Durante o primeiro pulso, os raios de poros de uma mesma região de discretização da célula não possuem o mesmo tamanho, pois cada raio evolui de acordo com seu tempo de criação, sendo que os criados primeiros têm mais tempo de evoluir e de se tornarem maiores. No intervalo entre os pulsos, quando não há campo elétrico externo, os raios já formados diminuem de tamanho até atingirem o raio mínimo do poro hidrofílico, mas não há fechamento de poros. Já durante o segundo pulso, todos os poros da mesma região $\Delta\theta$ adquirem o mesmo tamanho, assim como acontece no trabalho de SMITH *et al.* (2004). Isso ocorre, pois a energia do campo elétrico não causa a criação de novos poros, apenas faz com que os poros já existentes aumentem de tamanho. Como a densidade de corrente gerada pelo campo elétrico em cada região $\Delta\theta$ tem o mesmo efeito nos poros desta região, estes poros permanecem do mesmo tamanho durante toda a duração do pulso, a partir da estabilização (aproximadamente 150 μ s). Esse tempo de estabilização acontece, pois os raios que diminuíram de tamanho durante o intervalo dos pulsos, levam um tempo para evoluir até o tamanho máximo, nesse caso determinado pela magnitude do segundo pulso. Antes do desligamento do primeiro pulso, os raios dos poros de todas as regiões da célula possuem comportamento crescente. Durante o segundo pulso, os poros se tornam estáveis. Além disso, no

primeiro pulso a simulação gerou valores distintos para o raio médio e o raio máximo (para os polos despolarizado e hiperpolarizado), e no segundo pulso os valores de raio médio e raio máximo gerados para essas regiões são iguais, o que mostra que durante o segundo pulso os raios se tornam estáveis e os raios máximos e médios são iguais.

É importante a manutenção da estabilidade dos raios dos poros, porque com o uso de pulso único, são formados poros gigantes, que crescem sem controle, e, dependendo do tempo de aplicação do pulso, podem levar ao rompimento da célula, que aconteceria em aproximadamente 10 ms, como reportado por SMITH *et al.* (2004). Entretanto, para permitir a entrada de substâncias no interior da célula, é necessário manter a aplicação do pulso durante algum tempo (maior ou igual a 10 ms), para que as moléculas ou genes tenham tempo de se difundir para o interior da célula. Isso mostra a necessidade de se controlar de forma eficiente os raios dos poros.

Há, potencialmente, maneiras distintas de se manipular os raios dos poros: alterando as magnitudes e as durações do primeiro e do segundo pulso, ou alterando o intervalo entre os pulsos (SMITH *et al.*, 2004). A seguir são discutidas estas formas de manipular o raio dos poros.

Variação do intervalo entre os pulsos

Os protocolos 1, 2, 3, 4 e 7 têm o mesmo perfil e diferiram apenas na duração do intervalo interpulsos. O primeiro pulso tem duração de 400 μ s e magnitude de 40 kV/m, e o segundo pulso tem magnitude de 25 kV/m e duração de 600 μ s. Na realidade, o segundo pulso do protocolo 1 tem duração de 500 μ s, o que não influenciou no resultado, pois a duração do segundo pulso não foi uma variável importante, pois essa duração foi maior que o tempo de estabilização dos raios, que foi em torno de 150 μ s.

A diferença do intervalo entre os pulsos pode ser observada nos gráficos de raios médios e máximos em função do tempo (Figura 17 até Figura 20 e Figura 23).

A simulação destes cinco protocolos de pulso duplo gerou raios com valores muito próximos (Tabela 9), quando se leva em conta a variação do espaçamento entre os pulsos. Há uma pequena variação no número de poros durante o segundo pulso nos quatro protocolos. Alguns poros fecham durante o espaçamento, pois são muito pequenos e recém-criados no final do primeiro pulso. Além disso, parece que o tempo máximo de espaçamento entre pulsos usado na simulação não foi suficiente para verificar diferença significativa no tamanho dos raios. Se fosse usado um intervalo maior entre os pulsos, possivelmente haveria tempo suficiente para o fechamento de mais poros, o que implicaria na diminuição dos raios dos poros.

A literatura aponta que a diferença de espaçamento entre os pulsos possibilita um razoável controle dos raios e que quanto maior o pulso aplicado, maior o número de poros e menores os raios destes poros (SMITH *et al.*, 2004). Entretanto, para se verificar essa diferença normalmente são realizados aumentos expressivos no espaçamento entre os pulsos, para os valores de magnitude e duração dos pulsos de campo elétrico estudados. O espaçamento usado neste trabalho não foi suficiente para a observação deste fenômeno. Os tempos de simulação na plataforma de sistema operacional, no programa e na CPU utilizados tornariam simulações com intervalo entre pulsos de 100 ms, como o utilizado por Smith, Neu e Krassowska (SMITH *et al.*, 2004), muito longas. É indicado que a rotina computacional seja otimizada ou escrita em outra linguagem computacional, para que tempos mais longos de simulação possam ser empregados.

Variação da magnitude do primeiro pulso

Os protocolos 2 e 6 têm as mesmas características e diferem apenas na magnitude do primeiro pulso. As simulações do protocolo 2 ($E_1 = 40$ kV/m) e do protocolo 6 ($E_1 = 37$ kV/m) geraram valores de raios máximos distintos (Tabela 9). O protocolo 2 apresenta raio máximo menor (82,75 nm) que o do protocolo 6 (103,55 nm). Isso ocorre, pois como a magnitude do primeiro pulso é maior, há a formação de mais poros na célula (no protocolo 2 são formados 210.170 poros e no protocolo 6

170.701 poros). Como estes poros evoluem e aumentam de raio para deixar a membrana num estado de menor energia, os poros da célula que tem menos poros evoluem para um tamanho maior. Também é possível observar que, no protocolo 2, quinze poros fecham durante o intervalo interpulsos, enquanto no protocolo 6 apenas dez poros. O fechamento destes poros é irrelevante, pois eles são poros pequenos e recém criados, e não tem efeito significativo, pois na célula há centenas de milhares de poros. Essa diferença ocorre porque os poros maiores precisam de mais tempo para diminuir de tamanho e o intervalo de tempo utilizado na simulação não permitiu que houvesse fechamento de mais poros. Logo, quanto maior a magnitude do primeiro pulso, maior o número de poros e menores os raios destes poros, o que está de acordo com SMITH *et al.* (2004).

Variação da magnitude do segundo pulso

Os protocolos 2, 8 e 9 têm as mesmas características e diferem apenas na magnitude do segundo pulso. O protocolo 2 ($E_2 = 25$ kV/m), o protocolo 8 ($E_2 = 20$ kV/m) e o protocolo 9 ($E_2 = 35$ kV/m) geraram valores de raio máximo distinto durante o segundo pulso. O maior raio é o do protocolo 9 (163,3 nm), o que era esperado, já que este possui o maior E_2 . No caso do segundo pulso, como os poros já estão formados, a célula que terá raios maiores é a que for exposta a um campo com maior magnitude, pois o raio evolui para um tamanho maior para manter a membrana num estado de menor energia. Não há formação de novos poros com o segundo pulso, pois a tensão transmembrana não ultrapassa o limiar necessário, assim toda a energia é empregada no aumento do raio dos poros já existentes. O protocolo 8 tem o menor raio máximo do poro, já que a magnitude do segundo pulso foi pequena. Os números de poros gerados nas simulações dos três protocolos são muito próximos, pois a formação dos poros ocorreu durante o primeiro pulso, que no caso foi igual para os três.

No caso do segundo pulso, não há formação de novos poros, pois a energia da densidade de corrente gerada pela aplicação do segundo pulso é toda empregada no

aumento dos poros, e, a partir da estabilização, na manutenção dos poros abertos,.

Variação da duração do primeiro pulso

Os protocolos 4 e 5 têm as mesmas características e diferem apenas na duração do primeiro pulso. O protocolo 4 (E_1 aplicado durante 0,4 ms) e o protocolo 5 (E_1 aplicado durante 0,1 ms) geraram valores muito similares de raios dos poros e de outras variáveis analisadas. No número de poros dos dois protocolos, a diferença do número de poros formados durante o primeiro pulso é apenas de um poro. Como o pulso do protocolo 5 durou apenas 0,1 ms, não houve tempo para a formação do último poro, da região de 73° , que é formado em 215,45 μ s. Como não há tempo para a formação deste poro, outros poros precisam evoluir um pouco mais para compensar a ausência deste poro, o que faz com que o raio máximo do protocolo 5 (82,76 nm) seja um pouco maior que o do protocolo 4 (82,73 nm).

A duração do primeiro pulso não se mostrou uma variável muito importante, pois a diferença verificada foi apenas na formação de um único poro, o poro gigante, que pode causar o rompimento da célula se for usado protocolo de pulso único, que acontece atrasada em relação aos outros. Logo, parece que essa variável não seria a mais indicada e é ineficiente para controlar os raios dos poros.

Considerações a respeito das maneiras avaliadas para controlar o raio dos poros

A literatura tem reportado que os raios dos poros são função do intervalo de tempo entre os pulsos (SMITH *et al.*, 2004). Entretanto, não foi possível observar essa dependência neste trabalho, por não ter sido viável se realizar uma simulação com um intervalo necessário para que houvesse diferenças significativas nos raios dos poros. Isso ocorreu, pois seriam necessários intervalos entre os pulsos de no mínimo 10ms, para que uma quantidade significativa de poros tivesse tempo de se fechar, o que implicaria no aumento dos poros restantes, os quais evoluiriam para raios maiores, mantendo a célula num estado de menor energia. Pelos tempos de simulação, apresentados na Tabela 9, verifica-se que não foi viável, com o sistema computacional

usado, realizar uma simulação com tempos de intervalo entre os pulsos maiores ou iguais a 10 ms.

A manipulação da magnitude dos pulsos deve ser utilizada com cautela para o controle do raio do poro. Há duas limitações: se a magnitude do pulso for muito alta, acontecerá rompimento da célula; se a magnitude for muito pequena, a tensão transmembrana não ultrapassa o limiar e não há formação de poros. O método mais indicado para o controle do raio dos poros é a manipulação do intervalo de tempo entre os pulsos, método que, no entanto, não foi analisado neste trabalho.

Capítulo 7

Conclusão

Há um vasto campo de estudo para os principais temas levantados pela motivação principal deste trabalho. Dentre eles poderiam ser citados: a possibilidade de novos tratamentos para pacientes com doenças cardíacas isquêmicas, o quanto é promissor o uso de células-tronco no tratamento destes pacientes, estudos sobre células-tronco e seus mecanismos de diferenciação e de diversas formas da indução da diferenciação, o direcionamento da diferenciação na linhagem celular desejada, e ainda a diferenciação e formação de tecidos e órgãos especializados. O trabalho com células-tronco é novo e a comunidade científica ainda busca aprender a manipulação e novas aplicações dessas células.

Dentre os métodos estudados para a indução da diferenciação, a eletroporação é um método promissor, que foi e vem sendo usado com algum sucesso. Ainda é necessário realizar extensos estudos teóricos para se compreender melhor os diversos mecanismos envolvidos na eletroporação. Também são necessários desenvolvimentos tanto no que diz respeito a novos eletroporadores, como a outros hardwares e softwares apropriados para eletroporação. De forma análoga, há carência no desenvolvimento de protocolos com múltiplos pulsos de campo elétrico, assim como de experimentos com diferentes tipos de células e meios de cultura.

Esse trabalho é um dos primeiros de uma série que o Laboratório de Instrumentação Biomédica desenvolve no tema de eletroporação. Outros trabalhos em curso desenvolvem um eletroporador programável, no que tange ao projeto,

montagem, testes de bancada e validação experimental em protocolos de eletroporação em bactérias. Poucos grupos no país trabalham com eletroporação e com a modelagem deste fenômeno, havendo espaço para muita pesquisa e desenvolvimento.

Este trabalho gerou como principal contribuição um simulador, que ainda deve ser otimizado e pode ser adaptado de acordo com o estudo e a análise desejada (tipo de célula, perfil de campo elétrico). Os resultados possibilitaram apontar que um protocolo de pulso duplo parece ser mais indicado para gerar raios que possibilitem a entrada adequada de substâncias na célula.

O simulador desenvolvido e as simulações realizadas neste estudo permitiram avaliar a influência de algumas variáveis no controle dos raios dos poros formados na membrana celular. Foi observada, para os protocolos de pulsos duplos, a seguinte dependência entre as variáveis do modelo:

- Com o aumento da magnitude do primeiro pulso, há aumento do número de poros formados na célula, e conseqüentemente os raios destes poros evoluem para um tamanho menor do que se houvesse menos poros. Logo, os raios dos poros são inversamente proporcionais à magnitude do primeiro pulso.
- Com o aumento da magnitude do segundo pulso, como a célula já tem o número de poros definido, há aumento dos raios dos poros. Logo, os raios dos poros são diretamente proporcionais à magnitude do segundo pulso.

De um modo geral, é vantajoso realizar simulações para orientar processos experimentais de eletroporação, economizando recursos experimentais, assim como o tempo necessário para se realizar buscas exaustivas na banca de teste na busca da melhor condição de eletroporação num certo espaço de parâmetros. Foram percebidas, no entanto, algumas limitações. É necessário o uso de melhores condições computacionais para se realizar simulações com maiores intervalos de

tempo, além de permitir simulações repetidas que possam abordar a validade estatística dos resultados.

Referências

ABDELWAHID E., RICE D., PELLINIEMI L.J. *et al.*, 2001, "Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart", *Cell and Tissue Research* v. 305, n. 1 (67-78).

AKHYARI P., KAMIYA H., HAVERICH A. *et al.*, 2008, "Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion", *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* v. 34, n. 2 (229-241).

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J. *et al.*, 2002, "Molecular Biology of the cell", 4 ed. New York, Garland Science, 2002.

ANTIN P.B., YATSKIEVYCH T., DOMINGUEZ J.L. *et al.*, 1998, "Regulation of avian precardiac mesoderm development by insulin and insulin-like growth factors", *Journal of Cellular Physiology* v. 168, n. 1 (42-50).

ANVERSA P., LERI A., ROTA M. *et al.*, 2007, "Stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts", *Stem Cells* v. 25, n. 3 (589-601).

ANVERSA P. , NADAL-GINARD B., 2002, "Myocyte renewal and ventricular remodelling", *Nature* v. 415, n. 1 (240-243).

ASSMUS B., SCHÄCHINGER V., TEUPE C. *et al.*, 2002, "Transplantation of progenitor cells and regeneration", *Circulation* v. 106, n. 24 (3009-3017).

BARKER M., BILLUPSB B., HAMANNA M., 2009, " Focal macromolecule delivery in neuronal tissue using simultaneous pressure ejection and local electroporation", *Journal of Neuroscience Methods* v. 177, (273–284).

BARNETT A., 1990, "The current-voltage relation of an aqueous pore in a lipid bilayer membrane", *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* v. 1025, n. 1 (10-14).

BELTRAMI A.P., BARLUCCHI L., TORELLA D. *et al.*, 2003, "Adult cardiac stem cells

are multipotent and support myocardial regeneration", *Cell* v. 114, n. 6 (763-776).

BENZ R. , ZIMMERMANN U., 1980, "376 - Relaxation studies on cell membranes and lipid bilayers in the high electric field range", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* v. 7, n. 4 (723-739).

BERNE R.M. , LEVY M.N., 1990, "Principles of Physiology, Part IV", International Student Edition London, Wolfe Publishing, 1990.

BJÖRKLUND A. , LINDVALL O., 2000, "Cell replacement therapies for central nervous system disorders", *Nature Neuroscience* v. 3, n. 6 (537-544).

BORST H.G., HAVERICH A., WALTERBUSCH G. *et al.*, 1982, "Fibrin adhesive: An important hemostatic adjunct in cardiovascular operations", *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* v. 84, n. 4 (548-553).

CHEN C., SMYE S.W., ROBINSON M.P. *et al.*, 2006, "Membrane electroporation theories: A review", *Medical and Biological Engineering and Computing* v. 44, n. 1-2 (5-14).

CHERNOMORDIK L.V., SUKHAREV S.I., ABIDOR I.G. *et al.*, 1983, "Breakdown of lipid bilayer membranes in an electric field", *BBA - Biomembranes* v. 736, n. 2 (203-213).

CHRISTOFOROU N. , GEARHART J.D., 2007, "Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies", *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 49, n. 6 (396-413).

DANALACHE B.A., PAQUIN J., DONGHAO W. *et al.*, 2007, "Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis", *Stem Cells* v. 25, n. 3 (679-688).

DEBRUIN K.A., 1999, "Modeling electroporation in a single cell. II. Effects of ionic concentrations", *Biophysical Journal* v. 77, n. 3 (1225-1233).

DEBRUIN K.A. , KRASSOWSKA W., 1999, "Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential", *Biophysical Journal* v. 77, n. 3 (1213-1224).

DIMARAKIS I., LEVICAR N., NIHOYANNOPOULOS P. *et al.*, 2006a, "In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Part 2: Chemicals, extracellular matrix, physical stimuli and coculture assays", *Journal of Cardiothoracic-Renal Research* v. 1, n. 2

(115-121).

DIMARAKIS I., LEVICAR N., NIHOYANNOPOULOS P. *et al.*, 2006b, "In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Part 1. Culture medium and growth factors", *Journal of Cardiothoracic-Renal Research* v. 1, n. 2 (107-114).

DOHMANN H.F.R., PERIN E.C., BOROJEVIC R. *et al.*, 2005, "Sustained improvement in symptoms and exercise capacity up to six months after autologous transendocardial transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with severe ischemic heart disease", *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* v. 84, n. 5 (360-366).

ENTCHEVA E., BIEN H., YIN L. *et al.*, 2004, "Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding", *Biomaterials* v. 25, n. 26 (5753-5762).

ERICKSON C.A. , NUCCITELLI R., 1984, "Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields", *Journal of Cell Biology* v. 98, n. 1 (296-307).

ESCHENHAGEN T., FINK C., REMMERS U. *et al.*, 1997, "Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: A new heart muscle model system", *FASEB Journal* v. 11, n. 8 (683-694).

FLANDERS K.C., WINOKUR T.S., HOLDER M.G. *et al.*, 1993, "Hyperthermia induces expression of transforming growth factor- β s in rat cardiac cells in vitro and in vivo", *Journal of Clinical Investigation* v. 92, n. 1 (404-410).

FUKUDA K., 2008, "Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes", *Comptes Rendus Biologies* v. 325, n. 10 (1027-1028).

GENOVESE J.A., SPADACCIO C., LANGER J. *et al.*, 2008, "Electrostimulation induces cardiomyocyte predifferentiation of fibroblasts", *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 370, n. 3 (450-455).

GLASER R.W., LEIKIN S.L., CHERNOMORDIK L.V. *et al.*, 1988, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores", *BBA - Biomembranes* v. 940, n. 2 (275-287).

GOWRISHANKAR, T.R., STEWART, C., WEAVER, J.C., 2004, "Electroporation of a multicellular system: Asymptotic model analysis", *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings* v. 26 VII, n. 5444-5446.

HABARA-OHKUBO A., 1996, "Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells", *Cell Structure and Function* v. 21, n. 2 (101-110).

HENG B.C., HAIDER H.KH, SIM E.K.-W. *et al.*, 2004, "Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro", *Cardiovascular Research* v. 62, n. 1 (34-42).

HINKLE L., MCCAIG C.D., ROBINSON K.R., 1981, "The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field", *Journal of Physiology* v. Vol. 314, (121-135).

HODGKIN A. , HUXLEY A., 1952, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve", *Journal of Physiology* v. 117, n. 4 (500-544).

HOLT E., LUNDE P.K., SEJERSTED O.M. *et al.*, 1997, "Electrical stimulation of adult rat cardiomyocytes in culture improves contractile properties and is associated with altered calcium handling", *Basic Research in Cardiology* v. 92, n. 5 (289-298).

HWANG N.S., VARGHESE S., ELISSEEFF J., 2007, "Controlled differentiation of stem cells ", *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 60, (199-214).

IMANAKA-YOSHIDA K., MATSUMOTO K.I., HARA M. *et al.*, 2003, "The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse", *Differentiation* v. 71, n. 4-5 (291-298).

JACKSON K.A., MAJKA S.M., WANG H. *et al.*, 2008, "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells", *The Journal of Clinical Investigation* v. 107, n. 11 (1395-1402).

JIANG Y., JAHAGIRDAR B.N., REINHARDT R.L. *et al.*, 2008, "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow ", *Nature* v. 418, (41-49).

JOGGERST, S.J. , HATZOPOULOS, A.K., 2009, "Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers", *Expert reviews in molecular medicine* v. 11, n.20, (1-19).

JOYEUX-FAURE M., GODIN-RIBUOT D., RIBUOT C., 2005, "Erythropoietin and myocardial protection: What's new?", *Fundamental and Clinical Pharmacology* v. 19, n. 4 (439-446).

KAJSTURA J., ROTA M., WHANG B. *et al.*, 2005, "Bone Marrow Cells Differentiate in Cardiac Cell Lineages After Infarction Independently of Cell Fusion", *Circulation Research* v. 96, n. 1 (127-137).

KAZUHIKO K.JR. , TSONG T.Y., 1977, "Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane", *Nature* v. 268, n. 8 (438-441).

KAZUHIKO K.JR. , TSONG T.Y., 1978, "Survival of sucrose-loaded erythrocytes in the circulation", *Nature* v. 272, n. 3 (258).

KHADEMHOSEINI, A., ENG, G., YEH, J. *et al.*, 2007, "Microfluidic patterning for fabrication of contractile cardiac organoids", *Biomedical Microdevices* v. 9, n. 2 (149-157).

KRASSOWSKA W. , FILEV P.D., 2007, "Modeling electroporation in a single cell", *Biophysical Journal* v. 92, n. 2 (404-417).

LADD A.N., YATSKIEVYCH T.A., ANTIN P.B., 1998, "Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins", *Developmental Biology* v. 204, n. 2 (407-419).

LE BLANC K., GÖTHERSTRÖM, C., RINGDÉN, O. *et al.*, 2005, "Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta", *Transplantation* v. 79, n. 11 (1607-1614).

LENNON D.P., HAYNESWORTH, S.E., YOUNG, R.G. *et al.*, 1995, "A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells", *Experimental Cell Research* v. 219, n. 1 (211-222).

LI J., HAN Y., YAN C. *et al.*, 2011, " A novel method to inhibit apoptosis and promote

differentiation of induced pluripotent stem cells in transplantation therapy for myocardial infarction"; *Medical Hypotheses* v. 76 (264–265).

LI R.K., YAU T.M., WEISEL R.D. *et al.*, 2000, "Construction of a bioengineered cardiac graft", *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* v. 119, n. 2 (368-375).

LIN Q., FU Q., ZHANG, Y. *et al.*, 2010, "Tumourigenesis in the infarcted rat heart is eliminated through differentiation and enrichment of the transplanted embryonic stem cells", *European Journal of Heart Failure* v. 12, (1179–1185)

LO, H., KADIYALA, S., GUGGINO, S.E. *et al.*, 1996, "Poly(L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity", *Journal of Biomedical Materials Research* v. 30, n. 4 (475-484).

LOPEZ A.D., MATHERS C.D., EZZATI M. *et al.*, 2006, "Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data", *Lancet* v. 367, (1747-1757).

MANGI A.A., NOISEUX N., KONG D. *et al.*, 2003, "Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts", *Nature Medicine* v. 9, n. 9 (1109-1110).

MÄRTSON M., VILJANTO J., HURME T. *et al.*, 1999, "Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat", *Biomaterials* v. 20, n. 21 (1989-1995).

MCDEVITT T.C., WOODHOUSE K.A., HAUSCHKA S.D. *et al.*, 2003, "Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* v. 66, n. 3 (586-595).

MOHAMAD AZHAR, JO EL J.SCHULTZ, INGRID GRUPP *et al.*, 2005, "Transforming growth factor *beta* in cardiovascular development and function ", *Cytokine & Growth Factor Reviews* v. 14, n. 5 (391-407).

NELSON D.L. , COX M.M., 2006, "Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway", 4 ed. New York, W. H. Freeman and Company Press, 2005.

NEUMANN E. , ROSENHECK K., 1972, "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes", *Journal of Membrane Biology* v. 10, n. 3 (279-290).

NOVOTNY N.M., RAY R., MARKEL T.A. *et al.*, 2008, "Stem cell therapy in myocardial repair and remodeling", *Journal of the American College of Surgeons* v. 207, n. 3 (423-434).

ORR A.W., HELMKE B.P., BLACKMAN B.R. *et al.*, 2006, "Mechanisms of mechanotransduction", *Developmental Cell* v. 10, n. 1 (11-20).

PASSIER R , MUMMERY C, 2005, "Cardiomyocytes from human embryonic stem cells", v. 174, (101-122).

PASTUSHENKO V.F., CHIZMADZHEV YU, ARAKELYAN V.B., 1979, "Electric breakdown of bilayer lipid membranes. II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* v. 6, n. 1 (53-62).

PERIN E.C., DOHMANN H.F.R., BOROJEVIC R. *et al.*, 2003, "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure", *Circulation* v. 107, n. 18 (2294-2302).

PERIN E.C., DOHMANN H.F.R., BOROJEVIC R. *et al.*, 2004, "Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy", *Circulation* v. 110, n. 11 (II213-II218).

QIAN L., LIU J., BODMER R., 2005, "Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis", *Current Biology* v. 15, n. 24 (2271-2278).

RADISIC M., PARK H., SHING H. *et al.*, 2004, "Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 101, n. 52 (18129-18134).

RAUCH C., BRUNET A.C., DELEULE J. *et al.*, 2002, "C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps endocytosis enhanced by epigenetic inhibition of BMP", *Am J*

Physiol Cell Physiol v. 283, n. 2 (235-243).

ROBINSON K.R., 1985, "The responses of cells to electrical fields: A review", *Journal of Cell Biology* v. 101, n. 6 (2023-2027).

ROURA S., FARRE J., HOVE-MADSEN, L. *et al.*, 2010, " Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells", *Basic Research in Cardiology* v. 105, (419–430).

SAUER H., RAHIMI G., HESCHELER J. *et al.*, 1999, "Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells", *Journal of cellular biochemistry* v. 75, n. 4 (710-723).

SAUER H., RAHIMI G., HESCHELER J. *et al.*, 2000, "Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells", *FEBS Letters* v. 476, n. 3 (218-223).

SCHÄCHINGER V., ASSMUS B., BRITTEN M.B. *et al.*, 2004, "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction", *Journal of the American College of Cardiology* v. 44, n. 8 (1690-1699).

SCHMELTER M., ATEGHANG B., HELMIG S. *et al.*, 2006, "Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation", *FASEB Journal* v. 20, n. 8 (E294-E306).

SEGERS V.F.M. , LEE R.T., 2008, "Stem-cell therapy for cardiac disease", *Nature* v. 451, (937-942).

SHIN M., ISHII O., SUEDA T. *et al.*, 2004, "Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh", *Biomaterials* v. 25, n. 17 (3717-3723).

SMITH K.C., NEU J.C., KRASSOWSKA W., 2004, "Model of Creation and Evolution of Stable Electropores for DNA Delivery", *Biophysical Journal* v. 86, n. 5 (2813-2826).

SMITH T.K. , BADER D.M., 2007, "Signals from both sides: Control of cardiac development by the endocardium and epicardium", *Seminars in Cell and Developmental* v. 18, n. 1 (84-89).

SMITH, K.C., NEU, J.C., KRASSOWSKA, W., 2004, "Model of Creation and Evolution

of Stable Electropores for DNA Delivery", *Biophysical Journal* v. 86, n. 5 (2813-2826).

STAMM C., WESTPHAL B., KLEINE H.D. *et al.*, 2003, "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration", *Lancet* v. 361, n. 9351 (45-46).

SYKOVÁ E., HOMOLA A., MAZANEC R. *et al.*, 2006, "Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury", *Cell Transplantation* v. 15, n. 8-9 (675-687).

TEISSIE J., GOLZIO M., ROLS M.P., 2005, "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge", *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* v. 1724, n. 3 (270-280).

TSONG T.Y., 1991, "Electroporation of cell membranes", *Biophysical Journal* v. 60, n. 2 (297-306).

TUCH B.E., 2006, "Stem cells: A clinical update", *Australian Family Physician* v. 35, n. 9 (719-721).

TURA, B.R., MARTINO, H.F., GOWDAK, L.H. *et al.*, 2007, "Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart study", *Trials* v. 8, n. 2 .

VASILKOSKI, Z., ESSER, A.T., GOWRISHANKAR, T.R. *et al.*, 2006, "Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation", *Physical review.E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* v. 74, n. 2 Pt 1 .

VUNJAK-NOVAKOVIC G., OBRADOVIC B., MARTIN I. *et al.*, 1998, "Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering", *Biotechnology Progress* v. 14, n. 2 (193-202).

WEAVER J.C. , CHIZMADZHEV Y.U., 1996, "Theory of electroporation: A review", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* v. 41, n. 2 (135-160).

WINTER E.M. , GITTENBERGER-DE GROOT A.C, 2007, "Cardiovascular development: Towards biomedical applicability - Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration", *Cellular and Molecular Life Sciences* v. 64, n. 6 (692-703).

XIA Y., BUJA L.M., SCARPULLA R.C. *et al.*, 1997, "Electrical stimulation of neonatal

cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 94, n. 21 (11399-11404).

ZATZ, M., 2009, "Stem cell researches in Brazil: Present and future challenges", *Stem Cell Reviews and Reports* v. 5, n. 2 (123-129).

ZHANG J.Y., BECKMAN E.J., PIESCO N.P. *et al.*, 2000, "A new peptide-based urethane polymer: Synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro", *Biomaterials* v. 21, n. 12 (1247-1258).

ZHU D., L.QU, X.ZHANG *et al.*, 2005, "Icariin-mediated modulation of cell cycle and p53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells", *European Journal of Pharmacology* v. 514 (99-110).

ZIMMERMANN U., PILWAT G., RIEMANN F., 1974, "Dielectric breakdown of cell membranes", *Biophysical Journal* v. 14, n. 11 (881-899).

ZIZZI A., MINARDI D., CIAVATTINI A. *et al.*, 2010, "Green fluorescent protein as indicator of nonviral transient transfection efficiency in endometrial and testicular biopsies", *Microscopy Research and Technique* v. 73 (229–233).

Anexo I

Diferenciação de células-tronco e a formação do coração no desenvolvimento embrionário

Quatro processos essenciais ocorrem simultaneamente em um embrião animal em desenvolvimento: proliferação celular, especialização celular, interação celular e movimento celular. A célula embrionária dá origem a células menores, criando o folheto germinativo. A maior parte das células do folheto forma o ectoderma, precursor da epiderme e do sistema nervoso (SN). Uma parte, que fica voltada para o meio interno, forma o endoderma, precursor dos intestinos, pulmões e fígado. Outro grupo de células se move e fica entre o endoderma e o ectoderma, formando o mesoderma, precursor de músculos e tecidos conjuntivos. Esses três componentes formam a gástrula, que é uma etapa do desenvolvimento embrionário animal (ALBERTS *et al.*, 2002).

A embriologia descritiva traça as mudanças anatômicas do padrão de divisão, crescimento e movimento, que ocorrem na transformação do ovo em organismo. Durante o desenvolvimento embrionário, algumas células têm seus destinos determinados, ou seja, são especializadas de forma a garantir a formação da linhagem destino. Outras células, bioquimicamente idênticas, porém, não têm seu destino determinado (ALBERTS *et al.*, 2002).

A diferenciação de CTEs é um processo natural que acontece durante o desenvolvimento embrionário. As células são diferenciadas em grupos celulares distintos, que formarão tecidos específicos.

O coração é composto de linhagens derivadas mesodérmicas - cardiomiócitos, células endoteliais e células musculares lisas vasculares - e é o primeiro órgão a ser formado durante o desenvolvimento do embrião (PASSIER e MUMMERY, 2005).

Terapias celulares para cardiopatias

As doenças cardíacas isquêmicas, comuns após infartos, são uma das principais causas de morte no mundo (LOPEZ *et al.*, 2006, SEGERS e LEE, 2008). Além de medicamentos, o tratamento padrão atual, que apresenta resultados satisfatórios, é o transplante de coração (SEGERS e LEE, 2008).

Nos últimos anos foram feitas muitas pesquisas com diversos tipos de células-tronco, nas quais foi estudada a capacidade de regeneração miocárdica. A Figura 27 mostra os tipos de células usados nas terapias cardíacas.

Em 2002, Anversa e Nadal-Ginard publicaram evidências da renovação de células do miocárdio e classificaram como promissor o uso de terapias com células da medula óssea (ANVERSA e NADAL-GINARD, 2002). Os mesmos Anversa e Nadal-Ginard e outros colaboradores (KAJSTURA *et al.*, 2005) concluíram que células da medula de ratos podem se diferenciar na linhagem cardíaca.

Um grupo brasileiro, em um estudo com 26 pacientes, verificou melhora sintomática num grupo de doentes isquêmicos graves transplantados com células da medula. Também foi verificada a segurança da terapia com as células da medula óssea (DOHMANN *et al.*, 2005).

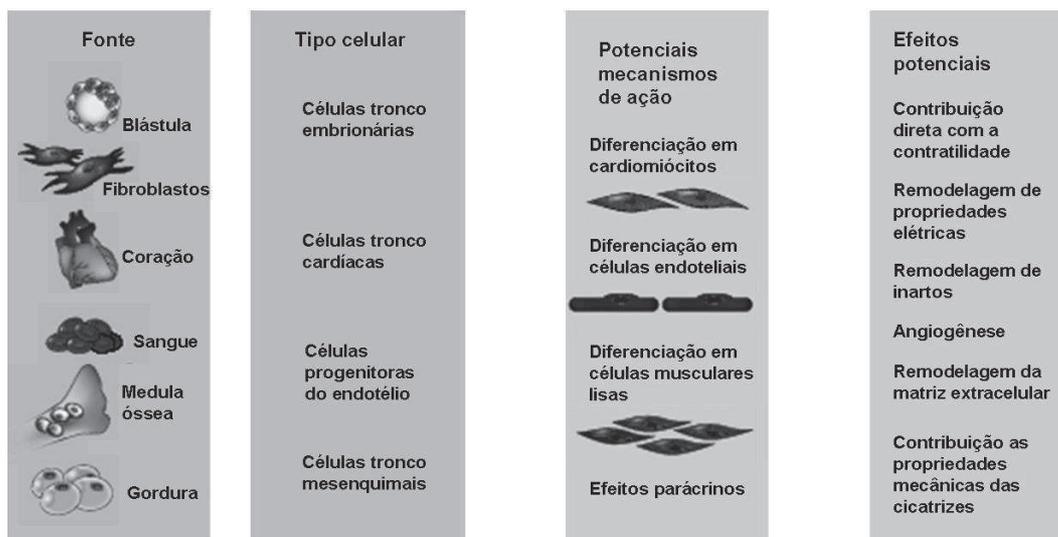


Figura 27: Tipos celulares e terapias propostas para o tratamento de cardiopatias. Adaptada com a permissão de Macmillan Publishers Ltd: [NATURE] (SEGRS e LEE, 2008), copyright(2008).

Um grupo da Universidade de Frankfurt realizou, em 2002, um estudo com 20 voluntários (ASSMUS *et al.*, 2002) e concluiu que o implante de células da medula óssea é seguro e benéfico para a remodelagem do coração doente. O mesmo grupo, dando continuidade ao estudo, fez um teste aleatorizado com 59 pacientes cardíacos e constatou a segurança no implante de CTs no coração, e a melhora discreta na regeneração do coração (SCHÄCHINGER *et al.*, 2004). Outro grupo, incluindo os pesquisadores Anversa e Nadal-Ginard, demonstrou que há CTs cardíacas com capacidade de regenerar o músculo cardíaco (BELTRAMI *et al.*, 2003). Um grupo formado por brasileiros e americanos publicou um trabalho, no qual mostrou a segurança de injeções de células da medula óssea do próprio paciente em pacientes com falência cardíaca severa (PERIN *et al.*, 2003). Em tal estudo foi verificada melhora da função ventricular esquerda. Os mesmos pesquisadores, em um trabalho que deu continuidade ao estudo anterior, conduzido com 20 pacientes ao longo de um ano, concluíram que a terapia de CTs analisada pode produzir efeitos terapêuticos duráveis e melhora da perfusão miocárdica (PERIN, DOHMANN *et al.*, 2004). Na

Universidade de Rostock, Alemanha, foi conduzido um teste, em 2003, com seis pacientes, que apresentou resultados positivos com a injeção de CTs autólogas da medula óssea no coração infartado (STAMM *et al.*, 2003). Pesquisadores da Harvard Medical School demonstraram que células-tronco da medula óssea de ratos manipuladas com o gene Akt1 são extremamente eficientes, quando implantadas, na remodelagem de corações doentes (MANGI *et al.*, 2003).

Estudos mais recentes também consideram promissor o uso de terapias de células-tronco para o reparo do coração de pacientes com doenças isquêmicas (TUCH, 2006, CHRISTOFOROU e GEARHART, 2007, NOVOTNY *et al.*, 2008, SEGERS e LEE, 2008). Entretanto, a taxa de diferenciação destas células *in vivo* é muito baixa. Logo, há a necessidade de utilização de técnicas para estimular a diferenciação *in vitro* (JACKSON *et al.*, 2008, SEGERS e LEE, 2008). Assim, deve ser investigada a forma de induzir a diferenciação das células para linhagem cardiomiogênica antes de realizar o implante. A Figura 28 mostra os caminhos seguidos e os principais desafios existentes para o uso da terapia de células-tronco como tratamento para determinadas doenças cardíacas.

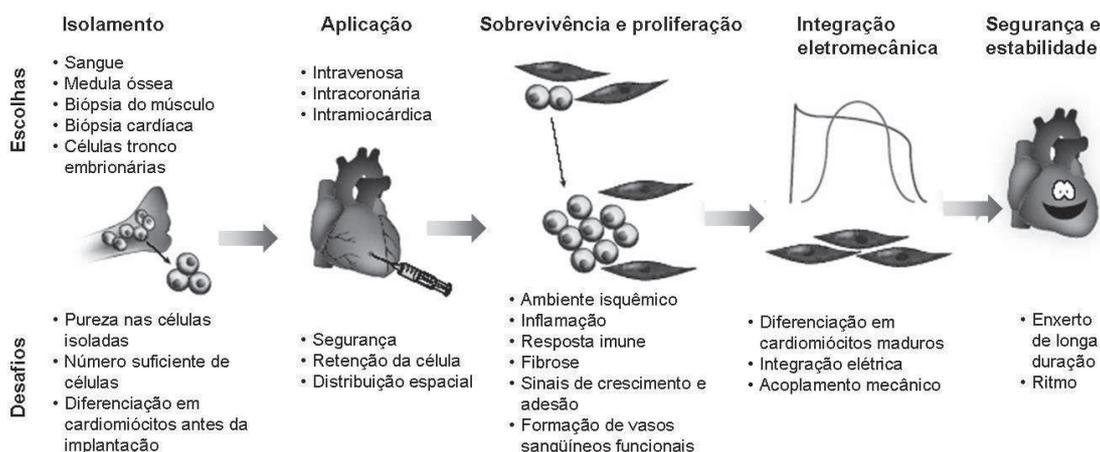


Figura 28: Desafios para o uso da terapia de células-tronco em doenças cardíacas. Adaptada com a permissão de Macmillan Publishers Ltd: [NATURE] (SEGERS e LEE, 2008), copyright (2008).

No Brasil, está em andamento o Estudo multicêntrico randomizado de terapia

celular em cardiomiopatias, o *MiHeart*, (TURA *et al.*, 2007). O estudo é composto por quatro estudos independentes, e cada estudo analisa uma cardiopatia (Figura 29). As cardiopatias são: Cardiomiopatia chagásica, cardiomiopatia dilatada, infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica crônica do coração (<http://terapiacelular.hcl.gov.br>, TURA *et al.*, 2007).

O MiHeart conta com a participação de 40 centros de pesquisa no Brasil, e o grupo total de voluntários será de 1200 pacientes, divididos em quatro grupos de 300, de acordo com as cardiopatias analisadas. Para cada cardiopatia há um centro âncora, o qual coordenará a pesquisa para aquela patologia (<http://www.incl.rj.saude.gov.br/index.asp>): INCOR de São Paulo – Doença isquêmica, FIOCRUZ da Bahia – Doença de chagas, Infarto agudo do miocárdio – Pró Cardíaco do Rio de Janeiro, e Cardiopatia dilatada – Instituto Nacional de Cardiologia do Rio de Janeiro (INC). A coordenação geral da pesquisa é feita pelo Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho, com base no INC.

A fase de inscrição dos candidatos foi encerrada em 2005 (<http://www.incl.rj.saude.gov.br/index.asp>). O trabalho publicado em 2007 (TURA *et al.*, 2007), informou que muitos dos estudos já estavam com a primeira fase completa. O resultado deste estudo será muito importante para a ampliação do conhecimento sobre a regeneração do coração pela terapia de CTs.

Em fevereiro de 2009, foi publicado um trabalho apontando o presente e os desafios futuros de pesquisadores de células-tronco no Brasil (ZATZ, 2009). Este trabalho aponta que não é esperado que CTs mononucleares da medula óssea regenerarão cardiomiócitos, e indica a necessidade de mais pesquisa com outras células.

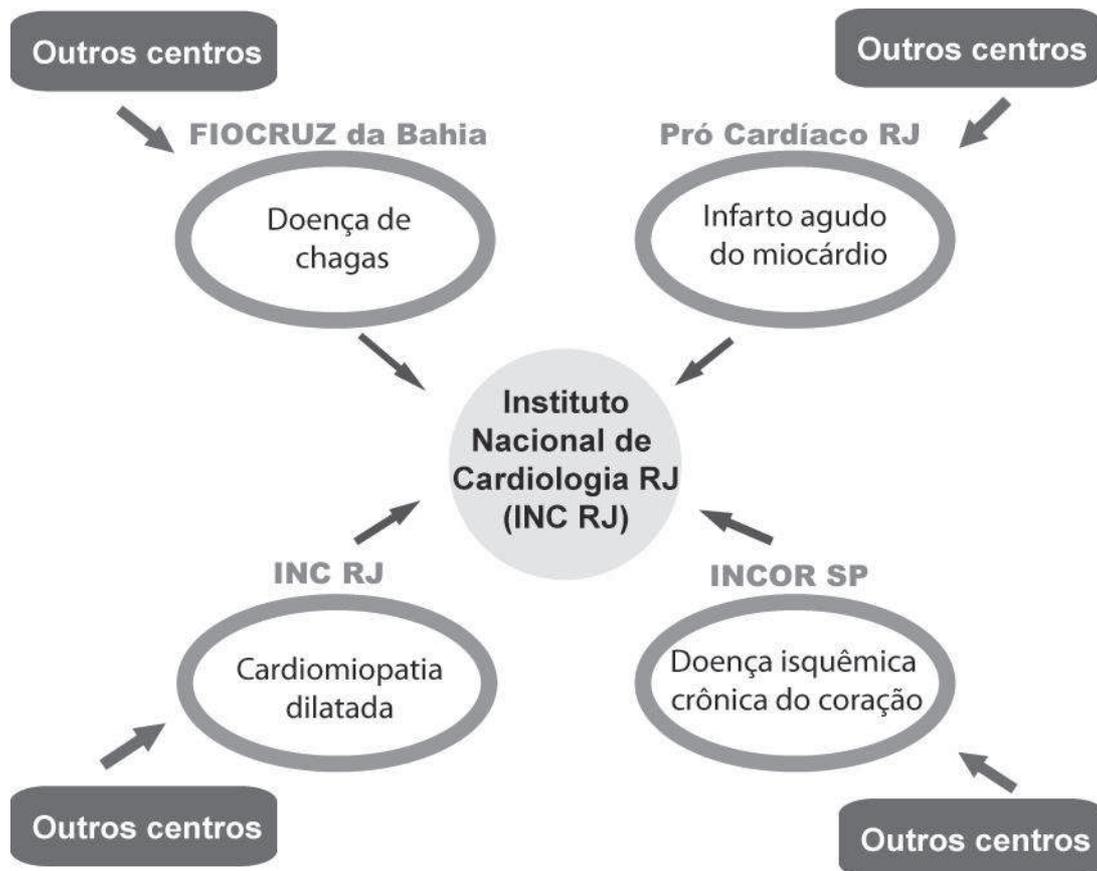


Figura 29: Estudo multicêntrico randomizado de terapia celular em cardiopatias (MiHeart). As quatro instituições âncora responsáveis por cada cardiopatia se reportam à coordenação geral, no INC RJ. Outras instituições (são 40 ao todo) se reportam às quatro instituições âncora.

Alguns tipos de células-tronco já foram estudados em larga escala em ensaios clínicos, outros ainda devem ser examinados para a verificação da eficácia na terapia para cardiopatias, e da efetiva diferenciação em cardiomiócitos (JOGGERST e HATZOPOULOS, 2009). A Tabela 10 apresenta tipos de CTs e suas características quando relacionadas ao tratamento de patologias cardíacas.

Além de pesquisas com outras células, também é necessário estudar a possibilidade de diferenciação em cardiomiócitos antes do implante. Logo, é necessário analisar as melhores condições para a indução da diferenciação de CTs em cardiomiócitos.

Tabela 10: Características de populações de células-tronco usadas na terapia cardíaca. Adaptado de: Joggerst,S.J.; Hatzopoulos,A.K., Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers, Expert reviews in molecular medicine, 11, p. 3, 2009 © Cambridge Journals, published by Cambridge University Press, reproduced with permission.

Célula-tronco	Origem	Vantagens	Desvantagens	Ensaio clínicos
CTEs	Massa de célula do interior de um blastocisto pré-implantado	Capacidade de auto-renovação teoricamente ilimitada; pluripotente	Considerações éticas; formação de teratoma	Nenhum
Células mononucleares da membrana, CTs hematopoiéticas	Medula óssea, sangue periférico, corão umbilical e placenta.	Fácil isolamento; segurança e viabilidade do implante comprovadas	Controverso se ocorre realmente a diferenciação em cardiomiócitos.	Larga-escala
CTs mesenquimais	Medula óssea (células aderentes), tecido adiposo	Fácil de isolar e de expandir em cultura; multipotente	Muita heterogeneidade; diferenciação heterotópica (ossificação)	Estudos de segurança e viabilidade e estudos em pequena escala
CTs cardíacas	Nichos especiais no miocárdio	Células residentes; grande potencial de diferenciação cardiovascular; formação de tumor reduzida		Nenhum

Técnicas para diferenciação de células-tronco na linhagem cardiomiogênica

Diversas técnicas estão sendo usadas na tentativa de diferenciar células-tronco em linhagens específicas. Essas técnicas usam estímulos físicos exógenos com objetivo de mimetizar certos aspectos observados no desenvolvimento natural de determinada linhagem celular. As tentativas têm sido feitas com o uso de: eletroestimulação (GENOVESE *et al.*, 2008, RADISIC *et al.*, 2004, XIA *et al.*, 1997, HOLT *et al.*, 1997), carregamento mecânico (SHIMKO e CLAYCOMB, 2008, ORR *et al.*, 2006, HWANG *et al.*, 2007), aplicação de temperatura (FLANDERS *et al.*, 1993) e agentes químicos, como radicais livres e espécies reativas de oxigênio (WINTER e GITTENBERGER-DE GROOT, 2007, DIMARAKIS *et al.*, 2006b, SAUER *et al.*, 2000, HWANG *et al.*, 2007). Também são de grande importância, e têm sido estudados e definidos, os meios de cultura, o uso de matrizes extracelulares e os fatores de crescimento necessários para diferenciação em células cardíacas. Na Figura 30 são apresentados os fatores usados para induzir a diferenciação.

Diante da grande variedade e possibilidade de combinação de estímulos e outros fatores para induzir a diferenciação de células-tronco em cardiomiócitos *in vitro*, devem ser estabelecidos protocolos, como o objetivo de tornar a terapia cardíaca com células-tronco mais segura e eficiente (DIMARAKIS *et al.*, 2006b).

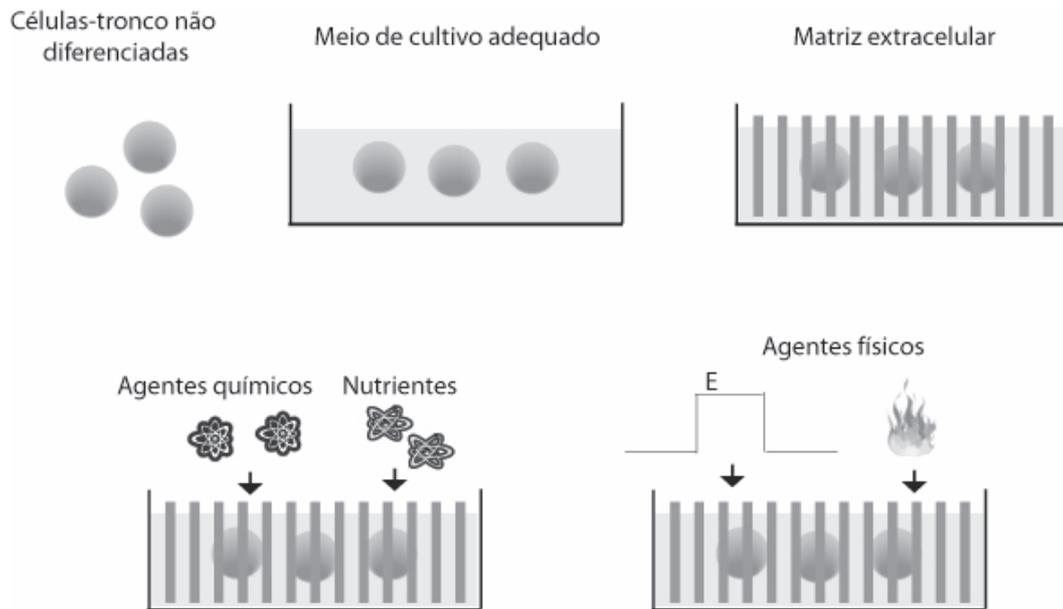


Figura 30: Fatores considerados na indução da diferenciação de células-tronco. É importante a definição do meio de cultivo, o uso da matriz celular apropriada, o uso dos agentes químicos e adição dos nutrientes adequados e o uso de estímulos físicos.

Condições de cultura para diferenciação na linhagem cardiomiogênica

Os meios de cultura para cultivo de qualquer célula, ou molécula, para uso terapêutico, devem ser livres de produtos de origem animal e humana, para evitar contaminações potenciais. Para a diferenciação de CTs em cardiomiócitos *in vitro*, o meio de cultura ideal deve ser quimicamente definido, livre de soro e conter os nutrientes necessários (RAUCH *et al.*, 2002, HENG *et al.*, 2004). Devem ser usados produtos sintéticos que substituam os produtos de origem animal. A definição química do meio é extremamente importante para proporcionar condições de cultura que garantam reprodutibilidade a eventuais experimentos realizados.

Na diferenciação em células cardíacas, a ausência de soro é importante, pois

algum fator de inibição não identificado pode estar presente no material de origem não sintética. Já foi verificado experimentalmente que células-tronco mesenquimais de ratos mantêm a capacidade de diferenciação e de proliferação quando cultivadas em meio livre de soro (LENNON *et al.*, 1995, DIMARAKIS *et al.*, 2006b).

Matrizes extracelulares

O miocárdio funcional é formado por cardiomiócitos envoltos e suportados por uma matriz extracelular, que protege e mantém a integridade estrutural do tecido. Essa rede é composta por colágeno, elastina, fibronectina, proteoglicanos e glicoproteínas (HENG *et al.*, 2004). Na realidade, sua composição é tão complexa quanto seu papel multifuncional na manutenção de condições favoráveis para o microambiente miocárdico (DIMARAKIS *et al.*, 2006a). *In situ*, está presente durante toda sinalização molecular, e seu funcionamento é entrelaçado ao desenvolvimento celular e à cardiogênese (IMANAKA-YOSHIDA *et al.*, 2003, QIAN *et al.*, 2005, DIMARAKIS *et al.*, 2006a). Assim, a presença de uma matriz extracelular apropriada é favorável à diferenciação na linhagem cardíaca.

Há mais de uma década, foi descrito um método de reconstituição de cardiomiócitos embrionários em uma matriz tridimensional de colágeno (ESCHENHAGEN *et al.*, 1997). Hoje, a discussão não é sobre o uso da matriz extracelular, mas sim sobre a composição da matriz usada para o processo de diferenciação. A Tabela 11 contém os principais materiais biológicos e sintéticos usados em modelos de matriz extracelular.

Os materiais sintéticos têm como vantagem o controle total sobre a composição, densidade e porosidade da matriz resultante, além da garantia, pelo processo produtivo, da ausência de substâncias de origem biológica, potenciais

geradoras de contaminação (AKHYARI *et al.*, 2008). Entretanto, há possibilidade de problemas de rejeição e, conseqüentemente, necessidade de transformar o polímero em um material biologicamente ativo.

Embora as matrizes extracelulares estejam sendo empregadas há alguns anos, ainda é preciso ampliar o conhecimento e realizar experimentos *in vivo* e *in vitro* para a determinação da melhor composição de matriz para a diferenciação na linhagem celular desejada.

Tabela 11: Materiais usados em modelos de matriz extracelular

Material	Origem	Aplicação
Colágeno (LI <i>et al.</i> , 2000, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008)	Biológica	Presente no Matrigel. Matrigel é um extrato líquido derivado da linhagem celular sarcoma, que contém colágeno e substâncias bioativas.
Fibrina (BORST <i>et al.</i> , 1982, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008)	Biológica	A fibrina tem duração temporária <i>in vivo</i> (sofre degradação). Tem aplicação como um potente agente hemostático, a cola de fibrina, que é usada em cirurgias.
Ácido Hialurônico (AH) (KHADEMHOSEINI, <i>et al.</i> , 2007, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008).	Biológica	O AH é um eficiente enchimento e tem impacto nas propriedades mecânicas do tecido. Foi demonstrado que tem efeito na diferenciação de CTs em cardiomiócitos.
Celulose (MÄRTSON <i>et al.</i> , 1999, ENTCHEVA <i>et al.</i> , 2004, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008)	Biológica	Já foi usada como matriz para cultura celular. Mesmo sem a presença de enzimas de degradação de celulose em mamíferos, ela pode, com o tempo, sofrer degradação após o implante.
Poliésteres (LO <i>et al.</i> , 1996, VUNJAK-NOVAKOVIC <i>et al.</i> , 1998, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008)	Sintética	O poliácido glicólico é usado para sutura. Permitiu a preservação e performance eletrofisiológica de células cardíacas, quando usado como matriz para o tecido. O poliácido láctico também pode ser usado, e tem maior resistência à degradação pela água, o que garante maior plasticidade. A degradação destes dois poliésteres resulta em metabólitos naturais (ácido glicólico e ácido láctico).
Polilactonas (SHIN <i>et al.</i> , 2004, AKHYARI <i>et al.</i> , 2008)	Sintética	Podem ser usadas em várias aplicações biomédicas. A introdução de culturas de células cardíacas em matrizes de polilactonas porosas foi feita com sucesso. Isso sugere a possibilidade do uso de combinação de materiais compósitos mais sofisticados para fabricação de matrizes extracelulares.
Poliuretanos (PU) (ZHANG <i>et al.</i> , 2000, MCDEVITT <i>et al.</i> , 2003, AKHYARI, 2008)	Sintética	De acordo com o processo de produção, o PU pode ter propriedades mecânicas muito variadas. Materiais baseados em PU estão sendo desenvolvidos com incorporação seletiva de peptídeos e outras moléculas bioativas. Materiais de PU podem ser usados para padronizar cardiomiócitos.

Nutrientes para o meio de cultura

Para que as CTs se diferenciem na linhagem cardíaca é necessário, além de garantir condições ótimas de meio de cultura e do uso de matrizes extracelulares, reproduzir, *in vitro*, as vias de sinalização da cardiogênese. O número de moléculas e vias que participam da cardiogênese é muito extenso e ainda não foram identificados todos os participantes do processo (DIMARAKIS *et al.*, 2006b). Alguns fatores de crescimento, que podem ser adicionados ao meio de cultivo, já foram identificados como promotores do início do processo de diferenciação (Tabela 12).

Agentes químicos

Há agentes químicos sintéticos que podem induzir a diferenciação em linhagens cardíacas (DIMARAKIS *et al.*, 2006a). O ácido retinóico (derivado da Vitamina A) contribui para a diferenciação em cardiomiócitos (DIMARAKIS *et al.*, 2006a, SMITH, BADER, 2007, WINTER, GITTENBERGER-DE GROOT, 2007) e participa criticamente da regulação da proliferação de cardiomiócitos (SMITH, BADER, 2007). O ácido ascórbico (Vitamina C) pode induzir a diferenciação, o que não é esperado devido às propriedades antioxidantes da vitamina C (DIMARAKIS *et al.*, 2006a).

Antioxidantes podem inibir a cardiogênese e espécies reativas do oxigênio, já radicais livres podem acentuá-la (SAUER *et al.*, 2000, DIMARAKIS *et al.*, 2006a). Há evidências que mostram que CTEs usam espécies reativas de oxigênio como transdutores de tensões mecânicas induzidas na diferenciação *in vitro* em tecido cardíaco (SAUER *et al.*, 2000, HWANG *et al.*, 2007). O radical livre dimetil sulfóxido (HABARA-OHKUBO, 1996, DIMARAKIS *et al.*, 2006a), o hormônio ocitocina

(DANALACHE *et al.*, 2007) e icariinas (ZHU *et al.*, 2005, DIMARAKIS *et al.*, 2006a) induzem a diferenciação em linhagem cardiomiogênica.

Tabela 12: Fatores de crescimento iniciadores da cardiogênese

Fator de crescimento	Provável função na cardiogênese
Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs)	BMP2: formação da junção átrio-ventricular e das válvulas. BMP4: desenvolvimento do trato miocárdico e do coxim endocárdico (ABDELWAHID <i>et al.</i> , 2001, DIMARAKIS <i>et al.</i> , 2006b).
Fatores de crescimento transformadores β (TGF- β)	Sinalização molecular indutora da formação de células precursoras miocárdicas e endocárdicas (AZHAR <i>et al.</i> , 2005).
Activinas	Promoção da miogênese cardíaca (LADD <i>et al.</i> , 1998, DIMARAKIS <i>et al.</i> , 2006b).
Fatores de crescimento fibroblastos	Atuação na diferenciação cardiomiogênica em conjunto com BMPs (DIMARAKIS <i>et al.</i> , 2006b).
Insulina	Promoção de desenvolvimento cardíaco <i>in vivo</i> por mecanismos autócrinos e parácrinos (ANTIN <i>et al.</i> , 1998, DIMARAKIS <i>et al.</i> , 2006b).
Eritropoietina	Ativação de transcritores genéticos responsáveis pela diferenciação e proliferação dos cardiomiócitos (JOYEUX-FAURE <i>et al.</i> , 2005, DIMARAKIS <i>et al.</i> , 2006b).

Anexo II

Rotina computacional escrita em MATLAB®

A rotina computacional apresentada a seguir foi escrita com base nas equações usadas por DEBRUIN e KRASSOWSKA (1999) e KRASSOWSKA e FILEV (2007).

```
% Programa baseado no modelos:
% DeBruin, Krassowska, 1999 e Krassowska, Filev, 2007.
% 08/2009

clear all
close all

% Valores dos componentes

g1=2; % condutividade superficial da membrana devido
aos canais de proteínas (S/m2)
R1=1/g1;
Vep=0.258; % tensão característica da eletroporação (V)
Cm1 = 1e-2; % valor da capacitância superficial em F/m2
(1F/m2 = 100uF/cm2)
N0=1.5e9; % densidade de poros de equilíbrio (#poros/m2)
alfa=1e9; % coeficiente da taxa de criação (1/s.m2)
rmin=0.51e-9; %raio min para criação (m)
rm=0.8e-9; % raio associado a energia mínima para raio
com Vm=0 (m)
S1=2e-2; % tensão mec da interface hidrocarboneto-agua
(seJ/m2)
S0=1e-6; % tensão mec da dupla camada sem poros (J/m2)
beta=1.4e-19; % energia de repulsão (J)
Fmax=0.7e-9; % max força elétrica para Vm=1V (N/V2)
rh = 0.97e-9; % const (m)
rt=0.31e-9; % const (m)
D= 5e-14; % coef de difusão pelo poro (1/s.m2)
k=1.38e-23; % const de Boltzman
Temp=310; % temp (K)
gama=1.8e-11; % energia de borda (J/m)
sigma=2 ; % condutividade da solução eletrolítica que
preenche o poro (S/m)
h= 5e-9; % espessura da membrana (m)
```

```

Vrest=-0.08;           % tensão de repouso transmembrana (V)
si=0.455;             % condutividade do liquido intracelular (S/m)
se=5;                % condutividade do liquido extracelular (S/m)
a=50e-6;             % Raio da célula (m)
A=2*pi*(a)^2;       % Área superficial da célula
Rei=a*(1/si+2/se);

% Definições sobre a fonte de excitação

ti = 0e-6;           % tempo inicial onde aparecera a primeira
excitação
tf =5e-6;           % tempo final de simulação e gráfico
dt = 2e-9;          % incremento temporal
t0 = 5e-6;          % duração do pulso
T = 15e-3;          % intervalo entre os pulsos
E=4e4;              % campo elétrico (V/m) = 10^2 V/cm

% Inicializações básicas

t = 0;
i=1;
tg(1) = 0;
Ig(1) = 0;
Itt(1) = 0;

% Discretização do angulo e área. Numero de passos da
% discretização = Nteta
Nteta = 18;
angulos = [-90+(180/Nteta):180/Nteta:90];

teta1 = [-90:180/Nteta:90-(180/Nteta)];
teta2 = [-90+(180/Nteta):180/Nteta:90];
dA = pi*(a^2)*abs(sind(teta2)-sind(teta1));

% Definição de variáveis para a plotagem dos gráficos
ang =[-40 0 60 90];
cor=['b' 'k' 'r' 'g'];
ntetaplot=4;

% Inicialização de variáveis do loop principal
V=ones(1,Nteta)*Vrest;
N=zeros(1,Nteta);
dN=ones(1,Nteta);
K=zeros(1,Nteta);
K_old = K;
r=ones(1,Nteta)*rmin;
r_med=r;
passou = zeros(1, Nteta);
Ap=zeros(1,Nteta);
for j=1:Nteta
    eval(['r_Klg_' num2str(j) '=[];']);
end

% Inicialização para otimização
Neq=zeros(1,Nteta);
Rs=zeros(1,Nteta);
Rp=zeros(1,Nteta);
Gp=zeros(1,Nteta);
ind=zeros(1,ntetaplot);

```

```

Vm=0;
Ng=0;
rg=0;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
%                               LOOP PRINCIPAL                               %
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
tic
while t<tf
    for y=1:(ntetaplot)
        for it=1:(Nteta)
            if Nteta==1
                teta=0;
            else
                teta=angulos(it);
            end;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%                               valor da fonte de excitação                               %
%                               (campo elétrico externo)                               %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

            tr = rem((t-ti),T);
            if (dt<tr)&(tr<t0)&(t>ti)
                Ie=1.5*E*a*cosd(teta)/Rei;
                Gei=1/Rei;
            else
                Ie=0;
                Gei=1/Rei;
            end;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%                               calculo de N = densidade de poros /                               %
%                               Surgimento de poros                               %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

            q=(0.8e-9/0.51e-9)^2;
            Neq(it) = N0*exp(q*(V(it)/Vep)^2);
            dN(it) = dt * alfa * exp((V(it)/Vep)^2) * (1 -
(N(it)./Neq(it)));

            N(it)=N(it) + dN(it);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%                               calculo de Ap = área dos poros                               %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

            Ap(it) = Ap(it) + (K(it)*pi*(r_med(it)^2));
            if Ap(it)>=A/100;
                Ap(it)=A/100;
            end;

```

```

%*****%
%          calculo de K = numero de poros          %
%*****%

K(it)= floor(N(it)*dA(it));

if (K(it) ~= K_old(it))&&(passou(it)==0)
    passou(it) = 1;
    eval(['r_Klg_' num2str(it) '= [r_Klg_' num2str(it) '
ones(1,K(it))*(1e-9)];']);
end;
if K(it) > (K_old(it))
    eval(['r_Klg_' num2str(it) '= [r_Klg_' num2str(it) '
ones(1,((K(it)-K_old(it)))*(1e-9)];']);
end;
if K(it) < K_old(it)
    eval(['r_Klg_' num2str(it) '= r_Klg_' num2str(it) '
(1:(end-(K_old(it)-K(it)))]);
end;

if K(it)>0
    rr=ones(1,K(it));
    eval(['rr=r_Klg_' num2str(it) ';']);

%*****%
%          calculo de r          %
%*****%

for m=1:K(it)

    Sef1=(1-Ap(it)/A)^2;
    Seff=2*S1 - (2*S1 - S0)/Sef1;

    U1=D/(k*Temp);
    U2=(V(it)^2*Fmax)/(1+(rh/(rr(m)+rt)));
    U3=4*beta*(rmin/rr(m))^4*(1/rr(m));
    U4=2*pi*gama;
    U5=(2*pi*Seff*rr(m));
    U=U1*(U2 + U3 - U4 + U5);
    rr(m)=rr(m)+dt*U;
    if rr(m)<rmin
        rr(m)=rmin;
    end;

end;

eval(['r_Klg_' num2str(it) '=rr;']);

%Calculo do r medio (poros grandes)
r_med(it)=sum(rr)/length(rr);

```

```

end;
K_old(it)=K(it);
% calculo das resistências dos poros (Rp) e de entrada do
poro (Rs)
Rs(it)=1/(2*sigma*r_med(it));
Rp(it)=h/(pi*sigma*r_med(it)^2);
Gp(it)=N(it)/(Rs(it)+Rp(it)); % condutividade dos poros
pequenos

G=Gp(it); % condutividade total dos poros pequenos
R=1/G;

Cm=Cm1;

%*****
% Calculo da tensão de membrana
% Cada termo de corrente a densidades de corrente

%*****

Iee=Ie*(dt/Cm);
Ivm=V(it)*Gei*(dt/Cm);
I1=(dt/Cm)*g1*(V(it)-Vrest);
Ip=(dt/Cm)*V(it)*G;

V(it) = V(it)+ Iee - Ivm - I1 - Ip;

% Variaveis para o grafico

ind(y) = find( ang(y) == angulos );
c=ind(y);

% Raio máximo
Vm(y,i) = V(c);
Ng(y,i)=K(c);
rg(y,i)=r_med(c)*1e9;

Apg(y,i)=Ap(c);

end;

end;

%*****
% ATUALIZAÇÃO das variáveis
%*****

i =i+1;
tg(i) = t*1e6; % tempo em us

t = t+dt;
Ig(i) = Ie;
RRg(i)=R;

```

```

end;

tempo = toc;

%tgmax=10e-6;
tgmax=tf;
% tgmax1=5e-6;
tgmax1=2*t0;

figure(1);
subplot(3,1,1);
semilogy(tg(1:round(tgmax/dt)),RRg(1:round(tgmax/dt)));
ylabel('R poros (Ohm)');
axis([0 max(tg(1:round(tgmax/dt))) 0 5e2]);

subplot(3,1,2);
semilogy(tg(1:round(tgmax/dt)),rg(1:round(tgmax/dt)));
ylabel('raio poro (nm)');

subplot(3,1,3);
semilogy(tg(1:round(tgmax/dt)),Apg(1:round(tgmax/dt)));
ylabel('Área dos poros (m2)');
xlabel('Tempo (us)');

figure(2)

subplot(4,1,1);
plot(tg(1:round(tgmax1/dt)),Ig(1:round(tgmax1/dt)));
ylabel('Corrente aplicada (A/m2)');
xlabel('Tempo (us)');

subplot(4,1,2);
for y=1:ntetaplot
    plot(tg(1:round(tgmax1/dt)),Vm(y,(1:round(tgmax1/dt))),cor(y));
    hold on;
end;
ylabel('Tensão transmembrana (V)');
axis([0 max(tg(1:round(tgmax1/dt))) -.1 2]);
xlabel('Tempo (us)');

subplot(4,1,3);
for y=1:ntetaplot
    plot(tg(1:round(tgmax1/dt)),rg(y,(1:round(tgmax1/dt))),cor(y));
    hold on;
end;
ylabel('Raio poro (nm)');
xlabel('Tempo (us)');

subplot(4,1,4);
for y=1:ntetaplot
    plot(tg(1:round(tgmax1/dt)),1e-
3*Ng(y,(1:round(tgmax1/dt))),cor(y));
    hold on;

```

```
end;  
ylabel('10^-3 * # poros pequenos');  
xlabel('Tempo (us)');
```