



DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM GERADOR PROGRAMÁVEL DE PULSOS MONOFÁSICOS DE CAMPO ELÉTRICO PARA ELETROPORAÇÃO

Mariana Dias da Silva

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
Setembro de 2011

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM GERADOR PROGRAMÁVEL DE
PULSOS MONOFÁSICOS DE CAMPO ELÉTRICO PARA ELETROPORAÇÃO

Mariana Dias da Silva

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. Márcio Nogueira de Souza, D.Sc.

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

Prof^a. Wanda Maria Almeida von Krüger, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

SETEMBRO DE 2011

Silva, Mariana Dias da

Desenvolvimento e Avaliação de um Gerador Programável de Pulsos Monofásicos de Campo Elétrico para Eletroporação/ Mariana Dias da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011

IX, 77 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. 73-77

1. Eletroporador. 2. Eletropermeabilização. 3. Membrana plasmática. I Souza, Márcio Nogueira de. *et al*
II Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,
Programa de Engenharia Biomédica. III Título.

Dedicatória

Aos meus avós Lais Dias (*in memoriam*), Noemia Baltor Dias e Laura da Silva Graça (*in memoriam*) por serem luz na minha vida e me guiarem pelo caminho do amor, da fé e do trabalho.

Agradecimentos

A Deus, que meu deu a vida e a chance de aprender, criar e compartilhar.

Aos meus orientadores Prof. Márcio Nogueira de Souza e Prof. Alexandre Visintainer Pino pelo esforço em me orientar e me fazer crescer como profissional.

Aos meus pais, Denise Dias e Paulo Roberto da Silva pelo amor e pela força que me dão e por terem me motivado no percurso deste trabalho, como sempre fizeram, tão amorosamente, em todos os momentos da minha vida.

Às minhas irmãs Paula Dias da Silva e Cristina Dias da Silva, por serem grandes companheiras e inspiração para mim.

A André Escovino da Silva pelo seu amor, companheirismo e por toda sua paciência que dispensou a mim durante este trabalho.

A Paulo Apulcro Fonseca, meu Tio querido, por ter me presenteado com o logotipo do eletroporador.

A Juliana Coronel por ter equipado o LIB e desenvolvido o protocolo que permitiu testar o eletroporador e ter tido a paciência de me mostrar o passo a passo do seu trabalho.

A todos meus amigos do Programa de Engenharia Biomédica, que transformaram o percurso deste trabalho em momentos de alegria e em dias memoráveis na minha vida.

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

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM GERADOR PROGRAMÁVEL DE PULSOS MONOFÁSICOS DE CAMPO ELÉTRICO PARA ELETROPORAÇÃO

Mariana Dias da Silva

Setembro/ 2011

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Programa: Engenharia Biomédica

A eletroporação é o aumento da permeabilidade da membrana plasmática causado pela aplicação de pulsos de campo elétrico externo à célula. A permeabilização ocorre pela formação de poros na estrutura da membrana e possui diversas aplicações na biotecnologia. Uma vez que a eficácia da eletroporação varia, entre outros fatores, com os parâmetros (amplitude, largura e intervalo entre os pulsos) dos pulsos do campo elétrico exógeno, faz-se importante o desenvolvimento de equipamentos que permitam o controle de tais características. Neste trabalho foi desenvolvido um equipamento de eletroporação que possibilita ao usuário controlar a quantidade de pulsos e os seus parâmetros individuais. O equipamento desenvolvido é controlado por um programa escrito em linguagem G e permite obter campos elétricos com amplitudes de até 4,1 kV/cm; larguras de pulso variando de 1 ms a 100 ms; e intervalos inter-pulsos acima de 10 ms. Foram realizados testes de bancada para avaliar o desempenho do equipamento, utilizando-se resistores para emular uma suspensão de células. Esses testes mostraram que a amplitude de pulso medida apresentou erro máximo em relação àquela programada pelo usuário de 5 %; a largura de pulso de 10 % e o espaçamento dos pulsos de 5 %. Um teste de eficácia de eletroporação realizado com bactérias *Escherichia Coli* mostrou que o equipamento foi capaz de propiciar a inserção de um plasmídeo que tornou as bactérias resistentes à ampicilina.

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

DESIGN AND EVALUATION OF A PROGRAMMABLE PULSE
GENERATOR OF SINGLE PHASE ELECTRIC FIELD FOR ELECTROPORATION

Mariana Dias da Silva

September/ 2011

Advisors: Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Department: Biomedical Engineering

Electroporation is the increase in permeability of plasmatic membrane due to the application of an external electric field. The permeabilization is caused by the formation of pores in the cellular membrane and it has several applications in biotechnology. Considering that the efficacy of electroporation varies according to the pulses parameters of the external electric field (amplitude, pulse length, inter-pulses interval), it is important to develop equipments that allow the control of these parameters. In this work, the developed device is controlled by a program written in G-language, which permits the user to program the pulse parameters individually: amplitude up to 4,1 kV/cm, length of pulse between 1 ms and 100 ms, and an inter-pulses interval greater than 10 ms. Benchmark electric tests were realized to evaluate the device performance by using resistors to emulate a cell suspension. Results showed that the error associated to the amplitude definition is around 5%; to the pulse length is around 10% and the one related to inter-pulses interval is less than 5%. An experimental test performed with *Escherichia Coli* bacteria, in order to verify the electroporation efficacy, showed that the equipment allowed the insertion of a plasmid into the bacterias that becomes them resistant to ampicillin.

Sumário

Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
Capítulo 2.....	3
Fundamentos.....	3
2.1.1 Carga elétrica, campo elétrico e potencial elétrico.....	3
2.1.2 A membrana plasmática	6
2.1.3 A eletroporação.....	9
2.1.4 Outras questões referentes à eletroporação	13
2.1.5 Aplicações da eletroporação	14
2.1.5.1 Introdução local de medicamentos - Eletroquimioterapia	14
2.1.5.2 Transferência de DNA e RNA	15
2.1.5.3 Descontaminação bacteriana.....	16
2.1.5.4 Manipulação intracelular.....	16
2.1.6 Métodos de avaliação da eletroporação.....	18
Capítulo 3.....	20
Projetos de eletroporadores	20
3.1.1 Técnicas fundamentadas em descarga de capacitores	20
3.1.2 Geradores de pulsos retangulares	22
3.1.3 Gerador analógico de sinais arbitrários	23
3.2 Fontes de alta tensão.....	26
3.2.1 Fonte linear de tensão	26
3.2.2 Fonte de tensão chaveada	27

3.2.3	Fonte de tensão modular.....	28
3.3	Eletroporadores comerciais	30
3.4	Estado da arte.....	32
Capítulo 4.....		37
Materiais e Métodos		37
4.1	Especificações do dispositivo.....	37
4.2	Circuito	39
4.3	Programa desenvolvido para utilização com o eletroporador	47
4.4	Testes elétricos	48
4.5	Experimento com amostra biológica	49
Capítulo 5.....		52
Resultados.....		52
5.1	Desempenho do eletroporador – resultado dos testes elétricos	54
5.2	Eficácia da eletroporação bacteriana utilizando o Eletroporador	62
Capítulo 6.....		66
Discussão		66
Capítulo 7.....		72
Conclusão		72

Capítulo 1

Introdução

A membrana plasmática é a estrutura da célula responsável por definir os seus meios interno e externo, sendo composta por uma bicamada de fosfolípidios e proteínas que representa uma barreira à passagem de diversas substâncias. Contudo, por meio de diferentes mecanismos, ela permite seletivamente a entrada e saída de íons, água e algumas outras substâncias importantes às atividades biológicas da célula (ALBERTS, 2002).

Uma maneira de se regular a entrada e a saída de substâncias na célula é a abertura de poros na membrana plasmática por meio da chamada eletroporação, que consiste na aplicação de campos elétricos externos às células. A existência de um campo elétrico externo à membrana plasmática ocasiona a reorientação das suas moléculas de lípidios, levando à permeabilização da sua estrutura, que se não controlada de forma adequada pode até mesmo levar à destruição celular (NEUMANN *et al.*, 1982, TSONG 1991, TEISSI *et al.*, 1999)

Entre aplicações da eletroporação estão a introdução local de medicamentos nas células – como na eletroquimioterapia – e a transferência de RNA e DNA (MIR *et al.*, 1991, BELEHRADEK *et al.*, 1993, GEHL, 2003). O uso de campos elétricos pode também ser relacionado a outras aplicações como, por exemplo, descontaminação bacteriana e a manipulação intracelular (SCHOENBACH *et al.*, 2001).

O campo elétrico utilizado no processo de eletroporação é normalmente obtido pela aplicação de pulsos de tensão entre dois eletrodos, onde haja uma suspensão de células (*in vitro*) ou uma região de um tecido de um paciente (*in vivo*), tendo-se como efeito a alteração da diferença de potencial através da bicamada lipídica. Quando este potencial transmembrana atinge uma intensidade crítica a poração é iniciada, sendo que a área permeabilizada é aumentada pelo tempo de duração do pulso de tensão e pela sua frequência de repetição (TEISSI, *et al.*, 1999). Além do valor crítico de tensão transmembrana a partir do qual se inicia a poração, existe um valor limite a partir do qual a célula não consegue, mesmo após o término da aplicação da tensão externa, retornar à sua permeabilidade original, podendo ser destruída. A variação da tensão

transmembrana depende da amplitude de campo elétrico externo ao qual a membrana é submetida, bem como do formato e do raio da célula, da condutividade da membrana e do ângulo entre a normal à membrana e a direção das linhas de campo (TSONG, 1991).

Obter os melhores ajustes para garantir sucesso em um processo de eletroporação com objetivo específico ainda é um desafio científico, sendo o ajuste dos parâmetros de eletroporação ainda empírico e depende do eletroporador e das células a serem poradas. Não existe consenso nem quanto ao melhor formato dos pulsos. Por isso muitos autores vêm desenvolvendo estudos comparativos entre os tipos de formatos, bem como sobre diferentes faixas de amplitude, duração e frequência de pulsos a fim de determinar as características ideais para aplicações específicas (NEUMANN *et al.*, 1982; KOTNIK *et al.*, 2001; YAKOVENKO, 2004; BERTACCHINI *et al.*, 2007).

Objetivos

- **Geral**

Desenvolver um equipamento de eletroporação de pulsos retangulares monofásicos que permita a programação dos principais parâmetros de tais pulsos, ou seja, amplitude, largura, intervalo e números de pulsos.

- **Específicos**

- Projetar, implementar e testar os circuitos do equipamento a ser construído.
- Desenvolver um programa de controle do equipamento e interface com o usuário, em Linguagem G (*LabView*), que permita operar o equipamento.
- Realizar testes de bancada para avaliar o equipamento projetado.
- Realizar teste do equipamento em um experimento de eletroporação.

Capítulo 2

Fundamentos

Este capítulo provê os fundamentos básicos, descreve as aplicações e as técnicas mais usadas em eletroporação, além de discutir as características dos pulsos de campo elétrico utilizados por diversos autores em diferentes aplicações.

2.1.1 Carga elétrica, campo elétrico e potencial elétrico

A carga elétrica é uma propriedade intrínseca das partículas fundamentais que formam os corpos. Essas partículas podem ter dois tipos de cargas, convencionadas como positivas ou negativas. Um corpo é dito eletricamente neutro quando possui quantidades iguais de cargas positivas e negativas. Ocorrendo desequilíbrio dessas cargas, diz-se que esse corpo está negativamente ou positivamente carregado (HAYT, 1981).

Partículas com carga de mesmo sinal se repelem, enquanto as partículas de cargas de sinais opostos se atraem. Da mesma forma, corpos carregados exercem força de atração ou repulsão uns sobre os outros. A intensidade (F) da força com que esses corpos se atraem ou se repelem, chamada de força eletrostática, foi determinada experimentalmente por Coulomb, pela seguinte lei:

$$F = k \cdot \frac{|q_1| \cdot |q_2|}{r^2} \quad (1)$$

sendo q_1 e q_2 quantidades positivas ou negativas de carga elétrica, r a distância entre elas e k uma constante.

A força que uma carga exerce sobre a outra é devida ao campo de força estabelecido por cada uma. Tanto a carga q_1 quanto a carga q_2 estabelecem um campo de força, denominado de campo elétrico, que possui uma intensidade, uma direção e um sentido. A intensidade, a direção e o sentido da força exercida em q_2 dependem da intensidade da direção e do sentido do campo estabelecido por q_1 . A Figura 2-1 ilustra a

situação de uma carga fixa positiva e as linhas do campo por ela estabelecidas, sendo tais linhas de campo elementos que representam o padrão de um campo elétrico no espaço. A direção do campo elétrico, em um determinado ponto, é a mesma da linha de campo ou tangente a ela, no caso de linhas curvas. O número de linhas por unidade de área, em um plano perpendicular às linhas, é proporcional à intensidade do campo. Na Figura 2-1, outra carga positiva (círculo preto cheio), está imersa nesse campo e por isso sofre a ação da força \vec{F} exercida pelo campo \vec{E} . Essa força é descrita pela Equação 2 (HAYT, 1981).

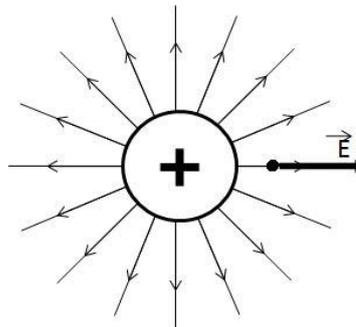


Figura 2-1 – Esquema de corpo carregado positivamente e as linhas do campo elétrico estabelecido por ele.

$$\vec{F} = \vec{E} \cdot q \quad (2)$$

Se se desejar mover a carga contra o campo elétrico deve-se exercer uma força igual e oposta a exercida pelo campo, o que exige dispêndio de energia ou trabalho. O trabalho diferencial dW realizado por uma força sobre uma partícula durante um deslocamento dL é definido pelo produto desse força pelo deslocamento diferencial como apresentado pela Equação 3 (HALLIDAY *et al.* 1995).

$$dW = \vec{F} \cdot \vec{dL} \quad (3)$$

ou

$$dW = q \cdot \vec{E} \cdot \vec{dL} \quad (4)$$

O trabalho total realizado durante todo deslocamento ao longo da linha de campo é, então, determinado por:

$$W = q \int_j^i \vec{E} \cdot d\vec{L} \quad (5)$$

Uma carga em um campo elétrico armazena uma quantidade de energia potencial devido a esse campo. Se uma partícula carregada é levada de um ponto a outro do campo elétrico, a variação da energia potencial elétrica entre esses dois pontos é igual a menos o trabalho realizado por essa força eletrostática. A diferença de potencial ΔV entre esses dois pontos pode ser definida como o trabalho realizado pela força do ponto inicial i ao ponto final f dividida pelo valor da carga q (Equação 6) (HALLIDAY *et al.* 1995):

$$\Delta V = -\frac{W}{q} \quad (6)$$

em que W é o trabalho realizado pela força eletrostática.

Dessa forma, por meio das equações (5) e (6) podemos ver que a diferença de potencial pode se definida como menos a integral de $\vec{E} \cdot d\vec{L}$ na trajetória de i até f (dois pontos quaisquer em um campo elétrico) (HALLIDAY *et al.* 1995).

$$\Delta V = V_f - V_i = - \int_i^f \vec{E} \cdot d\vec{L} \quad (7)$$

Considerando-se um campo uniforme, ou seja, aquele que possui em todos os pontos do espaço a sua intensidade, direção e sentido, a equação da diferença de potencial pode ser escrita na forma da equação 8 (HALLIDAY *et al.* 1995):

$$\Delta V = V_f - V_i = -\vec{E} \int_i^f d\vec{L} \quad (8)$$

Considerando que o resultado da integração do deslocamento diferencial $d\vec{L}$ do seu início i ao seu final f é o comprimento d da trajetória percorrida na direção e no

sentido das linhas de campo elétrico, a relação entre a diferença de potencial ΔV e a intensidade E do campo elétrico pode ser expressa como:

$$E = \frac{V_f - V_i}{d} = \frac{\Delta V}{d} \quad (9)$$

Um exemplo de campo elétrico uniforme é apresentado na Figura 2-2 e reinterpreta o campo entre duas placas planas e infinitas a uma distância d uma da outra.

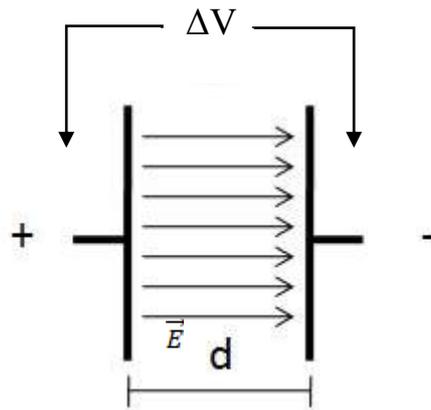


Figura 2-2 – Placas planas, paralelas e infinitas a uma distância d uma da outra, sob ação de uma diferença de potencial V . As linhas entre as placas representam o vetor campo elétrico.

2.1.2 A membrana plasmática

A membrana plasmática é a estrutura da célula que define o seu meio externo e interno. Ela é formada por uma bicamada lipídica com espessura aproximada de 6 nm e por diversos tipos de proteínas, que são diferentes nos vários tipos de células. Os lipídios mais abundantes são os fosfolipídios, que têm uma extremidade polar (hidrofílica) e a outra extremidade composta de duas caudas apolares (hidrofóbicas) de ácidos graxos, como apresentado na Figura 2-3 (ALBERTS, 2002).

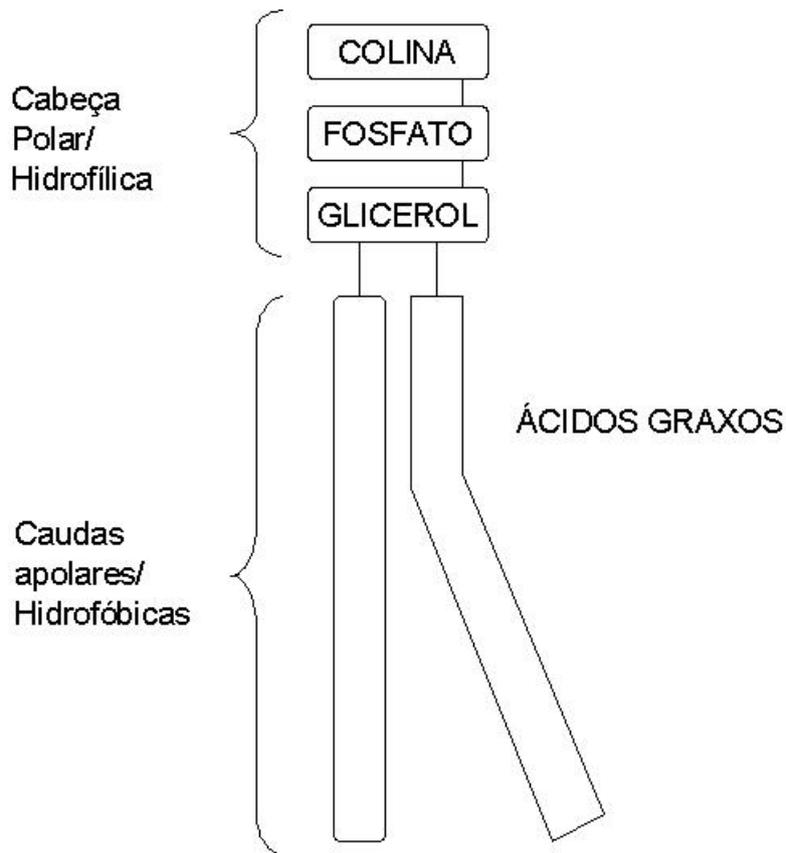


Figura 2-3 – Esquema da molécula de fosfolípido fosfatidilcolina, principal componente da membrana plasmática de animais e plantas. Possui uma cabeça de característica hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas.

A característica anfipática e o formato dos lipídios que constituem a membrana são os responsáveis pela formação natural de uma bicamada em um ambiente aquoso (ALBERTS, 2002). As extremidades hidrofílicas formam interações eletrostáticas com as moléculas de água e as extremidades apolares tendem a se direcionar para o interior da bicamada, como é mostrado no esquema de uma membrana plasmática da Figura 2-4; sendo dessa forma energeticamente mais favorável (ALBERTS, 2002). Se uma fenda é feita na bicamada, os fosfolipídios se rearranjam de forma que as caudas hidrofóbicas não fiquem em contato com a água.

Lipídios com formato que se aproxima de um cone invertido, em ambiente aquoso formarão uma micela. No caso daqueles, cujo formato se aproxima mais de um cilindro, em ambiente aquoso, formarão uma bicamada como a mostrada pela Figura 2-5 a (ALBERTS, 2002).

Se a bicamada estiver na configuração planar, as bordas ficam em contato com o meio aquoso. O único modo de isso não ocorrer é a membrana se fechar nela mesma, sendo energeticamente mais favorável para isso a forma esférica do que qualquer outra forma (Figura 2-5 b). Tal formato da célula é energeticamente mais favorável, considerando a forma básica da sua membrana – a bicamada lipídica. No entanto, as diferentes células possuem estruturas diferenciadas relativas às suas funções, conferindo-lhes formatos diferentes do esférico, como por exemplo, as hemácias e os neurônios (ALBERTS, 2002).

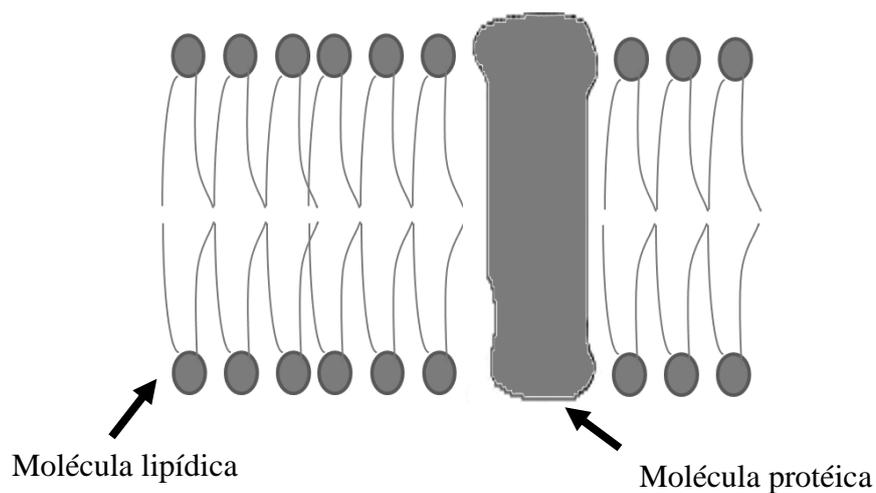


Figura 2-4 – Esquema da bicamada lipídica e molécula de proteína que compõem a membrana plasmática

Através da membrana são estabelecidos gradientes de concentração de diversas substâncias e sua estrutura apresenta permeabilidade seletiva a algumas que são necessárias ao metabolismo celular ou que devam ser excretadas.

O líquido que preenche o interior da bicamada lipídica possui constante dielétrica relativa de aproximadamente 2. Por outro lado, a constante dielétrica relativa do meio externo tem um valor aproximado ao da água, que é igual a 80. Devido a essa grande diferença das constantes dielétricas, para que um íon ou uma molécula carregada ultrapasse a bicamada é necessário que haja um grande acréscimo de energia, razão pela qual se diz que a bicamada lipídica representa uma barreira energética à passagem de íons e moléculas carregadas.

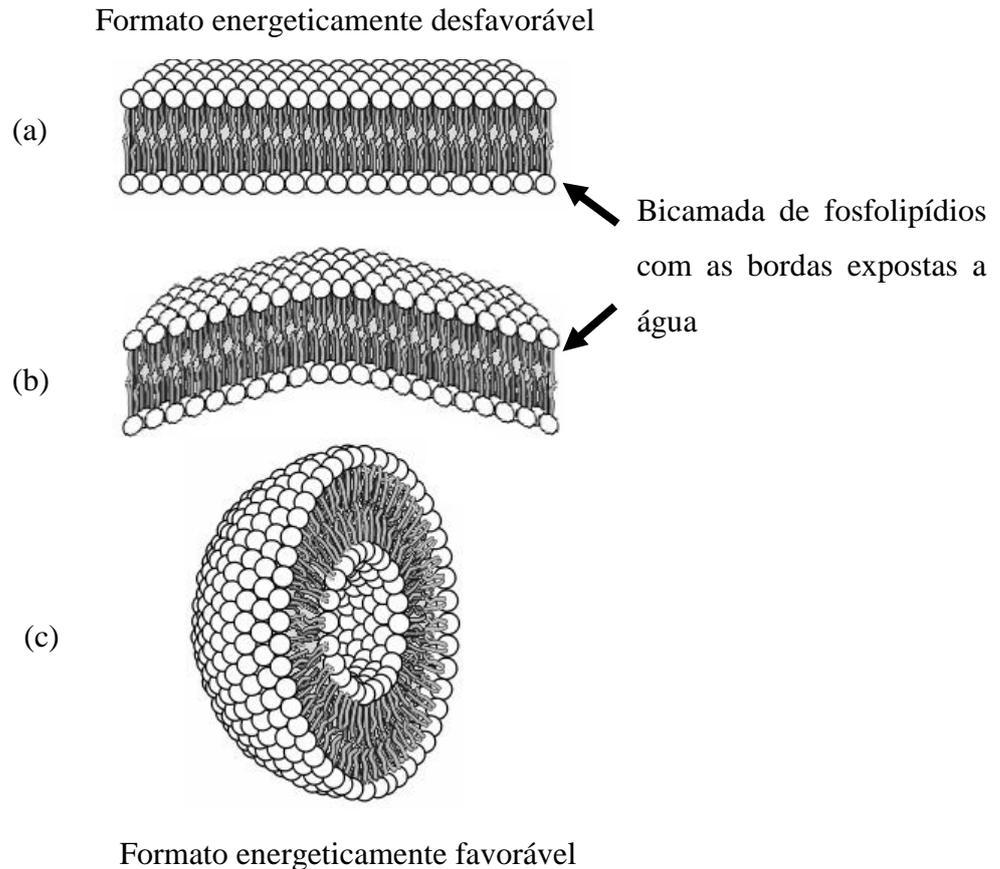


Figura 2-5 – Conformações possíveis para bicamada lipídica. (a) e (b) Conformação energeticamente menos favorável da bicamada lipídica, pois expõem as caudas hidrofóbicas ao contato com a água. (c) Conformação energeticamente mais favorável da bicamada lipídica, pois não expõem as caudas hidrofóbicas ao contato com a água (Imagem de domínio público com adaptações. Autor: Mariana Ruiz Villarreal).

2.1.3 A eletroporação

Eletroporação ou eletropermeabilização é um fenômeno que ocorre nas membranas plasmáticas das células quando estas são submetidas a campos elétricos, tornando-as permeáveis a substâncias às quais não o eram anteriormente. A membrana se torna permeável a tais substâncias pela formação de poros na sua bicamada lipídica (NEUMANN *et al.*, 1982). Dessa forma, a poração permite a destruição ou a fusão de células, a entrada de íons e moléculas no citoplasma, e que proteínas se insiram na sua membrana. A Figura 2-6 ilustra os resultados possíveis do processo de permeabilização de uma célula por exposição a um campo elétrico (PUC *et al.*, 2004).

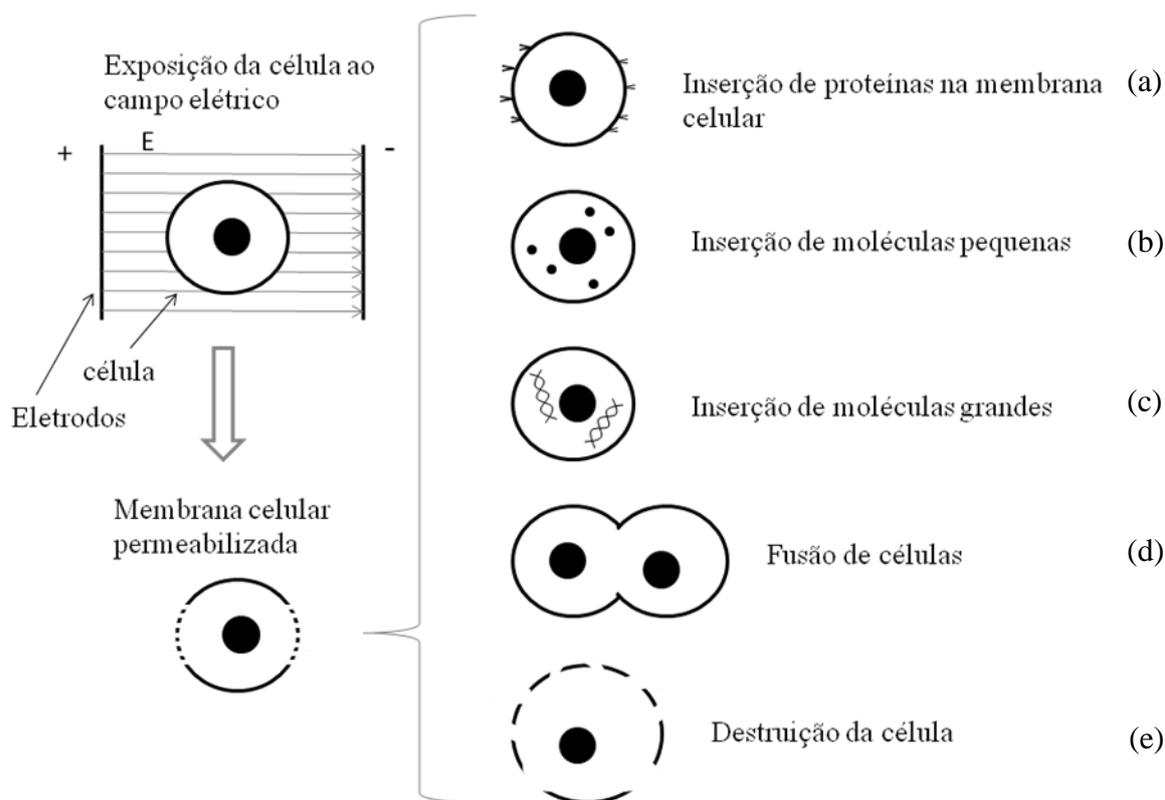


Figura 2-6 – Efeitos da exposição de uma célula a um campo elétrico e possíveis efeitos: (a) inserção de proteína na membrana celular, (b) inserção de moléculas pequenas, (c) inserção de moléculas grandes, (d) fusão de células e (e) destruição da célula. (Adaptado de PUC *et al.*, 2004).

A eletroporação constitui-se em método alternativo a tratamentos químicos, micro-injeções e ultra-som para a formação de poros em membranas celulares (YAKOVENKO, 2004).

A aplicação de um campo elétrico externo a uma célula inicia uma série de alterações mecânicas e elétricas em sua membrana, que tiveram seus diferentes aspectos descritos por muitos autores ao longo das últimas décadas (KINOSITA & TSONG, 1977, TSONG, 1991). Entretanto, os fenômenos que ocorrem na membrana, durante a aplicação de um campo elétrico que leva à sua permeabilização, ainda não são completamente esclarecidos.

Durante a aplicação de um campo elétrico as cargas ou dipolos elétricos das moléculas lipídicas são reorientados, enfraquecendo a barreira da bicamada lipídica contra íons, provocando um rearranjo das moléculas lipídicas e expandindo ou criando novos poros hidrofóbicos. A formação de um poro na membrana reduz a energia

necessária para um íon ou molécula atravessar a bicamada lipídica. Ocorre um rearranjo dos dipolos formando um conjunto de diferentes poros. Os poros são formados e se expandem, aumentando consideravelmente a condutividade da membrana, que cai rapidamente após a interrupção do campo externo (TSONG, 1991).

A formação de poros como fator responsável pelo aumento da permeabilidade da membrana é uma hipótese científica, sendo ainda hoje muito difícil registrá-los visualmente. Essa hipótese preconiza que os poros inicialmente criados pelo aumento da tensão transmembrana sejam poros hidrofóbicos e que esses se modifiquem espontaneamente para poros hidrofílicos, como ilustra a Figura 2-7 (TSONG, 1991, WEAVER & CHIZMADZHEV, 1996).

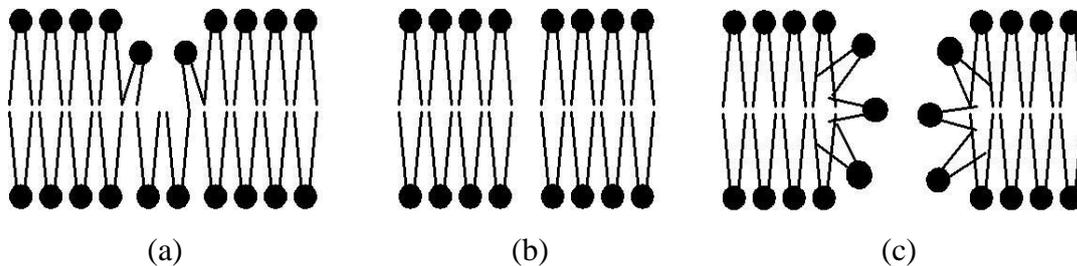


Figura 2-7 – Hipótese de formação de poros na membrana celular. (a) Deformação inicial, (b) poro hidrofóbico que se reorganiza em (c) poro hidrofílico.

Quando uma diferença de potencial V é aplicada entre dois eletrodos, onde haja uma suspensão de células, um campo elétrico surge nessa suspensão e tem-se como efeito a alteração da diferença de potencial através das membranas (TEISSI, *et al.*, 1999). O formato, o tamanho das células e a permeabilidade da membrana influenciam na diferença de potencial resultante. Essa diferença de potencial transmembrana é determinada pela equação 10:

$$\Delta\Psi = s \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E \cos\theta \quad (10)$$

onde $\Delta\Psi$ é a diferença de potencial na membrana, s é um fator relacionado com o formato da célula, g é uma função relacionada com a condutividade λ da membrana, r é o raio da célula, E é a intensidade do campo elétrico ao qual a membrana é submetida e θ é o ângulo entre a normal à membrana e a direção das linhas de campo. A função $g(\lambda)$ é relacionada às condutividades elétricas dos meios interno e externo à célula.

Além desses fatores, a distribuição das linhas de campo na célula também altera essa diferença de potencial, sendo que esse fator está relacionado com a geometria do eletrodo utilizado. Usualmente, adota-se que os eletrodos sejam placas planas e paralelas, e que produzam um campo uniforme como apresentado na Figura 2-2.

A diferença de potencial transmembrana causada pela aplicação de um campo elétrico de intensidade E excede a força dielétrica da membrana e, a partir de certo valor crítico, inicia a formação dos poros. Esse valor crítico pode variar entre 150 mV e 1 V (TSONG, 1991, KINOSITA & TSONG, 1977), dependendo da célula. Na etapa que se segue ao início da aplicação do campo elétrico, ocorre a expansão dos poros, enquanto permanecer o campo. Quando o campo cessa ou fica abaixo de um valor crítico ocorre a diminuição dos poros até que eles se fechem. O tempo de duração do poro é, normalmente, de dez minutos, dependendo do tipo de célula e da temperatura ambiente (YAKOVENKO, 2004).

Como o potencial de repouso interno da membrana é negativo em relação ao exterior, a primeira parte da membrana a ser permeabilizada é aquela voltada para o eletrodo positivo. Posteriormente, a região voltada para o eletrodo negativo também começa a ser permeabilizada (GEHL, 2003). Além disso, quanto mais afastada a região da membrana está dos eletrodos, a permeabilização ocorre mais fracamente ou não ocorre. Tal fato é expresso na equação (10) pela influência do termo $\cos\theta$.

A eletroporação ocorre tanto nas regiões lipídicas como protéicas (TSONG, 1991). Os canais iônicos da membrana, dependentes de tensão, apresentam abertura na faixa de 50 mV, valor bem menor que o de ruptura da membrana. A abertura desses canais não é capaz de impedir o aumento de $\Delta\Psi$ até o valor crítico. Esses canais, quando abertos, podem permitir a passagem de uma corrente muito maior do que são capazes de suportar e acabam por desnaturar devido ao efeito Joule (TSONG, 1991).

O efeito Joule é outra consequência do campo elétrico para a membrana, devido ao fluxo de cargas gerado, aumentando a temperatura da amostra. Esse efeito é, por muitas vezes, indesejado, mas pode ser controlado nos experimentos *in vitro*, diminuindo-se a quantidade de íons na solução ou diminuindo-se a quantidade de energia fornecida à amostra. Por outro lado, em estudos *in vivo*, esse efeito é mais difícil de ser controlado (TEISSIÉ *et al.*, 1999). Como o aquecimento é diretamente proporcional ao quadrado da intensidade de campo elétrico e à duração do pulso, tem-se que a melhor forma de diminuir esse efeito indesejado é diminuir a duração do pulso,

uma vez que a intensidade do campo elétrico é um fator crítico para a poração (TEISSIÉ *et al.*, 1999).

2.1.4 Outras questões referentes à eletroporação

Pelas etapas descritas percebe-se que o parâmetro crítico do campo elétrico que para formação dos poros é sua amplitude. Contudo, a área permeabilizada é aumentada pelo tempo de duração do pulso de tensão que origina o campo, e também pela sua frequência de repetição, uma vez que no intervalo entre um pulso e outro pode ocorrer o fechamento dos poros (TEISSI, *et al.*, 1999). Adicionalmente, se os parâmetros do campo (amplitude, largura de pulso e frequência) ultrapassam valores limites – diferentes para cada célula – a eletropermeabilização pode ser irreversível, pois as células não conseguem fechar os poros e acabam morrendo por perda do mecanismo homeostático.

Se a eletroporação é controlada pela intensidade do campo, a ruptura da membrana ocorre nos pontos onde o valor crítico da tensão transmembrana é atingido. A região da membrana celular onde ocorre a poração não depende da duração do pulso, entretanto a densidade dos poros é fortemente relacionada com esse fator, já que os poros aumentam seu tamanho durante a permanência do campo (TEISSI, *et al.*, 1999).

O valor crítico do campo é relacionado com o tamanho da célula. Células maiores são mais sensíveis a campos menos intensos do que células menores (TEISSI, *et al.*, 1999). Essa característica pode ser uma vantagem para se introduzir uma molécula em uma célula específica de um tecido, no caso da eletroporação *in vivo*. No sangue, por exemplo, os neutrófilos são maiores que as hemácias, então pode-se eletroporar aqueles sem que essas sejam alteradas.

Além das características do campo e das células, outras questões devem ser consideradas na eletroporação *in vitro*. Nos experimentos de Kinosita e Tsong, 1977, foi mostrado que existe uma estreita relação entre a temperatura e o tempo de fechamento dos poros, sendo maior em baixas temperaturas. Por exemplo, uma amostra a 37 °C retomou rapidamente a sua impermeabilidade a cátions enquanto que uma amostra idêntica a 3 °C ainda apresentava alta permeabilidade após 20h. Em relação à manipulação da amostra, esperar 15 min após a eletroporação parece evitar maiores prejuízos às células dessa amostra (GEHL, 2003).

A liberação de metal dos eletrodos na amostra também é uma preocupação apontada em alguns estudos, sobretudo no caso de pulsos longos. Além disso, a composição do meio também é apontada como uma importante variável na eletroporação *in vitro*, pois a diminuição da sua condutividade aumenta o percentual de sobrevivência das células após a poração (GEHL, 2003).

Já na eletroporação *in vivo* deve-se atentar à questão da distribuição do campo e à escolha dos eletrodos, que usualmente são de placa ou agulhas. Como o campo elétrico pode ser da ordem de 1 kV/cm, quanto maior a extensão tratada, maior deve ser a tensão aplicada, representando um maior perigo.

2.1.5 Aplicações da eletroporação

2.1.5.1 Introdução local de medicamentos - Eletroquimioterapia

A introdução local de medicamentos é uma importante aplicação da eletroporação, sendo empregada principalmente para o tratamento de tumores. A permeabilização das membranas das células a serem tratadas em combinação com as drogas quimioterápicas, às quais essa membrana é normalmente pouco permeável, potencializa os efeitos de tais drogas, aumentando as chances de sucesso do tratamento. Além de aumentar a penetração dos medicamentos, pulsos elétricos diminuem temporariamente a perfusão nos tumores, aumentando o tempo de atuação dos medicamentos nas células-alvo do tratamento (SERSA *et al.*, 2008). Os medicamentos normalmente usados em conjunto com a eletroporação são a bleomicina e a cisplatina. Estudos realizados em 1991 e 1993 (MIR *et al.*, 1991, BELEHRADEK *et al.*, 1993) reportaram que 72% dos tumores responderam ao tratamento de eletroquimioterapia e que 57% dos tumores cutâneos ou subcutâneos foram completamente tratados em pacientes que já haviam sido submetidos, sem sucesso, a tratamentos tradicionais com a quimioterapia convencional e cirurgia.

Um estudo de 2006 (MIR *et al.*, 2006) recomendou alguns procedimentos padrão nos protocolos de eletroquimioterapia. Em relação aos eletrodos, três diferentes tipos deveriam ser usados: eletrodos de placa, de agulha em arranjo linear e de agulha em arranjo hexagonal. Foram aplicados pulsos de campo elétrico de 100 μ s com amplitude de 1300 V/cm e de 1000 V/cm em combinação com a bleomicina e a cisplatina. Dos procedimentos relativos à escolha dos eletrodos, o estudo determinou

que para tumores menores que 1 cm, devem-se utilizar eletrodos de placa ou de agulhas paralelas e agulhas em arranjo hexagonal para tumores maiores que 1 cm. Em relação à frequência, deve-se utilizar 1 kHz ou 5 kHz. A frequência de 5 kHz é a única recomendada para eletrodos de agulha em geometria hexagonal.

Em estudos realizados no ano de 2001 por Kotnik e colaboradores foram comparados os efeitos de pulsos retangulares monofásicos e bifásicos quanto a quantidade de bleomicina absorvida pelas células e sua taxa de sobrevivência. Três conjuntos de pulsos foram comparados: 1- Oito pulsos retangulares monofásicos de 1ms e intervalo de 1 s entre os pulsos; 2- Oito pulsos retangulares bifásicos simétricos de 1ms e intervalo de 1 s entre os pulsos; 3- Quatro pulsos retangulares bifásicos de 2ms e intervalo de 1 s entre os pulsos. Os resultados mostraram que, para permeabilização de 50% das células, os pulsos bifásicos foram 20% menores em amplitude que os pulsos monofásicos. Os pulsos bifásicos aumentaram em 20% a captação de bleomicina pelas células e não houve diferença estatística entre a amplitude dos pulsos que provocaram a morte de 50% das células (KOTNIK *et al.*, 2001).

2.1.5.2 Transferência de DNA e RNA

Na transferência de DNA, a membrana da célula é permeabilizada e a molécula de DNA é forçada a entrar no citosol por forças eletroforéticas. Isto ocorre durante a aplicação dos pulsos, que podem ser de corrente contínua (CC) e baixa tensão (YAKOVENKO, 2004).

O primeiro estudo que relatava a transferência de genes foi publicado por Neumann *et al.*, (1982). Nessa época foram desenvolvidos alguns equipamentos de eletroporação para transferência de DNA que utilizavam pulsos com decaimento exponencial. Posteriormente foram desenvolvidos eletroporadores de pulsos retangulares, em que a largura do pulso e a sua amplitude podiam ser controladas separadamente (GEHL, 2003).

Como Gehl destaca em seus estudos (GEHL, 2003), existem três padrões de pulsos usualmente utilizados na transferência de DNA. O primeiro seria de pulsos curtos de alta amplitude, que garantiria boa eficácia e pouca perda de células. Seis pulsos de amplitude 1,4 kV/cm e 100 μ s de duração (HELLER *et al.*, 1996) representam um exemplo deste padrão. Outra possibilidade seria de pulsos mais longos e de menor amplitude, que teria melhor efeito eletroforético. Como exemplo, oito pulsos de intensidade 200 V/cm e largura de 20 ms (MIR *et al.*, 1999). Uma terceira possibilidade

usa uma combinação de pulsos curtos de alta amplitude, seguido de pulso longo e de baixa amplitude, para guiar o DNA pela membrana permeabilizada. Desta forma, a transferência de DNA é maior para uma menor permeabilização (BUREAU *et al.*, 2000).

2.1.6 Outras aplicações do uso de campos elétricos em células

2.1.6.1 Descontaminação bacteriana

A aplicação de pulsos de campos elétricos em valores letais para bactérias é utilizada para descontaminação de líquidos e alimentos (SEN GUPTA *et al.* 2005). Esse processo utilizado como alternativo ao processo térmico para descontaminação tem como vantagem menos alteração dos nutrientes e das propriedades organolépticas dos alimentos (TSUKAMOTO, 2007). Valores de amplitude do campo elétrico requeridos para essa aplicação são maiores que os utilizados em eletroporação de células de mamíferos, sendo na faixa de 10 a 100 kV/cm. Por outro lado, a largura de pulso é tipicamente, na faixa de 1 μ s a 10 μ s (SCHOENBACH *et al.*, 2001).

2.1.6.2 Manipulação intracelular

A eletroporação de membranas intracelulares requer os mesmos valores críticos de tensão transmembrana típicos requeridos para a membrana plasmática. Contudo, essas membranas, sendo de espessura de 1 μ m exigem campos da ordem de 10 kV/cm (SCHOENBACH *et al.*, 2001).

A Figura 2–8 apresenta relações ótimas de intensidade de campo elétrico (V/cm) e largura de pulso (s), para algumas aplicações de eletroporação, que foram determinados em estudos da literatura (SCHOENBACH *et al.*, 2001).

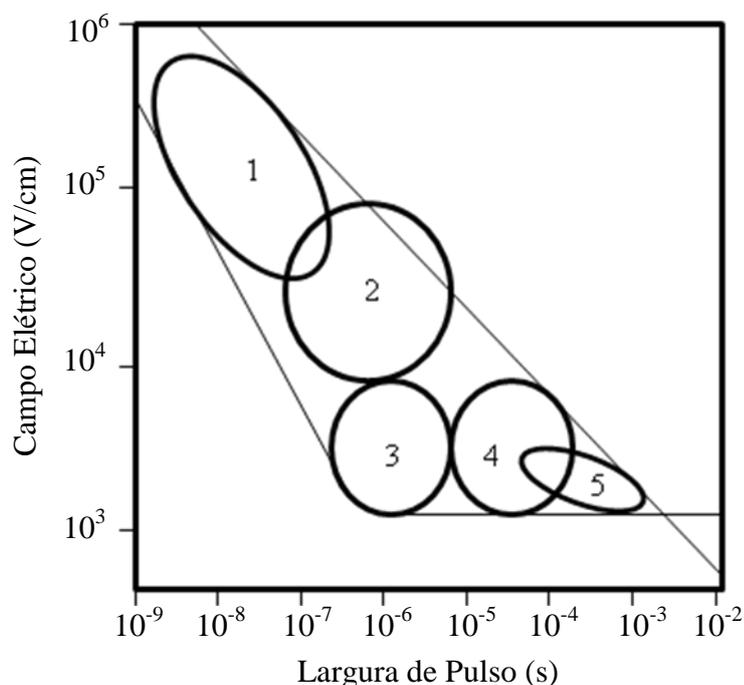


Figura 2-8 – Relações ótimas entre a intensidade de campo elétrico e largura de pulso para diferentes aplicações. 1 – Eletromanipulação intracelular; 2 – Descontaminação bacteriana; 3 – Prevenção de acúmulo de microorganismos; 4 – Introdução de medicamentos; 5 – Transferência de genes. (Adaptado de SCHOENBACH *et al.*, 2001).

2.1.6.3 Pesquisa em diferenciação de célula-tronco

Células-tronco são células não diferenciadas, capazes de proliferar, de se renovar, de se transformar em células diferenciadas e de regenerar tecidos (TUCH, 2006). Existem dois tipos de células-tronco, embrionárias e não-embrionárias, que se distinguem na capacidade de se diferenciarem. As embrionárias são ditas totipotentes, pois podem se diferenciar em qualquer tipo de célula e são originadas da massa de células formada dias após a fertilização. As não-embrionárias são multipotentes, o que significa que podem se diferenciar em um grupo restrito de células. Esses tipos de célula-tronco estão presentes em adultos, normalmente na medula óssea. Tais células, em especial as não-embrionárias, vêm sendo usadas há algumas décadas em vários tipos de tratamento, como o de lesão na medula espinhal, fratura de ossos não restaurados, mal de Parkinson, mal de Huntington, diabetes tipo 1 e doenças isquêmicas do coração (TUCH, 2006).

Muitos estudos têm procurado os meios pelos quais as células-tronco desencadeiam a sua diferenciação, para auxiliar naqueles tratamentos, em especial nas doenças isquêmicas do coração. Muitos fatores são identificados como possíveis

responsáveis por esse processo, como por exemplo, um meio extracelular apropriado, estímulos mecânicos ou elétricos.

No caso dos estímulos elétricos, já foi mostrado em pesquisas que cardiomiócitos de adultos quando estimulados eletricamente aumentavam as suas propriedades mecânicas de liberação de cálcio (HOLT *et al.*). Experimentos em miócitos ventriculares de ratos mostraram que a estimulação elétrica por pulsos retangulares de 2 ms, 5V/cm e 1 Hz, aumenta a expressão de genes cardíacos e provoca a formação de *gap junctions* (RADISIC *et al.*). Tais resultados indicam a potencialidade da eletroporação nas pesquisas referentes à diferenciação de células-tronco.

2.1.7 Métodos de avaliação da eletroporação

Não existe um método padrão para se verificar diretamente a poração, como, por exemplo, uma imagem da membrana mostrando os poros. Os métodos de evidenciar a poração são, normalmente, indiretos (WEAVER & CHIZMADZHEV, 1996). Uma forma da permeabilização das células ser quantificada é pela penetração de marcadores que, normalmente, não permeiam a membrana, como o azul de tripano ou marcadores fluorescentes como iodeto de propídio e calceína (TEISSI, *et al.*, 1999). O vazamento de ATP também é uma medição indireta para quantificar a quantidade de células permeabilizadas. No caso de eritrócitos, Kinota e Tsong (KINOSITA & TSONG, 1977) quantificaram as células que sofreram hemólise pela dosagem de hemoglobina na solução após a aplicação do campo, enquanto Scwister e Deuticke (SCHWISTER & DEUTICKE, 1985) verificaram a permeabilização dessas células pelo vazamento de K⁺.

A verificação da permeabilidade pelo aumento da condutividade da membrana e imagens fluorescentes também são métodos para avaliação da extensão da eletroporação (Tsong, 1991). A condutividade da membrana aumenta com a permeabilização das células, sendo possível avaliar a sua extensão pela medida da condutividade total da amostra, uma vez que a condutividade do meio extracelular permanece constante (PAVLIN *et al.*, 2005, KRASSOWSKA & FILEV, 2007). A condutividade, ao longo do tempo pode ser avaliada medindo-se a tensão e a corrente na amostra (Equação 11) (PAVLIN *et al.*, 2005):

$$\sigma(t) = \frac{I(t)}{V(t)} \cdot \frac{d}{S} \quad (11)$$

em que $\sigma(t)$ é a condutividade ao longo do tempo em S/m, $I(t)$ é a corrente medida ao longo do tempo em A, $V(t)$ é a tensão aplicada em Volts, d é a distância entre os eletrodos em metros e S é a superfície de contato da amostra com os eletrodos em m².

De acordo com Krassowska & Filev (2007) valores usuais de condutividade são: condutividade intracelular – 0,455 S/m, condutividade extracelular – 5 S/m e condutividade da solução que preenche o poro – 2 S/m. Segundo, Pavlin *et al.*, 2005, valores de condutividade usuais de amostras usadas para aplicações *in vitro* são: 0,1275 S/m ou 1,58 S/m.

Capítulo 3

Projetos de eletroporadores

Em termos elétricos, os eletroporadores podem apresentar saídas em tensão ou corrente. Para o caso mais simples, com saída em tensão, é possível determinar o valor do campo elétrico conhecendo-se a diferença de potencial fornecida e a distância entre os eletrodos (Equação 9). Se usado o eletroporador com saída em corrente é necessário medir a tensão de saída ou determinar a impedância da amostra para, só então, estimar o valor do campo elétrico aplicado.

Nas próximas seções é apresentada uma série de soluções comumente empregadas para projetos de eletroporadores comerciais e acadêmicos. Os projetos a seguir explicados geram pulsos de tensão, cujo formato pode ser: decaimento exponencial, retangular monofásico, retangular bifásico, senoidal ou ainda uma composição desses formatos. Muitos autores têm comparado os efeitos desses formatos de pulso em relação à eficácia da eletroporação e à sobrevivência das células após a aplicação do campo.

3.1.1 Técnicas fundamentadas em descarga de capacitores

O eletroporador com sinal de saída de tensão é muito mais utilizado que aquele com saída em corrente. Das técnicas normalmente adotadas a mais antiga é mostrada no circuito da Figura 3-1 (PUC *et al.*, 2004). Uma fonte de tensão é conectada a um capacitor por uma chave, ocorrendo desta forma o carregamento desse capacitor. Alternando-se a posição da chave, o capacitor é conectado em paralelo a uma resistência fixa (R) e à carga (R_L), a qual representa a amostra de suspensão de células. Neste circuito a tensão sobre a carga (V_{ZL}) apresenta formato exponencial dado pela Equação 12.

$$V_{ZL} = V_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (12)$$

em que V_0 é a tensão da fonte e τ , a constante de tempo de descarga do capacitor, dada pela Equação 13.

$$\tau = (R // R_L) \cdot C \quad (13)$$

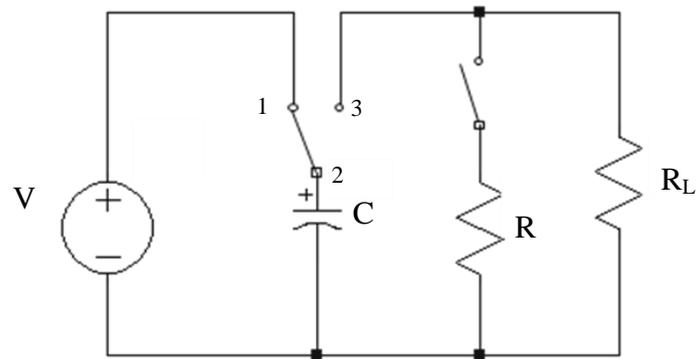


Figura 3-1 – Diagrama elétrico simplificado de um eletroporador por pulsos de tensão obtidos com a descarga de um capacitor.

Dependendo do valor de R_L essa descarga pode ser aproximada como um pulso retangular como mostrado na Figura 3-2. Uma carga de baixa resistência, entretanto, requer alta corrente causando um sensível decaimento no pulso de tensão. (BERTACCHINI *et al.*, 2007, PUC *et al.*, 2004). Para aumentar a constante de tempo e diminuir este decaimento de tensão o capacitor deve ser dimensionado de tal forma que a constante de tempo do decaimento da tensão seja muito maior que a duração do pulso, mesmo nas condições menos favoráveis de carga.

Se $R \gg 10 \cdot R_L$, pode-se aproximar a constante de tempo por um valor fixo igual a $R_L \cdot C$. Mesmo assim essa técnica não permite boa definição e flexibilidade da amplitude e da largura de pulso do campo elétrico. Além disso, a frequência do sinal é limitada pelo tempo necessário para recarga e chaveamento do capacitor.

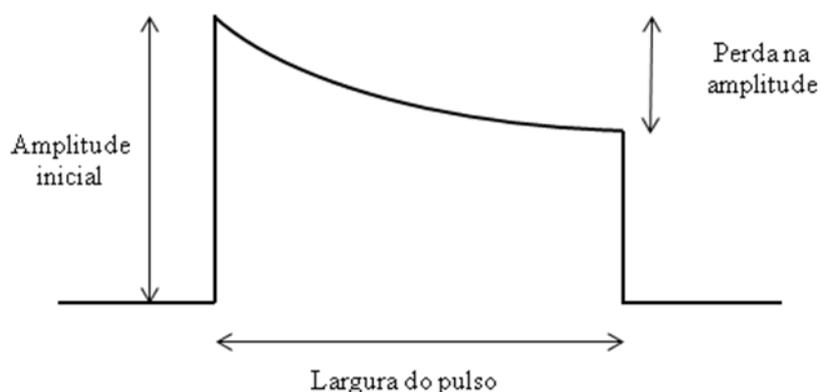


Figura 3-2 – Pulso de tensão gerado pela descarga de um capacitor.

3.1.2 Geradores de pulsos retangulares

Para tentar contornar os problemas relativos à baixa exatidão na determinação do campo elétrico e ao longo período entre pulsos, surgiram eletroporadores de pulsos retangulares com controle eletrônico. A Figura 3-3 (PUC *et al.*, 2004) mostra um gerador de onda quadrada. Porém, nesse caso, é utilizado um circuito de disparo para acionar uma chave MOSFET de potência ou um IGBT, que faz o chaveamento da tensão na carga. Tal configuração permite melhor controle da frequência de repetição dos pulsos e da largura de pulso. O circuito de disparo fecha a malha de controle para tentar manter a tensão na carga constante independente do restante do circuito.

A amplitude da saída ainda é determinada pela amplitude da fonte, e os problemas relativos ao tempo de carga e descarga do capacitor, bem como da corrente de saída, continuam influenciando o desempenho global do circuito. Se a resistência R_L for baixa, a combinação entre a corrente de descarga do capacitor e a largura do pulso na carga pode ser tal que a fonte não tenha capacidade de manter a carga mínima no capacitor para de manter o regime de pulsos. Esse problema pode ser resolvido aumentando-se a capacitância utilizada, bem como aumentando a potência da fonte (PUC *et al.*, 2004).

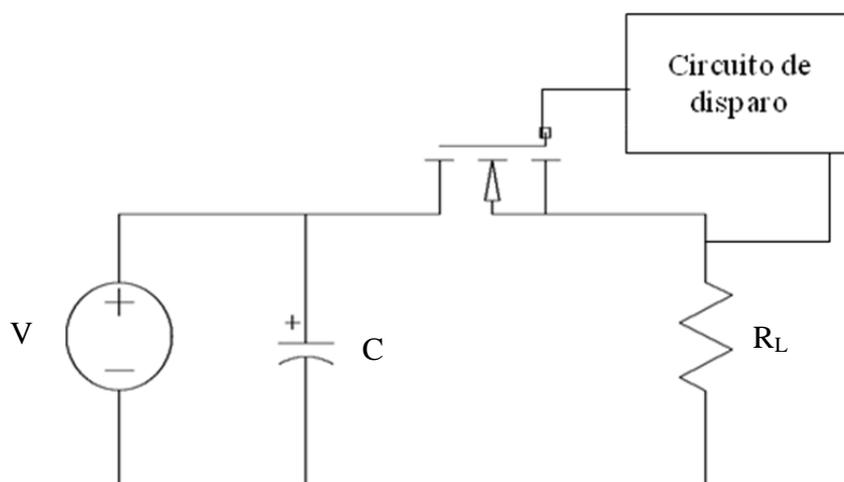


Figura 3-3 – Diagrama simplificado de circuito de eletroporação baseado em descarga de capacitor, com pulsos controlados por chaveamento de um MOSFET.

Esse circuito pode ainda ser usado em combinação com um transformador de pulsos, permitindo o uso de um gerador de tensão mais baixa. Por outro lado, piora a flexibilidade em relação à frequência, pois ela é limitada pelas características do transformador e, além disso, a relação não linear entre a densidade de fluxo B e a amplitude do campo H no transformador tornam o projeto mais complicado e sujeito a distorções nas formas de onda (BERTACCHINI *et al.*, 2007).

Uma alternativa aos circuitos anteriores é apresentada na Figura 3-4. Uma fonte de alta tensão regulada é chaveada sobre a carga por um circuito independente. O controle da fonte é responsável por manter a tensão constante enquanto que o circuito de chaveamento é responsável por determinar a largura e a frequência dos pulsos aplicados à carga (TOKMAKÇI, 2006).

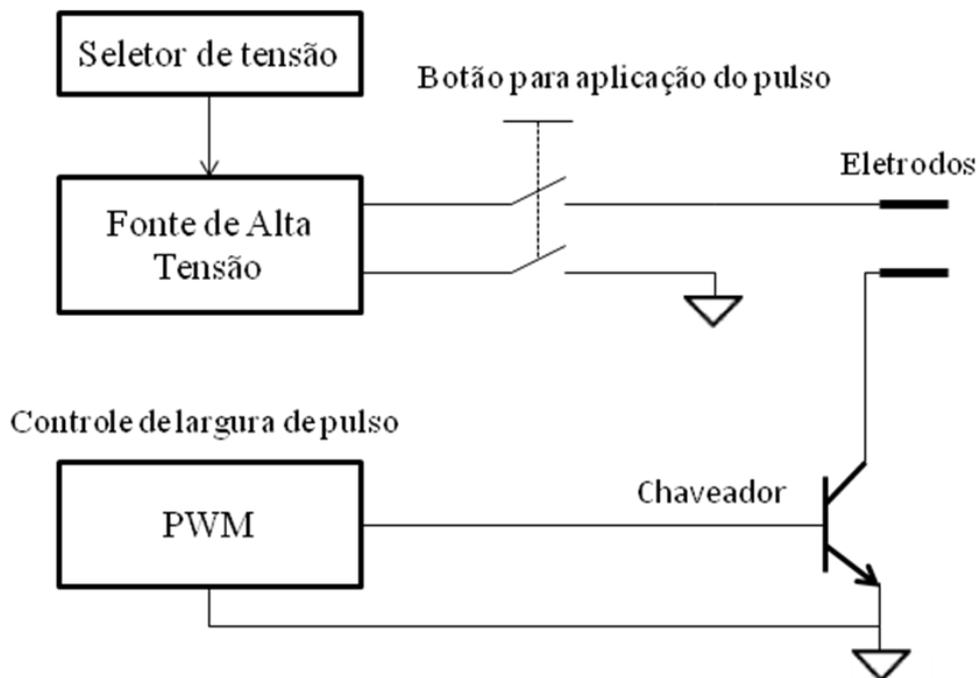


Figura 3-4 – Eletroporador baseado em pulsos retangulares monopolares, com controle de amplitude, largura e intervalo entre os pulsos.

3.1.3 Gerador analógico de sinais arbitrários

Apesar da maioria dos trabalhos com eletroporação empregarem pulsos retangulares de tensão, algumas aplicações tem sido desenvolvidas com o uso de sinais arbitrários. PUC e colaboradores, em 2004, revisaram algumas destas topologias que também podem ser classificadas quanto à polaridade do sinal de saída em sinais

monofásicos (Figura 3-5) ou bifásicos (Figura 3-6) (PUC *et al.*, 2004). No primeiro caso o autor apresenta uma topologia onde o sinal desejado é levado a um amplificador de potência transistorizado de dois estágios através de um *buffer* de ganho unitário. O primeiro estágio do amplificador é composto por um MOSFET e um resistor conectado a fonte do transistor. O MOSFET conduz de acordo com o sinal de tensão que o gerador de funções fornece entre a porta e a fonte do transistor, e a tensão de saída é, então, modificada (PUC *et al.*, 2004). Depois o sinal é entregue ao estágio de corrente. Esse estágio é um seguidor de fonte formado por MOSFETS de potência conectados em paralelo. O último estágio satisfaz a potência determinada pela impedância entre os eletrodos. Esse projeto permite alta flexibilidade de todos os parâmetros elétricos, mas a corrente e tensão de saída são limitadas pelas características dos transistores (PUC *et al.*, 2004).

Um exemplo de circuito com saída bifásica é apresentado na Figura 3-6. O sinal é fornecido por um gerador de sinais arbitrários a um estágio amplificador de tensão que por sua vez alimenta um estágio de saída responsável por fornecer corrente a carga. A estrutura é bastante semelhante à descrita anteriormente. Adicionalmente este circuito é espelhado, permitindo a geração de sinais bipolares e, para maior controle do sinal de saída, a tensão sobre a carga é realimentada para a entrada. Este controle de tensão em malha fechada permite a aplicação de qualquer forma de onda bipolar na carga.

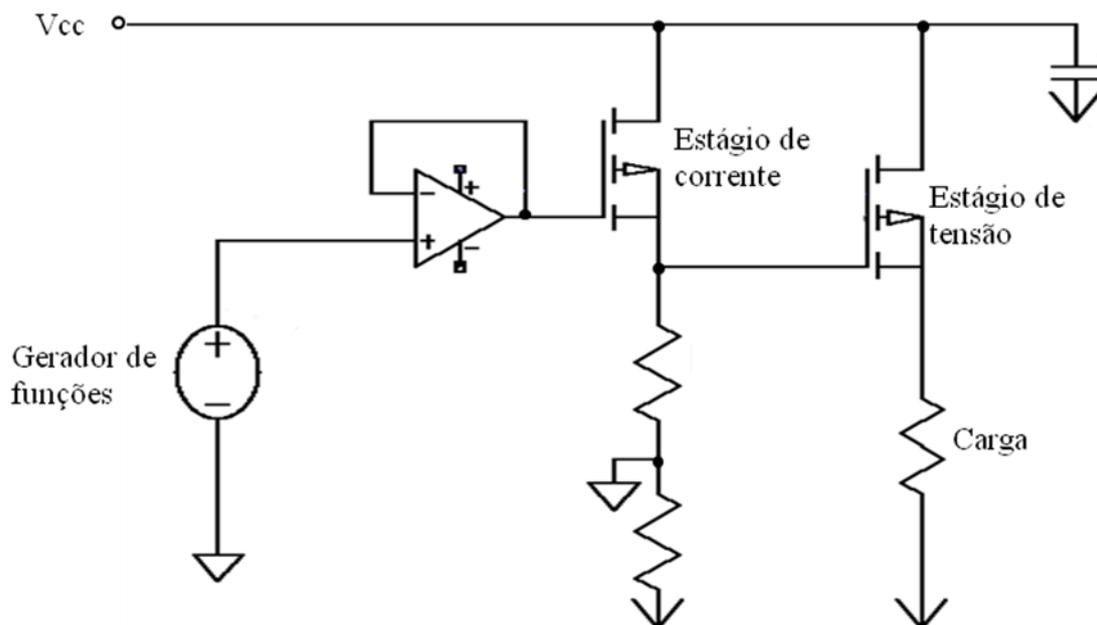


Figura 3-5 – Esquema de um gerador analógico de sinais arbitrários monofásicos.

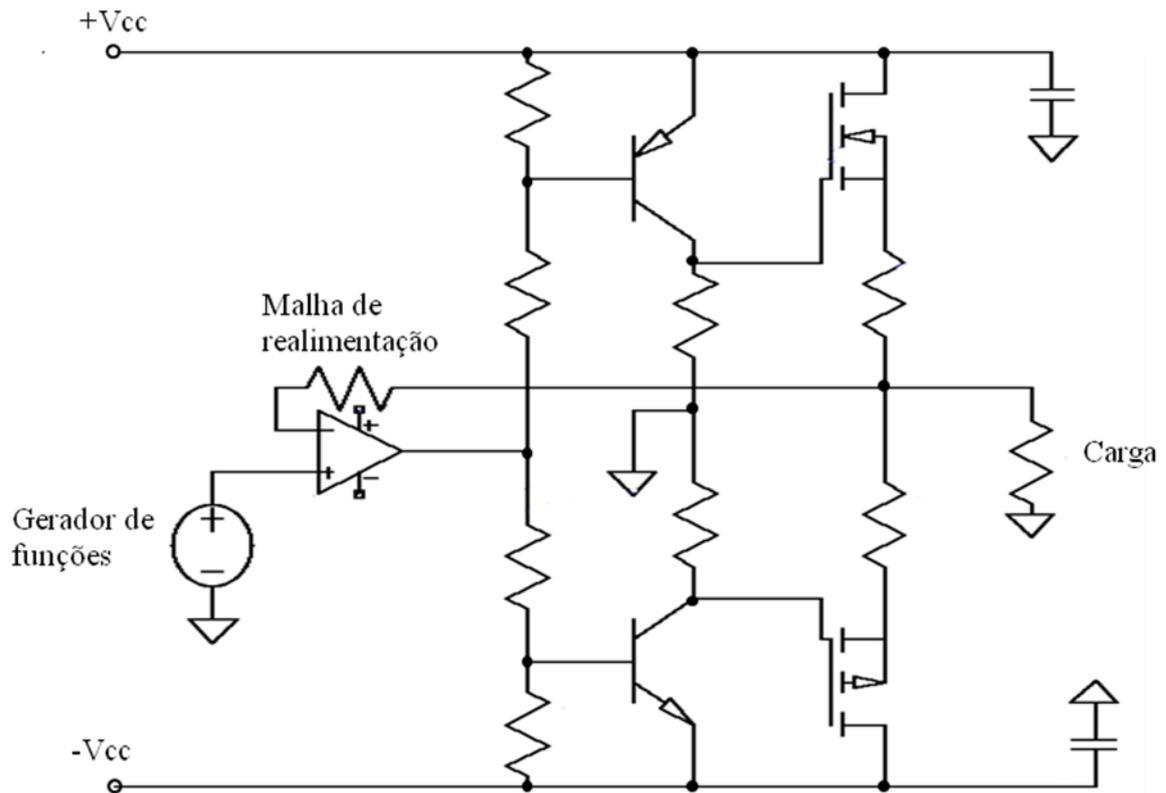


Figura 3-6 – Esquema de um gerador analógico de sinais arbitrários bifásicos.

Yakovenko (2004) desenvolveu um sistema digital de eletroporação com um conversor digital-analógico para geração dos pulsos, seguido por estágios de amplificação de tensão e corrente. O formato do pulso é programável (retangular, rampa crescente e decrescente, senoidal, exponencial), incluindo pulsos bipolares. O sistema, apresentado na Figura 3-7 (YAKOVENKO, 2004), possui tensão de saída na faixa de - 150 V a +150 V e resistência interna de 500 Ω . O uso de amplificadores de tensão e corrente da alta velocidade permite que o sistema amplifique as tensões e corrente em uma taxa de 1 V/ns. Um circuito de medida que monitora os sinais de tensão e corrente entregues à carga é feito por meio de amplificadores e um conversor analógico-digital. Todo o controle do sistema é realizado digitalmente por um microcomputador. O sistema possui um *software* para que protocolos de eletroporação sejam gravados e recuperados pelo usuário.

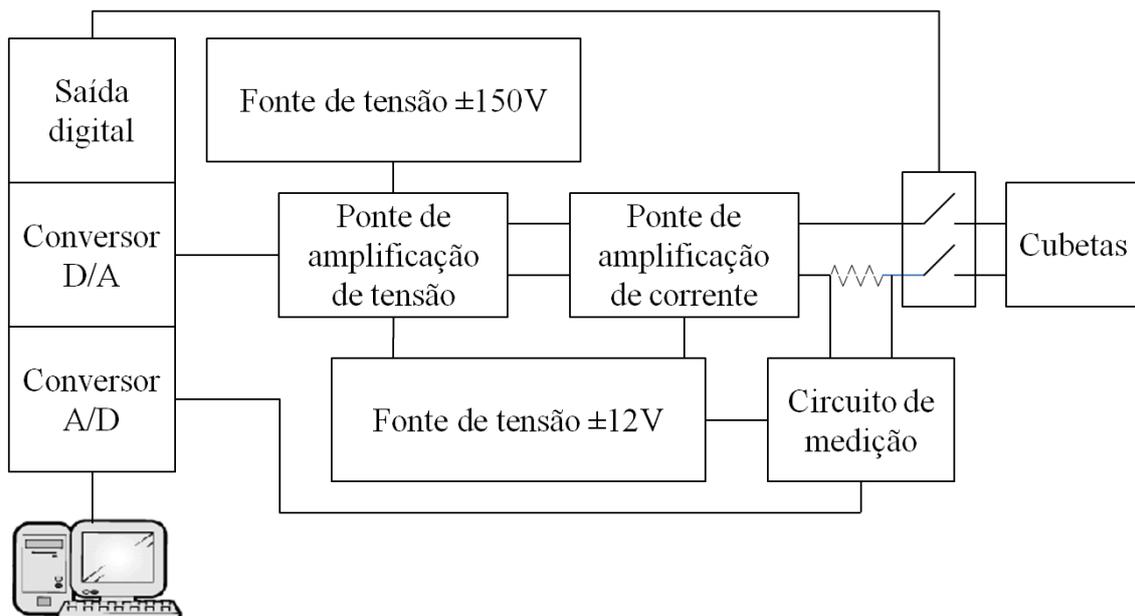


Figura 3-7 – Diagrama do sistema digital de eletroporação idealizado por Yakovenko (2004)

3.2 Fontes de alta tensão

Nas seções 3.1.1 a 3.1.3 foram apresentadas as técnicas mais usadas em dispositivos de eletroporação. Um item importante comum a essas técnicas é a necessidade de fontes de alta tensão. Essa seção se dedica ao estudo de algumas configurações de fontes.

3.2.1 Fonte linear de tensão

A Figura 3-8 apresenta uma fonte linear de tensão, composta por um transformador em 60 Hz, um retificador e um filtro capacitivo. A comparação entre a tensão de saída (V_o) e a tensão de referência ($V_{o,ref}$) do circuito de controle ajusta a corrente de base do transistor. Nesse caso, o transistor funciona como um resistor ajustável (operando na região ativa), apresentando perda de potência, o que é um fator de limitação ao uso desse tipo de configuração. Além disso, há a necessidade do uso de transformador em 60 Hz, que são maiores que os transformadores para alta frequência. Por outro lado, a fonte linear é simples de ser montada e seus componentes são usuais. Além disso sofrem baixa interferência eletromagnética.

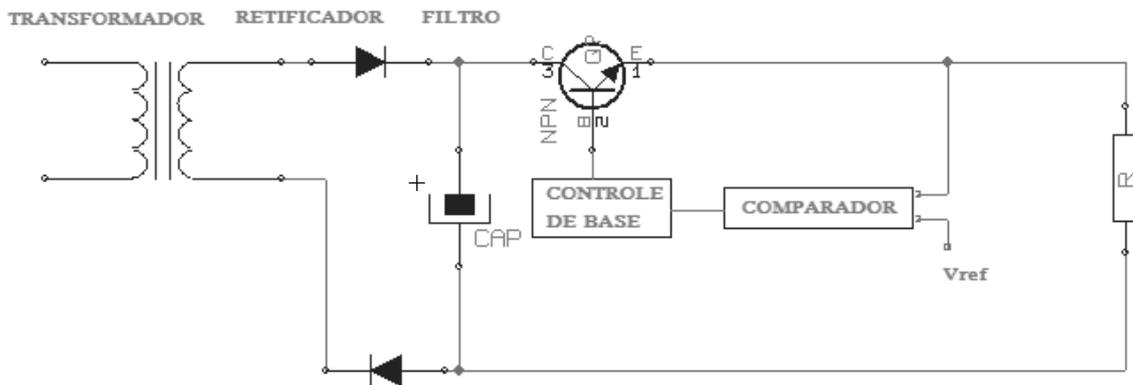


Figura 3-8 – Diagrama esquemático de uma fonte linear de tensão.

3.2.2 Fonte de tensão chaveada

Nas fontes chaveadas a transformação de um nível de tensão de CC para outro é feito usando circuitos conversores DC – DC. Nesse tipo de circuito, os transistores operam como chaves, o que apresenta menor perda de potência do que o caso anterior, em que operavam na região ativa, possibilitando maiores níveis de tensão e corrente. A Figura 3-9 apresenta um diagrama de bloco simplificado de uma fonte chaveada. A entrada em corrente alternada (AC) da rede é retificada e filtrada, passa pelo módulo de conversão DC – DC, que converte o nível de tensão da entrada. Esse módulo é composto por um chaveamento em alta frequência para produzir uma tensão AC em alta frequência no primário do transformador. A saída, no secundário do transformador, é então retificada e filtrada para gerar a tensão de saída (V_o). A saída da fonte é controlada por comparação com uma tensão de referência ($V_{o,ref}$).

As vantagens da fonte chaveada são que ela possui dimensão menor que a fonte linear e que possui maior rendimento, pois dissipa menos potência. Como desvantagens, sofre e causa alta interferência eletromagnética, fazendo-se necessário o uso de filtros e blindagens. Além disso, os seus componentes não são tão usuais quanto os da fonte linear, portanto mais difíceis de serem encontrados no mercado.

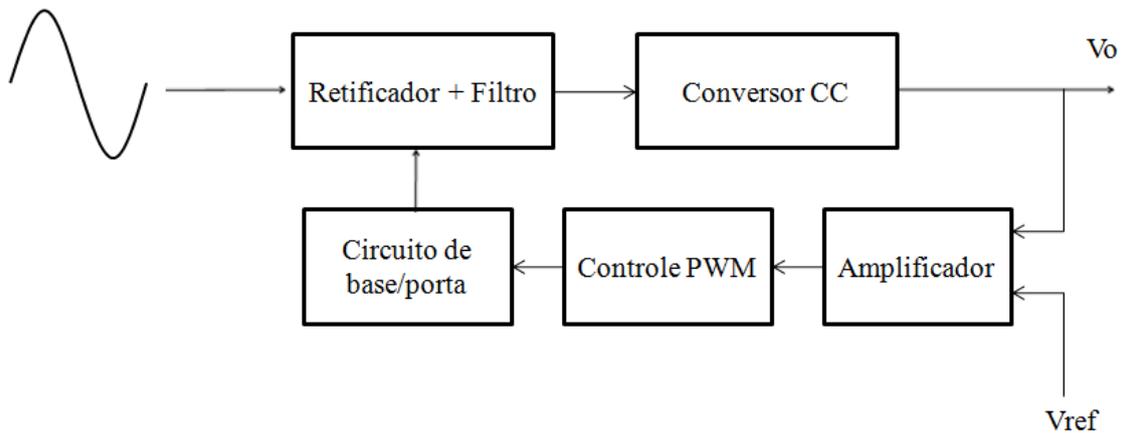


Figura 3-9 – Diagrama de blocos de fonte chaveada.

3.2.3 Fonte de tensão modular

Especificamente para a obtenção de altas tensões é possível interligar em série N fontes de tensão, controladas separadamente, compondo N módulos, como se pode ver no esquema da Figura 3-10. Cada uma das N fontes pode ser conectada à carga de forma independente, o que permite a programação de 2^N diferentes esquemas de conexão e níveis de tensão de saída.

Com a mesma filosofia de somar tensões também é possível usar circuitos mais simples, como os conhecidos multiplicadores de tensão, com diodos e capacitores, ou os chamados geradores de Marx (MANKOWSKI & KRISTIANSEN, 2000). Os multiplicadores de tensão permitem que se tenha na saída valores múltiplos da tensão de entrada, como exemplificado pelo circuito da Figura 3-11. Os geradores de Marx funcionam carregando N capacitores em paralelo, ou seja, com todas as chaves abertas. Posteriormente são chaveados em série, de forma que a tensão aplicada será o produto entre N e a tensão V_m , como apresentado na Figura 3-12 (MANKOWSKI & KRISTIANSEN, 2000).

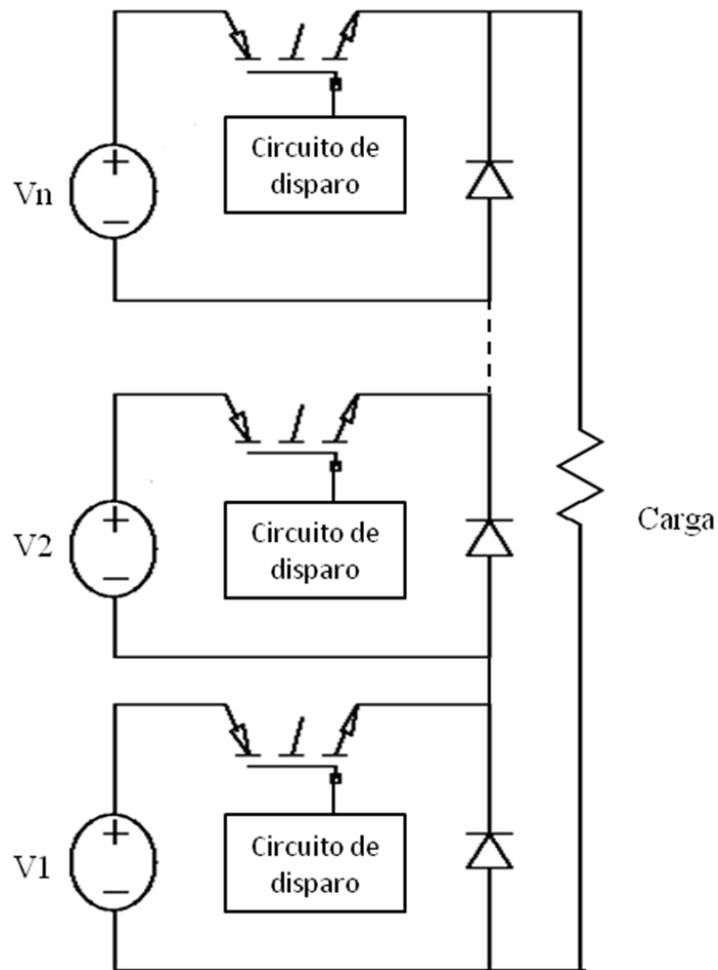


Figura 3-10 – Fonte modular de tensão formada por N módulos.

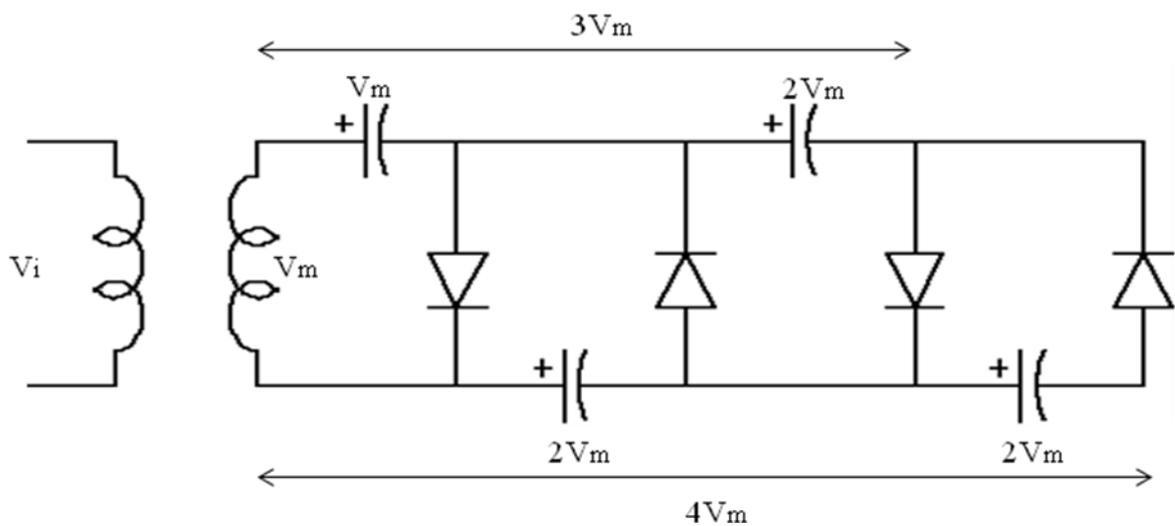


Figura 3-11 – Circuito multiplicador de tensão

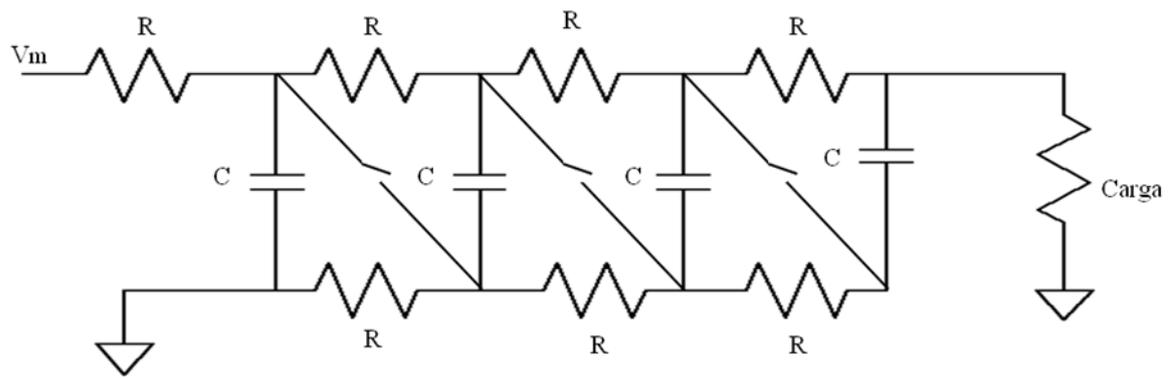


Figura 3-12 – Gerador de Marx .

3.3 *Eletroporadores comerciais*

São descritos neste tópico as principais características de alguns equipamentos de eletroporação encontrados atualmente no mercado. Nesta descrição (Tabela 1) estão consideradas as características de amplitude, largura, frequência e formato dos pulsos.

Tabela 1 – Descrição de eletroporadores comerciais

Nome	Faixa de tensão	Faixa de largura de pulso	Intervalo entre os pulsos	Formato do pulso	observações
ECM 830	5-500 V modelo de baixa tensão 30-3000 V modelo de alta tensão	10 μ s – 999 μ s modelo de baixa tensão 1 ms – 999 ms - modelo de baixa tensão 1 s – 10 s - modelo de baixa tensão 10 μ s – 600 μ s - modelo de alta tensão	100 ms – 10 s	monofásico	Entrada 110 V/220 V 5 V de resolução 500 A modelo de baixa tensão 100 A modelo de baixa tensão Eletrodos: cubetas de 1mm, 2 mm e 4 mm
ADITUS™ Medical CythorLab™	0 – 600 V - modelo de baixa tensão 0-3000 V- modelo de alta tensão	400 ms modelo de baixa tensão 5 ms modelo de alta tensão		Monofásico e bifásico	200 W de consumo
CelljecT Uno	1800 a 2500 V	5 ms		Decaimento exponencial	Eletrodos: cubetas de 1,2 mm ou 4 mm
CelljecT Duo	20 a 2500 V	1,5 ms a 7 s		Decaimento exponencial	Eletrodos: cubetas de 1 mm, 2 mm, 4 mm e 10 mm

3.4 Estado da arte

Na tentativa de entender melhor os fenômenos envolvidos no processo de poração, buscar um maior controle sobre a poração e aumentar sua eficiência, novos sistemas de eletroporação têm sido desenvolvidos com métodos de ajuste dos parâmetros dos pulsos de campo elétrico. Muitos pesquisadores destes novos sistemas também concentram seus esforços no desenvolvimento de novos eletrodos e cubetas.

Com o objetivo de construir um eletroporador de baixo custo, programável, Rodamporn *et al.* (2007) desenvolveram um sistema que consiste em um módulo de controle, num gerador de pulso e em um MOSFET de potência utilizado como chave. O sistema é capaz de gerar campos elétricos monofásicos de 100 a 1000 V/cm com largura de pulso programável entre 10 μ s a 20 ms, com 1 μ s de resolução. O sistema foi testado com células HeLa¹. Para esse tipo de célula, o autor mostrou que campo de 600 V/cm de amplitude combinado a uma largura de pulso de 5 ms, apresentou a maior taxa de permeabilização, em torno de 48,7%.

Como se sabe, as regiões da membrana em que ocorre a maior permeabilização são aquelas voltadas para os eletrodos. A partir desse conceito, Rebersek *et al.* (2007) desenvolveram novos sistema e protocolo de eletroporação que permitiam a mudança automática da direção das linhas de campo elétrico e com isso, aumentar a área permeabilizada e a eficiência da transferência de genes. Essa mudança foi permitida pela elaboração de um tipo de cubeta com dois pares de eletrodos (Figura 3-13), sendo então possível que a direção das linhas de campo fossem variadas de 90°.

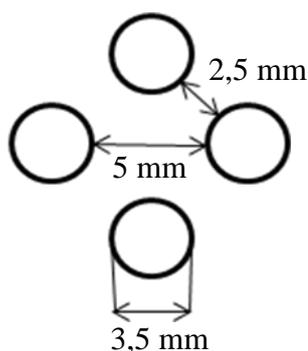


Figura 3-13 – Geometria dos eletrodos desenvolvidos por REBERSEK *et al.* (2007).

¹ Células de tumor cervical de Henrietta Lacks.

O eletroporador gera de 1 a 32 pulsos retangulares de 80 a 400 V e duração entre 10 e 1000 μ s, com frequência de repetição de 0,1 a 5000 Hz. O sistema foi testado comprovando o aumento da transferência de genes com as mudanças na direção do campo durante a eletroporação, sem haver aumento da perda das células. Os pulsos utilizados nos experimentos eram de 200 V de amplitude, de 1 ms de largura e de 1 Hz de frequência

Outro problema relacionado aos eletroporadores está na amplitude da tensão necessária para se obter o campo elétrico requerido. Uma alternativa que começou a ser explorada a partir do final da década de 90 são os chamados equipamentos de micro-eletroporação, no quais as células passam por tubos ou lâminas, onde os eletrodos estão espaçados de dimensões micrométricas. Estes sistemas com o espaçamento reduzido entre os eletrodos diminuem significativamente a tensão que o equipamento precisa fornecer para resultar na mesma amplitude de campo. Por conseguinte, reduzem o dano às células devido à alta tensão, aumentam a eficiência da permeabilização e controlam a eletroporação individualmente em cada célula (HUANG & RUBINSKY, 1999).

Em 2005 foi desenvolvido por Khine *et al.* uma lâmina capaz de seletivamente imobilizar e eletroporar células individualmente. O uso da lâmina dispensa a manipulação de eletrodos e pipetas. A eficiência da eletroporação foi testada com células HeLa com tensões menores que 1 V. A tensão transmembrana média requerida para eletroporação foi de $0,51 \pm 0,13$ V.

He *et al.* (2006) construíram micro-lâminas com a técnica *lift-off* e fotolitografia, nas quais são aplicados pulsos de radio-frequência que são programáveis por computador utilizando-se *LabView*. Segundo Ziv *et al.*(2008), em seu estudo com micro-eletroporação em células-tronco mesenquimais, a aplicação de pulsos em corrente contínua para um grande volume de células deve ser evitada, pois causam a eletrólise da suspensão de células e bolhas de gás são formadas próximas aos eletrodos. Quando essas bolhas passam pelo canal de fluxo das células, podem bloqueá-lo, desconectando o sistema. Um esquema conceitual do seu sistema é apresentado na Figura 3-14.

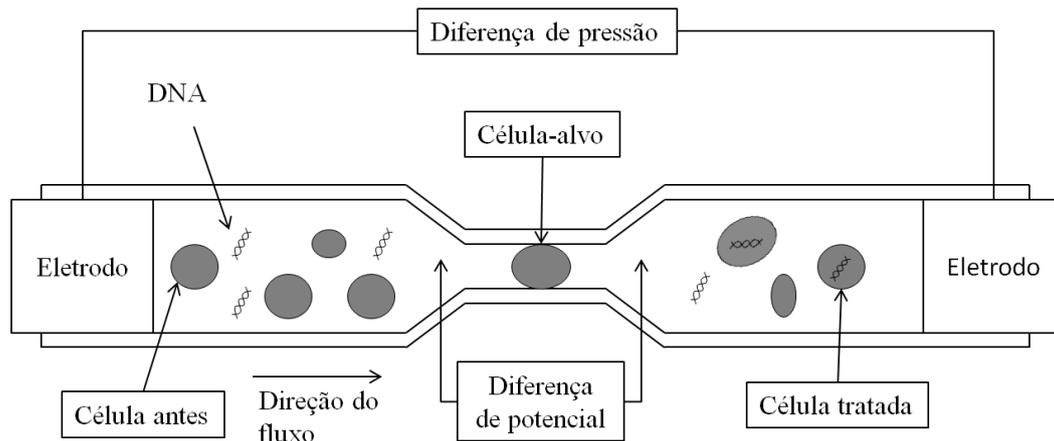


Figura 3-14 – Esquemático de um micro canal de eletroporação. Devido à diferença de espessura entre a parte estreita e a parte larga, o campo elétrico com o valor desejado é aplicado somente no segmento estreito, onde as células conseguem passar uma de cada vez. Adaptado de (Ziv *et al.*, 2008) com permissão dos autores.

Sang *et al.* (2007) construíram um micro-eletroporador que opera sob baixa tensão ininterrupta em corrente contínua na faixa de 7 V a 15 V. A micro-lâmina tira proveito da condutividade iônica do eletrodo gel para controlar o campo elétrico que é aplicado às células, sem gerar bolhas nos micro-canais.

Wang & Lu (2006) desenvolveram um eletroporador a partir de uma micro-lâmina feita de um polímero polidimetilsiloxano (PMDS). Nessa lâmina foram feitos canais de 33 μm de largura, por onde se faz passar as células. Nesses canais, a tensão aplicada é constante, de forma que o tempo de exposição da célula ao campo elétrico é controlado pela velocidade do fluxo por eles. Experimentos realizados em células de ovário de hamster chineses (CHO) mostraram que valor limiar para poração é de 400 V/cm. Com um aparato semelhante ao anteriormente mencionado, os autores (WANG & LU, 2008) analisaram a inserção de moléculas pequenas, que normalmente não permeiam a membrana celular, em CHO, e verificaram a taxa de transferência e a viabilidade das células após a poração. As moléculas testadas foram ácidos nucleicos corados conhecidos como *SYTOX green*. Na Figura 3-15 são apresentados os resultados da permeabilização da células para campos de até 800 V/cm com duração de 0,2 ms, 1,1 ms e 6,0 ms. O resultado de cerca de 80% - o melhor valor obtido - de células permeabilizadas viáveis foi obtido com a intensidade de campo de 800 V/cm e duração

de 1,1 ms. O percentual de 70% foi o máximo atingido para duração de 6,0 ms com intensidade de campo de aproximadamente 500 V/cm.

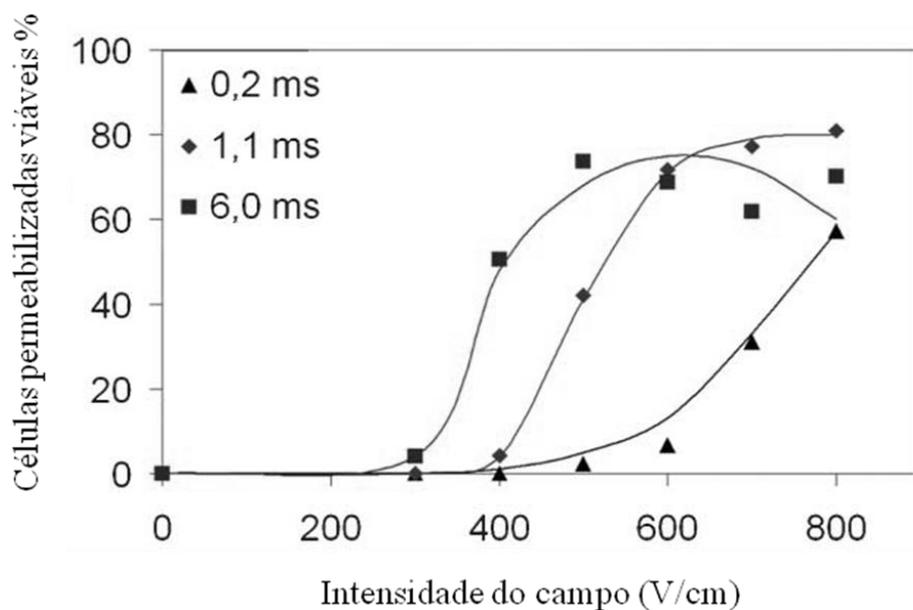


Figura 3-15 – Eficiência de permeabilização de CHO submetidos a campos elétricos distintos (WANG & LU, 2008) com permissão dos autores.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos parâmetros de campo elétrico utilizado por diversos autores abordados neste texto, e auxilia na escolha das faixas e características dos pulsos a serem gerados pelo dispositivo de que trata o presente trabalho.

Tabela 2 – Valores de amplitude de campo (I) elétrico, largura do pulso (D) e frequência/intervalo entre os pulsos (T), utilizados para permeabilização de diversos tipos celulares.

Autor/ano	I (V/cm)	D	T	Formato	Observações
(KINOSITA & TSONG, 1977)	3700	20 μ s		Retangular monofásico	Causa poração em eritrócitos sem dano permanente
(ZIMMERMAN N et al., 1980)	4000	40 μ s		Monofásico	Dano permanente em timócitos
	14000	<5 μ s		Monofásico	Não ocorre dano permanente em timócitos

(NEUMANN <i>et al.</i> , 1982)	8000 (inicial)	5 μ s		Decaimento exponencial	Valores ótimos para transferência de DNA
Autor/ano	I (V/cm)	D	T	Formato	Observações
(CHANG, 1989)	1800 2100	2 ms	40 Hz	CA (radiofrequên cia)	Maior efetividade na transferência de genes
(HELLER <i>et al.</i> , 1996)	1400	100 μ s		Retangular monofásico	
(MIR <i>et al.</i> , 1999)	200	20 ms	1 Hz	Retangular monofásico	Valores ótimos para transferência de DNA, utilizando uma sequência de 8 pulsos
(BUREAU <i>et al.</i> , 2000)	800	100 μ s		Retangular monofásico	Combinação de pulsos de alta tensão, com largura de pulso menor e pulsos de baixa tensão e maior largura de pulso
	80	83 ms			
(MIR <i>et al.</i> , 2006)	1300 e 1000	100 μ s		Retangular monofásico	Valores para eletroquimioterapia (bleomicina e cisplatina)
(WANG & LU, 2006)	400			Retangular Monofásico	Limiar para poração de CHO- K1
(RODAMPORN <i>et al.</i> , 2007)	600	5,0 ms		Retangular Monofásico	Máxima transferência em células HeLa
(WANG & LU, 2008)	800	0,2 ms		Retangular Monofásico	80% de permeabilização de amostra de CHO
(WANG & LU, 2008)	500	6,0 ms		Retangular Monofásico	70% de permeabilização de células CHO
(CAO <i>et al.</i> , 2010)	750	2,2ms		Decaimento Exponencial	Transferência de DNA para células-tronco embrionárias

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1 Especificações do dispositivo

Como visto nos capítulos precedentes, para se atender às diversas aplicações de eletroporação é necessária a variação dos parâmetros dos pulsos para os diferentes protocolos e por vezes no mesmo protocolo de eletroporação. A fim de se atender a essa necessidade a característica mais relevante do equipamento desenvolvido neste projeto foi a possibilidade de escolha dos parâmetros individuais dos pulsos de campo elétrico. Dessa forma, foi priorizado o estabelecimento de uma raquitetura que possibilitasse o controle de amplitude, largura e intervalo entre os pulsos de campo elétrico.

De acordo com os valores apontados pela literatura, existe uma larga faixa de amplitudes de campo elétrico, largura e intervalo, que podem ser utilizadas, dependendo muito do objetivo do estudo (Tabela 2 e Figura 2–8

Figura 2-8). Baseado nisso, e considerando-se que o equipamento em desenvolvimento será utilizado em aplicações *in vitro*, os pulsos gerados, por tal equipamento, terão as seguintes características:

1. Forma: retangular monofásico
2. Amplitude de campo elétrico máxima de 4 kV/cm
3. Largura de pulso: mínimo de 250 μ s e máximo de 100 ms
4. Intervalo mínimo: de 10 ms.
5. Quantidade de pulsos escolhida pelo usuário, que pode, para cada pulso, determinar valores distintos para parâmetros mencionados anteriormente.

A escolha dos parâmetros pelo usuário foi feita por meio de um *software*, que permite que estes sejam salvos para posterior utilização. Tal programa também tem a função de comandar o início da eletroporação.

Na Figura 4-1 são mostradas as cubetas da *Life Technologies* usadas no processo de eletroporação com o equipamento construído. Tal cubeta é formada por eletrodos de alumínio e apresenta duas regiões internas: uma com espaçamento de 4 mm e outra com

espaçamento de 1,5 mm. Utilizando-se o espaçamento de 1,5 mm é necessário gerar 600 V de tensão, para obter a amplitude de campo desejada.

O circuito foi construído com base em uma fonte de tensão linear, regulada (Figura 4-2), cuja tensão de saída pode ser ajustada por um programa de computador escrito em linguagem G (LabView, *National Instruments*, EUA). Os pulsos de tensão foram obtidos pelo chaveamento desta tensão sobre a amostra. Toda a temporização relativa a este chaveamento, largura do pulso e intervalo entre pulsos, também foi controlada pelo programa de computador. A interface do programa permite a escolha do número de pulsos e para cada pulso estabelecido pode-se variar os parâmetros: amplitude, largura de pulso e intervalo entre os pulsos. Estes parâmetros são usados, então, para a programação dos temporizadores e do conversor D/A de uma placa de aquisição de sinais DAQCard-6062E (*National Instruments*, EUA), responsável pela interface entre o programa e os demais circuitos do eletroporador.

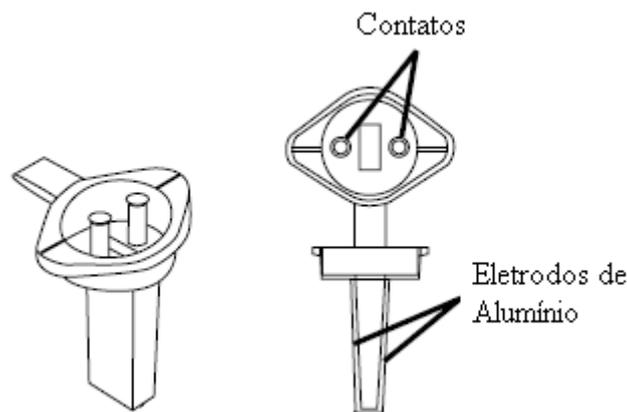


Figura 4-1 – Cubeta contendo eletrodos de alumínio.

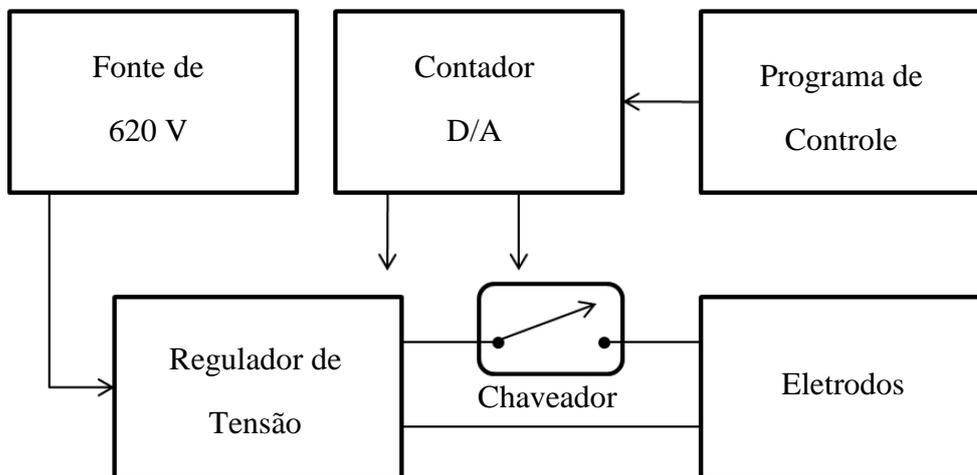


Figura 4-2 – Diagrama do eletroporador desenvolvido.

4.2 Circuito

O circuito do eletroporador foi dividido em três partes de forma a facilitar o entendimento, são elas: fonte de 620 V, regulador de tensão e chaveamento. O circuito da fonte (Figura 4-3) é composto por um transformador de núcleo de ferro, com potência de 10 VA, cujo primário é conectado a rede de 127 V e sua saída é de 220 V eficaz, ou seja, 311 V de pico. Um dobrador de tensão na saída do transformador retifica e eleva a tensão para 620 V.

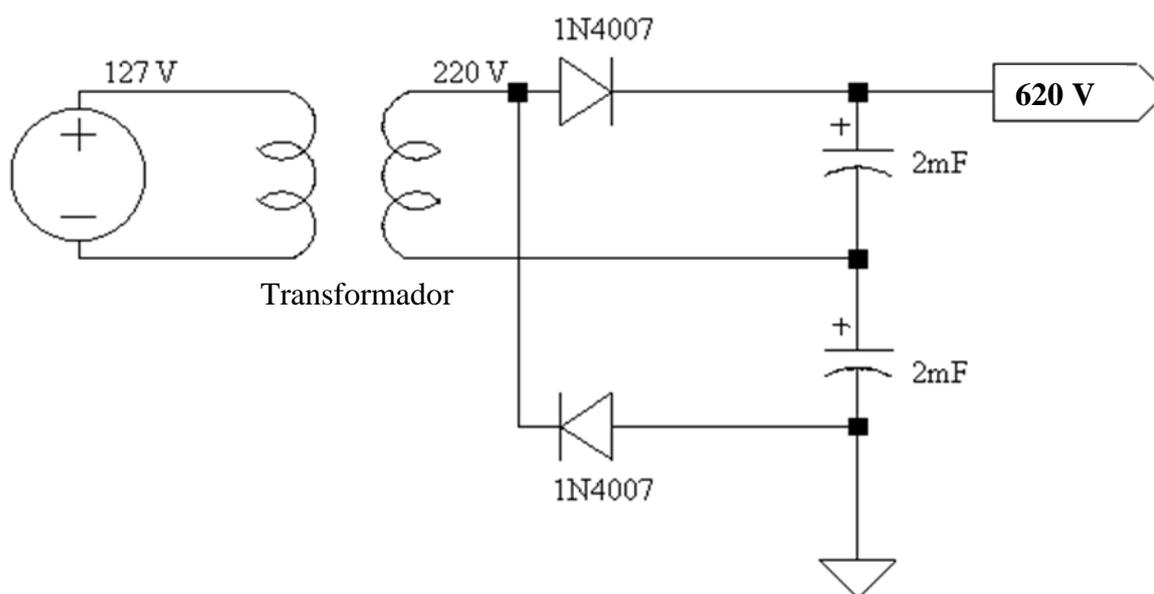


Figura 4-3 – Circuito da fonte de 620 V composto por um multiplicador de tensão.

A tensão de saída da fonte é então fornecida ao circuito do regulador de tensão, apresentado pela Figura 4-4, e é controlada por meio do transistor T_1 (SA 1807). A tensão aplicada à carga é amostrada pelo divisor resistivo e comparada com uma tensão analógica de referência. A saída do comparador aciona o transistor T_2 (BU508A), cujo coletor está ligado à base do transistor SA 1807, fechando a malha de controle proporcional.

A seguir é explicitado o equacionamento do regulador série, a partir da análise da Figura 4-4.

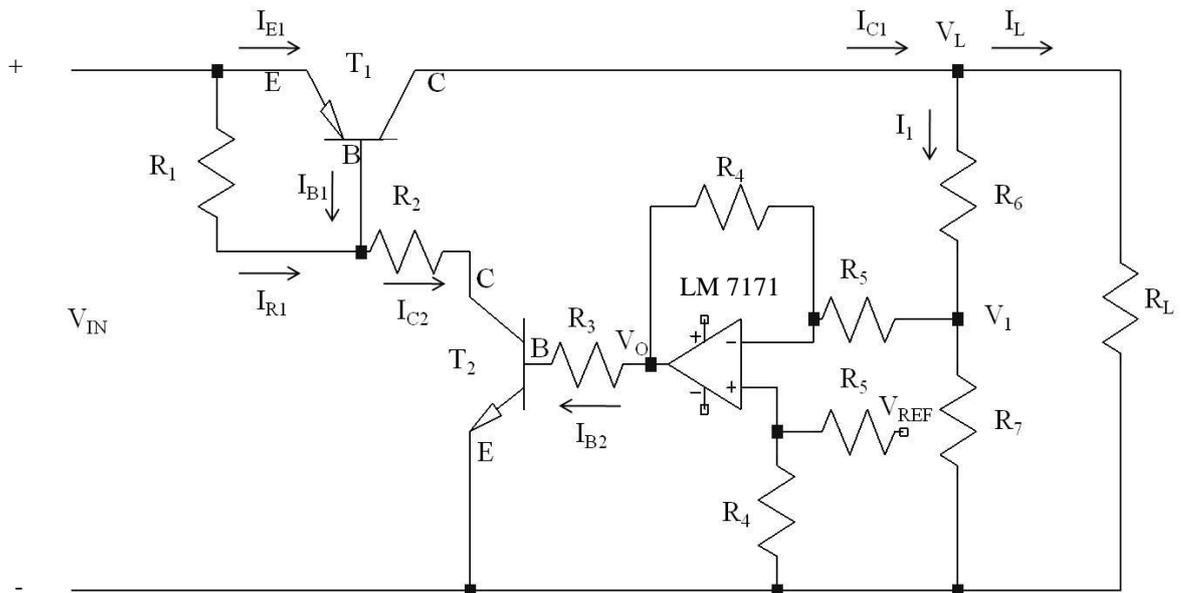


Figura 4-4 – Regulador série do circuito do eletroporador.

Na saída do amplificador operacional a tensão V_0 é determinada pela Equação (14), na qual a tensão V_2 é a tensão de referência, V_{REF} do circuito.

$$V_0 = (V_2 - V_1) \cdot \frac{R_4}{R_5} \quad (14)$$

Se $R_4 + R_5 \gg R_7$, pode-se dizer que a tensão V_1 é igual a:

$$V_1 = \frac{V_L}{R_6 + R_7} \cdot R_7 \quad (15)$$

Substituindo (19) em (18),

$$V_0 = \left(V_2 - \frac{R_7}{R_6 + R_7} \cdot V_L \right) \cdot \frac{R_4}{R_5} \quad (16)$$

Analisando o circuito, tem-se ainda que:

$$V_0 - V_{R_3} - V_{BE_2} = 0. \quad (17)$$

Então

$$I_{E_2} = \frac{V_{R_3}}{R_3} = \frac{V_0 - V_{BE_2}}{R_3} \quad (18)$$

Substituindo (16) em (18),

$$I_{E_2} = \frac{\left(V_2 - \frac{R_7}{R_6 + R_7} \cdot V_L \right) \cdot \frac{R_4}{R_5} - V_{BE_2}}{R_3} \quad (19)$$

Mas,

$$I_{C_2} = \beta_2 \cdot I_{E_2} \quad (20)$$

Então, substituindo (19) em (20)

$$I_{C_2} = \beta_2 \cdot \left[\frac{\left(V_2 - \frac{R_7}{R_6 + R_7} \cdot V_L \right) \cdot \frac{R_4}{R_5} - V_{BE_2}}{R_3} \right] \quad (21)$$

Como ainda

$$I_{C_2} = I_{B_1} + I_{R_1} \quad (22)$$

$$I_{C_2} = I_{B_1} + \frac{V_{EE_1}}{R_1} \quad (23)$$

$$I_{C_1} = \beta_1 \cdot I_{B_1} \quad (24)$$

$$I_{C_2} = \frac{I_{C_1}}{\beta_1} + \frac{V_{EB_1}}{R_1} \quad (25)$$

Então,

$$\frac{I_{C_1}}{\beta_1} + \frac{V_{EB_1}}{R_1} = \beta_2 \cdot \left[\frac{(V_2 - \frac{R_7}{R_6 + R_7} \cdot V_L) \cdot \frac{R_4}{R_5} - V_{BE_2}}{R_3} \right] \quad (26)$$

Como

$$I_{C_1} = I_1 + I_L \quad (27)$$

$$I_{C_1} = \frac{V_L}{R_6 + R_7} + \frac{V_L}{R_L} \quad (28)$$

$$I_{C_1} = \frac{R_L \cdot V_L + (R_6 + R_7) \cdot V_L}{R_L \cdot (R_6 + R_7)} \quad (29)$$

$$\frac{R_L \cdot V_L + (R_6 + R_7) \cdot V_L}{\beta_1 \cdot R_L \cdot (R_6 + R_7)} + \frac{V_{EB_1}}{R_1} = \beta_2 \cdot \left[\frac{(V_2 - \frac{R_7}{R_6 + R_7} \cdot V_L) \cdot \frac{R_4}{R_5} - V_{BE_2}}{R_3} \right] \quad (30)$$

Reorganizando a Equação 30 obtém-se

$$\begin{aligned} & \frac{\beta_1 \cdot \beta_2 \cdot R_4 \cdot R_7 \cdot R_L + R_3 \cdot R_5 \cdot R_L + R_3 \cdot R_5 \cdot R_6 + R_3 \cdot R_5 \cdot R_7}{\beta_1 \cdot R_3 \cdot R_5 \cdot R_L \cdot (R_6 + R_7)} \cdot V_L = \\ & = \frac{\beta_2 \cdot R_4}{R_3 \cdot R_5} \cdot V_2 - \frac{V_{BE_2} \cdot \beta_2}{R_3} - \frac{V_{EB_1}}{R_1} \end{aligned} \quad (31)$$

A equação 31 pode ser simplificada, fazendo-se as seguintes considerações:

$$R_4 + R_5 \gg R_7$$

$$R_4 \gg R_5$$

$$R_6 \gg R_7$$

$$R_6 + R_7 \gg R_L$$

Obtendo-se a Equação 32

$$V_L = \frac{R_6}{R_7} \cdot V_2 - \frac{R_3 \cdot R_5 \cdot R_6}{\beta_2 \cdot R_1 \cdot R_4 \cdot R_7} \cdot V_{BE2} \quad (32)$$

A partir da equação 32 pode-se determinar o comportamento da tensão na carga V_L de acordo com a tensão de referência V_2 .

Considerando I_{C1} aproximadamente igual a I_L , pode-se dizer que a corrente de coletor a ser suportada pelo transistor do regulador série T_1 era de 0,3 A, se considerada uma carga de no mínimo 2,2 k Ω (Seção 4.4). A tensão V_{CE} de T_1 precisava ser de 600 V, pois de acordo com o princípio de regulador, quando a tensão na carga for nula a tensão entre coletor e emissor no transistor será máxima. A potência dissipada no transistor T_1 foi calculada na Tabela 3. A primeira coluna da tabela apresenta valores de tensão na carga desde o valor máximo 600 V até 0 V. A segunda coluna apresenta o valor da tensão correspondente entre o coletor e emissor de T_1 . A terceira coluna exibe a corrente em cada caso, considerando $R_L = 2,2$ k Ω . A potência dissipada no transistor é determinada na quarta coluna pela multiplicação da tensão V_{CE} pela corrente I_{C1} . Verifica-se, portanto, que a potência máxima dissipada é de aproximadamente 40 W.

O transistor escolhido foi o modelo 2SA 1413, pois atende aos parâmetros de tensão e de corrente exigidos. No entanto, a potência máxima dissipada desse transistor é de 10 W. Como não se encontrou transistor de maior potência, foram colocados transistores em paralelo, de modo que a corrente fosse dividida pelos transistores e, portanto, seria dividida também a potência dissipada.

Tabela 3 – Cálculo da tensão V_{CE1} , da corrente I_{C1} e da potência dissipada no transistor do regulador série (T_1) para $R_L = 2,2$ k Ω

Vcarga (V)	V_{CE} (V)	Corrente (A)	Potencia dissipada (W)
600	0	0,27	0,0
550	50	0,25	12,5
500	100	0,23	22,7
450	150	0,20	30,7
400	200	0,18	36,4
350	250	0,16	39,8
300	300	0,14	40,9
250	350	0,11	39,8
200	400	0,09	36,4
150	450	0,07	30,7

Vcarga (V)	V_{CE} (V)	Corrente (A)	Potencia dissipada (W)
100	500	0,05	22,7
50	550	0,02	12,5
0	600	0,00	0,0

Em relação ao transistor T₂, a tensão V_{CE2} foi de no mínimo 600 V e a corrente I_{C2} foi calculada pela Equação 25 como igual 8 mA, tomando-se como valor de I_{B1,0} calculado a partir de R_L=2,2 kΩ. Para atender aos valores calculados foi escolhido o transistor BU 508A.

A Tabela 4 apresenta os valores dos resistores e das demais grandezas consideradas para o cálculo do circuito do regulador a partir da equação determinada (31) segundo o circuito da Figura 4-4.

Tabela 4 – Valores utilizados no regulador série

Grandezas	Valores	Grandezas	Valores
R1	120 kΩ	R7	33 kΩ
R3	10 kΩ	VEB1	0,7 V
R4	560 kΩ	VEB2	0,7 V
R5	10 kΩ	β1	100
R6	2 MΩ	β2	5

A partir dos valores da tabela 4 a Equação 32 que relaciona a tensão na carga V_L com a tensão referência V₂.

$$V_L = 60,61 \cdot V_2 - 0,013 \quad (32)$$

A tensão fornecida pela fonte de tensão linear é, então, chaveada por um IGBT de acordo com o sinal de controle enviado pelo temporizador da placa DAQCard-6062E, criando assim os pulsos gerados do campo elétrico fornecido pelo equipamento.

O contador da DAQCard-6062E é usado para programar a largura dos pulsos na faixa de 250 μs até 0,5 s, bem como o intervalo de tempo a partir de 10 ms até 1 s. O conversor D/A, cuja saída varia entre 0 V e 10 V fornece o sinal de referência para o controle analógico (V_{REF} na Figura 4-45) que regula a fonte de tensão linear, e consequentemente a amplitude do pulso de campo elétrico. A resolução do sinal de referência é de 2,44 mV, o que significa que para efeito do controle da saída de 0 V a

620 V a resolução é de aproximadamente 0,15 V ou 1 V/cm de campo elétrico. O eletroporador se conecta diretamente ao suporte para cubetas da *Life Technologies*, mas pode ser facilmente adaptado a outras cubetas comerciais. A Figura 4–6 apresenta o circuito completo do eletroporador: a fonte, o multiplicador de tensão, o regulador série, e o chaveador.

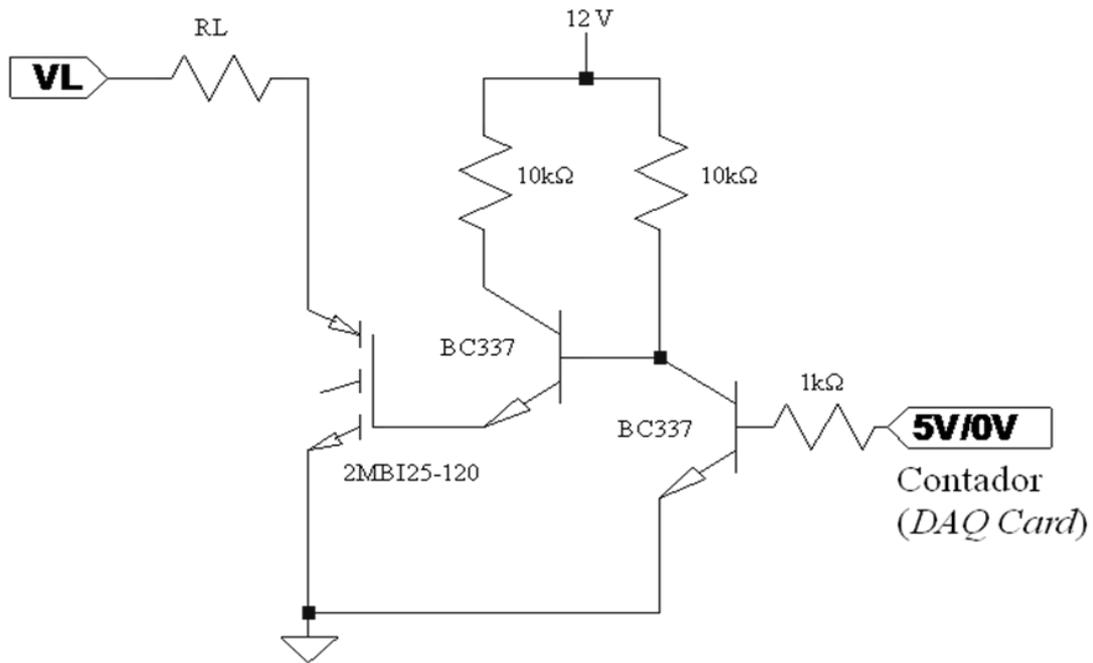


Figura 4-5 – Circuito de chaveamento.

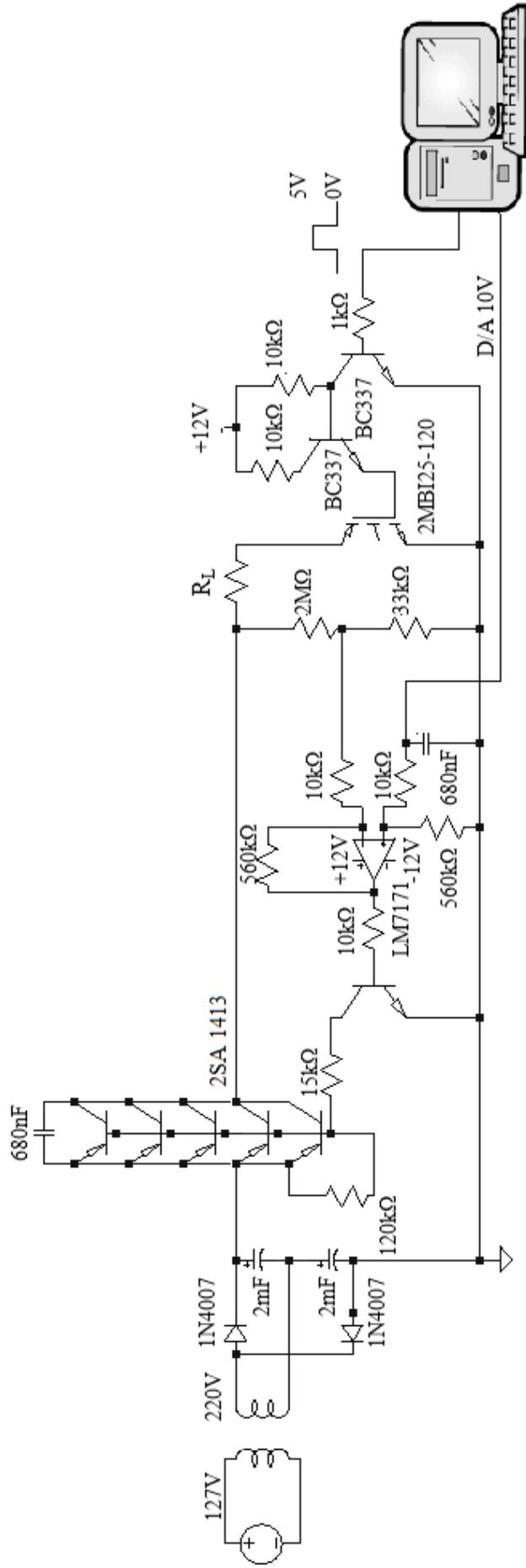


Figura -4-6 – Circuito do eletroproporador integrado ao controle realizado por LabView 7.1 por meio de um contador e um conversor D/A que regulam a largura e o intervalo, e a intensidade dos pulsos, respectivamente. A carga no circuito representada por uma resistência é ilustrada pela cubeta onde são colocadas as soluções que receberão os pulsos

4.3 Programa desenvolvido para utilização com o eletroporador

O programa desenvolvido em ambiente *Labview* permite ao usuário definir o número de pulsos a serem aplicados e para cada pulso definir sua amplitude I e largura D , e ainda o espaçamento entre os pulsos T dentro das faixas especificadas na seção 4.1. A Figura 4-7 exemplifica a definição de cinco pulsos em cada um dos parâmetros. A definição da amplitude (a) é demonstrada pelo primeiro gráfico da figura, para os cinco pulsos exemplificados. Os dois gráficos que se seguem apresentam a definição dos parâmetros de largura e intervalo (b e c), respectivamente. Por fim, o último gráfico (d) apresenta os pulsos definidos pelos parâmetros escolhidos.

Inicialmente o usuário decide se os pulsos serão todos iguais ou variáveis em seus parâmetros. Escolhendo a opção definir pulsos constantes, uma janela de diálogo se abrirá, onde deve ser inserido o número de pulsos, amplitude em V, a largura em μs e o intervalo em s. Caso o usuário escolha definir pulsos variáveis, uma janela se abre para que seja informada a sua quantidade, após isso se abre outra janela para que sejam informados os demais parâmetros para o primeiro pulso, outra para o segundo pulso e assim até o último ser definido. Um arquivo pode ser salvo e aberto, posteriormente, contendo todos os seguintes parâmetros: número de pulsos (N), Amplitude (I), largura de pulso (D) e intervalo entre os pulsos (T).

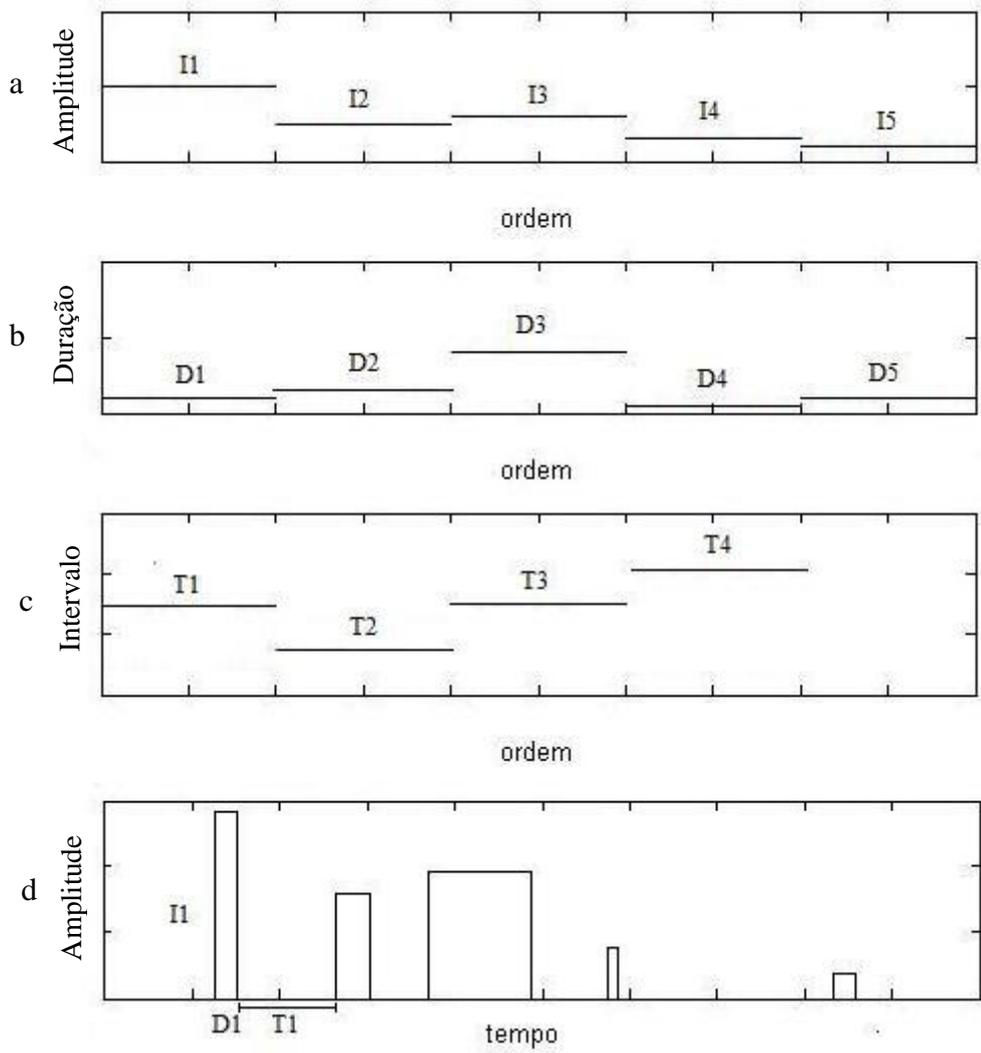


Figura 4-7 – Definição dos parâmetros dos pulsos. a – Amplitude de cada pulso. b- Duração de cada pulso. c – Intervalo entre cada pulso. d – Os cinco pulsos, cada um com os parâmetros definidos nos gráficos anteriores.

4.4 Testes elétricos

Após a montagem do circuito e do *software*, foram realizados teste de bancada que tiveram como objetivo estabelecer a reta de calibração entre a tensão de referência (controle analógico) e a tensão de saída numa carga resisitiva emulando a cubeta com a amostra biológica de células em suspensão. Os valores das resistências utilizadas foram: 2,2 k Ω , 3,3 k Ω , 5,6 k Ω , 8,2 k Ω , 10 k Ω , 15 k Ω , 22 k Ω , 33 k Ω , 55 k Ω , 100 k Ω , 680 k Ω . A potência de dissipação dos resistores utilizados era de 5 W e a tolerância de 5 %. A tensão de controle foi variada de 2 V a 10 V com passos de 0,5 V a cada medida, sendo a tensão de saída medida por um osciloscópio TDS1001 (Tektronix, EUA).

Também foi verificada a exatidão do circuito em relação à largura de pulso e intervalo entre os pulsos com os mesmos valores de resistência de carga. No caso da largura de pulso foram testados os seguintes valores: 250 μ s, 500 μ s, 1 ms, 5 ms, 10 ms, 100 ms. Para o intervalo inter-pulsos foram testados os intervalos: 10 ms, 50 ms, 100 ms, 500 ms, 1 s.

O erro relativo de cada medida foi calculado pela diferença entre o valor medido e o valor programado dividido pelo valor programado, como na Equação 33.

$$E_{\%} = \frac{|\text{valor programado} - \text{valor medido}|}{\text{valor programado}} \quad (33)$$

4.5 Experimento com amostra biológica

Além de testes elétricos, foram realizados experimentos envolvendo uma solução contendo material biológico, a partir do protocolo desenvolvido na dissertação de mestrado da engenheira biomédica Juliana Coronel (CORONEL, 2011). O experimento foi realizado com bactérias *Escherichia coli*, da cepa *Rosetta*TM (DE3) (EMDBiosciences, EUA) e teve como objetivo introduzir, por meio da eletroporação, um plasmídeo nessas bactérias. Plasmídeos são DNAs extra-cromossomais que quando transferidos de uma bactéria para outra conferem a esta, certas características, como resistência a antibióticos.

No experimento, a partir de uma população de bactérias da cepa de *E. coli* não resistente a ampicilina (*Rosetta*) realizou-se por meio da eletroporação a transferência do plasmídeo pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences, EUA) a essas células, o que as tornou resistente ao antibiótico em questão, a ampicilina. Essa transferência realizou-se a partir da aplicação de pulsos de campo elétrico nas amostras, retiradas da população de bactérias, na presença dos plasmídeos.

Antes da realização da eletroporação as bactérias passaram por um processo que as tornou competentes para receberem os plasmídeos. Para tal, uma amostra de bactéria foi colocada para crescer em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C, com agitação a 200 rpm, em um tubo Falcon. Após esse procedimento fez-se a expansão de 1 ml de células em 100 ml de meio LB que são cultivadas até se obter densidade óptica em 600nm

(DO_{600nm}) de 0,5 a 0,7. Após esse procedimento a cultura foi resfriada até 0 °C para que então fossem centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em água tipo 1, estéril e gelada. Repetiu-se por três vezes a centrifugação e a lavagem, obtendo-se um precipitado final que foi ressuspenso em 150 µl de glicerol 10% gelado. A suspensão foi distribuída em amostras de 20 µl que foram estocadas a 4°C até o momento da eletroporação.

O meio LB utilizado no protocolo de células competentes foi feito nas seguintes concentrações: triptona, 10 g/l, extrato de levedura, 5 g/l e cloreto de sódio, 10 g/l. O meio continha ainda cloranfenicol na concentração de 34 µg/ml. O cloranfenicol foi utilizado para prevenir contaminações nas culturas, pois a cepa de *E. coli* utilizada no experimento possui um plasmídeo que a torna resistente a esse antibiótico.

Após a aplicação dos pulsos, as amostras passaram por um tempo de recuperação de 45 min sofrendo agitação em tubos estéreis em meio LB sem ampicilina e a 37 °C. Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de Petri, em meio de cultura como o descrito e contendo também ampicilina (100 µg/ml).

A comprovação da eletroporação baseou-se em verificar a presença e a quantidade de colônias que crescem nessas placas, ou seja, a quantidade de bactérias que se tornaram resistentes à ampicilina como resultado da inserção do plasmídeo em decorrência do processo de eletroporação.

A fim de atestar os resultados foram realizados dois tipos de controle, quais sejam: controle negativo e o controle positivo. As suspensões bacterianas utilizadas para os controles foram retiradas da mesma população utilizada para o experimento de fato.

O controle negativo teve como objetivo comprovar que esta população de bactérias, a partir da qual se retirou amostras para eletroporação, não eram resistentes ao antibiótico antes do experimento. Para tanto, cultivou-se uma amostra dessas bactérias, sem se realizar o processo de eletroporação, em meio de cultura contendo ampicilina, a fim de comprovar a não resistência das mesmas ao antibiótico. Isso significa que o resultado esperado era o de que não houvesse crescimento de colônias na placa do controle negativo.

O controle positivo teve como objetivo mostrar que as bactérias da população de onde se retiraram amostras para o experimento eram viáveis antes de realizá-lo. Para isso, retirou-se uma amostra dessa população e sem realizar a eletroporação, cultivou-a em meio LB e sem a presença de ampicilina. O resultado esperado dessa etapa era a de

que essa amostra se proliferasse na placa do controle positivo, atestando a viabilidade das bactérias.

A solução submetida a eletroporação tinha um volume de 20 μl de células e glicerol e 5 μl ($\approx 93 \text{ ng}/\mu\text{l}$) de plasmídeos. As cubetas usadas foram a de espaçamento de 1,5 mm. Foram feitas 3 amostras em duplicata com o mesmo volume de células e plasmídeos, e foram aplicados os seguintes pulsos nas seguintes condições:

Condição 1 – 1 pulso de 10 ms e 4,1 kV/cm.

Condição 2 – 10 pulsos de 10 ms, 4,1 kV/cm e com intervalo de 10 ms.

Condição 3 – 10 pulsos de 20 ms, 4,1 kV/cm e com intervalo de 10 ms.

Outra etapa desse experimento foi medir a condutância/resistência de uma amostra a fim de compará-la com os resultados dos testes elétricos de bancada previamente realizados (Seção 4.4). Essa medição foi feita descarregando-se um capacitor, carregado com tensão V_0 , sobre uma cubeta contendo a amostra (Figura 4-8). A partir da medição da constante de tempo do decaimento exponencial de descarga e do valor conhecido da capacitância, pode-se estimar a resistência da amostra. A constante de tempo é o tempo necessário para que a tensão atinja o valor de 37% da tensão inicial e foi medida com auxílio de um osciloscópio. Como explicado no Capítulo 2, o valor da constante de tempo do diagrama elétrico (Figura 4-8 (a)) equivale à resistência da amostra multiplicada pela capacitância. (Equação 13, página 20).

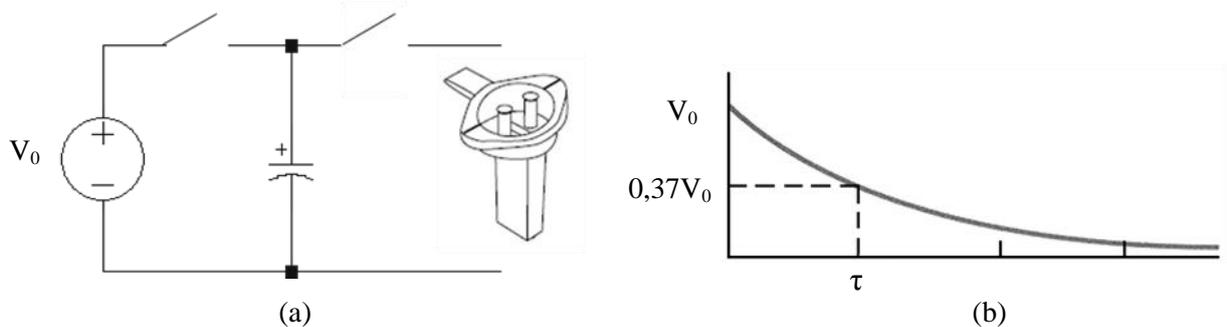


Figura 4-8 – Método utilizado para estimar a condutância da amostra. (a) diagrama elétrico e (b) perfil de tensão de descarga do capacitor

Capítulo 5

Resultados

A montagem do sistema de eletroporação é apresentada na Figura 5-1. Nesta se vê a caixa com o circuito montado e conectado ao suporte de cubetas da *Life Technologies*, onde são inseridas as cubetas; o osciloscópio conectado ao equipamento pela saída auxiliar e o painel frontal do programa no momento da sua execução. O suporte para cubetas pode ser visto em detalhe na Figura 5-2 e o painel frontal do programa é apresentado pela Figura 5-3, que exhibe as opções para definir pulsos constantes e ou variáveis. No caso de pulsos constantes, os seus parâmetros são informados apenas uma vez e para os casos em que há variação dos parâmetros, estes são informados separadamente para cada pulso antes do início da aplicação dos mesmos. O programa permite ainda que os parâmetros relativos aos pulsos sejam salvos e abertos posteriormente para novas aplicações. A Figura 5-4 apresenta as janelas de diálogo utilizadas pelo programa para a inserção dos parâmetros.



Figura 5-1 – Sistema de eletroporação desenvolvido. a) eletroporador; b) suporte para as cubetas; c) programa de controle. Ao fundo um osciloscópio TDS1001 (Tektronix, EUA) para registrar os pulsos gerados pelo eletroporador.

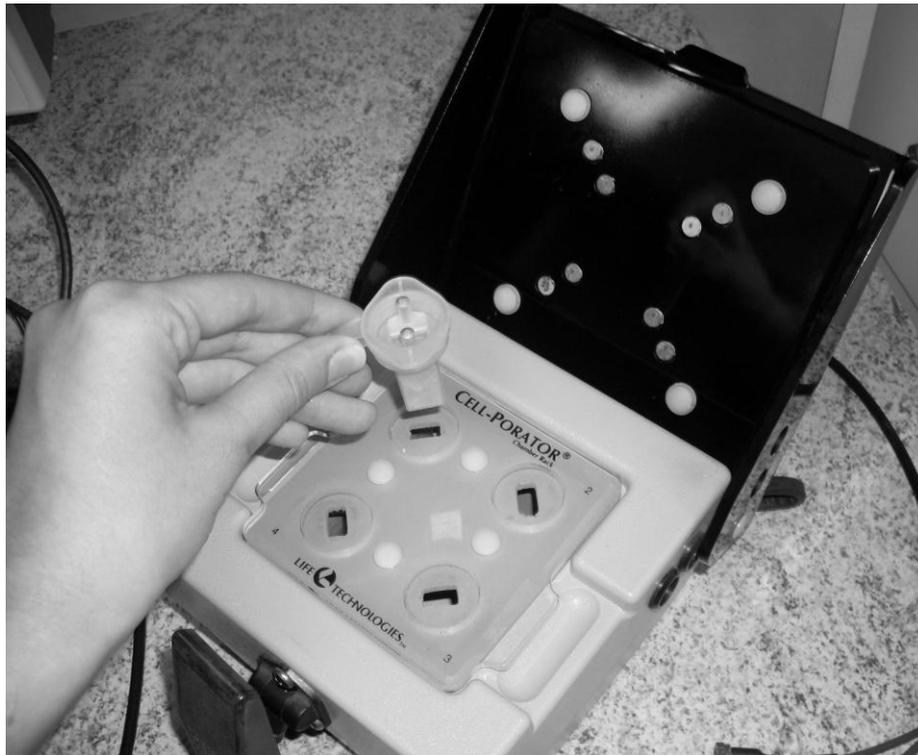


Figura 5-2 – Detalhe da cubeta sendo posicionada no suporte.

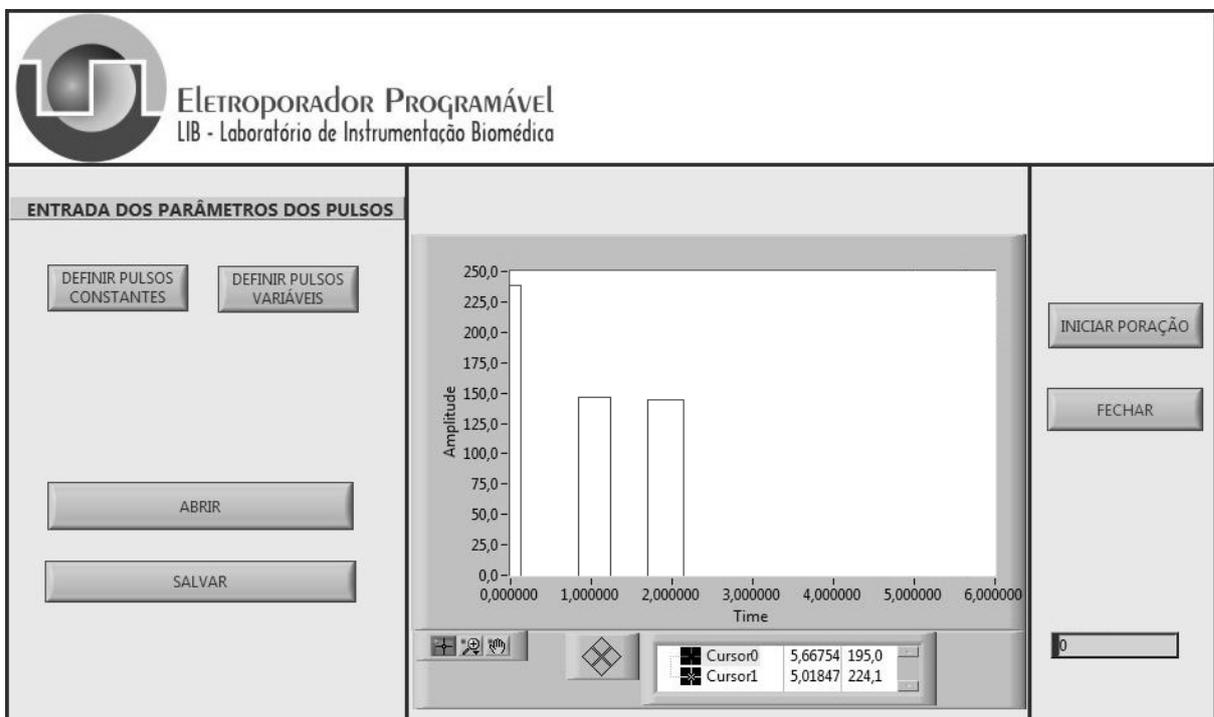


Figura 5-3 – Painel frontal do programa em *LabView 7.1*. Esse programa permite ao usuário definir os parâmetros de um conjunto de pulsos constantes ou variáveis, salvá-los e abri-los, posteriormente. Pode-se conferir pelo gráfico os parâmetros dos pulsos – amplitude em V/cm e tempo em segundos, e iniciar a sua aplicação

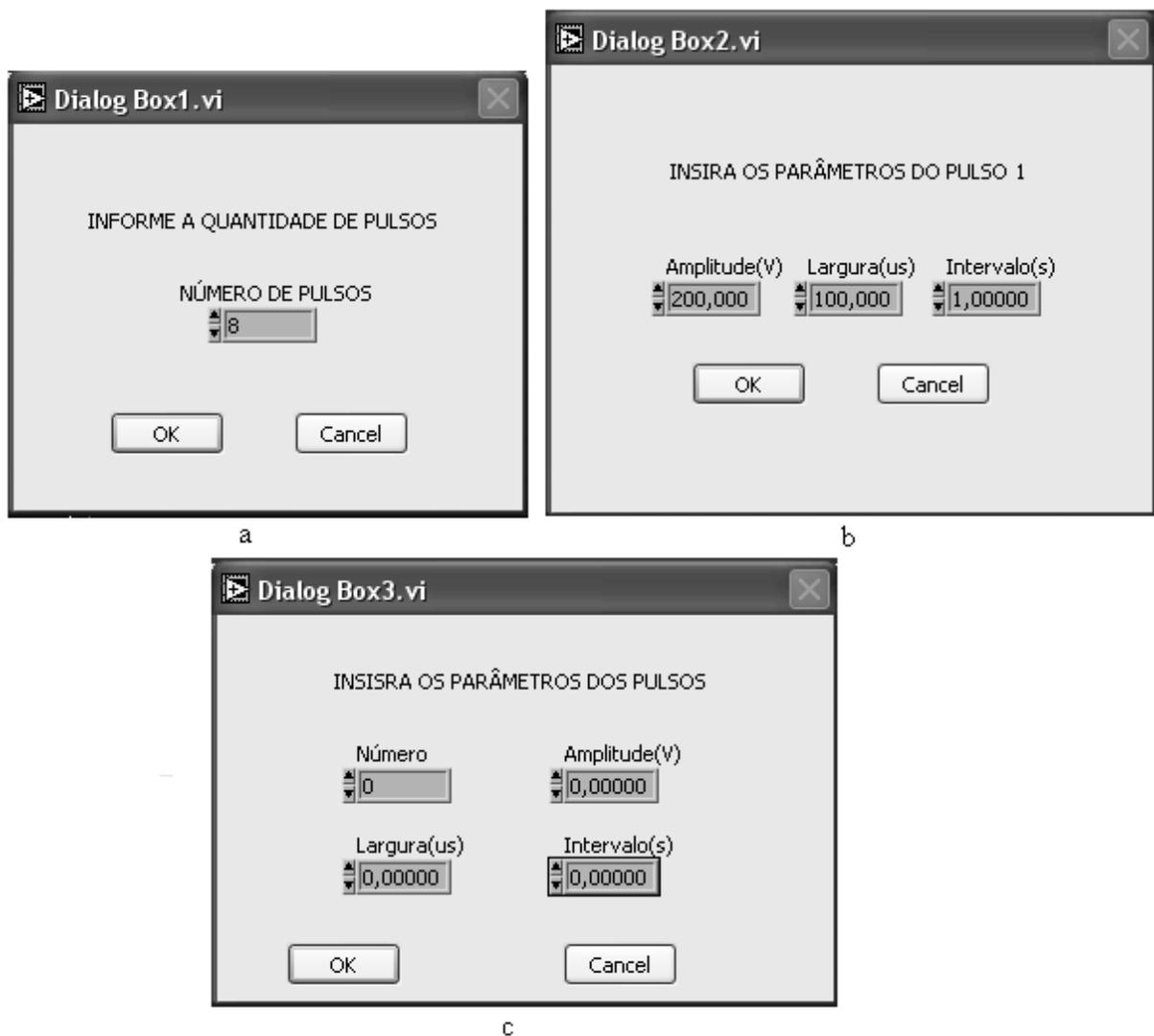


Figura 5-4 – Janelas de diálogos para inserção dos parâmetros dos pulsos. Para pulsos variáveis, a quantidade N de pulsos é inicialmente informada (a), seguindo-se pelos parâmetros de cada pulso de 1 a N (b). Para pulsos de parâmetros constantes em apenas uma janela são informados o número de pulsos, a amplitude, a duração e o intervalo (c).

5.1 Desempenho do eletroporador – resultado dos testes elétricos

Como resultado dos testes referentes ao controle da amplitude de tensão com diferentes valores de cargas, como previsto no item 4.4, tem-se a reta de calibração apresentada pela Figura 5–5.

A equação da reta de calibração determinada por regressão linear é a seguinte:

$$V_L = 63,769 \cdot V_2 + 12,847 \quad (34)$$

sendo que V_L é a amplitude da tensão e V_{REF} , a amplitude do sinal de controle.

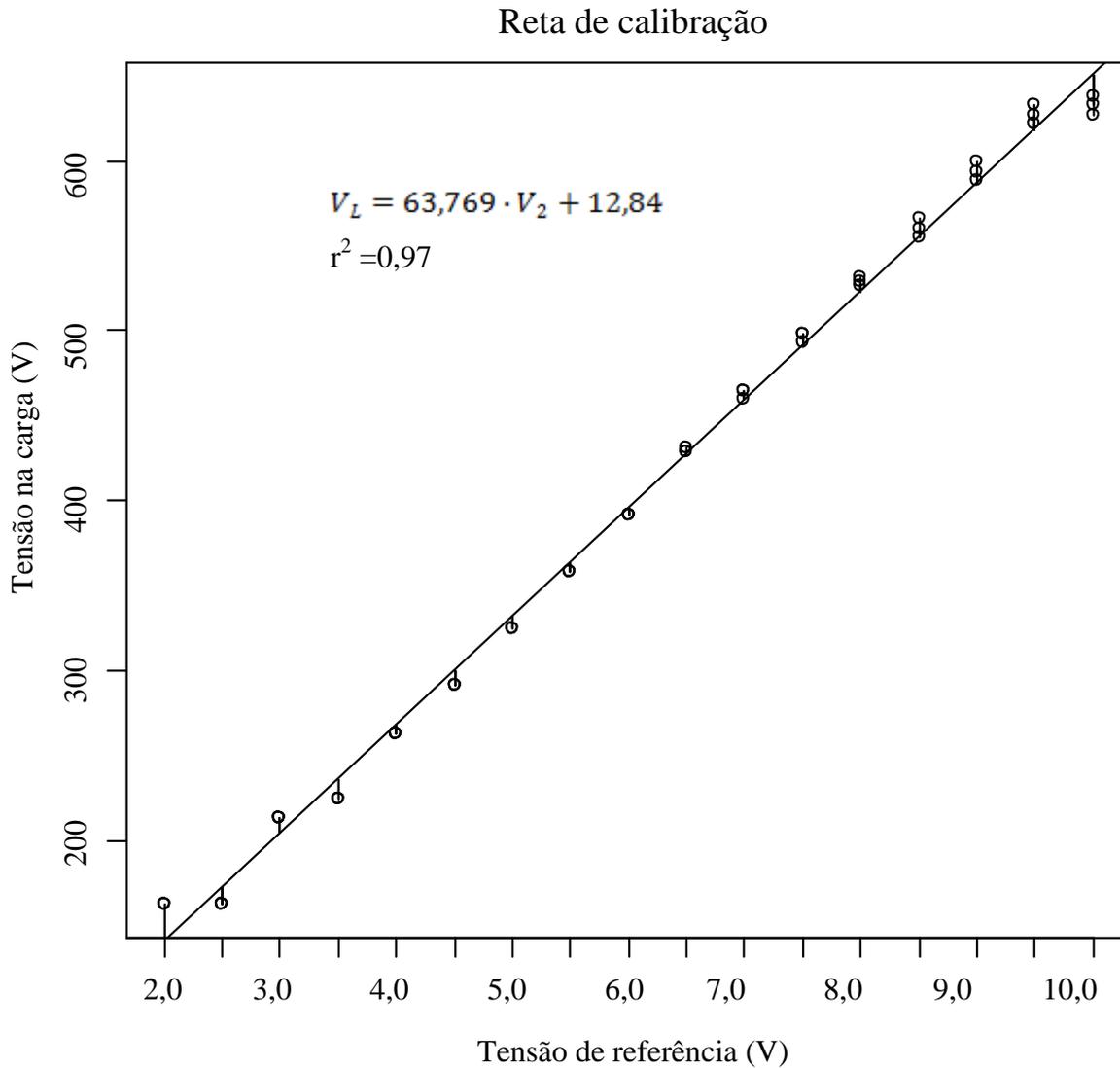


Figura 5-5 Reta de calibração do controle da amplitude de tensão.

O gráfico da Figura 5-6 (a) mostra a reta de calibração da largura de pulso programada e a largura medida para os valores aferidos como o previsto no item 5.1. Nota-se, nesse caso, uma dispersão maior dos valores próximos a 100 ms. No caso dos valores abaixo de 1 ms, a visualização por essa reta não é satisfatória. Para tornar a visualização dos dados mais clara foi feito outro gráfico mostrando a mesma reta, porém somente os valores entre 250 μ s e 1 m [Figura 5-6 (a)], pois não se podia observá-los com detalhe na reta contendo toda a faixa medida.

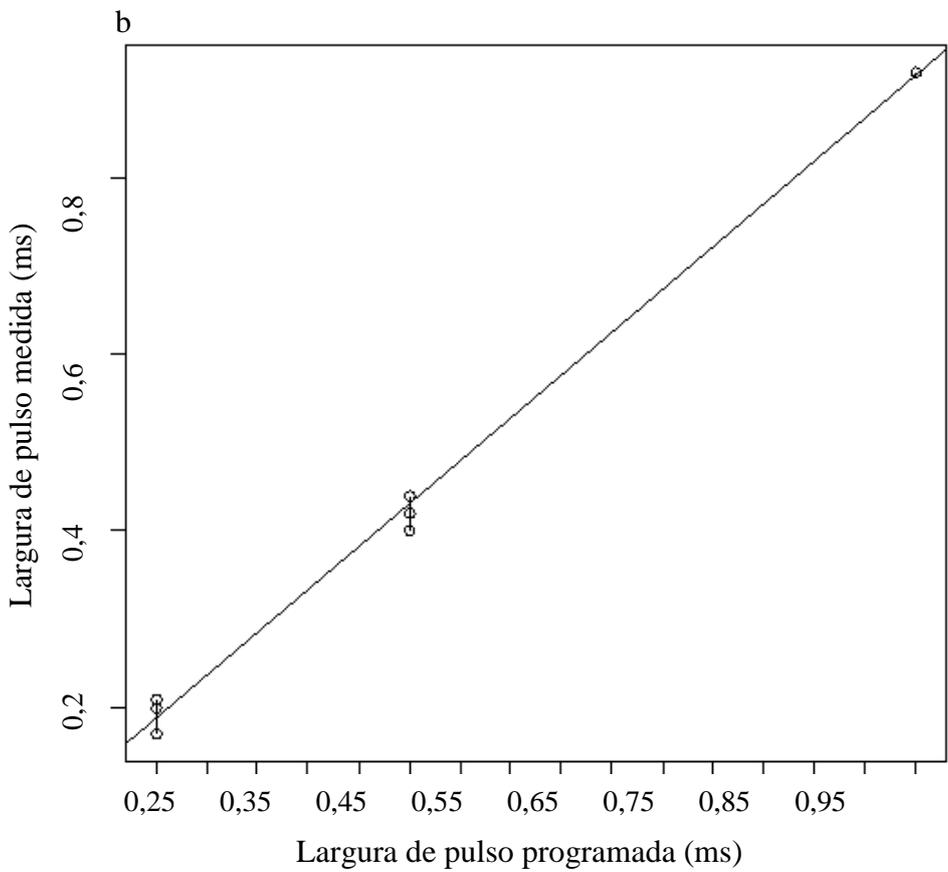
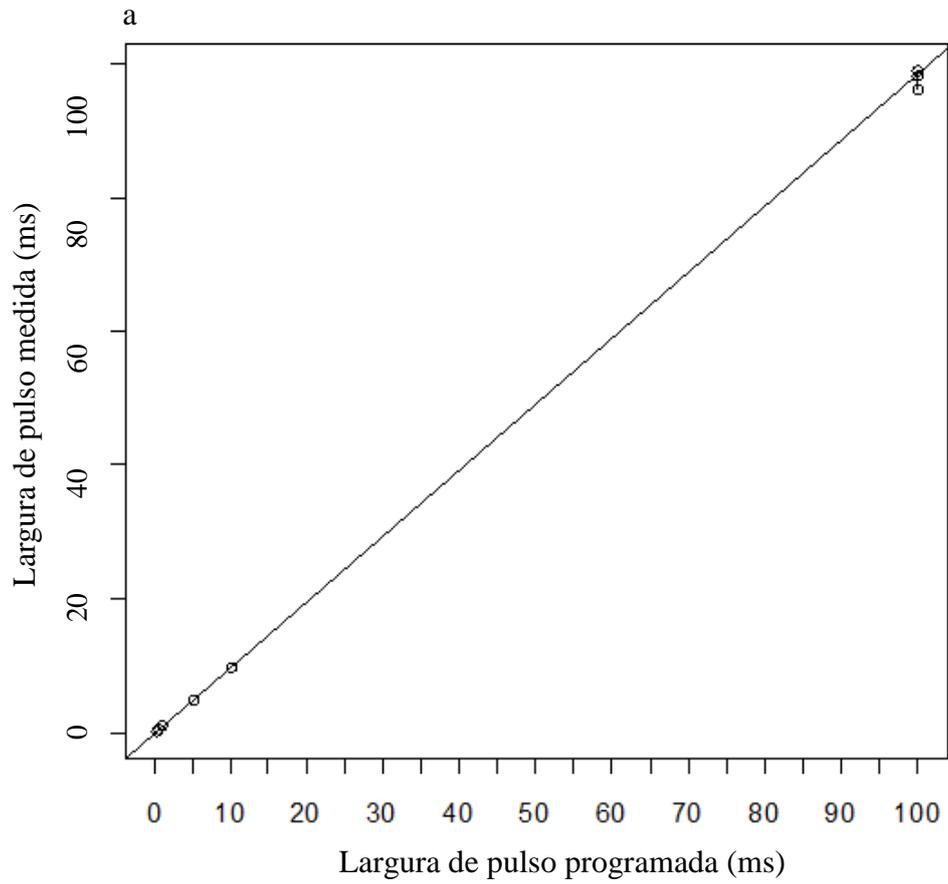


Figura 5-6 – Retas de calibração da largura de pulso programada entre 250 μ s e 100ms (a) e entre 250 μ s e 1ms (b).

Também nessa região da reta, se observou uma dispersão maior de alguns valores, os quais apresentaram os maiores erros, sendo que os pontos de ordenada 250 μs apresentaram erros na ordem de 40 %. Os pontos de ordenada 500 μs apresentaram erros de no máximo 20 % e os pontos de ordenada 1 ms apresentaram erro de 10 %, enquanto que todos os demais pontos medidos apresentaram erros inferiores a 5 %.

O gráfico de linearidade da programação do intervalo entre os pulsos pode ser visto na Figura 5-7. Os dados apresentaram baixa dispersão em todo intervalo medido e foram avaliados erros de no máximo 5 %

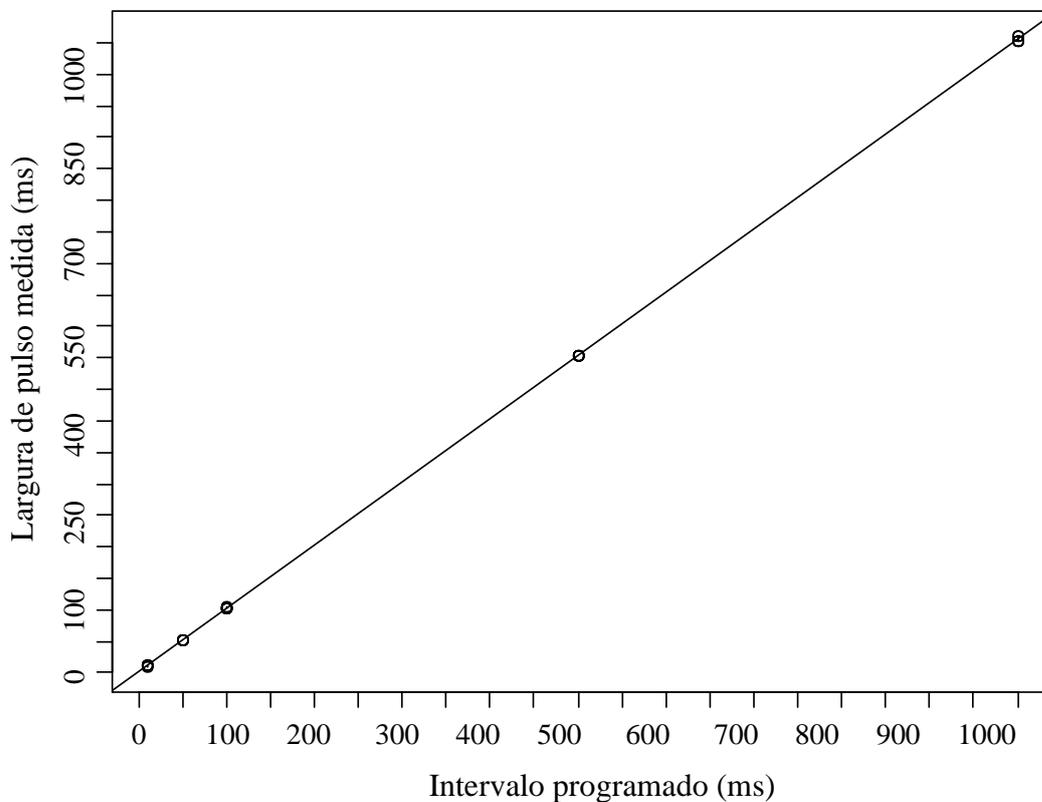


Figura 5-7 – Gráfico da relação entre intervalo de pulso medido e o programado

Da série de medidas realizadas, conforme previsto item 5.1, foram selecionadas algumas das imagens obtidas com o osciloscópio, de forma a complementar essa análise, apresentando-se o perfil dos pulsos de tensão obtidos. Os pulsos a seguir exibidos foram obtidos com resistência de carga de valor igual a 100 k Ω . Decidiu-se apresentar somente essa sequência, pois os demais pulsos –

testados com os demais valores de carga – resultaram em perfis semelhante e não serão, portanto, apresentados neste trabalho.

Nas Figuras 5–8 a 5–13 são mostrados os pulsos programados para as larguras de 250 μ s, 500 μ s, 1 m, 2,5 ms, 5 ms e 10 ms, respectivamente. Nota-se nessa seqüência de imagens que o tempo de descida dos pulso é de aproximadamente 100 μ s. Foi utilizado o critério para determinação da largura de pulso o critério da meia altura como apresentado na Figura 5-8

Nas 5–14 a 5–18 são ilustrados os intervalos entre pulsos para os seguintes valores, respectivamente: 10 ms, 50 ms, 100 ms, 500 ms e 1 s.

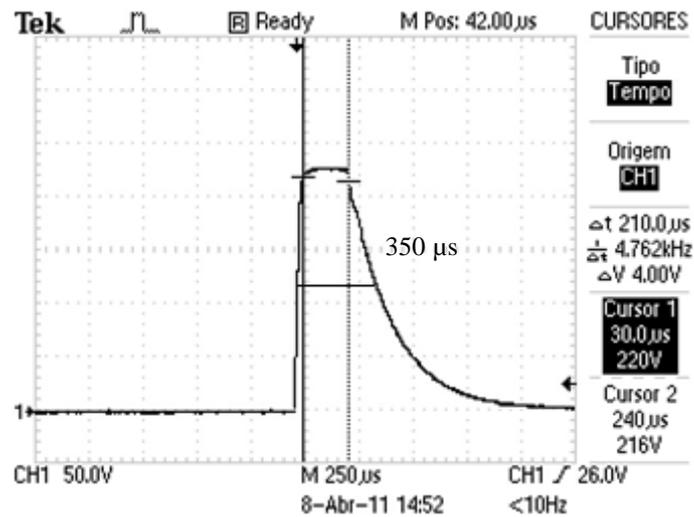


Figura 5-8 – Imagem do pulso com largura programada para 250 μ s.

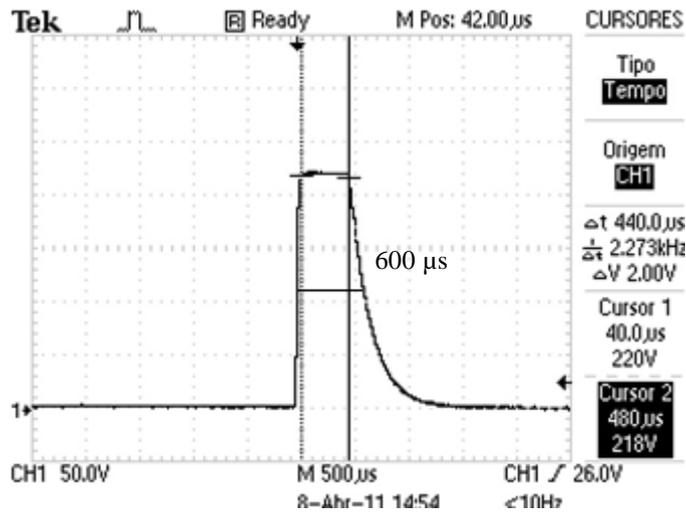


Figura 5-9 – Imagem do pulso com largura programada para 500 μs.

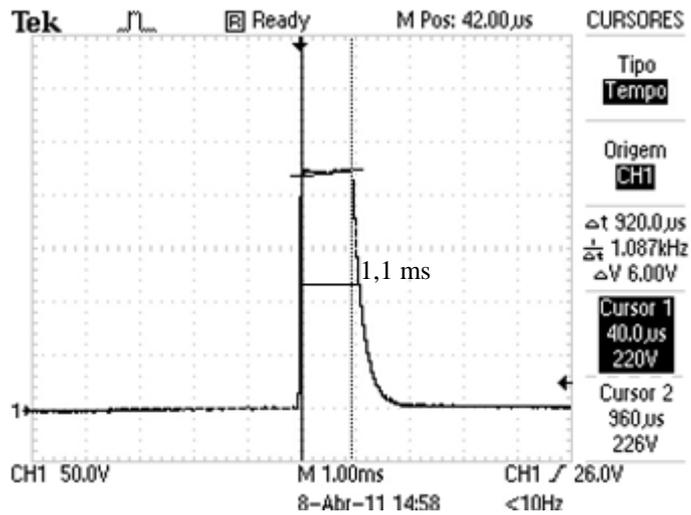


Figura 5-10 – Imagem do pulso com largura programada para 1 ms.

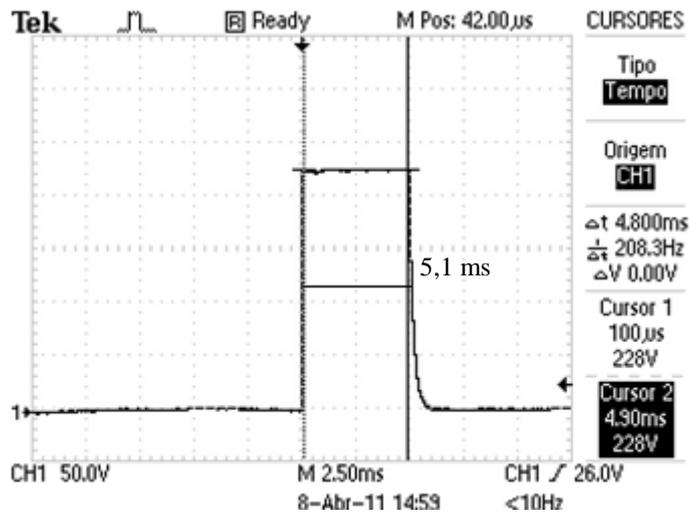


Figura 5-11 – Imagem do pulso com largura programada para 5 ms.

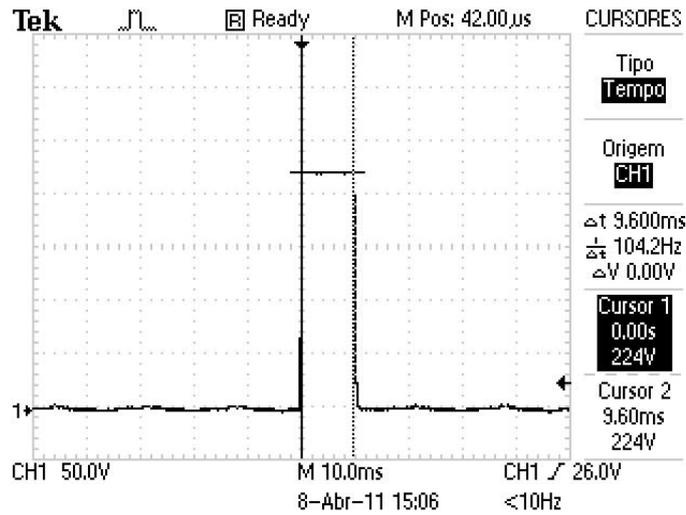


Figura 5-12 – Imagem do pulso com largura programada para 10 ms.

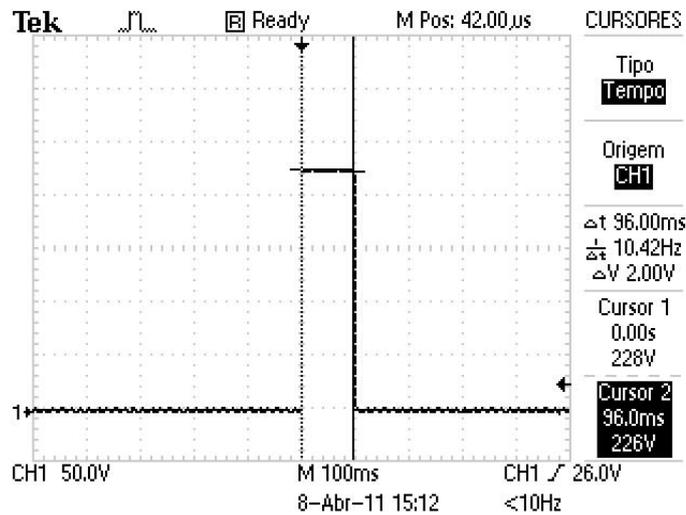


Figura 5-13 – Imagem do pulso com largura programada para 100 ms.

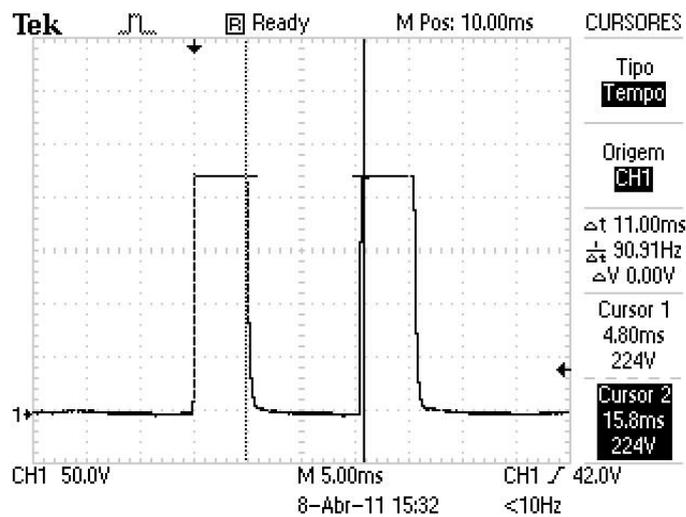


Figura 5-14 – Imagem dos pulsos com intervalo programado para 10 ms.

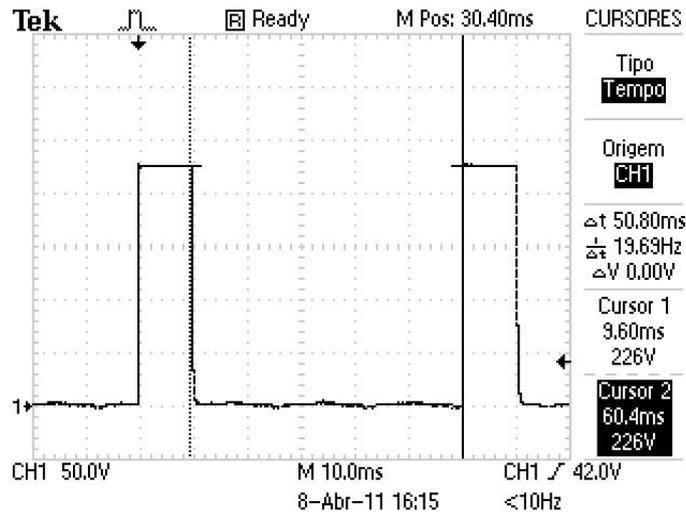


Figura 5-15 – Imagem dos pulsos com intervalo programado para 50 ms.

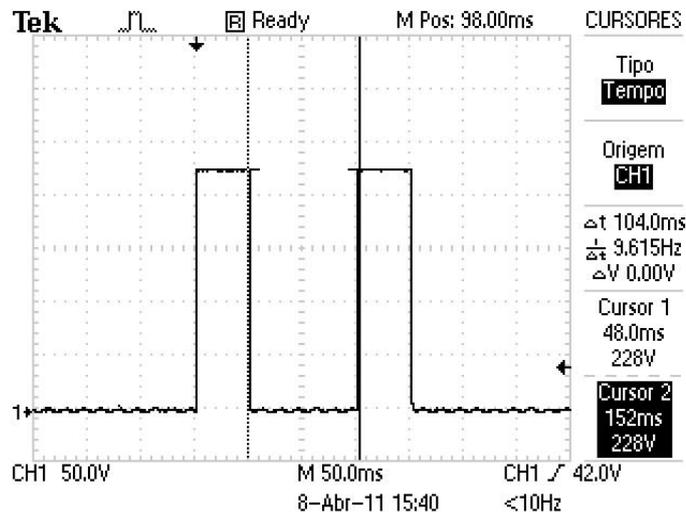


Figura 5-16 – Imagem dos pulsos com intervalo programado para 100 ms.

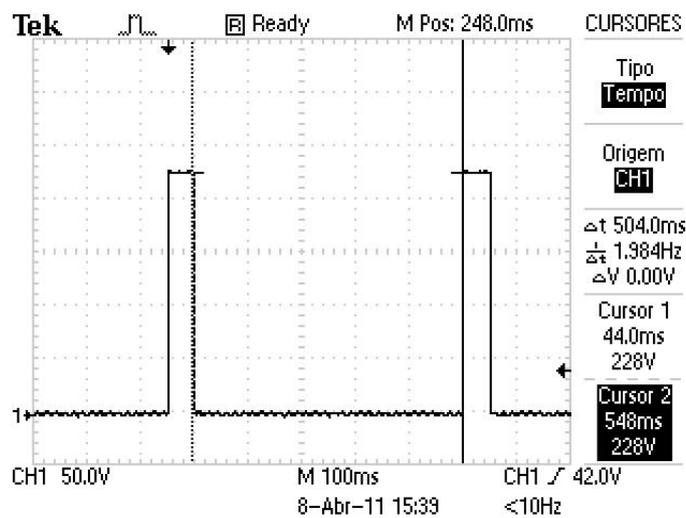


Figura 5-17 – Imagem dos pulsos com intervalo programado para 500 ms.

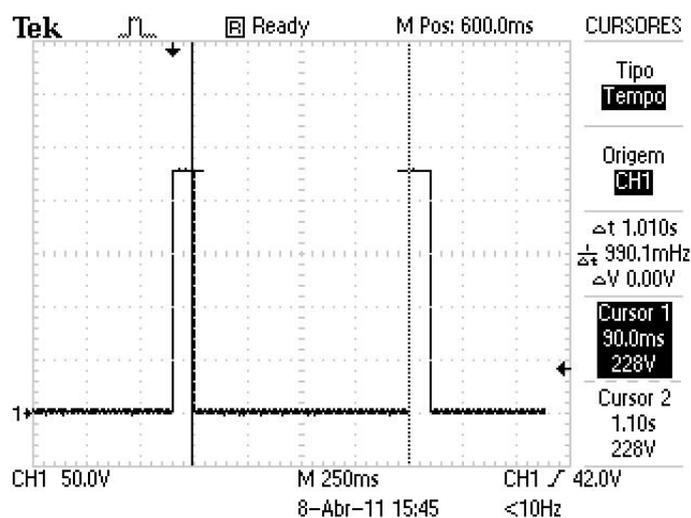


Figura 5-18 – Imagem dos pulsos com intervalo programado para 1 s.

5.2 Eficácia da eletroporação bacteriana utilizando o Eletroporador

Serão apresentadas a seguir as imagens dos pulsos aplicados nas amostras do experimento *in vitro* realizado e o resultado do crescimento bacteriano após 16 h. A Figura 5-19 apresenta o pulso aplicado nas duas amostras bacterianas como previsto para a condição 1 (Seção 4.5). As Figuras 5-20 e 5-21 apresentam os pulsos previstos pelas condições 2 e 3, respectivamente.

Nas Figuras 5-22 (a) e (b) pode-se ver o resultado do cultivo das duas amostras de bactérias após a aplicação do pulso da condição 1, em que se pode notar que houve o crescimento de colônias. Das duas amostras, nas quais foram aplicados os pulsos previstos pela condição 2, em apenas uma observou-se o crescimento de uma colônia (Figuras 5-22 (c) e (d)). Em relação às duas amostras em que foram aplicados os pulsos da condição 3, nenhuma apresentou crescimento de colônias bacterianas (Figuras 5-22 (e) e (f)).

As imagens das Figuras 5-23 (a) e (b) apresentam as placas nas quais foram cultivadas as amostras dos controles negativo e positivo, respectivamente, que atestaram que as bactérias utilizadas não eram resistentes à ampicilina e eram viáveis antes da eletroporação.

O resultado da estimativa da resistência de uma suspensão de bactérias, semelhante às usadas nos experimentos, com a aplicação de um pulso exponencial na mesma, é apresentado pela Tabela 5. A estimativa da resistência foi feita a partir da Equação 13, considerando $R = \infty$.

Tabela 5 – Resultado da estimativa da resistência da suspensão de bactérias

Capacitor (μF)	τ (ms)	R_L ($\text{k}\Omega$)
50	840	16,8
10	162	16,2
		$\overline{R_L}=16,5$

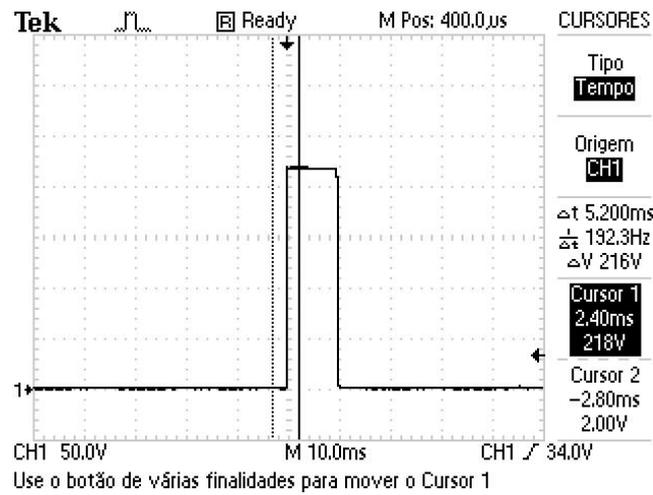


Figura 5-19 – Imagem do pulso aplicado às amostras da condição 1.

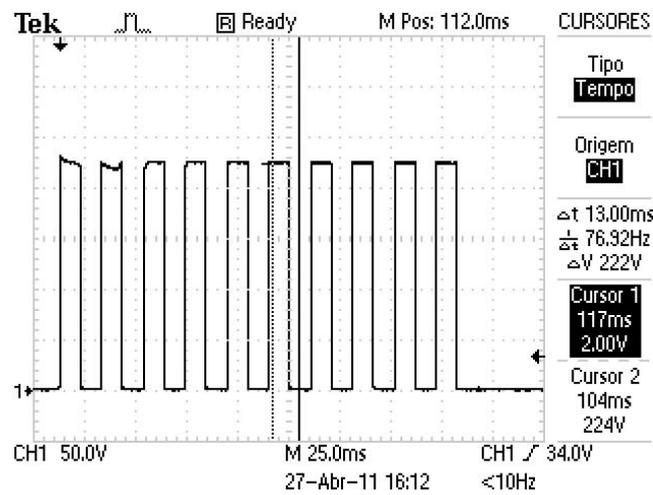


Figura 5-20 – Imagem dos pulsos aplicados às amostras da condição 2.

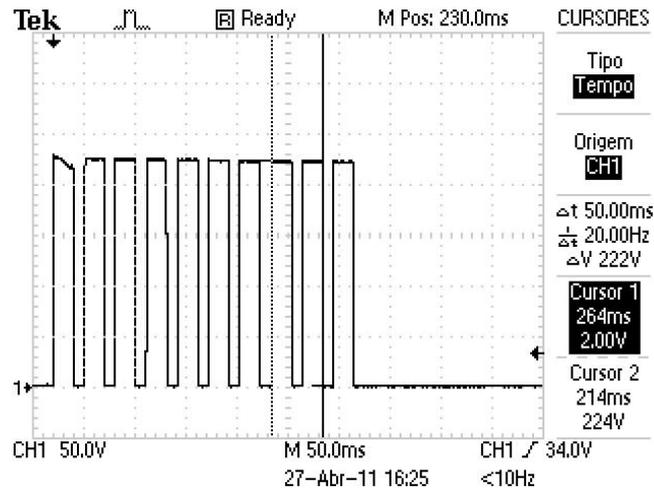


Figura 5-21 – Imagem dos pulsos aplicados às amostras da condição 3.

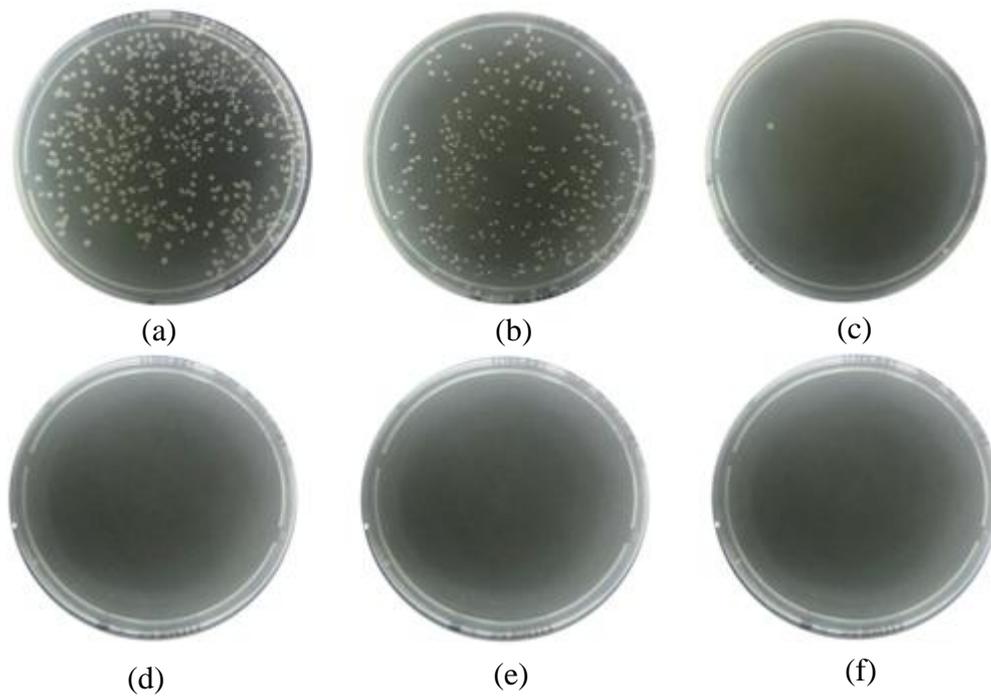


Figura 5-22 – Eficácia da eletroporação bacteriana sob diferentes condições. (a) e (b) resultado das culturas das duas amostras que receberam o pulso da condição 1; (c) e (d) da condição 2 e (e) e (f) da condição 3.

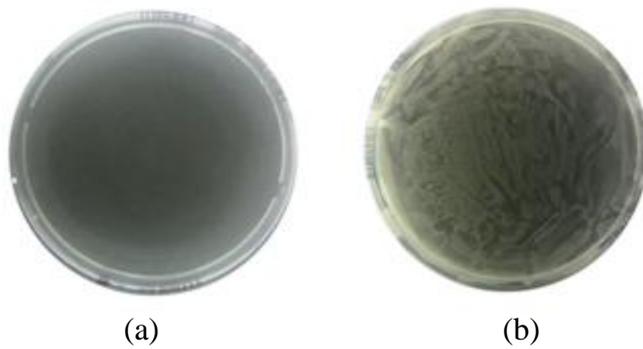


Figura 5-23 – Resultado dos controles negativo (a) e positivo (b).

Capítulo 6

Discussão

Foi desenvolvido um eletroporador para aplicações *in vitro*, obtendo-se como resultado um equipamento capaz de gerar pulsos de campo elétrico controláveis. Sua tensão de saída máxima é de 620 V, o que permite, a partir da utilização de uma cubeta de espaçamento de 1,5 mm, que seja obtida amplitude máxima de campo elétrico igual a 4,1 kV/cm. O controle dessa amplitude foi baseado em um circuito de um regulador série e os erros avaliados foram menores que 5 %.

No que se refere aos parâmetros temporais, a largura de pulso mínima que pode ser garantida para este equipamento foi de 1 ms, com erros de até 10%. Para os pulsos de menor duração, 250 μ s e 500 μ s, os erros aferidos foram de 40% e 20%, respectivamente (Item 5.1). A máxima largura de pulso testada foi de 100 ms, considerando que não houve decaimento da amplitude de tensão. Em relação ao parâmetro do intervalo entre os pulsos, a faixa testada foi entre 10 ms e 1 s, dentro da qual os erros avaliados foram sempre inferiores a 5%. Nesse caso os maiores valores de erro encontrados foram para os intervalos menores, sendo limitado 10 ms para o erro apresentado. Não existe um limite máximo para esse parâmetro.

A seguir são discutidos alguns fatores relacionados às limitações encontradas no desempenho do equipamento. O parâmetro da largura do pulso foi limitado pelo tempo de resposta do regulador e pelo tempo de chaveamento, o que pode ser notado pelas Figuras 5–8 e 5–9. A partir dessas imagens verifica-se que o tempo de descida do pulso é de aproximadamente 100 μ s, o que compromete a definição de pulsos dessa ordem de grandeza. Pode-se notar, então, pelas Figuras de 5–10 a 5–13, que esse tempo torna-se menos expressivo para pulsos de maior largura.

No que diz respeito ao intervalo entre os pulsos, seu valor mínimo foi limitado principalmente pelo tempo necessário à execução dos laços utilizados na estrutura de programação. A programação da largura do pulso é feita diretamente no *hardware* da placa, por outro lado, o tempo de intervalo entre um pulso e outro é programado por um laço de programação. A cada laço é refeita a programação dos parâmetros do pulso no

hardware, permitindo que cada pulso tenha parametrização individual. Como consequência disso, tem-se um atraso adicionado no tempo de intervalo de cada pulso relativo ao tempo de execução do laço de programação.

Em relação à amplitude, não se verificou, para as cargas avaliadas, limitação na capacidade da fonte em manter a tensão no valor desejado considerando-se a tolerância de 5 %.

Em comparação com os eletroporadores comerciais (Tabela 1), nota-se que o equipamento desenvolvido neste trabalho se assemelha aos modelos de baixa tensão, os quais são projetados para aplicações em células de mamífero. Por outro lado, a maior parte dos modelos comerciais não garante o controle individual dos pulsos.

Uma das gerações mais recentes de eletroporadores desenvolvidos pela empresa BTX para uso em células de mamíferos possui as seguintes características: amplitude máxima de campo elétrico de 2000 V/cm, largura de pulso de 50 μ s a 10 ms, intervalo de 200 μ s a 1 s e cubeta de 6 mm de espaçamento e volume de até 6 ml.

Retomando alguns exemplos discutidos no Capítulo 2, pode-se perceber que, mesmo considerados os limites relatados do equipamento, os valores obtidos para os parâmetros do eletroporador estão dentro da faixa utilizada em diversas aplicações, especialmente em células de mamíferos (RODAMPORN *et al.*, 2007; WANG & LU, 2008; CAO *et al.*, 2010).

Em experimentos realizados por Rodamporn e colaboradores (2007) foram testados campos elétricos de amplitudes que variavam de 100 a 1000 V/cm com largura de pulso variando de 10 μ s a 20 ms em células HeLa. Nesses experimentos utilizou-se propídio iodado como marcador a fim de evidenciar a permeabilização das células. Como resultado, os autores observaram que o maior índice de células coradas atingido foi de 48,74 %, quando o campo aplicado foi de 600 V/cm de amplitude e 10 ms de largura.

Wang e Lu (2008) testaram diversos valores de amplitude e largura de pulso, como mostrado na Figura 3-15. Em relação à amplitude de campo foram testados valores de até 800V/cm, com largura de pulso de 0,2ms, 1,1ms e 6ms. O resultado de maior permeabilização – cerca de 80% de células permeabilizadas viáveis – foi obtido a partir da aplicação de campo com intensidade de 800 V/cm e duração de 1,1 ms.

Retomando os valores definidos por Schoenbach e colaboradores para diferentes aplicações (SCHOENBACH *et al.*, 2001), a Figura 6-1 apresenta novamente esses valores juntamente com o retângulo sombreado que representa os valores atingidos pelo

Eletroporador Programável desenvolvido. É possível ver que o eletroporador cobre parte da região 5, definida pelo autor como sendo valores próprios para eletroporação com o objetivo de realizar transferência de DNA e parte da região 4 definida como a mais apropriada para introdução de medicamentos. As demais regiões - manipulação intracelular; descontaminação bacteriana; combate a acúmulo de microorganismos – não estão incluídos dentre das aplicações do equipamento desenvolvido.

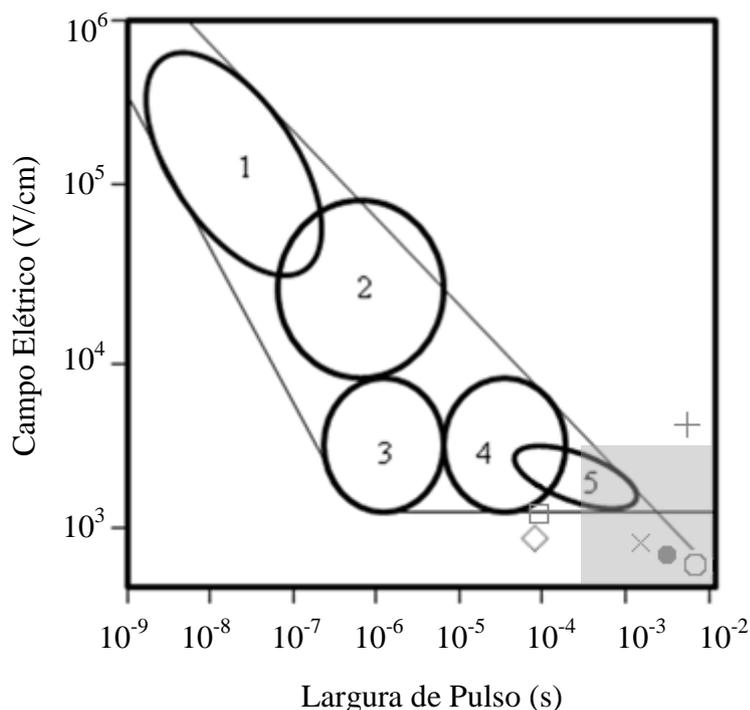


Figura 6-1 – Comparação entre os parâmetros definidos por (adaptado de SCHOENBACH *et al.*, 2001) para diferentes aplicações de eletroporação, os limites alcançados pelo Eletroporador Programável (área sombreada) e trabalhos de outros autores. 1 – Eletromanipulação intracelular; 2 – Descontaminação bacteriana; 3 – Prevenção de acúmulo de microorganismos; 4 – Introdução de medicamentos; 5 – Transferência de genes. Demais autores: (x) – Transferência de DNA para células-tronco embrionárias (CAO *et al.*, 2010); (◻) – Valores padrão para eletroquimioterapia (MIR *et al.*, 2006); (•) – Permeabilização de células HeLa (RODAMPORN *et al.*, 2007); (◊) – Permeabilização de células CHO em 70% (WANG & LU, 2008); (◻) – Permeabilização de células CHO em 80% (WANG & LU, 2008); (+) – Transferência de DNA para bactérias *E. coli* (DOWER *et al.*, 1988).

De fato, aplicações relacionadas a células bacterianas exigem amplitudes mais elevadas de campo elétrico. Dower e colegas (1988) realizaram uma pesquisa na qual testaram variadas condições de campo elétrico aplicados a bactérias *E. coli*. Dentre os resultados observados pelos autores está o fato de que existe, até certo limite, uma compensação da amplitude de campo em relação a largura do pulso. Os autores citam que um pulso exponencial 7 kV/cm e 20 ms redonda em eficiência semelhante em transferência de DNA que um pulso de 12,5 kV e 5 ms, mas que pulsos com amplitudes até 2 kV/cm não alcançaram a mesma eficiência, mesmo que a largura de pulso fosse aumentada até mesmo a 0,9 s. Também foi observado fato semelhante em testes pilotos realizados em nosso laboratório. Nesse caso, foram aplicados pulsos com amplitude de 1,2 kV/cm a amostras como as descritas no item 4.5, com largura de pulso de até 1s e em nenhuma delas se obteve sucesso na introdução dos plasmídeos.

Como foi descrito no Capítulo 5, o experimento realizado com o Eletroporador Programável com amplitude 4,1 kV em células de *E. coli* mostrou que o equipamento está apto a realizar uma aplicação típica da eletroporação como a inserção de plasmídeos nesse tipo de bactéria.

Pode-se observar a partir do experimento que o tratamento que possibilitou a obtenção de maior número de colônias resistentes, ou seja, maior quantidade de células poradas, foi um pulso de 10 ms e 4,1 kV/cm (condição 1). Das as amostras, que receberam 10 pulsos de 10 ms e 4,1 kV (condição 2), em apenas uma obteve-se a formação de uma colônia e nas amostras estimuladas com 10 pulsos de 20 ms e 4,1 kV (condição 3) não se observou a formação de colônias bacterianas. Evidentemente, o objetivo deste trabalho não incluiu comparar a eficiência de diferentes protocolos de eletroporação, mas sim avaliar o desempenho do equipamento. Contudo, diante do resultado constatado que a repetição dos pulsos pode ter gerado aumento da temperatura na amostra, o que pode reduzir o tempo de abertura dos poros diminuindo a eficiência do processo (KINOSITA & TSONG, 1977). Com o objetivo de minimizar o aumento de temperatura durante a aplicação dos pulsos foi adotado o procedimento de preencher com gelo o suporte das cubetas no momento da eletroporação. Outra possibilidade para explicar o esse resultado é considerar que a repetição dos pulsos possa ter levado à morte celular. Sabe-se que a amplitude de pulso de campo elétrico de 4,1 kV não seria suficiente em um pulso único para levar à morte da bactéria, pois amplitudes de pulso mais elevadas foram utilizadas sem ocasionar tal efeito (DOWER *et al.*, 1988, SCHOENBACH *et al.*, 2001, CORONEL, 2011). Entretanto não se sabe dos efeitos da

repetição desse padrão de pulso. Devido a esse fato, sugere-se a repetição do experimento com a realização, além dos controles positivo e negativo, o controle da eletroporação. Esse controle é feito após a aplicação dos pulsos, cultivando as células, em meio sem ampicilina, para verificar se os procedimentos utilizados na técnica levam à morte celular (CORONEL, 2011). Em relação ao resultado da avaliação da resistência da amostra (16,5 k Ω), nota-se que está dentro dos valores de resistências ensaiadas nos testes elétricos que foram de 2,2 k Ω a 680 k Ω .

O fato de cada pulso ser caracterizado individualmente permite, por exemplo, que em um mesmo perfil sejam aplicados pulsos estreitos de grande amplitude e largos com amplitude mais baixa. Como exemplo da necessidade de aplicação de pulsos de parâmetros variados em um mesmo protocolo tem-se o trabalho desenvolvido por BUREAU *et al.* (2000). Em tal trabalho foi observado que houve diferença significativa em relação à transferência genética entre a aplicação de um pulso de 800 V/cm e 0,1 ms de duração e a aplicação do mesmo pulso seguido de quatro pulsos de amplitude de 80 V/cm e 83 ms de largura de pulso; a taxa de transferência no segundo caso foi três vezes maior que no primeiro. Os autores observaram ainda que, quando alterada a ordem dos pulsos, ou seja, aplicando-se inicialmente os quatro pulsos de menor amplitude seguidos pelo de maior amplitude, a taxa de transferência era comparável à aplicação de apenas um pulso de 800 V/cm. Bureau e colaboradores (2000) atribuíram esse fato observado ao efeito eletroforético que o pulso de menor amplitude e maior duração exerce sobre o DNA.

Serão discutidas algumas modificações que poderão ser implementadas no projeto e algumas limitações em relação aos componentes e a topologia escolhida para a fonte, bem como a topologia escolhida para o chaveador. Como foi visto, o eletroporador desenvolvido poderá necessitar de aumento na amplitude de campo elétrico para atender a determinadas aplicações, como aquelas relacionadas à bactérias. Este aumento poderá ser realizado a partir da mesma topologia do circuito desenvolvido com algumas modificações. O aumento de tensão da fonte pode ser feito, por exemplo, alterando-se o circuito multiplicador de tensão. Se a razão de multiplicação fosse aumentada de dois para três, por exemplo, a tensão seria aumentada para, aproximadamente, 900 V. O circuito de fonte linear seguida do multiplicador de tensão (Figura 3-11) é simples de ser montado, pois os componentes especificados são facilmente encontrados no mercado – transformador de ferro para frequência de 60 Hz, capacitores e diodos. Dos três elementos listados, aquele que pode representar um

problema não em relação à disponibilidade no mercado, mas sim de dimensões é o banco de capacitores. Tais elementos em frequência de 60 Hz são de grandes dimensões. Este fato não foi limitante no equipamento desenvolvido neste trabalho, no entanto, havendo a necessidade de acréscimo de tensão, a solução do multiplicador poderá representar um aumento tal do banco de capacitores utilizado que possa justificar a utilização de uma fonte chaveada, alternativamente. Deve-se comentar ainda que essa alternativa também pode requerer atenção, pois se por um lado podem-se diminuir as dimensões dos capacitores pela elevação da frequência, no caso da fonte chaveada o transformador utilizado também deve ser próprio para altas frequências. Tipicamente são utilizados transformadores de ferrite, na faixa de frequência de trabalho de fontes chaveadas, pois o núcleo de ferro normalmente utilizado em 60 Hz não tem boa resposta em alta frequência. Esse tipo de transformador não é normalmente encontrado nos níveis de potência requeridos nesse tipo de circuito, em oposição ao transformador de ferro, utilizado em fonte linear, que é facilmente encontrado para diversos níveis de tensão e potência. Para essa solução ser posta em prática, provavelmente deverá ser acompanhada de um projeto específico de um transformador para altas frequências que atenda a tensão e a potência desejadas. Além da fonte de tensão, seriam necessárias adaptações no circuito do controlador série no sentido de adequar os componentes à nova realidade do nível de tensão e potência. Outra possibilidade para aumentar a amplitude de campo elétrico é reduzir o espaçamento entre os eletrodos, seguindo a tendência da microeletroporação.

Outra modificação que pode ser necessária, além do aumento de amplitude de campo, é diminuir a largura e intervalo mínimos dos pulsos. No que tange ao parâmetro da largura de pulso, teriam que ser adotadas estratégias para aumentar a velocidade do chaveamento. Os transistores de junção bipolar apresentaram, como visto, maior velocidade de chaveamento que o IGBT. Por outro lado ocorreu a limitação da corrente fornecida pela placa de aquisição utilizada (DAQCard-6062E) à base do transistor. Alternativamente, pode-se testar a substituição do IGBT por um MOSFET para aumentar a velocidade do chaveamento a fim de diminuir a largura do pulso para 50 μ s, como já se obteve em testes pilotos.

Capítulo 7

Conclusão

Foi atingido o objetivo de se construir um eletroporador que permite a programação individual dos parâmetros dos pulsos retangulares de campo elétrico, isto é, amplitude, largura, intervalo e número de pulsos, dentro de uma certa faixa de operação.

O eletroporador pode fornecer pulsos de campo elétrico de até 4,1 kV/cm com erro máximo de 5%, com largura de pulso, na faixa de 1 ms a 100ms, considerando erro máximo de 10%, e intervalo mínimo entre os pulsos de 10 ms, com erro de até 5%. Tais características foram obtidas em experimentos de bancada. No experimento realizado com bactérias *E. coli*, mostrou-se que o equipamento foi eficaz em introduzir plasmídeos nessas bactérias, tornando-as resistentes à ampicilina.

Apesar de se ter obtido sucesso no desenvolvimento de um eletroporador programável, que já encontra uma gama de aplicações em eletroporação de células de mamífero, o equipamento ainda pode ser melhorado. Nesse sentido sugere-se para projetos futuros modificações que permitam a elevação da saída da fonte de tensão e a adaptação da topologia de controle de tensão para se obter aumento da amplitude de campo elétrico fornecido pelo equipamento. Além disso, propõe-se que seja projetado um circuito de chaveamento mais veloz, de forma a obter pulsos mais estreitos. Sugere-se também o desenvolvimento de um método de estimativa da condutância/resistência da suspensão celular antes e durante a aplicação dos pulsos, com o objetivo de se avaliar sua alteração e relacionar tais dados com a efetiva permeabilização das células.

Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B., 2002, "Molecular Biology of the Cell". 4 ed. New York, Garland Publishing, Inc.
- BELEHRADEK, M., DOMENGE, C., LUBOINSKI, B. *et al*, 1993, "Electrochemotherapy, a new antitumor treatment". *First clinical phase I-II trial. Cancer*, 72, 3694-3700.
- BERTACCHINI, C., MARGOTTI, P. M., BERGAMINI, E., *et al*, 2007, Design of an irreversible electroporation system for clinical use. *Technology in cancer research & treatment*, 6, 313-20.
- BUREAU, M. F., GEHL, J., DELEUZE, V., *et al*, 2000, Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1474, 353-359.
- CAO, F., XIE, X., GOLLAN, T., *et al*, 2010, Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 12, 15-24.
- CHANG, D. C., 1989, "Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field". *Biophysical journal*, 56, 641-652.
- CORONEL J., 2011, *Avaliação Experimental da Eletroporação Celular*. Dissertação de M.Sc., COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- DOWER, W. J., MILLER, J. F. & RAGSDALE, C.W., 1988, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 16, 6127-6145.

- GEHL, J., 2003, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research". *Acta Physiologica Scandinavica*, 177, 437-447.
- HALLIDAY D, RESNICK R, MERRILL J, 1995, Fundamentos de Física, vol. 3 Eletromagnetismo, LTC Editora. RJ.
- HAYT, W. H., 1981, Engineering Electromagnetics. 4 ed. New York, McGraw-Hill Inc.,US.
- HE, H., CHANG, D. & LEE, Y., 2006, "Micro pulsed radio-frequency electroporation chips". *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 68, 89-97.
- HELLER, R., JAROSZESKI, M., ATKIN, A., *et al.*, 1996, "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver". *FEBS Letters*, 389, 225-228.
- HOLT E, LUNDE PK, SEJERSTED OM, CHRISTENSEN G , 1997, "Electrical stimulation of adult rat cardiomyocytes in culture improves contractile properties and is associated with altered calcium handling". *Basic Res Cardiol* 92: 289-298.
- HUANG, Y. & RUBINSKY, B., 1999, "Micro-Electroporation: Improving the Efficiency and Understanding of Electrical Permeabilization of Cells". *Biomedical Microdevices*, 2, 145-150.
- KHINE, M., LAU, A., IONESCU-ZANETTI, C., SEO, J. & LEE, L., 2005, "A single cell electroporation chip". *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, 5, 38-43.
- KINOSITA, K. & TSONG, T.Y., 1977, "Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane". *Nature*, 268, 438-41.
- KOTNIK, T., MIR, L. M., FLISAR, K., *et al*, 2001, "Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part I. Increased efficiency of permeabilization". *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 54, 83-90.

- KRASSOWSKA, W. & FILEV, P.D., 2007, "Modeling Electroporation in a Single Cell". *Biophys. J*, 92, 404-417.
- MANKOWSKI, J. & KRISTIANSEN, M., 2000, "A review of short pulse generator technology". *Plasma Science, IEEE Transactions on*, 28, 102-108.
- MIR, L. M., BUREAU, M. F., GEHL, J., *et al.*, 1999, "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses". National Acad Sciences.
- MIR, L. M., GEHL, J., SERSA, G., *et al.*, 2006, "Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes". *EJC Supplements*, 4, 14-25.
- MIR, L., BELEHRADEK, M., DOMENGE, C., *et al.*, 1991, "Electrochemotherapy, a novel antitumor treatment: First clinical trial". *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*, 313, 613-618.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M., WANG, Y. & HOFSCHEIDER, P.H., 1982, "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields". *The EMBO journal*, 1, 841-5.
- PAVLIN, M., KANDUSER, M., REBERSEK, M., *et al.*, 2005, "Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension". *Biophys. J*, 88, 4378-4390.
- PUC, M., COROVIC, S., FLISAR, K., *et al.*, 2004, "Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices". *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 64, 113-24.
- 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*, 101, 18129-18134.

- REBERSEK, M., FAURIE, C., KANDUSER, M., *et al.*, 2007, "Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro". *BioMedical Engineering OnLine*, 6, 25-25.
- RODAMPORN, S., BEEBY, S., HARRIS, N., *et al.*, 2007, "Design and Construction of a Programmable Electroporation system for Biological Applications". *The 1st Symposium Thai Biomedical Engineering, Thailand*. 234-238.
- SANG, K., JAE, H., KWANG, P. & TAEK, D., 2007, "Continuous Low-Voltage de Electroporation on a Microfluidic Chip with Polyelectrolytic Salt Bridges". *Analytical Chemistry*, 79, 7761-7766.
- SCHOENBACH, K., STARK, R., BEEBE, S. & BUESCHER, E., 2001, "Bioelectrics-new applications for pulsed power technology". *Pulsed Power Plasma Science, 2001. PPPS-2001. Digest of Technical Papers, 1*, 21-28 vol.1-21-28 vol.1.
- SCHWISTER, K. & DEUTICKE, B., 1985, "Formation and properties of aqueous leaks induced in human erythrocytes by electrical breakdown". *Biochimica et biophysica acta*, 816, 332-348.
- SEN GUPTA B, MASTERSON F, MAGEE TRA, 2005, "Inactivation of *E. coli* in Cranberry Juice by a High Voltage Pulsed Electric Field". *Eng Life Sci*,c5: 148-151.
- SERSA, G., MIKLAVCIC, D., CEMAZAR, M., *et al*, 2008, "Electrochemotherapy in treatment of tumours". *European Journal of Surgical Oncology*, 34, 232-240.
- TEISSIÉ, J., EYNARD, N., GABRIEL, B. & ROLS, M.P., 1999, "Electropermeabilization of cell membranes". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35, 3-19.
- TOKMAKÇI, M., 2006, "A High-Voltage Pulse Generation Instrument for Electrochemotherapy Method". *Journal of medical systems*, 30, 145-151.
- TSONG, T. Y., 1991, "Electroporation of cell membranes". *Biophys. J*, 60, 297-306.

- TSUKAMOTO J, 2007, "Efeito esterilizante da aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem em suco de laranja". *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 9: 45-52.
- WANG, H. & LU, C., 2006, "Electroporation of Mammalian Cells in a Microfluidic Channel with Geometric Variation". *Analytical Chemistry*, 78, 5158-5164.
- WANG, H. & LU, C., 2008, "Microfluidic electroporation for delivery of small molecules and genes into cells using a common DC power supply". *Biotechnology and bioengineering*, 100, 579-586.
- WEAVER, J. C. & CHIZMADZHEV, Y., 1996, "Theory of electroporation: A review". *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41, 135-160.
- YAKOVENKO, S., 2004, "Electroporators based on digital formation of arbitrarily-shaped electroporation pulses". *Biomedical Instrumentation and Technology*, 38, 397-409.
- ZIMMERMANN, U., VIENKEN, J. & PILWAT, G., 1980, "Development of drug carrier systems: electric field induced effects in cell membranes". *J. Electroanal. Chem*, 116, 553-574.
- ZIV, R., STEINHARDT, Y., PELLED, G., GAZIT, D. & RUBINSKY, B., 2008, "Micro-electroporation of mesenchymal stem cells with alternating electrical current pulses". *Biomedical microdevices*, 11,95–101.