

O livro das

Tecnologias e Tratamentos Baseados em Eletroporação

Editado por:
Peter Kramar
Damijan Miklavčič

1ª edição

www.ebtt.org

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in
univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID 102426115
ISBN 978-961-243-437-3 (PDF)

URL: <http://www.ebtt.org/>

Copyright © 2022 Založba FE. All rights reserved.
Razmnoževanje (tudi fotokopiranje) dela v celoti ali po delih
brez predhodnega dovoljenja Založbe FE prepovedano.

Založnik: Založba FE, Ljubljana
Izdajatelj: Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana
Urednik: prof. dr. Sašo Tomažič
1. elektronska izdaja

Prefácio

Este livro foi criado para preencher a necessidade de uma introdução concisa à eletroporação e às tecnologias e tratamentos baseados em eletroporação para aqueles que estão começando na área, incluindo estudantes. O campo da eletroporação é um campo verdadeiramente interdisciplinar, pois requer conhecimentos básicos e avançados em física, química, biologia, engenharia e medicina e, portanto, é muito difícil começar sem esse amplo conhecimento interdisciplinar. A maior parte do material é baseado no curso de pós-graduação e workshop internacional “Tecnologias e Tratamentos Baseados em Eletroporação” realizado em Liubliana semestralmente a partir de 2003, e anualmente desde 2011 (veja a história em www.ebtt.org). Outras partes do material vêm da experiência dos autores contribuintes e suas experiências no ensino e treinamento de alunos de pós-doutorado neste campo interdisciplinar. Agradecemos a todos os autores que contribuíram com material para este livro.

Damijan Miklavčič

Capítulo 1	7
A célula no campo elétrico – Potencial transmembranar induzido	
Tadej Kotnik	
Capítulo 2	22
Propriedades elétricas dos tecidos e suas mudanças durante a eletroporação	
Damijan Miklavčič, Bor Kos	
Capítulo 3	40
Eletropermeabilização celular <i>in vitro</i>	
Justin Teissié	
Capítulo 4	57
Transferência de ácidos nucleicos <i>in vitro</i>	
Marie-Pierre Rols	
Capítulo 5	777
Simulações de dinâmica molecular da eletroporação de membranas lipídicas	
Mounir Tarek	
Capítulo 6	110
Estresse elétrico e permeabilização da membrana em nanoescala e multiescala	
P. Thomas Vernier	
Capítulo 7	1266
Eletrotransferência gênica <i>in vivo</i>	
Maja Čemažar	
Capítulo 8	1411
Eletrotransferência de vacinas de DNA	
Véronique Prémat and Gaëlle Vandermeulen	
Capítulo 9	146
Eletroquimioterapia do laboratório ao paciente: princípios, mecanismos e aplicações	
Gregor Serša	
Capítulo 10	161
Eletroquimioterapia na prática clínica; Lições do desenvolvimento, implementação e perspectivas futuras	
Julie Gehl	
Capítulo 11	167
Desenvolvimento de equipamentos e eletrodos	
Damijan Miklavčič, Matej Reberšek	
Capítulo 12	1866
Eletroporação e eletropermeabilização – montando o quebra-cabeça	
Lluís M Mir	

Capítulo 1

A Célula no Campo Elétrico – Potencial Transmembranar Induzido

Tadej Kotnik

Universidade de Liubliana, Faculdade de Engenharia Elétrica, Liubliana, Eslovênia.

Resumo: Em condições fisiológicas, a membrana celular apresenta de forma contínua uma voltagem em repouso na faixa de dezenas de milivolts. A exposição da célula a um campo elétrico externo induz um componente adicional de voltagem transmembranar, proporcional à intensidade do campo externo e sobreposto ao componente de repouso durante a exposição. Ao contrário da voltagem de repouso, a voltagem induzida varia com a posição, e também do formato da célula e sua orientação em relação ao campo elétrico. Em suspensões de células, a voltagem induzida também depende da fração do volume ocupada por células. Há um atraso entre o campo elétrico externo e a voltagem induzida por ele, normalmente um pouco abaixo de um microssegundo, mas maior quando as células estão suspensas em um meio de baixa condutividade. Como consequência desse atraso, em exposições a campos elétricos com frequências acima de 1 megahertz (MHz) ou a pulsos elétricos com durações abaixo de 1 milissegundo (μs), a amplitude da voltagem induzida começa a diminuir com o aumento da frequência do campo elétrico ou com a diminuição da duração do pulso elétrico. Com frequências de campo elétrico se aproximando da faixa de giga-hertz ou com durações de pulso na faixa de nanossegundos, essa atenuação se torna tão pronunciada que as voltagens induzidas nas membranas de organelas no interior da célula se tornam comparáveis e podem até mesmo exceder a voltagem induzida na própria membrana plasmática.

A célula e sua membrana plasmática

Uma célula pode ser considerada sob vários aspectos. Pularemos a descrição mais usual, a de um biólogo, e nos concentraremos em duas outras mais técnicas, a descrição elétrica e a geométrica.

Do ponto de vista elétrico, uma célula pode ser grosseiramente descrita como um eletrólito (o citoplasma) circundado por um escudo eletricamente isolante (a membrana plasmática). Fisiologicamente, o exterior da célula também se assemelha a um eletrólito. Se uma célula for exposta a um campo elétrico externo, em suas imediações o campo elétrico se concentra na membrana. Isso resulta em uma diferença de potencial elétrico através da membrana, chamada de *voltagem transmembranar induzida*, que se sobrepõe à *voltagem transmembranar de repouso* tipicamente presente em condições fisiológicas. A *voltagem transmembranar* pode afetar o funcionamento dos canais de membrana dependentes de *voltagem*, iniciar potenciais de ação, estimular células cardíacas e, quando suficientemente alta, também leva à eletroporação da membrana celular, com as regiões da membrana em que se formam os poros intimamente correlacionadas com as regiões onde a *voltagem transmembranar induzida* se apresenta mais alta [1]. Com campos elétricos que variam rapidamente com o tempo, como ondas com frequências na faixa de megahertz ou superiores ou pulsos elétricos com duração na faixa de submicrosegundos, a membrana celular e seus arredores devem ser tratados como materiais com condutividade elétrica diferente de zero e uma permissividade dielétrica diferente de zero.

Do ponto de vista geométrico, a célula pode ser caracterizada como um corpo geométrico (o citoplasma) circundado por uma concha de espessura uniforme (a membrana). Para células suspensas, o modelo mais simples de célula é uma esfera cercada por uma concha esférica. Para uma generalidade aumentada, a esfera pode ser substituída por um esferoide (ou um elipsoide), mas, neste caso, o requisito de espessura uniforme complica substancialmente a descrição da concha. Se sua superfície interna é um esferoide ou elipsoide, sua superfície externa carece de uma caracterização geométrica simples, e vice-versa¹. Felizmente, essa complicação não afeta a *voltagem induzida* em estado

¹ Isso pode ser visualizado em duas dimensões desenhando uma elipse e, em seguida, tentando desenhar uma curva fechada em todos os lugares equidistantes da elipse. Esta curva não é uma elipse, e se se contentar com uma aproximação, a tarefa é realmente mais fácil de realizar manualmente do que com programas básicos de desenho em um computador.

estacionário na membrana plasmática dessas células, podendo ser determinada analiticamente.

Esferas, esferoides e elipsoides podem ser modelos razoáveis para células em suspensão, mas não para células em tecidos. Nenhum corpo geométrico simples pode modelar uma célula típica em um tecido e, além disso, cada célula geralmente difere em sua forma das demais. Com geometrias irregulares e/ou com células próximas umas das outras, a voltagem induzida não pode ser determinada analiticamente e, portanto, não pode ser formulada como uma função matemática explícita. Isso nos priva de parte do conhecimento disponível a partir de expressões explícitas, mas usando computadores modernos e métodos numéricos, a voltagem induzida em cada célula irregular particular ainda pode ser determinada com bastante precisão.

Voltagem transmembranar de repouso

Em condições fisiológicas, uma voltagem na faixa de -90 mV até -40 mV está sempre presente na membrana celular [2,3]. Essa voltagem é causada por um déficit mínimo de íons positivos no citoplasma em relação aos negativos, que é uma consequência do transporte de íons específicos através da membrana. Os atores mais importantes neste transporte são: (i) as bombas de Na-K, que exportam íons Na^+ para fora da célula e simultaneamente importam íons K^+ para dentro da célula; e (ii) os canais de vazamento de K, através dos quais íons K^+ podem fluir através da membrana em ambas as direções. A voltagem transmembranar de repouso reflete o equilíbrio eletroquímico da ação desses dois mecanismos e talvez a maneira mais fácil de explicar a ocorrência dessa voltagem seja descrever como o equilíbrio é alcançado.

A bomba Na-K funciona em ciclos. Em um único ciclo, ela exporta três íons Na^+ para fora da célula e importa dois íons K^+ para dentro dela. Isso gera um pequeno déficit de íons positivos no citoplasma e um gradiente de potencial elétrico que importa íons positivos para a célula e exporta íons negativos para fora da célula. Mas, ao mesmo tempo, a bomba também gera gradientes de concentração de Na^+ e K^+ , que atraem os íons Na^+ para dentro da célula e os íons K^+ para fora da célula. Os íons K^+ são os únicos que possuem um mecanismo significativo de transporte passivo através da membrana, a saber, os canais de vazamento de íons K, e através destes os íons K^+ são conduzidos para o equilíbrio elétrico e do gradiente de concentração. Quando esse equilíbrio é alcançado, o gradiente elétrico através da membrana determina a voltagem

transmembranar em repouso que está continuamente presente na membrana.

O desequilíbrio iônico responsável pela voltagem transmembranar de repouso representa uma fração muito pequena de todos os íons no citoplasma, de modo que a diferença de pressão osmótica gerada por esse desequilíbrio é desprezível. Além disso, a membrana atua como um capacitor carregado com os íons desbalanceados se acumulando perto de sua superfície, de modo que o citoplasma pode, em geral, ser visto como eletricamente neutro.

Voltagem transmembranar induzida

Quando uma célula é colocada em um campo elétrico, isso leva a uma distorção local do campo na célula e em seus arredores. Conforme descrito na seção introdutória deste capítulo, devido à baixa condutividade da membrana, nas proximidades da célula o campo elétrico está concentrado na membrana celular, onde é várias ordens de magnitude maior do que no citoplasma e fora da célula. Isso resulta em uma chamada voltagem transmembranar induzida que se sobrepõe ao componente em repouso. Nas subseções a seguir, descrevemos com mais detalhes a voltagem transmembranar induzida em células de várias formas e sob várias condições. Em cada caso considerado, os princípios de sobreposição permitem obter uma completa voltagem transmembranar adicionando o componente induzido ao de repouso.

Células esféricas

Para uma exposição a um campo elétrico homogêneo de corrente contínua (CC), a voltagem induzida na membrana celular é determinada resolvendo a equação de Laplace. Embora as células biológicas não sejam esferas perfeitas, em tratamentos teóricos geralmente são consideradas como tal. Para a primeira aproximação, a membrana plasmática também pode ser tratada como não condutiva. Sob essas suposições, a voltagem transmembranar induzida $\Delta\Phi_m$ é dada por uma fórmula frequentemente referida como a equação de Schwan (estado estacionário) [4],

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2} ER \cos \theta, \quad (1)$$

onde E é o campo elétrico na região onde a célula está situada, R é o raio da célula e θ é o ângulo medido a partir do centro da célula em relação à direção do campo. A voltagem é proporcional ao campo elétrico aplicado e ao raio da célula. Além disso, há valores extremos nos pontos onde o campo é perpendicular à membrana, ou seja, em $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$ (os "polos" da célula), e entre esses polos varia proporcionalmente ao cosseno de θ (ver Fig. 1, tracejado).

O valor de $\Delta\Phi_m$ dado pela Eq. (1) é normalmente estabelecido vários μ s após o início do campo elétrico. Com exposições a um campo CC durando centenas de microssegundos ou mais, esta fórmula pode ser aplicada com segurança para produzir o valor máximo de estado estacionário da voltagem transmembranar induzida. Para descrever o comportamento transitório durante os microssegundos iniciais, utiliza-se a equação de Schwan de primeira ordem [5],

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2} ER \cos \theta (1 - \exp(-t / \tau_m)), \quad (2)$$

onde τ_m é a constante de tempo de carregamento da membrana,

$$\tau_m = \frac{R \epsilon_m}{2d \frac{\sigma_i \sigma_e}{\sigma_i + 2\sigma_e} + R\sigma_m} \quad (3)$$

com σ_i , σ_m e σ_e sendo as condutividades do citoplasma, membrana celular e meio extracelular, respectivamente, ϵ_m a permissividade dielétrica da membrana, d a espessura da membrana e R novamente o raio da célula.

Em certos experimentos *in vitro*, onde meios extracelulares artificiais com condutividades substancialmente inferiores às fisiológicas são usados, o fator $3/2$ nas equações (1) e (2) diminui em valor, conforme descrito em detalhes em [6]. Mas geralmente, as equações (2) e (3) são aplicáveis a exposições a campos elétricos sinusoidais (corrente alternada, CA) com frequências abaixo de 1 MHz e pulsos elétricos retangulares superiores a 1 μ s.

Para determinar a voltagem induzida por frequências de campo ainda mais altas ou pulsos ainda mais curtos, as permissividades dielétricas dos eletrólitos em ambos os lados da membrana também devem ser levadas em consideração. Isso leva a uma nova generalização das equações (2) e (3) para um modelo de segunda ordem [7-9], e os resultados que ele produz serão descritos na última seção deste capítulo.

Células esferoidais e elipsoidais

Outra forma de generalização é assumir o formato de uma célula mais geral do que o de uma esfera. A generalização mais direta é para um esferoide (um corpo geométrico obtido girando uma elipse em torno de um de seus raios, de modo que uma de suas projeções ortogonais seja uma esfera e as outras duas sejam a mesma elipse) e mais adiante para um elipsoide (um corpo geométrico em que cada uma de suas três projeções ortogonais é uma elipse diferente). Para obter os análogos da equação de Schwan para tais células, resolve-se a equação de Laplace em coordenadas esferoidais e elipsoidais, respectivamente [10-12]. Além do fato de que esta solução é por si só um pouco mais complexa do que aquela em coordenadas esféricas, a generalização da forma invoca duas complicações adicionais descritas nos próximos dois parágrafos.

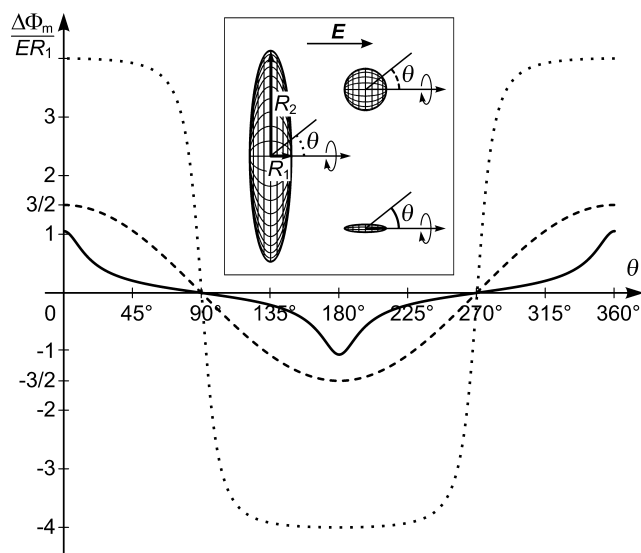


Figura 1: $\Delta\Phi_m$ em estado estacionário normalizado como função do ângulo polar θ para células esferoidais com o eixo de simetria rotacional alinhado com a direção do campo. Linha contínua: uma célula esferoidal prolata com $R_2 = 0,2 \times R_1$. Linha tracejada: uma célula esférica, $R_2 = R_1 = R$. Linha pontilhada: uma célula esferoidal oblata com $R_2 = 5 \times R_1$.

A descrição de uma célula é geometricamente realista se a espessura de sua membrana for uniforme. Este é o caso se a membrana representar o espaço entre duas esferas concêntricas, mas não com dois esferoides ou elipsoides confocais. Como resultado, a espessura da membrana

modelada em coordenadas esféricas ou elipsoidais é necessariamente não uniforme. Resolvendo a equação de Laplace nessas coordenadas, obtemos a distribuição espacial do potencial elétrico em um cenário não realista. No entanto, assumindo que a condutividade da membrana é zero, a voltagem transmembranar induzida obtida desta maneira ainda é realista. Ou seja, a blindagem do citoplasma está, então, completa e, portanto, o potencial elétrico em todo o citoplasma é constante. Deste modo, a geometria da superfície interna da membrana não afeta a distribuição de potencial fora da célula, que é o mesmo como se a célula fosse um corpo homogêneo não condutor com o mesmo formato². Uma discussão mais rigorosa da validade desta abordagem pode ser encontrada em [10]. A Fig. 1 compara a voltagem transmembranar induzida em dois esferoides com o eixo de simetria rotacional alinhado com a direção do campo, e aquela induzida em uma esfera.

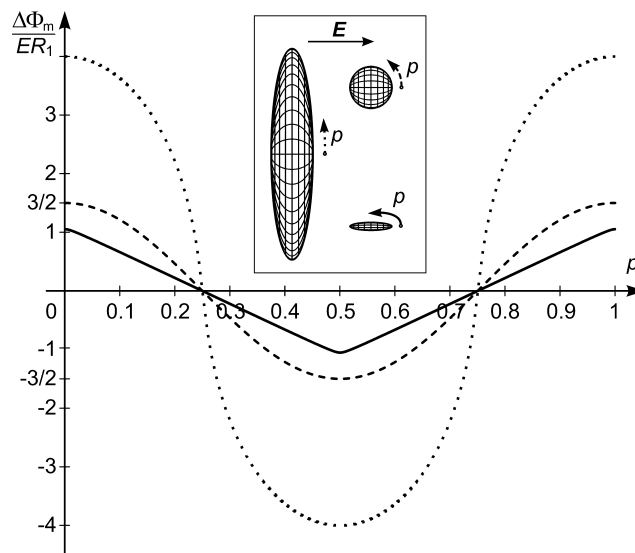


Figura 2: $\Delta\Phi_m$ em estado estacionário normalizado em função do comprimento do arco normalizado p para células esféricas com o eixo de simetria rotacional alinhado com a direção do campo. Linha contínua: célula esférica prolata com

² Como uma analogia grosseira, quando uma pedra é colocada em um riacho, as linhas de fluxo ao redor da pedra são as mesmas, independentemente da composição interna da pedra. Devido ao fato de que a pedra ser impermeável à água, apenas sua forma externa importa a este respeito. Da mesma forma, quando a membrana não é condutiva ou "impermeável à corrente elétrica", apenas a forma externa da célula afeta a densidade da corrente e a distribuição de potencial fora da célula.

$R_2 = 0,2 \times R_1$. Linha tracejada: célula esférica, $R_2 = R_1 = R$. Linha pontilhada: célula esferoidal oblata com $R_2 = 5 \times R_1$.

Para células não esféricas, geralmente, é mais revelador expressar $\Delta\Phi_m$ em função do comprimento do arco do que em função do ângulo θ (para uma esfera, as duas quantidades são diretamente proporcionais). Para uniformidade, a versão normalizada do comprimento do arco é usada, denotada por p e aumentando de 0 a 1 equidistantemente ao longo do arco da membrana. Isso é ilustrado na Fig. 2 para as células para as quais $\Delta\Phi_m(\theta)$ é mostrado na Fig. 1, e todos os gráficos de $\Delta\Phi_m$ em células não esféricas serão doravante apresentados desta forma.

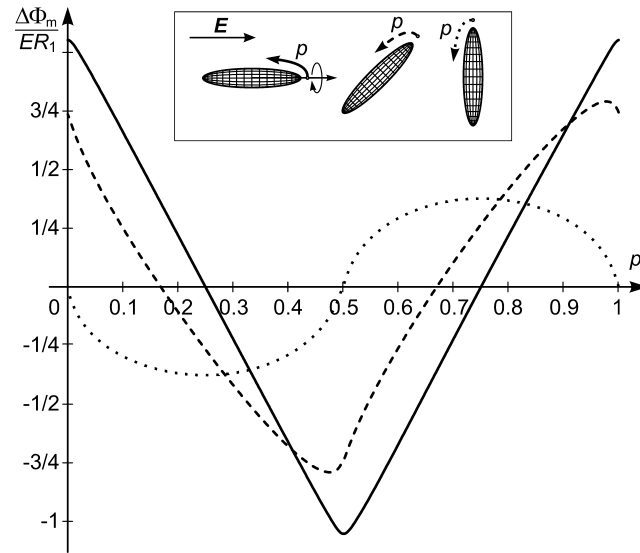


Figura 3: $\Delta\Phi_m(p)$ em estado estacionário normalizado para uma célula esferoidal prolata com $R_2 = 0,2 \times R_1$. Linha contínua: eixo de simetria rotacional (ESR) alinhado com o campo. Linha tracejada: ESR a 45° em relação ao campo. Linha pontilhada: ESR perpendicular ao campo.

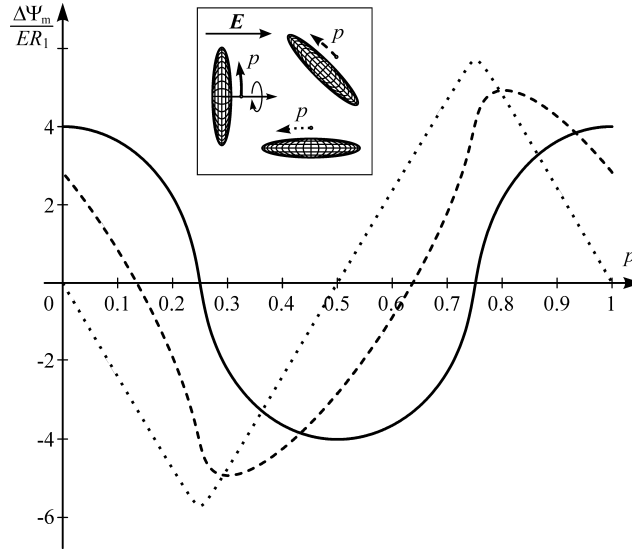


Figura 4: $\Delta\Phi_m(p)$ em estado estacionário normalizado para uma célula esferoide oblata com $R_2 = 5 \times R_1$. Linha contínua: eixo de simetria rotacional (ERS) alinhado com o campo. Linha tracejada: ERS a 45° em relação ao campo. Linha pontilhada: ERS perpendicular ao campo.

A segunda complicação de generalizar a forma da célula de uma esfera para um esferoide ou elipsoide é que a voltagem induzida agora também se torna dependente da orientação da célula em relação ao campo elétrico. Para lidar com isso, decompõe-se o vetor de campo em componentes paralelos aos eixos do esferoide ou elipsoide, e escreve-se a voltagem induzida como uma combinação linear correspondente das voltagens induzidas para cada uma das três orientações coaxiais [11,12]. As Figs. 3 e 4 mostram o efeito da rotação de dois esferoides diferentes em relação à direção do campo.

Células de forma irregular

Para uma célula com uma forma irregular, a voltagem transmembranar induzida não pode ser determinada exatamente, pois para tal geometria a equação de Laplace não pode ser resolvida analiticamente. Usando computadores modernos e ferramentas de elementos finitos, como o COMSOL Multiphysics, a voltagem induzida em uma determinada célula irregular ainda pode ser determinada numericamente, conforme descrito em detalhes em [13,14]. Embora os resultados obtidos dessa

maneira sejam bastante precisos, eles são aplicáveis apenas ao formato de célula particular para o qual foram calculados. A Fig. 5 mostra exemplos de duas células crescendo em uma placa de Petri e as tensões induzidas em suas membranas.

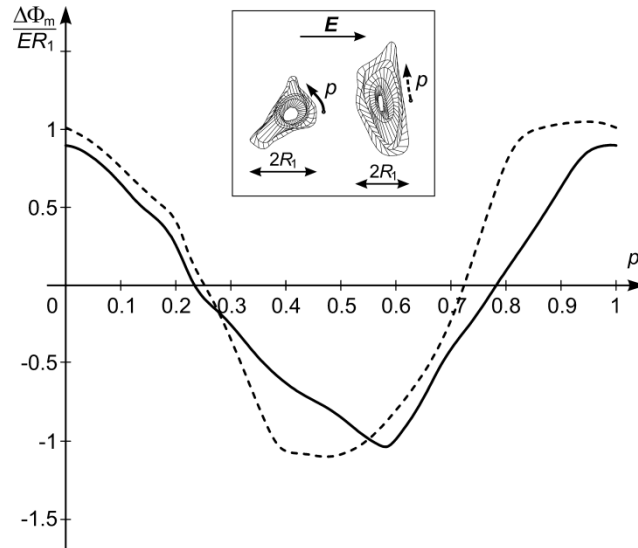


Figura 5: $\Delta\Phi_m(p)$ em estado estacionário normalizado para duas células de formato irregular crescendo na superfície plana de uma placa de Petri.

Células em suspensões densas

Em suspensões de células diluídas, a distância entre as células é muito maior do que as próprias células, e o campo local fora de cada célula praticamente não é afetado pela presença de outras células. Assim, para células que representam menos de 1% do volume da suspensão (para uma célula esférica com um raio de $10\ \mu\text{m}$, isso significa até 2 milhões de células/ml), o desvio real da voltagem transmembranar induzida prevista pela equação de Schwan é insignificante. No entanto, à medida que a fração de volume ocupada pelas células fica maior, a distorção do campo local em torno de cada célula pela presença de outras células nas proximidades torna-se mais pronunciada e a previsão produzida pela equação de Schwan menos realista (Fig. 6). Para frações de volume acima de dez por cento, bem como para *clusters* e redes de células, deve-se usar soluções numéricas ou analíticas aproximadas apropriadas para uma análise confiável da voltagem transmembranar induzida [15,16].

Independentemente da fração de volume que ocupam, enquanto as células estão suspensas, elas flutuam livremente e seu arranjo é bastante uniforme. Assintoticamente, isso corresponderia a uma estrutura cúbica de face centrada, e essa estrutura também é a mais apropriada para a análise da voltagem transmembranar induzida nas células em suspensão.

Para volumes com frações ainda maiores de células, as propriedades elétricas da suspensão começam a se assemelhar às de um tecido, mas apenas até certo ponto. O arranjo das células nos tecidos não se assemelha necessariamente a uma estrutura centrada na face, uma vez que as células podem formar estruturas específicas (camadas, por exemplo). Além disso, as células nos tecidos podem ser diretamente acopladas eletricamente (por exemplo, através de junções comunicantes). Essas e outras características específicas das interações entre células em tecidos e campos elétricos serão consideradas com mais detalhes no próximo capítulo.

Campos de alta frequência e pulsos muito curtos

A constante de tempo do carregamento da membrana (τ_m) dada pela equação (3) implica que há um atraso entre a aplicação do campo elétrico externo e a voltagem induzida por este campo. Como mencionado acima, τ_m (e, portanto, o atraso) está um pouco abaixo de um microssegundo em condições fisiológicas, mas pode ser maior quando as células estão suspensas em um meio de baixa condutividade. Para campos alternados (CA) com o período de oscilação muito mais longo que τ_m , bem como para pulsos retangulares muito mais longos que τ_m , a amplitude da voltagem induzida permanece inalterada. No entanto, para campos CA com período comparável ou menor que τ_m , bem como para pulsos menores que τ_m , a amplitude da voltagem induzida começa a diminuir.

Para ilustrar como a amplitude da voltagem transmembranar induzida é atenuada à medida que a frequência do campo CA aumenta, traçamos a amplitude normalizada da voltagem induzida como uma função da frequência do campo. Para uma célula esférica, o gráfico obtido é mostrado na Fig. 6. O platô de baixa frequência e o declive que se segue são ambos descritos pela equação de Schwan de primeira ordem, mas o platô de alta frequência é apenas descrito pelo modelo de segunda ordem [7-9], em que todas as condutividades elétricas e permissividades dielétricas são contabilizadas.

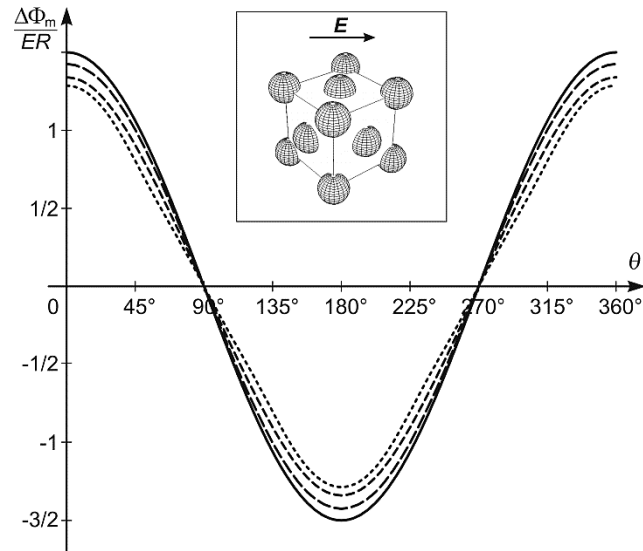


Figura 6: $\Delta\Phi_m(\theta)$ em estado estacionário normalizado para células esféricas em suspensões de várias densidades (distâncias intercelulares). Linha contínua: resultado analítico para uma única célula, conforme fornecido pela equação (1). Linhas tracejadas: resultados numéricos para células dispostas em uma estrutura cúbica centrada na face e ocupando (com tamanho dos traços decrescendo) 10%, 30% e 50% do volume total da suspensão.

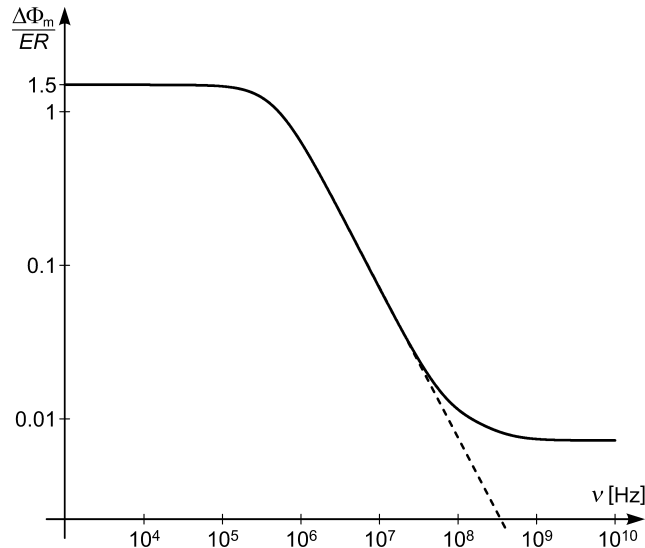


Figura 7: A amplitude do $\Delta\Phi_m$ em estado estacionário normalizado em função da frequência do campo CA. A curva tracejada mostra a primeira ordem, e a curva sólida mostra a equação de Schwan de segunda ordem. Observe que ambos os eixos são logarítmicos.

Com frequências de campo se aproximando da faixa de GHz, ou com durações de pulso na faixa de nanossegundos, a atenuação da voltagem induzida na membrana citoplasmática torna-se tão pronunciada que esta voltagem se torna comparável à voltagem induzida nas membranas de organelas no interior da célula. Em certas circunstâncias, particularmente se o interior da organela é eletricamente mais condutor do que o citoplasma ou se a membrana da organela tem uma permissividade dielétrica mais baixa do que a membrana celular, a voltagem induzida na membrana desta organela pode temporariamente até exceder a voltagem induzida na membrana plasmática [17]. Em princípio, isso poderia fornecer uma explicação teórica para uma série de relatórios recentes de que pulsos elétricos muito curtos e intensos (dezenas de ns, milhões ou dezenas de milhões de V/m) também podem induzir a eletroporação em membranas de organelas [18-20].

Referências

- [1] T. Kotnik, G. Pucihar, D. Miklavčič. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *J. Membrane Biol.* 236: 3-13, 2010.

- [2] K.S. Cole. *Membranes, Ions and Impulses*. University of California Press, Berkeley, USA, 1972.
- [3] H.L. Atwood, W.A. Mackay. *Essentials of Neurophysiology*. BC Decker, Toronto, Canada, 1989.
- [4] H.P. Schwan. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5: 147-209, 1957.
- [5] H. Pauly, H.P. Schwan. Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforsch.* 14B: 125-131, 1959.
- [6] T. Kotnik, F. Bobanović, D. Miklavčič. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields — a theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 285-291, 1997.
- [7] C. Grosse, H.P. Schwan. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63: 1632-1642, 1992.
- [8] T. Kotnik, D. Miklavčič, T. Slivnik. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields — a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45: 3-16, 1998.
- [9] T. Kotnik, D. Miklavčič. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47: 1074-1081, 2000.
- [10] T. Kotnik, D. Miklavčič. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.* 79: 670-679, 2000.
- [11] J. Gimsa, D. Wachner. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys. J.* 81: 1888-1896, 2001.
- [12] B. Valič, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissié, M.P. Rols, D. Miklavčič. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* 32: 519-528, 2003.
- [13] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valič, D. Miklavčič. Numerical determination of the transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals Biomed. Eng.* 34: 642-652, 2006.
- [14] G. Pucihar, D. Miklavčič, T. Kotnik. A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE T. Biomed. Eng.* 56: 1491-1501, 2009.
- [15] R. Susil, D. Šemrov, D. Miklavčič. Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro. Magnetobiol.* 17: 391-399, 1998.
- [16] M. Pavlin, N. Pavšelj, D. Miklavčič. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49: 605-612, 2002.
- [17] T. Kotnik, D. Miklavčič. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys. J.* 90: 480-491, 2006.
- [18] K.H. Schoenbach, S.J. Beebe, E.S. Buescher. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22: 440-448, 2001.
- [19] S.J. Beebe, P.M. Fox, L.J. Rec, E.L. Willis, K.H. Schoenbach. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J.* 17: 1493-1495, 2003.

- [20] E. Tekle, H. Oubrahim, S.M. Dzekunov, J.F. Kolb, K.H. Schoenbach, P. B. Chock. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys. J.* 89: 274-284, 2005.

Agradecimentos



Este trabalho foi apoiado pela Agência de Pesquisa Eslovena.

Tadej Kotnik nasceu em Liubliana, Eslovênia, em 1972. Recebeu o título de Ph.D. em Biofísica pela Universidade Paris XI e outro Ph.D. em Engenharia Elétrica pela Universidade de Liubliana, ambos em 2000. Atualmente é Professor Pleno e ex-Vice-Reitor de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Liubliana. Seus interesses de pesquisa incluem eletrodinâmica da membrana celular, bem como estudo teórico e experimental de fenômenos biofísicos relacionados, particularmente eletroporação de membrana e eletrotransferência gênica.

Tadej Kotnik é o primeiro autor de 23 artigos em periódicos classificados na SCI, citados mais de 1200 vezes, excluindo autocitações, e coautor de outros 28 artigos citados mais de 800 vezes, excluindo autocitações. Seu índice h é de 26. Em 2001 ele recebeu o Prêmio Galvani da Sociedade de Bioeletroquímica.

Capítulo 2

Propriedades Elétricas dos Tecidos e suas Mudanças durante a Eletroporação

Damijan Miklavčič, Bor Kos

Universidade de Liubliana, Faculdade de Engenharia Elétrica, Liubliana, Eslovênia.

Resumo: Propriedades elétricas passivas dos tecidos biológicos, como permissividade e condutividade, são importantes em problemas aplicados de eletroporação. As densidades e caminhos da corrente resultantes de um pulso elétrico aplicado são ditadas em grande parte pela permissividade e condutividade relativa dos tecidos biológicos. Apresentamos resumidamente algumas bases teóricas sobre a condução elétrica em materiais biológicos e fatores que afetam a medição das propriedades dielétricas do tecido que precisam ser levados em consideração ao projetar os procedimentos de medição. Grandes discrepâncias entre os dados relatados por diferentes pesquisadores são encontradas na literatura. Isso se deve a fatores como as diferentes técnicas de medição utilizadas, o fato de as propriedades macroscópicas do tecido não apresentarem homogeneidade, dispersões, anisotropia, não linearidade, bem como dependência da temperatura e mudanças ao longo do tempo. Além disso, quando o tecido biológico é exposto a um campo elétrico alto, ocorrem alterações em suas propriedades elétricas.

Introdução

As propriedades elétricas dos tecidos biológicos e das suspensões celulares têm sido alvo de interesse há mais de um século. Tais propriedades determinam os caminhos do fluxo de corrente através do corpo e, portanto, são muito importantes na análise de uma ampla gama de aplicações biomédicas. Em um nível mais fundamental, o conhecimento dessas propriedades elétricas pode levar à compreensão dos processos biológicos

básicos subjacentes. Para analisar a resposta de um tecido ao estímulo elétrico, são necessários dados sobre a condutividade e a permissividade relativa dos tecidos ou órgãos. Uma descrição microscópica da resposta é complicada pela variedade de formas celulares e sua distribuição dentro do tecido, bem como pelas diferentes propriedades do meio extracelular. Em baixa frequência, a condutividade elétrica é determinada principalmente pela concentração de íons extracelulares e sua mobilidade.

Portanto, uma abordagem macroscópica é mais frequentemente usada para caracterizar distribuições de campo em sistemas biológicos. No entanto, mesmo em um nível macroscópico, as propriedades elétricas são complexas. Estas podem depender da orientação do tecido em relação ao campo aplicado (anisotropia direcional), da frequência do campo aplicado (o tecido não é um dielétrico perfeito, nem um condutor perfeito) ou também serem dependentes do tempo e espaço (por exemplo, mudanças na condutividade do tecido durante a eletroporação) [1]–[3].

Materiais biológicos no campo elétrico

As propriedades elétricas de qualquer material, incluindo tecidos biológicos, podem ser amplamente divididas em duas categorias: condutor e isolante. Em um condutor, as cargas elétricas se movem livremente em resposta à aplicação de um campo elétrico, ao passo que em um isolante (dielétrico) as cargas são fixas e, portanto, não são livres para se mover – a corrente não flui.

Se um material condutor for colocado em um campo elétrico externo, as cargas serão redistribuídas dentro do condutor até que o campo elétrico interno resultante seja zero. No caso de um material isolante, não há cargas elétricas livres, portanto, a migração de carga líquida não ocorre. Em materiais polares, os centros de carga positivo e negativo nas moléculas (por exemplo, água) não coincidem. Um campo aplicado, E_0 , tende a orientar os dipolos e produz um campo dentro do dielétrico, E_p , que se opõe ao campo aplicado. Este processo é denominado polarização. A maioria dos materiais contém uma combinação de dipolos e cargas livres. Assim, o campo elétrico em qualquer material é reduzido em relação ao seu valor de espaço livre (vácuo). O campo interno resultante dentro do material, E , é então:

$$E = E_0 - E_p$$

O campo elétrico interno resultante é reduzido significativamente em relação ao campo aplicado se o material for um isolante e tem redução praticamente zero em um bom condutor. Essa redução é caracterizada por

um fator ϵ_r , que é chamado de permissividade relativa ou constante dielétrica, de acordo com:

$$E = \frac{E_0}{\epsilon_r}$$

Na prática, a maioria dos materiais, incluindo os tecidos biológicos, apresentam algumas características de ambos, tanto isolantes como condutores, pois contêm dipolos e também cargas que podem se mover, mas de forma restrita [4], [5].

Em um nível macroscópico, descrevemos o material como tendo uma permissividade, ϵ , e uma condutividade, σ . A permissividade caracteriza a capacidade do material de prender ou armazenar cargas ou girar dipolos moleculares, enquanto a condutividade descreve sua capacidade de transportar cargas. A permissividade também ajuda a determinar a velocidade da luz em um material de forma que o espaço livre tenha uma permissividade $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12}$ F/m. Desta forma:

$$\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$$

A energia armazenada por unidade de volume em um material, u , e a potência dissipada por unidade de volume, p , são:

$$u = \frac{\epsilon E^2}{2} \qquad p = \frac{\sigma E^2}{2}$$

Considere um exemplo de material que tem uma espessura, d , e uma área da seção transversal, A (Figura 1).

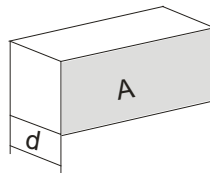


Figura 1: Uma pequena parte teórica considerada de um material.

Se o material for um isolante, tratamos a amostra como um capacitor com capacitância (C); se for um condutor, então o tratamos como um condutor com condutância (G):

$$C = \epsilon \cdot \frac{A}{d} \qquad G = \sigma \cdot \frac{A}{d}$$

Um modelo simples para um material real, como tecido, seria uma combinação paralela de um capacitor e um condutor. Se uma voltagem V constante (DC) for aplicada a esta combinação paralela, então uma corrente de condução $I_c = GV$ fluirá e uma quantidade de carga $Q = CV$ será armazenada. No entanto, se uma voltagem alternada (AC) foi aplicada à combinação:

$$V(t) = V_0 \cos(\omega t)$$

A carga nas placas do capacitor agora está mudando com a frequência f . Caracterizamos este fluxo como uma corrente de deslocamento:

$$I_d = \frac{dQ}{dt} = -\omega CV_0 \sin(\omega t)$$

A corrente total que flui através do material é a soma das correntes de condução e deslocamento, que estão afastadas 90° em fase, com as correntes de deslocamento estando “à frente” da voltagem aplicada. A corrente total é $I = I_c + I_d$, portanto:

$$I = GV + C \cdot \frac{dV}{dt} = (\sigma + i\omega\epsilon)V \cdot \frac{A}{d}$$

O material real, então, pode ser caracterizado como tendo uma admitância, Y^* , dada por:

$$Y^* = G + i\omega C = (A/d)(\sigma + i\omega\epsilon)$$

Onde $*$ indica uma quantidade de valor complexo. Em termos de propriedades do material, definimos uma condutividade correspondente de valor complexo:

$$\sigma^* = (\sigma + i\omega\epsilon)$$

Descrever um material em termos de sua admitância enfatiza sua capacidade de transportar corrente elétrica. Alternativamente, poderíamos enfatizar sua capacidade de restringir o fluxo de corrente considerando sua impedância $Z^* = 1/Y^*$ ou para uma condutância pura, sua resistência, $R = 1/G$.

Também podemos definir a corrente total como:

$$I = (\epsilon_r - i\sigma/\omega\epsilon_0)i\omega\epsilon_0 \frac{A}{d} = C \frac{dV}{dt}$$

Podemos definir uma permissividade relativa de valor complexo:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_r - \frac{i\sigma}{\omega\varepsilon_0} = \varepsilon_r' - i\varepsilon_r''$$

com $\varepsilon_r' = \varepsilon_r$ e $\varepsilon_r'' = \sigma / (\omega\varepsilon_0)$. A condutividade complexa e a permissividade complexa estão relacionadas por:

$$\sigma^* = i\omega\varepsilon^* = i\omega\varepsilon_0\varepsilon_r^*$$

Podemos considerar a condutividade de um material como uma medida da capacidade de sua carga ser transportada por todo o seu volume em resposta ao campo elétrico aplicado. Da mesma forma, sua permissividade é uma medida da capacidade de seus dipolos girarem ou de sua carga ser armazenada em resposta ao campo aplicado. Observe que se a permissividade e a condutividade do material forem constantes, a corrente de deslocamento aumentará com a frequência, enquanto a corrente de condução não muda. Em frequências baixas, o material se comportará como um condutor, mas os efeitos capacitivos se tornarão mais importantes em frequências mais altas. Para a maioria dos materiais, entretanto, σ^* e ε^* são dependentes da frequência. Essa variação é chamada de dispersão e é devido ao relaxamento dielétrico – o atraso na polarização molecular após a mudança do campo elétrico em um material. Os tecidos biológicos exibem várias dispersões diferentes em uma ampla faixa de frequências [4].

As dispersões podem ser entendidas em termos da orientação dos dipolos e do movimento dos portadores de carga. Em frequências relativamente baixas, é relativamente fácil para os dipolos se orientarem em resposta à mudança no campo aplicado, enquanto os portadores de carga viajam por distâncias maiores sobre as quais há uma maior oportunidade de aprisionamento em um defeito ou interface como a membrana celular [6]. À medida que a frequência aumenta, os dipolos são menos capazes de acompanhar as mudanças no campo aplicado e a polarização correspondente desaparece. Em contraste, os portadores de carga viajam distâncias mais curtas durante cada meio-ciclo e têm menos probabilidade de ficarem presos. Conforme a frequência aumenta, a permissividade diminui e, como o aprisionamento se torna menos importante, a condutividade aumenta. Em um material heterogêneo, como o tecido biológico, várias dispersões são observadas, conforme ilustrado na Figura 2. Em suma, a dispersão alfa na faixa de quilohertz é devido aos efeitos da membrana celular, como canais iônicos e difusão iônica e é a primeira das dispersões a desaparecer com a morte do tecido. A dispersão beta pode ser observada em torno da faixa de megahertz devido à carga capacitiva das membranas celulares. Acima da dispersão beta, a impedância das membranas celulares cai drasticamente, permitindo que a corrente elétrica passe não apenas pelo espaço extracelular, mas também pelo intracelular.

Esta dispersão é particularmente interessante, pois também é evidente na condutividade do material. A última, a dispersão gama (acima da faixa de gigahertz) se deve a mecanismos dipolares das moléculas de água no material.

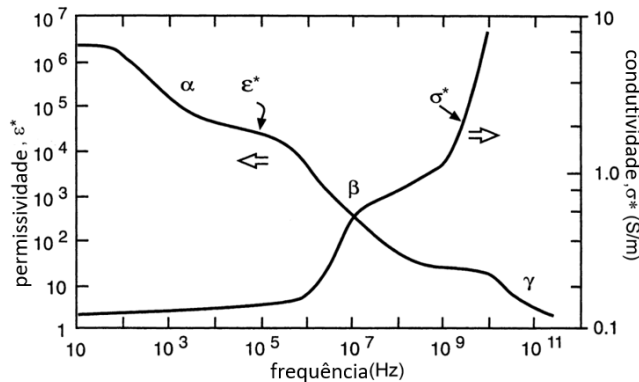


Figura 2: Dependência de frequência típica da permissividade complexa e condutividade complexa de um material heterogêneo, como um tecido biológico.

Medições de propriedades dielétricas dos tecidos

Existe uma grande discrepância entre vários dados sobre as propriedades elétricas de materiais biológicos encontrados na literatura. A medição das propriedades dielétricas do tecido pode ser complicada devido a vários fatores, como a falta de homogeneidade do tecido, anisotropia, o estado fisiológico do tecido, sazonalidade, mudanças relacionadas à idade e doenças e polarização do eletrodo [1].

Heterogeneidade dos tecidos

O tecido é um material altamente não homogêneo. A própria célula é composta por uma membrana isolante que envolve um citoplasma condutor. Uma suspensão de células pode ser considerada em baixas frequências simplesmente como inclusões não condutoras em um fluido condutor [6]. O isolamento é fornecido pela membrana celular. Em frequências na faixa de MHz, o acoplamento capacitivo através dessa membrana torna-se mais importante, permitindo que a corrente elétrica passe não apenas ao redor da célula, mas também através dela. No tecido, as células são circundadas por

uma matriz extracelular, que pode ser extensa, como no caso do osso, ou mínima, como no caso do tecido epitelial. Tecidos não são formados por células de um único tamanho ou função. Um tecido é perfundido com sangue e ligado ao sistema nervoso central por neurônios. Portanto, é difícil (se não impossível) extrapolar das propriedades dielétricas de uma suspensão de células para as de um tecido intacto.

Anisotropia de tecidos

Alguns materiais biológicos, como osso ou músculo esquelético, são anisotrópicos. Portanto, ao se referir aos valores de condutividade e permissividade medidos, é necessário incluir dados sobre a orientação dos eletrodos em relação ao eixo principal do tecido; por exemplo, eixo longitudinal, transversal ou uma combinação de ambos. Por exemplo, os músculos são compostos de fibras, células individuais muito grandes alinhadas na direção da contração muscular. A condução elétrica ao longo do comprimento da fibra é significativamente mais fácil do que a condução na direção perpendicular às fibras. Portanto, o tecido muscular manifesta propriedades elétricas anisotrópicas típicas. A condutividade longitudinal é significativamente maior do que a condutividade transversal (pode ser até 8 vezes maior) [7].

Além disso, a anisotropia do tecido é dependente da frequência. Ou seja, se a frequência da corrente for alta o suficiente, as propriedades anisotrópicas desaparecem. Especificamente para o tecido muscular, isso acontece na faixa de frequência MHz, ou seja, na dispersão beta.

Fatores fisiológicos e mudanças no tecido

Quaisquer mudanças na fisiologia do tecido devem produzir mudanças em suas propriedades elétricas. Este princípio tem sido usado para identificar e/ou monitorar a presença de várias doenças ou condições [8, 9].

Os tumores geralmente têm maior conteúdo de água do que as células normais devido à necrose celular, mas também à vascularização irregular e fenestrada. A maior condutividade de tumores na faixa de frequência MHz foi identificada como um alvo potencial para aplicações de exames de imagem [10]. Além disso, pode haver diferenças na estrutura da membrana e também a presença de gordura, que é um condutor de eletricidade pior que a água. Mudanças na porcentagem de gordura corporal ou água são refletidas em mudanças na impedância do tecido [8]. Também foi relatado

que alterações patológicas no fígado, como esteatose ou cirrose hepática, podem influenciar as propriedades medidas do tecido em frequências de 100 MHz [9].

Além disso, a morte ou excisão do tecido resulta em mudanças significativas nas propriedades elétricas. O metabolismo do tecido diminui após a excisão do tecido e, frequentemente, a temperatura cai. Se o tecido é mantido por sistemas de manutenção de temperatura e perfusão, o tecido pode ser estabilizado por um período limitado de tempo em um estado vivo *in vitro* (*ex vivo*). Se o tecido não tiver essa manutenção, entretanto, ocorrerão mudanças irreversíveis, seguidas de morte celular e tecidual. Por essas razões, deve-se ter um cuidado considerável na interpretação das medições elétricas realizadas em tecidos excisados.

As propriedades elétricas do tecido também dependem de sua temperatura. A mobilidade dos íons que transportam a corrente aumenta com a temperatura à medida que a viscosidade do fluido extracelular diminui. Foi sugerido que o rápido aumento da condutividade por conta da temperatura fosse usado, por exemplo, para monitorar o progresso do tratamento de hipertermia. Além disso, outras possíveis alterações, como edema celular ou oclusão do fluxo sanguíneo, também afetam as propriedades do tecido.

Polarização dos eletrodos

A polarização do eletrodo é uma manifestação da organização das cargas que ocorrem na interface tecido/amostra-eletrodo na presença de moléculas de água e íons hidratados. O efeito aumenta com o aumento da condutividade da amostra [11].

Em uma suspensão de células, uma camada de contra-íons pode se formar em cada eletrodo. A queda de potencial nesta camada reduz o campo elétrico disponível para conduzir o transporte de carga na suspensão, resultando em uma condutividade aparentemente mais baixa da suspensão. À medida que a frequência aumenta, a camada de contra-íons é menos capaz de seguir as mudanças no sinal aplicado, a queda de potencial na interface amostra-eletrodo diminui e a condutividade aparente da suspensão aumenta. Assim, a polarização do eletrodo é mais pronunciada em frequências mais baixas e em amplitudes mais baixas do sinal da voltagem medido.

O processo é mais complicado em tecidos. A inserção de eletrodos invasivos pode primeiro causar a liberação de eletrólitos devido ao trauma do tecido circundante e, posteriormente, pode ocorrer o desenvolvimento de uma região ferida pouco condutora. Esta região pode blindar parte do

eletrodo da corrente iônica e, assim, reduzir os efeitos de polarização em comparação com uma solução iônica equivalente em condutividade ao fluido intracelular.

O material do eletrodo desempenha um papel importante na determinação de sua impedância de polarização, cuja importância relativa diminui com o aumento da frequência. É considerada uma boa prática medir a impedância do tecido *in vivo* depois de esperar um tempo suficiente para que os processos de polarização do eletrodo se estabilizem. Um tempo típico pode ser da ordem de trinta minutos.

Duas diferentes configurações básicas de eletrodos são usadas para medir as propriedades elétricas de materiais biológicos; o método de dois eletrodos e o método de quatro eletrodos.

Método de dois eletrodos: adequado para medições de corrente alternada (CA). Não pode ser usado para medições de corrente contínua (DC) devido à polarização do eletrodo, que conseqüentemente dá resultados incorretos para a condutividade da amostra entre os eletrodos. Para medições CA, a faixa de frequência na qual a polarização do eletrodo é importante e depende, até certo ponto, do sistema que está sendo medido e do material do eletrodo. Para suspensões de células é importante até quase 100 kHz, enquanto para tecido medido *in vivo* é significativo apenas até cerca de 1 kHz. Variando a separação dos eletrodos, a contribuição da polarização do eletrodo pode ser determinada e eliminada, porém este é um método mais aplicável para amostras líquidas, uma vez que requer eletrodos de placa paralela.

Método de quatro eletrodos: pode ser usado para medições DC e CA. Dois pares de eletrodos são usados: os eletrodos de corrente externos e os eletrodos de voltagem internos. A corrente da fonte passa pela amostra. Eletrodos de voltagem com separação conhecida são colocados na amostra entre os eletrodos de corrente. Ao medir a corrente como a queda de voltagem através de um resistor em série com a amostra e a queda de voltagem através dos eletrodos internos, pode-se determinar a condutividade da amostra entre os eletrodos internos. A vantagem desse método é que a polarização nos eletrodos de corrente não tem influência na diferença de voltagem entre os eletrodos de voltagem. A polarização nos eletrodos de voltagem é insignificante para DC e AC devido à alta impedância de entrada do sistema de medição. A desvantagem é que os resultados da medição são interpretados com base na suposição de que o tecido é homogêneo em toda a região onde a medição é realizada.

Resposta elétrica do tecido ao campo elétrico

Alterações na condutividade do tecido foram observadas *in vivo* em tecidos submetidos a um campo elétrico alto o suficiente. Dito isto, podemos usar as propriedades dielétricas do fígado e tentar calcular a resposta elétrica teórica a um pulso de tensão retangular curta com a duração de 100 μs e o tempo de subida de 1 μs (parâmetros de pulso típicos usados para eletroquimioterapia). Usamos o circuito RC paralelo para modelar a resposta elétrica do tecido (ver Figura 3).

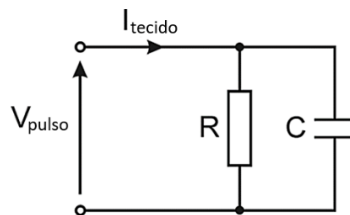


Figura 3: Circuito RC paralelo: uma representação teórica da resposta do tecido aos pulsos elétricos.

As complicações surgem do fato de que: i) os parâmetros de pulso (a duração do pulso, o tempo de subida e descida) determinam o conteúdo de seu espectro de frequência e ii) a condutividade e a permissividade do tecido dependem da frequência. A resposta obtida para o primeiro pulso é apresentada na Figura 4. No início do pulso de tensão, a corrente de deslocamento transitória capacitiva é observada. À medida que as membranas são carregadas, a tensão entre elas aumenta e a corrente medida diminui. Logo o estado estacionário é alcançado e a corrente se estabiliza por meio da condutância do fluido extracelular. Como o modelo que descreve as dispersões dielétricas é linear, a mudança da tensão aplicada escala proporcionalmente à amplitude da corrente.

Podemos comparar esta resposta calculada com a resposta medida no fígado de um murino *in vivo* para o mesmo pulso, como acima, e diferentes amplitudes de pulso abrangendo até intensidades de campo eletroporativo (Figura 5) [12]. Para a menor tensão aplicada, podemos ver uma boa concordância com a resposta calculada. À medida que a intensidade do campo é aumentada, a resposta elétrica do tecido não é mais linear, o que significa que a corrente está aumentando mais rápido do que a tensão. A corrente também está aumentando *durante* o próprio pulso, como pode ser visto pelo aumento da corrente nas tensões mais altas na Figura 5. Medir as propriedades elétricas passivas de tecidos eletroporados pode fornecer

feedback em tempo real sobre o resultado do tratamento [12], [13]. No entanto, deve-se ter cuidado na interpretação do aumento da corrente durante a aplicação de tratamentos de eletroporação, devido à variabilidade natural das propriedades dielétricas do tecido e porque o aumento da condutividade também pode ser um produto do aquecimento do tecido [14], [15].

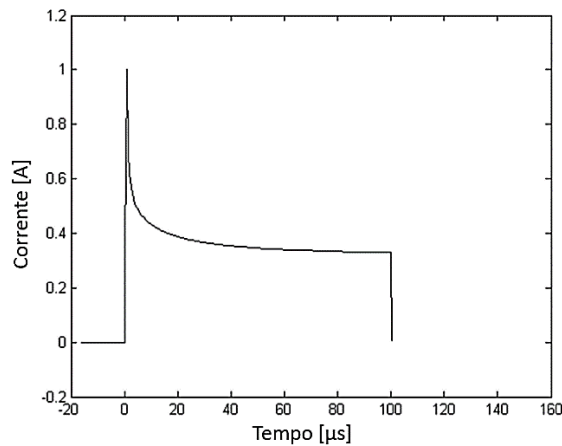


Figura 4: Resposta calculada do tecido durante a entrega de pulso de tensão retangular com a duração de 100 μs , tendo o tempo de subida de 1 μs e a amplitude de 120 V. Eletrodos de placa com distância entre eletrodos de 4,4 mm.

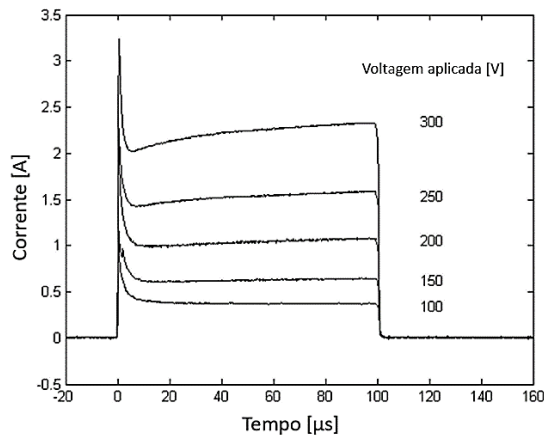


Figura 5: Resposta do tecido medida durante a entrega de pulsos retangulares de 100 μs de diferentes amplitudes ao fígado de um murino *in vivo*. Adaptado de Cukjati *et al.* [10]. Os pulsos foram gerados usando Jouan GHT1287B; foram utilizados eletrodos de placa com distância de 4,4 mm entre os eletrodos.

A resposta medida é consistente com a hipótese de que a condutividade do tecido também deve aumentar de forma mensurável, uma vez que em um nível celular a eletroporação causa o aumento da condutância da membrana [16]. Ao medir o tecido *ex vivo* e um “tecido fantasma” feito de material semelhante a um gel [17] e tecido hepático *ex-vivo* [18] usando MREIT (*Magnetic Resonance Electrical Impedance Tomography*), pudemos demonstrar que as mudanças de condutividade elétrica devido à eletroporação de membrana são dependentes da amplitude e ocorrem apenas no tecido, mas não no tecido fantasma. Não está claro, entretanto, para qual valor a condutividade do tecido aumenta como consequência da eletroporação da membrana plasmática. Foi estipulado que este poderia ser próximo ao valor na faixa de dispersão beta [19].

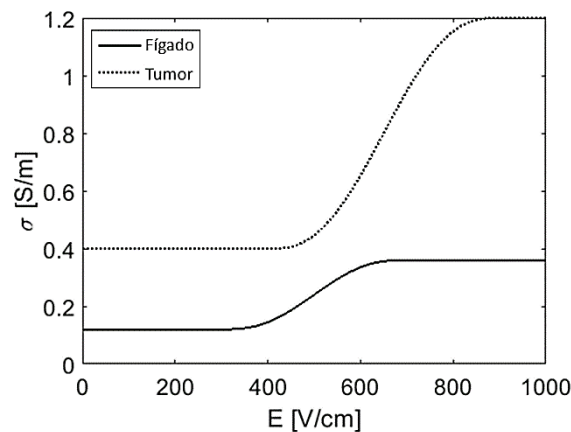


Figura 6: Condutividade dos tecidos em função da intensidade do campo elétrico local.

Além disso, em aplicações onde pulsos elétricos na pele ou em tecidos subjacentes (como tumor subcutâneo) são aplicados externamente, pode-se esperar que sejam necessárias amplitudes de voltagem muito altas para vencer a alta resistência da pele e permeabilizar os tecidos subjacentes. Ou seja, os tecidos entre os eletrodos podem ser vistos como resistores conectados em série. Aplicar voltagem em tal circuito (divisor de voltagem) faz com que a voltagem seja distribuída entre os resistores proporcionalmente às suas resistividades [20]. Ao se aplicar pulsos elétricos, quase toda a voltagem aplicada cai sobre o tecido mais resistivo (menos condutor), em nosso caso as camadas mais externas da pele. Isso resultaria em uma força de campo elétrico muito alta na pele, enquanto o campo elétrico em outros tecidos permaneceria insuficiente para uma

eletroporação celular bem-sucedida. Se nosso objetivo é a eletroquimioterapia do tumor subjacente (neste caso, subcutâneo), podemos nos perguntar como é possível uma eletroquimioterapia bem-sucedida de tumores subcutâneos quando eletrodos de placa externa são usados. A resposta está no aumento em massa da condutividade dos tecidos durante a eletroporação, um fenômeno que também foi observado *in vivo*. Este aumento de condutividade leva à uma mudança na distribuição do campo elétrico, que expõe o tumor a um campo elétrico alto o suficiente para a permeabilização da membrana celular [21]. Para apoiar ainda mais essa hipótese, descrevemos esse processo com um modelo numérico, levando em consideração as mudanças nas propriedades elétricas dos diferentes tecidos durante a eletroporação. Na Figura 6, seis etapas do processo de eletroporação no modelo de tumor subcutâneo para a voltagem de 1000 V entre os eletrodos são mostradas. A distribuição do campo elétrico é mostrada em V/cm. A etapa 0 denota a distribuição do campo elétrico como estava logo antes do início do processo de eletroporação, ou seja, quando todos os tecidos ainda tinham suas condutividades iniciais. Quando a voltagem é aplicada aos eletrodos, o campo elétrico é distribuído no tecido de acordo com as relações de condutividade dos tecidos no modelo. A intensidade do campo é maior nos tecidos com condutividade mais baixa, onde a queda de voltagem é maior. Em nosso caso, quase toda a queda de voltagem ocorre na camada de pele, que tem uma condutividade de cerca de 10-100 vezes menor do que os tecidos que ficam abaixo.

Se olharmos para a última etapa da análise sequencial (etapa 5), à 1000 V (Figura 7) o tumor está totalmente permeabilizado, e em algumas áreas o campo elétrico também está acima do limiar irreversível.

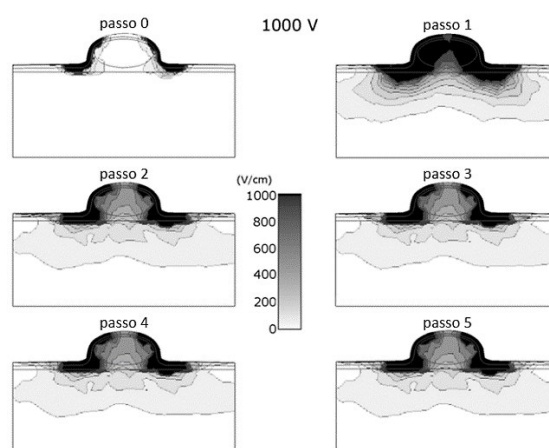


Figura 7: Seis etapas da análise sequencial do processo de eletroporação no modelo de tumor subcutâneo a 1000 V entre dois eletrodos de placa com distância de 8 mm

[21]. Os intervalos de tempo entre as etapas geralmente não são uniformes. As diferentes etapas seguem uma ordem cronológica, mas não têm um valor de tempo exato associado a elas. A distribuição do campo elétrico é mostrada em V/cm.

Uma situação semelhante pode ser encontrada ao aplicar pulsos elétricos em uma prega cutânea com eletrodos de placas como um método para aumentar a transfecção de genes *in vivo* na pele [22]. A pele é composta por três camadas principais: epiderme, derme e tecido subcutâneo (Figura 8). A epiderme é composta por diferentes camadas, mas a que mais define suas propriedades elétricas é a camada mais externa, o estrato córneo. Embora muito fino (normalmente cerca de $20\ \mu\text{m}$), contribui muito para as propriedades elétricas da pele. Sua condutividade é três a quatro ordens de magnitude menor do que a condutividade das camadas mais profundas da pele. Novamente, quando os pulsos elétricos são aplicados na prega cutânea por meio de eletrodos de placas, quase toda a voltagem aplicada cai sobre o estrato córneo, o que causa um campo elétrico muito alto nessa camada, enquanto o campo elétrico nas camadas mais profundas da pele (as camadas visadas para transfecção de genes) permanece muito baixo. Da mesma forma como no caso de tumores subcutâneos, o aumento em massa da condutividade das camadas da pele durante a eletroporação expõe as camadas da pele abaixo do estrato córneo a um campo elétrico alto o suficiente para uma permeabilização bem-sucedida [23].

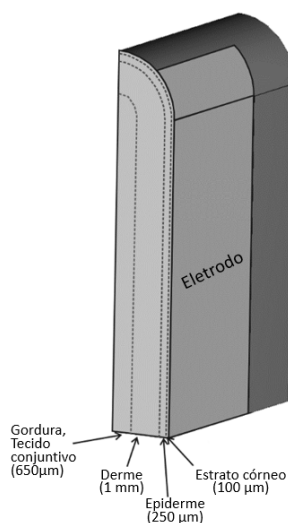


Figura 8: Esquema de uma prega cutânea conforme descrito em um modelo numérico. Apenas um quarto da dobra cutânea é apresentada aqui.

Propriedades do tecido durante a eletroporação de alta frequência

Recentemente, a eletroporação de alta frequência tem ganho atenção considerável após ter sido apontado na literatura que a eletroporação com durações de pulso entre 1 μs e 100 μs é relativamente inexplorada [24]. Pulsos com durações mais curtas, combinados com alguma pausa entre os pulsos, têm o potencial de reduzir a estimulação nervosa e muscular presente nos pulsos de eletroporação “clássicos” [25]. Uma vez que os protocolos de pulso de eletroporação de alta frequência normalmente empregam um número maior de pulsos bipolares de curta duração, o conteúdo de frequência desses pulsos pode ser marcadamente diferente dos pulsos de eletroporação de 100 μs típicos [26]. Uma possível vantagem disto é que poderia haver um contraste de condutividade inferior entre, por exemplo, um tumor e seu respectivo tecido saudável circundante, no entanto, as frequências principais dos tecidos dessas sequências de pulso ainda são baixas o suficiente, de modo que a eletroporação causa um aumento significativo na condutividade devido à eletroporação da membrana.

Conclusões

A explicação teórica do processo de eletroporação oferece uma visão útil para a compreensão dos processos biológicos subjacentes e permite prever o resultado do tratamento [27]. Portanto, um devido esforço precisa ser investido em medições das propriedades elétricas do tecido e suas mudanças durante a eletroporação [28].

Além disso, uma das preocupações associadas à eletroporação pode ser a quantidade de aquecimento resistivo no tecido. Um aquecimento excessivo é indesejado não apenas para evitar queimaduras na pele e garantir a segurança do paciente, mas também para evitar danos às células viáveis. O potencial excesso de aquecimento resistivo durante a eletroporação foi demonstrado em [29], portanto, o aspecto térmico no planejamento do tratamento e a análise teórica de aplicações específicas de tratamentos baseados em eletroporação devem ser considerados [26]. Para se manter dentro do limite de segurança e obter sucesso no tratamento, o aquecimento precisa ser estimado por meio de modelos teóricos como parte do planejamento do tratamento [30].

Referências

- [1] D. Miklavčič, N. Pavšelj, and F. X. Hart, “Electric Properties of Tissues,” in *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, M. Akay, Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. ebs0403.
 - [2] K. R. Foster and H. P. Schwan, “Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review,” *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 17, no. 1, pp. 25–104, 1989.
 - [3] C. Gabriel, A. Peyman, and E. H. Grant, “Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 MHz,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 54, no. 16, pp. 4863–4878, Aug. 2009.
 - [4] J. P. Reilly, *Applied Bioelectricity*. New York, NY: Springer New York, 1998.
 - [5] S. Grimnes and O. G. Martinsen, *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*, Second edition. Elsevier, 2008.
 - [6] S. Huclova, D. Erni, and J. Fröhlich, “Modelling and validation of dielectric properties of human skin in the MHz region focusing on skin layer morphology and material composition,” *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 45, no. 2, p. 025301, Jan. 2012.
 - [7] B. R. Epstein and K. R. Foster, “Anisotropy in the dielectric properties of skeletal muscle,” *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 21, pp. 51–55, 1983.
 - [8] F. X. Hart, “Bioimpedance in the clinic,” *Slovenian Medical Journal*, vol. 78, no. 12, Dec. 2009.
 - [9] A. Peyman *et al.*, “Variation in dielectric properties due to pathological changes in human liver,” *Bioelectromagnetics*, vol. 36, no. 8, pp. 603–612, Dec. 2015.
 - [10] D. O’Loughlin, M. O’Halloran, B. M. Moloney, M. Glavin, E. Jones, and M. A. Elahi, “Microwave Breast Imaging: Clinical Advances and Remaining Challenges,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 65, no. 11, pp. 2580–2590, 2018.
 - [11] H. P. Schwan, “Electrode Polarization Impedance and Measurements in Biological Materials*,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 148, no. 1, pp. 191–209, Feb. 1968.
 - [12] D. Cukjati, D. Batuskaite, F. Andre, D. Miklavcic, and L. Mir, “Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy,” *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 501–507, May 2007.
 - [13] A. Ivorra, B. Al-Sakere, B. Rubinsky, and L. Mir, “In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome,” *Phys Med Biol*, vol. 54, no. 19, pp. 5949–5963, Oct. 2009.
 - [14] R. C. G. Martin *et al.*, “Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: A call for standardization of energy delivery: IRE Technique in Pancreatic Cancer,” *Journal of Surgical Oncology*, vol. 114, no. 7, pp. 865–871, Dec. 2016.
 - [15] A. H. Ruarus, L. G. P. H. Vroomen, R. S. Puijk, H. J. Scheffer, T. J. C. Faes, and M. R. Meijerink, “Conductivity Rise During Irreversible Electroporation: True Permeabilization or Heat?,” *CardioVascular and Interventional Radiology*, vol. 41, no. 8, pp. 1257–1266, Aug. 2018.
 - [16] M. Pavlin and D. Miklavcic, “Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: A theoretical analysis,” *Biophys. J.*, vol. 85, no. 2, pp. 719–729, 2003.
 - [17] M. Kranjc, F. Bajd, I. Serša, and D. Miklavčič, “Magnetic resonance electrical impedance tomography for measuring electrical conductivity during electroporation,” *Physiol Meas*, vol. 35, no. 6, pp. 985–996, Jun. 2014.
-

- [18] M. Kranjc, F. Bajd, I. Sersa, E. J. Woo, and D. Miklavcic, "Ex vivo and in silico feasibility study of monitoring electric field distribution in tissue during electroporation based treatments," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, p. e45737, 2012.
- [19] R. E. Neal 2nd, P. A. Garcia, J. L. Robertson, and R. V. Davalos, "Experimental characterization and numerical modeling of tissue electrical conductivity during pulsed electric fields for irreversible electroporation treatment planning," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 59, no. 4, pp. 1076–1085, Apr. 2012.
- [20] N. Pavšelj and D. Miklavčič, "Numerical modeling in electroporation-based biomedical applications," *Radiol. Oncol.*, vol. 42, no. 3, pp. 159–168, Sep. 2008.
- [21] N. Pavšelj, Z. Bregar, D. Cukjati, D. Batiuskaite, L. M. Mir, and D. Miklavcic, "The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 8, pp. 1373–1381, Aug. 2005.
- [22] N. Pavšelj and V. Preat, "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse," *J. Controlled Release*, vol. 106, no. 3, pp. 407–415, Sep. 2005.
- [23] N. Pavšelj, V. Prémat, and D. Miklavčič, "A Numerical Model of Skin Electroporpermabilization Based on In Vivo Experiments," *Ann Biomed Eng*, vol. 35, no. 12, pp. 2138–2144, Sep. 2007.
- [24] J. C. Weaver, K. C. Smith, A. T. Esser, R. S. Son, and T. R. Gowrishankar, "A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: a region where additional intracellular effects are expected," *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 236–243, Oct. 2012.
- [25] C. B. Arena *et al.*, "High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction," *Biomed Eng Online*, vol. 10, p. 102, 2011.
- [26] S. Bhonsle, M. F. Lorenzo, A. Safaai-Jazi, and R. V. Davalos, "Characterization of Nonlinearity and Dispersion in Tissue Impedance During High-Frequency Electroporation," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 65, no. 10, pp. 2190–2201, Oct. 2018.
- [27] D. Miklavcic *et al.*, "Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy," *Biomed Eng Online*, vol. 9, p. 10, 2010.
- [28] J. Langus, M. Kranjc, B. Kos, T. Šuštar, and D. Miklavčič, "Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 26409, May 2016.
- [29] I. Lackovic, R. Magjarevic, and D. Miklavcic, "Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer," *IEEE Trans. Dielect. Electr. Insul.*, vol. 16, no. 5, pp. 1338–1347, Oct. 2009.
- [30] B. Kos, P. Voigt, D. Miklavcic, and M. Moche, "Careful treatment planning enables safe ablation of liver tumors adjacent to major blood vessels by percutaneous irreversible electroporation (IRE)," *Radiol Oncol*, vol. 49, no. 3, pp. 234–241, Sep. 2015.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Agência de Pesquisa Eslovena.



Damijan Miklavčič nasceu em Liubliana, Eslovênia, em 1963. Fez mestrado e doutorado em Engenharia Elétrica pela Universidade de Liubliana em 1991 e 1993, respectivamente. Atualmente é Professor e Chefe do Laboratório de Biocibernética da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Ljubljana.

Suas áreas de pesquisa são engenharia biomédica e estudo da interação de campos eletromagnéticos com sistemas biológicos. Nos últimos anos, ele se concentrou nos aspectos de engenharia da eletroporação como a base da administração de fármacos nas células em modelos de tumor *in vitro* e *in vivo*. Sua pesquisa inclui experimentação biológica, modelagem numérica e desenvolvimento de hardware para eletroquimioterapia, eletroporação irreversível e eletrotransferência gênica.



Bor Kos nasceu em Liubliana, Eslovênia, em 1983. Recebeu o grau de Doutor em Engenharia Elétrica pela Universidade de Liubliana em 2013. Atualmente é Professor Assistente na Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Liubliana. Seu campo de investigação é bioeletromagnetismo e engenharia biomédica com enfoque principalmente em modelação numérica da eletroporação. Desde que o primeiro tratamento de tumores profundos com eletroquimioterapia foi realizado no Instituto de Oncologia de Liubliana, Bor Kos tem se empenhado constantemente no desenvolvimento, validação e avanço do planejamento numérico de tratamentos baseados em eletroporação. Por suas contribuições à

área, recebeu o prêmio Alessandro Chiabrera 2018, concedido pela EBEA. Está envolvido em colaborações de pesquisa e publicações internacionais com colegas da Dinamarca, Hungria, França, Alemanha, Itália, Israel, Polônia, Espanha, Reino Unido e EUA.

Capítulo 3

Eletropermeabilização de Células *In vitro*

Justin Teissié

IPBS UMR 5089 CNRS e Universidade de Toulouse, Toulouse, França

Resumo: A eletropulsção (entrega de pulsos elétricos de curta duração) é um dos métodos não-virais de maior sucesso para introduzir moléculas externas em células vivas *in vitro*. Este capítulo descreve os fatores que controlam a eletropermeabilização de moléculas pequenas (<4 kDa). As durações dos pulsos são selecionadas de submicrosegundos à alguns milissegundos. A descrição dos eventos *in vitro* chama-nos a atenção para os processos que ocorrem antes, durante e após a eletropulsção das células. O papel dos diferentes parâmetros elétricos (intensidade do campo, duração do pulso, intervalo entre os pulsos) é delineado. A cinética dos processos que afetam a superfície da célula é descrita, delineando que a maior parte do intercâmbio de moléculas através da membrana ocorre após o pulso, durante o chamado resselamento (*resealing*). A contribuição da célula para esta etapa crítica é explicada de forma provisória. Os eventos de membrana parecem ser controlados pelo metabolismo celular.

Introdução

A aplicação de pulsos elétricos nas células leva à permeabilização transitória da membrana plasmática (eletropermeabilização). Esse fenômeno traz novas propriedades à membrana celular: ela se torna permeabilizada, então proteínas fusogênicas e exógenas à membrana podem ser inseridas. Essa técnica tem sido usada para introduzir uma grande variedade de moléculas em vários tipos de células *in vitro* [1, 2].

O presente capítulo descreve o que se denomina “eletropermeabilização clássica”. Isso significa que é relevante para o efeito de pulsos de campo elétrico que duram de μ s a vários ms, com um tempo crescente de algumas

centenas de ns. Neste domínio de tempo, a espectroscopia dielétrica de uma célula mostra que a membrana pode ser considerada um isolante não condutor (de fato, alguns vazamentos ativos podem estar presentes). A física deste processo fez parte do capítulo do Prof. Kotnik.

Um dos problemas limitantes permanece sendo o fato de que muito pouco é conhecido sobre os mecanismos físico-químicos que mantêm a reorganização da membrana celular. A eletropermeabilização não é simplesmente perfurar uma bicamada lipídica. A fisiologia da célula está controlando muitos parâmetros. A desestabilização associada à perda da impermeabilidade da membrana é um estresse para as células e pode afetar a viabilidade celular.

Este capítulo explica os fatores que controlam a eletropermeabilização de moléculas pequenas (<4 kDa). Os eventos que ocorrem antes, durante e após a eletropulsão das células são descritos.

Preâmbulo: o que é uma membrana biológica?

O principal alvo da eletropermeabilização é a membrana celular, mais precisamente a membrana plasmática. As organelas podem ser afetadas quando estão protegidas pela membrana plasmática ou por um efeito posterior ao transporte de moléculas ligado à permeabilização da membrana plasmática (absorção de íons, vazamento de metabólitos secundários). Em muitas abordagens, como simulações de dinâmica molecular, a descrição de uma membrana é limitada a uma bicamada lipídica. Isso está longe da complexidade biológica e deve ser usada apenas para investigações de matéria mole. Quando o processo é aplicado a uma célula (e a um tecido), uma descrição mais sofisticada da organização da membrana biológica é necessária. A membrana celular é um conjunto complexo entre proteínas e uma mistura de lipídios. Deriva de uma rede de forças fracas, resultando em um padrão complexo de pressão lateral através da membrana. Muitos movimentos laterais e de rotação dos componentes da membrana na escala temporal de microssegundos estão presentes. Os movimentos transversos espontâneos são movidos por energia ou resultam de eventos relacionados ao tráfego de membrana (endocitose, exocitose). A distribuição de lipídios não é homogênea como assumido no modelo de matriz fluida, mas acumulações específicas localizadas são detectadas (jangadas lipídicas). Isso se deve ao fato de que uma membrana biológica é uma entidade ativa onde um fluxo de componentes está ocorrendo continuamente (o chamado tráfego de membrana). Endocitose e exocitose são processos envolvidos na organização da membrana. Eles são afetados por estresses aplicados na

célula. Os sinais mecânicos são transduzidos pela membrana. Isso custa muita energia provida pelo metabolismo celular. Outra consequência é o gradiente iônico através da membrana resultante do equilíbrio entre o bombeamento ativo e vazamentos espontâneos de íons. Um aspecto final é que os danos à membrana são reparados não apenas por um processo intramembranar (como no caso de um material viscoelástico), mas por um processo de reparação mediado por vesículas citosólicas.

Portanto, é muito difícil fornecer uma descrição física precisa de uma membrana biológica no nível molecular. São usadas aproximações supersimplificadas (usando vesículas lipídicas, uma abordagem de matéria mole) ou uma descrição fenomenológica fornecida com o ajuste de equações físico-químicas (uma abordagem de ciências da vida). Ambos são válidos, desde que se esteja ciente dos limites de precisão. O presente capítulo está dentro da abordagem das ciências da vida para fornecer informações adequadas para aplicações clínicas e biotecnológicas.

A- Uma descrição biofísica e uma validação biológica

A-1 O campo elétrico externo induz a modulação da diferença de potencial de membrana

Um campo elétrico externo modula a diferença de potencial da membrana, visto que uma célula pode ser considerada um capacitor esférico [3]. A diferença de potencial transmembranar (TMP) induzida pelo campo elétrico após um tempo de carregamento (capacitivo), $\Delta\Psi_i$, é uma função complexa $g(\lambda)$ das condutividades específicas da membrana (λ_m), do buffer (meio para eletroporação) utilizado durante a aplicação dos pulsos (λ_o) e do citoplasma (λ_i), da espessura da membrana, do tamanho da célula (r) e do empacotamento lipídico. Assim,

$$\Delta\Psi_i = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E \cdot \cos\theta \quad (1)$$

em que θ designa o ângulo entre a direção normal à membrana no ponto considerado da superfície celular e a direção do campo, E a intensidade do campo, r o raio da célula e f um fator de forma (uma célula sendo um esferoide). Portanto, $\Delta\Psi_i$ não é uniforme na superfície da célula. Tem seu máximo nas posições da célula voltadas para os eletrodos. Essas previsões físicas foram verificadas experimentalmente por videomicroscopia, usando

sondas fluorescentes sensíveis à diferença de potencial [4-6]. Mais localmente, na superfície da célula, $\Delta\Psi_i$ é afetado pela curvatura local e os defeitos associados ao empacotamento lipídico. Esta descrição é válida para suspensões diluídas de células. Em sistemas densos, a autoblindagem na população de células afeta a distribuição local do campo elétrico e reduz sua a distribuição local (efetiva) [7]. Intensidades de campo mais fortes são necessárias para obter o mesmo potencial induzido. Outro fator que afeta as diferenças de potencial induzidas é a formato das células e sua orientação em relação às linhas do campo elétrico. Quando a diferença de potencial transmembranar resultante $\Delta\Psi$ (ou seja, a soma entre o valor de repouso da membrana celular, $\Delta\Psi_o$, e o valor eletroinduzido, $\Delta\Psi_i$) atinge localmente 250 mV, essa parte da membrana torna-se altamente permeável à pequenas moléculas carregadas e o transporte é detectado [3, 8].

Mais um parâmetro a considerar é que como a membrana plasmática deve ser considerada como um capacitor, existe um tempo de carregamento da membrana que pode afetar a magnitude do TMP quando a duração do pulso é curta (submicrosegundo) ou em buffers de pulsação de baixa condução.

A-2 Paramentos que afetam a eletropermeabilização

A-2-1 Parâmetros do campo elétrico

A permeabilização é controlada pela intensidade do campo. Intensidade de campo maior que um valor crítico ($E_{p,r}$) deve ser aplicada à suspensão de células. Da equação (1), a permeabilização é primeiro obtida para θ próximo a 0 ou π . $E_{p,r}$ é tal que:

$$\Delta\Psi_{i,perm} = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E_{p,r} \quad (2)$$

A permeabilização é, portanto, um processo local na superfície da célula. A extensão da superfície permeabilizada de uma célula esférica, A_{perm} , é dada por:

$$A_{perm} = A_{tot} \frac{\left(1 - \frac{E_{p,r}}{E}\right)}{2} \quad (3)$$

onde A_{tot} é a superfície da célula e E é a intensidade do campo aplicado. O aumento da intensidade do campo aumentará a parte da superfície da célula que é levada ao estado eletropermeabilizado.

Essas previsões teóricas são experimentalmente suportadas diretamente em suspensões de células ao se medir o vazamento de metabólitos (ATP) [9] em uma população de células ou no nível de uma única célula por

microscopia de fluorescência digitalizada [10, 11]. A parte permeabilizada da superfície celular é uma função linear recíproca da intensidade do campo. A permeabilização, devido a alterações estruturais da membrana, permaneceu detectada em um limite restrito na superfície da célula. Em outras palavras, a célula obedece às previsões físicas! A área afetada pelo campo elétrico depende também da forma (esferoide) e da orientação da célula com as linhas do campo elétrico [12]. Mudar a orientação do campo entre os diferentes pulsos aumenta a fração da superfície da célula que é permeabilizada.

Resultados experimentais obtidos tanto pelo monitoramento das mudanças de condutância em suspensão de células [13] ou pela observação de fluorescência na microscopia de nível de célula única [10, 11] mostram que a densidade das alterações locais é fortemente controlada pela duração do pulso. Um aumento do número de pulsos leva primeiro a um aumento do nível de permeabilização local.

A intensidade do campo controla a geometria da parte da célula que é permeabilizada. Isso é simples para células esféricas (e validado por microscopia de fluorescência), mas mais complicado com outras formas de células. Dentro deste limite, a densidade dos defeitos é uniforme e sob o controle da duração do(s) pulso(s).

A-2-2 O tamanho da célula

O potencial induzido depende do tamanho da célula (Equação (1)). A porcentagem de células eletropermeabilizadas em uma população, onde a heterogeneidade de tamanho está presente, aumenta com o aumento na intensidade do campo. A parte relativa da superfície da célula que é permeabilizada é maior em uma célula maior em uma determinada intensidade de campo [13]. As células grandes são mais sensíveis a intensidades de campo mais baixas do que as pequenas. Células plaqueadas são permeabilizadas com valor E_p menor do que quando em suspensão. Além disso, as células grandes em uma população parecem ser mais frágeis. Uma permeabilização irreversível de uma subpopulação é observada quando pulsos de intensidades baixas (mas maiores do que E_p) são aplicados. Outra característica é que o tempo de 'carregamento' está sob o controle do tamanho da célula [14].

A-3 Forças atuando na membrana

O campo elétrico do pulso externo gera uma força mecânica transitória que tende a esticar a membrana esférica [15]. Esta força aparece devido ao

tensor de Maxwell existentes no escudo esférico dielétrico que causa a deformação. A força radial total atua na membrana durante o processo transitório e tende a esticar o microrganismo. Pode até levar à ruptura da membrana resultando na morte do microrganismo [16]. Mas como a elasticidade celular é baseada no citoesqueleto de actina, esse alongamento afetaria a organização interna da célula por transdução de sinal.

B- Investigações estruturais

B-1 Investigações de P31 NMR da região da cabeça polar de fosfolipídios

O NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) do átomo de fósforo no grupo-cabeça da fosfatidilcolina foi fortemente afetado quando multicamadas lipídicas foram submetidas a pulsos de campo elétrico. Conclui-se que a conformação do grupo cabeça foi bastante afetada, embora nenhuma influência na estrutura e dinâmica das cadeias de hidrocarbonetos possa ser detectada [17]. Em células CHO eletropermeabilizadas, um novo pico anisotrópico em relação às células controle foi observado na análise espectroscópica de P31 NMR dos componentes fosfolipídicos [18]. Uma reorganização da região do grupo de cabeças polares levando a um enfraquecimento da camada de hidratação pode ser responsável por essas observações. Isso também foi pensado para explicar a fusogenicidade de longa duração induzida pelo campo elétrico dessas células.

B-2 Abordagens estruturais com tecnologias avançadas

A Microscopia de Força Atômica (AFM) tem sido amplamente utilizada para obter imagens em nanoescala de amostras biológicas vivas na ausência de qualquer coloração ou preparação das células [19]. A AFM, nos modos de imagem, pode sondar as modificações morfológicas das células induzidas por eletroporação (EP). No modo de espectroscopia de força, é possível acompanhar as propriedades nanomecânicas de uma célula e sondar as modificações mecânicas induzidas por EP. Uma ondulação transitória da superfície da membrana foi observada como consequência da eletropermeabilização e uma diminuição de 40% na elasticidade da membrana foi medida em células CHO vivas [20]. Um efeito interno afetou toda a superfície celular que pode estar relacionado à desestabilização do citoesqueleto.

Devido à natureza não linear e coerente da microscopia de geração de segundo harmônico (SHG), os padrões de radiação 3D de membranas

neurônais coradas eram sensíveis à distribuição espacial de dispersores no patch iluminado e, em particular, à formação de defeitos de membrana. Densidades de dispersores mais altas (alterações de membrana), com duração <5 milissegundos, foram observadas em setores da membrana perpendiculares ao campo, enquanto densidades mais baixas foram observadas em locais parcialmente tangentes [21, 22]. Densidades de poros mais altas foram detectadas no polo ânodo (polo positivo) em comparação com o cátodo (polo negativo).

Espectroscopia Coerente Anti-Stokes Raman (CARS) é uma espectroscopia sem etiqueta. Recentemente, foi usado para confirmar que as proteínas foram afetadas ao longo da eletropermeabilização [23, 24].

Os resultados do CARS são indicativos de uma alteração das moléculas interfaciais de água, uma consequência direta da fusogenicidade das membranas eletropermeabilizadas [25].

C- Aspectos práticos da eletropermeabilização

C-1 A peneiração da eletropermeabilização

A eletropermeabilização permite uma livre difusão pós-pulso de pequenas moléculas (até 4 kDa), qualquer que seja sua natureza química. Os compostos polares atravessam facilmente a membrana. Contudo, a característica mais importante é que essa organização reversível da membrana, no entanto, tem vida longa nas células. A difusão é observada durante os primeiros segundos e minutos após o pulso na ordem de milissegundos. A maior parte deste intercâmbio ocorre após o pulso [10, 11]. O resselamento dos vários defeitos da membrana e da permeabilização induzida é um processo de várias etapas de primeira ordem, que parece ser controlado pela reorganização de proteínas e organelas. Porém, como para outros danos macroscópicos à membrana plasmática, foi demonstrado que a eletropermeabilização causa a exocitose das vesículas internas (lisossomas) para reparar o dano à membrana, um processo mediado pelo cálcio denominado exocitose lisossomal. A resselagem da membrana é, portanto, um processo celular.

C-2 Intercâmbio transmembranar associado

A transferência molecular de pequenas moléculas (<4 kDa) através da área permeabilizada é conduzida principalmente pelo gradiente de

concentração através da membrana. Forças eletroforéticas durante o pulso podem contribuir [10]. A difusão por gradiente de concentração de moléculas polares de baixo peso após o pulso pode ser descrita usando a equação de Fick em sua membrana eletropermeabilizada [9]. Isso dá a seguinte fórmula para uma determinada molécula S e uma célula com um raio r :

$$\phi(S, t) = 2\pi r^2 \cdot P_s \cdot \Delta S \cdot X(N, T) \left(1 - \frac{E_p \cdot t}{E}\right) \exp(-k \cdot (N, T) \cdot t) \quad (4)$$

onde $\phi(S, t)$ é o fluxo no tempo t após os pulsos N de duração T (o intervalo entre os pulsos sendo curto em comparação com t), P_s é o coeficiente de permeabilidade de S através da membrana permeabilizada e ΔS é a diferença de concentração de S através da membrana. X está relacionado a densidade de defeitos de condução na região afetada pelo campo na superfície da célula. E_p depende de r (tamanho). O intervalo entre os pulsos está claramente desempenhando um papel na definição de X , mas isso ainda precisa ser investigado em detalhes. A caracterização da eletropermeabilização depende claramente do transporte de S através de P_s e da sensibilidade de sua detecção. Para uma determinada célula, o tempo de resselagem (recíproco de k) é uma função da duração do pulso, mas não da intensidade do campo como verificado por videomicroscopia digital [9]. Observa-se um forte controle por parte da temperatura. A integridade do citoesqueleto deve ser preservada [27]. A resselagem das membranas celulares é um processo complexo controlado pelo nível de ATP. Células privadas de nutrientes são frágeis. Uma questão em aberto é saber se é um auto-resselamento ou se outros componentes da célula estão envolvidos. A fusão de organelas pode estar envolvida, como no caso de outro reparo de membrana que ocorre após dano induzido por laser. A resselagem é complexa, pois o cancelamento da permeabilização é obtido quando pulsos bipolares com um curto intervalo entre pulsos são administrados [29,30].

C-3 Respostas celulares

Quando as células são submetidas a pulsos de campo elétrico de curta duração ocorre um vazamento de metabólitos do citoplasma, o que pode levar à perda de viabilidade celular. Isso pode ocorrer logo após o pulso (morte a curto prazo) ou em um período muito mais longo, quando as células já estavam novamente seladas (morte a longo prazo) [27]. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas nos *loci* permeabilizados, dependendo dos parâmetros do campo elétrico [28]. Essas ROS podem afetar a viabilidade celular. Esta é uma grande desvantagem para a

transferência de espécies sensíveis (ácidos nucleicos). Adicionar antioxidantes é uma abordagem segura [31].

Quando uma célula é permeabilizada, pode ocorrer um inchaço osmótico, levando à entrada de água na célula. Este aumento do volume celular está sob o controle da duração do pulso e, claro, do estresse osmótico [32].

Há uma perda da assimetria da bicamada de fosfolipídios da membrana dos eritrócitos [33] devido ao edema osmótico induzido levando à hemólise.

Um estresse mecânico está presente durante a entrega do pulso quando altos campos estão presentes, como mostrado pela ocorrência de ondas de choque [34] o que resulta em uma resposta biológica [35].

Conclusão

Todas as observações experimentais sobre eletropermeabilização celular estão em conflito com um modelo simplista, onde é proposto que a eletropermeabilização é o resultado de buracos perfurados em uma bicamada lipídica (ver [36] como uma revisão recente). Modificações bioquímicas como a oxidação de lipídios podem estar presentes, conforme sugerido por bolhas de membrana formadas logo após a liberação do pulso elétrico [37, 38]. Mudanças estruturais na organização da membrana que fundamentam a permeabilização permanecem mal caracterizadas. Novas informações são fornecidas por simulações computacionais baseadas em granulação grossa. No entanto, é possível, por meio de uma seleção cuidadosa dos parâmetros de pulsação de acordo com o tipo celular, introduzir qualquer tipo de moléculas polares em uma célula de mamífero, preservando sua viabilidade. Os processos que suportam a transferência são muito diferentes para moléculas diferentes. A transferência é mediada eletroforicamente durante o pulso e está presente principalmente após o pulso conduzido pela difusão de pequenas moléculas carregadas (fármacos) [39, 9]. SiRNA são transferidos apenas pelo arraste eletroforético presente durante o pulso [40]. Os plasmídeos de DNA são acumulados em pontos na superfície da célula eletropermeabilizada durante o pulso e são translocados lentamente no citoplasma ao longo de microtúbulos por um processo metabólico [41, 42].

A eletropermeabilização da membrana celular é um processo complexo. Para melhorar nosso conhecimento, é necessário muito cuidado na descrição do protocolo experimental [43].

Agradecimentos

Apoios do CNRS e da região Midi Pyrénées devem ser reconhecidos. Este estudo do estado da arte em eletropermeabilização se deve principalmente ao trabalho coletivo de cientistas e alunos do meu antigo grupo de “Biofísica Celular” em Toulouse, na França. As discussões com muitos colegas foram apreciadas. *Pesquisa realizada no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA) e no âmbito da Ação COST TD1104.*

Referências

- [1] Potter, H., Application of electroporation in recombinant DNA technology, in *Methods in Enzymology*, vol. 217, I. Academic Press, Editor. 1993.
 - [2] Orłowski, S. and L.M. Mir, Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1154(1): 51-63.
 - [3] Teissié, J. and M.P. Rols, An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys J*, 1993. 65(1): 409-13.
 - [4] Gross, D., L.M. Loew, and W.W. Webb, Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophys J*, 1986. 50: 339-48.
 - [5] Lojewska, Z., et al., Analysis of the effect of medium and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields. *Biophys J*, 1989. 56(1): 121-8.
 - [6] Hibino, M., et al., Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J*, 1991. 59(1): 209-20.
 - [7] Pucihar, G., et al., Electropermeabilization of dense cell suspensions. *Biophys J*. 2007 36(3): 173-185
 - [8] Teissié, J. and T.Y. Tsong, Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 1981. 20(6): 1548-54.
 - [9] Rols, M.P. and J. Teissie, Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J*, 1990. 58(5): 1089-98.
 - [10] Gabriel, B. and J. Teissie, Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys J*, 1997. 73(5): 2630-7.
 - [11] Gabriel, B. and J. Teissie, Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophys J*, 1999. 76(4): 2158-65.
 - [12] Valič B, Golzio M, Pavlin M, Schatz A, Faurie C, Gabriel B, Teissié J, Rols MP, Miklavčič D. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.* **32**: 519-528, 2003
 - [13] Kinoshita, K., Jr. and T.Y. Tsong, Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1979. 554(2): 479-97.
 - [14] Sixou, S. and J. Teissie, Specific electropermeabilization of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1028(2): 154-60.
 - [15] Winterhalter M and Helfrich W Deformation of spherical vesicles by electric fields *J. Colloid Interface Sci.* 1988. 122 583–6
-

- [16] Harbich W. and Helfrich W Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields *Z Naturforsch* 1991 34a, , 133-1335.
- [17] Stulen G. Electric field effects on lipid membrane structure. *Biochim Biophys Acta*. 1981 ; 640(3):621-7
- [18] Lopez A, Rols MP, Teissie J. 31P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. 1988 ;27(4):1222-8
- [19] Pillet F, Chopinet L, Formosa C, Dague E Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2014) 1028–1050
- [20] Chopinet L, Roduit C, Rols MP, Dague E Destabilization induced by electroporation analyzed by atomic force microscopy *Biochimica et Biophysica Acta* 2013 1828 2223–2229
- [21] Zalvidea D, Claverol-Tintur'e E Second Harmonic Generation for time-resolved monitoring of membrane pore dynamics subserving electroporation of neurons *Biomedical Optics Express* 2011 / Vol. 2, No. 2 / 305-314
- [22] Moen, EK, Ibe, BL, Beier HT Detecting Subtle Plasma Membrane Perturbation in Living Cells Using Second Harmonic Generation Imaging *Biophysical Journal* 2014 106 L37–L40
- [23] Azan A, Untereiner V, Gobinet C, Sockalingum GD, Breton M, Piot O, Mir LM. Demonstration of the Protein Involvement in Cell Electroporation using Confocal Raman Microspectroscopy. *Sci Rep*. 2017 ;7:40448. doi: 10.1038/srep40448.
- [24] Azan A, Untereiner V, Descamps L, Merla C, Gobinet C, Breton M, Piot O, Mir LM. Comprehensive Characterization of the Interaction between Pulsed Electric Fields and Live Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Anal Chem*. 2017 ;89(20):10790-10797. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02079.
- [25] Azan A, Scherman M, Silve A, Breton M, Leray I, Dorval N, Attal-Trétout B, Mir LM Interfacial water probing by CARS spectroscopy on biological samples exposed to intense pulsed electric fields 2015 URSI AT-RASC Conference, ISBN: 9789090086286
- [26] Gabriel, B. and J. Teissie, Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporation of Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1266(2): 171-8.
- [27] Teissié, J. and M.P. Rols, Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 720: 98-110.
- [28] Gabriel, B. and J. Teissie, Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *Eur J Biochem*, 1994. 223(1): 25-33.
- [29] Ibe BL, Ullery JC, Pakhomova ON, Roth CC, Semenov I, Beier HT, Tarango M, Xiao S, Schoenbach KH, Pakhomov AG, Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporation and killing cells than monopolar pulses, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014 443 568–573..
- [30] Schoenbach KH, Pakhomov AG, Semenov I, Xiao S, Pakhomova ON, Ibe BL, Ion transport into cells exposed to monopolar and bipolar nanosecond pulses, *Bioelectrochemistry* 2015 103 44–51.
- [31] Markelc B, Tevz G, Cemazar M, Kranjc S, Lavrencak J, Zegura B, Teissie J, Sersa G. Muscle gene electrotransfer is increased by the antioxidant tempol in mice. *Gene Ther*. 2011. doi: 10.1038

- [32] Golzio, M., et al., Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 1998. 74(6): 3015-22.
- [33] Haest, C.W., D. Kamp, and B. Deuticke, Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1325(1): 17-33.
- [34] Barnes RA, Roth CC, Beier HT, Noojin G, Valdez C, Bixler J, Moen E, Shadaram M, Ibey BL. Probe beam deflection optical imaging of thermal and mechanical phenomena resulting from nanosecond electric pulse (nsEP) exposure in-vitro. *Opt Express*. 2017;25(6):6621-6643. doi: 10.1364/OE.25.006621.
- [35] Roth CC, Glickman RD, Martens SL, Echgadda I, Beier HT, Barnes RA Jr, Ibey BL. Adult human dermal fibroblasts exposed to nanosecond electrical pulses exhibit genetic biomarkers of mechanical stress. *Biochem Biophys* 2017;9:302-309. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.01.007
- [36] Teissie J, Golzio M, Rols MP Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim Biophys Acta*, 2005 .1724(3): 270-80
- [37] Gass GV, Chernomordik LV Reversible large-scale deformations in the membranes of electrically-treated cells: electroinduced bleb formation. *Biochim Biophys Acta*. 1990 1023(1):1-11
- [38] Escande-Géraud ML, Rols MP, Dupont MA, Gas N, Teissie J. Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electropermeabilization in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*. 1988 939(2):247-59
- [39] Pucihar G, Kotnik T, Miklavcic D, Teissie J. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells *Biophys J*. 2008; **95**(6) :2837-48
- [40] Paganin-Gioanni A, Bellard E, Escoffre JM, Rols MP, Teissie J, Golzio M. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(26): 10443-7.
- [41] Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissie J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*. 1994;**66**(2):524-31.
- [42] Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**(3): 1292-7.
- [43] Cemazar M, Sersa G, Frey W, Miklavcic D, Teissie J Recommendations and requirements for reporting on applications of electric pulse delivery for electroporation of biological samples. *Bioelectrochemistry*. 2018; 122:69-76. doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.03.005.

APPENDIX – Transporte transmembranar

Introdução

O transporte transmembranar está em conformidade com os princípios básicos da termodinâmica. Um princípio geral da termodinâmica que rege a transferência de substâncias através de membranas e outras superfícies é que a troca de energia livre, ΔG , para o transporte de uma substância de

concentração C_1 para outro compartimento onde está presente na concentração C_2 , isto é:

$$\Delta G = RT \log \frac{C_2}{C_1}$$

(T , temperatura; R , constante dos gases, isto é: 8.3145 J/mol·K.)

Quando C_2 é menor que C_1 , ΔG é negativo e o processo é termodinamicamente favorável. Conforme a energia é transferida de um lugar para outro, um equilíbrio será alcançado onde $C_2 = C_1$ ($\Delta G = 0$). No entanto, existem circunstâncias relevantes para o funcionamento *in vivo* das membranas biológicas, nas quais este equilíbrio não será alcançado. Pode existir um potencial elétrico de membrana que pode influenciar a distribuição dos íons. Por exemplo, para o transporte de íons do exterior para o interior de uma célula,

$$\Delta G = RT \log \frac{C_{inside}}{C_{outside}} + ZF\Delta P \quad (1)$$

Onde F é a constante de Faraday, Z a carga do íon e ΔP o potencial transmembranar. Se ΔP for negativo e Z for positivo, a contribuição do termo $ZF\Delta P$ para ΔG será negativa, ou seja, favorecerá o transporte de cátions para fora da célula. Assim, se a diferença de potencial for mantida, o estado de equilíbrio $\Delta G=0$ não corresponderá a uma concentração equimolar de íons em ambos os lados da membrana.

Difusão passiva

A difusão simples e a osmose são em alguns aspectos semelhantes. A difusão simples é o movimento passivo do soluto em uma concentração alta para uma concentração mais baixa até que a concentração do soluto seja uniforme e atinja o equilíbrio. A osmose é muito semelhante à difusão simples, mas descreve especificamente o movimento da água (não o soluto) através de uma membrana permeável até que haja uma concentração igual de soluto em ambos os lados da membrana. Tanto a difusão simples e a osmose são formas de transporte passivo

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (2)$$

Deriva eletroforética

Quando um campo elétrico externo E está presente, ele tem uma ação sobre as moléculas do buffer. Se a molécula estiver carregada (ácidos

nucleicos, íons, corantes), ela migrará em um campo elétrico para o eletrodo de carga oposta.

Considere o caso simples de uma partícula carregada (+ Q) movendo-se em um campo elétrico (E) em um meio mal condutor, como a água. Se a partícula está se movendo a uma velocidade constante em direção ao cátodo (eletrodo negativo), a força líquida F_{tot} na partícula é 0 (uma vez que $F=ma$, e a aceleração (a) da partícula é 0 a uma velocidade constante). Duas forças são exercidas sobre a partícula, a força exercida sobre a partícula carregada pelo campo F_e , que está na direção do movimento (em direção ao cátodo), e a força de atrito na partícula carregada, F_f , que retarda seu movimento em direção ao cátodo.

Portanto:

$$F_{tot} = F_e + F_f = 0, \quad (3)$$

onde $F_e = QE$ (a força elétrica) e $F_f = -fv$ (a força de atrito),

onde v é a velocidade da partícula e f é uma constante chamada de coeficiente de atrito. A última equação mostra que a força F_f que impede o movimento em direção ao cátodo é proporcional à velocidade da partícula (Nota: no caso de partículas carregadas negativamente, como ácidos nucleicos, as direções das forças são invertidas e a direção do movimento também).

O coeficiente de atrito depende do tamanho e da forma da molécula. Quanto maior a molécula, maior o coeficiente de atrito (ou seja, mais resistência ao movimento da molécula). O coeficiente de atrito para uma partícula esférica é dado por

$$f = 6\pi\eta R_s \quad (4)$$

onde η é a viscosidade e R_s (raio de Stokes) é o raio da esfera hidratada.

De (1), (2) e (3), $F_e = F_f$, ou

$$QE = fv \quad (5)$$

Portanto $v/E = Q/f = U =$ mobilidade eletroforética, ou

$$U = \frac{v}{E} = \frac{Q}{2\pi\eta R_s} \quad (6)$$

Os contra-íons na solução (dos sais) formam uma nuvem em torno da macromolécula carregada e protegem parcialmente a partícula carregada do campo elétrico E .

Quando o campo é distribuído através de uma membrana “porosa”, o atrito é crítico. “Poroso” significa que defeitos estruturais transitórios estão

presentes. As moléculas menores podem passar pelos defeitos da membrana mais facilmente do que as moléculas maiores, portanto, há um mecanismo de peneiramento adicional que contribui para um transporte efetivo.

Nota: a nomenclatura do eletrodo pode ser confusa para alguns leitores. Como mencionado acima, os cátions se movem em direção ao cátodo (onde ocorre a redução), então o cátodo deve ser negativo. Da mesma forma, o ânion se move em direção ao ânodo (onde ocorre a oxidação), então o ânodo deve ser positivo.

Difusão facilitada

A difusão facilitada, também chamada de osmose mediada por carreador, é o movimento das moléculas através da membrana celular por meio de proteínas de transporte especiais que estão embutidas na membrana celular. Moléculas grandes e insolúveis como glicose, vesículas e proteínas, requerem uma molécula carreadora para se mover através da membrana plasmática. A difusão facilitada é um processo passivo: os solutos se movem por seu gradiente de concentração e não requerem gasto de energia celular.

Transporte ativo e cotransporte

No transporte ativo, um soluto é movido contra uma concentração ou gradiente eletroquímico através de proteínas de transporte que consomem energia metabólica, geralmente ATP. No transporte ativo primário, a hidrólise do provedor de energia (por exemplo, ATP) ocorre diretamente a fim de transportar o soluto em questão (enzimas ATPase). No transporte ativo secundário, o fornecedor de energia atua indiretamente; a energia é armazenada em um gradiente eletroquímico para transportar um composto alvo contra o gradiente.

O transporte ativo primário é mediado pela formação de um complexo substrato-transportador; portanto, cada proteína de transporte tem uma constante de afinidade para um soluto. Isso é equivalente ao caso de uma enzima para a constante de Michaelis-Menten.

$$J = \frac{J_{max}S}{K_m + S} \quad (7)$$

Outra característica importante do transporte ativo, além de sua capacidade de intervir mesmo contra um gradiente, sua cinética e o uso de ATP, é sua alta seletividade.

Bombas

Uma bomba é uma proteína que hidrolisa o ATP para transportar um determinado soluto através de uma membrana e, ao fazer isso, gera um potencial de membrana de gradiente eletroquímico. Este gradiente é de interesse como um indicador do estado da célula por meio de parâmetros como o potencial de Nernst

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion fora da célula}]}{[\text{ion dentro da célula}]} \quad (8)$$

Com o bombeamento ativo, a equação de Goldman dá o potencial de repouso

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{in}}{\sum_i^N P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{out}} \right) \quad (9)$$

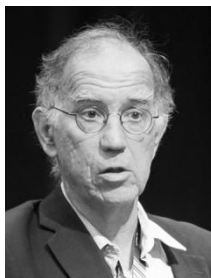
E_m é o potencial transmembranar, P_{ion} é a permeabilidade para esse íon, $[ion]_{out}$ é a concentração extracelular desse íon, $[ion]_{in}$ é a concentração intracelular desse íon.

Transporte por vesículas

Vesículas especializadas que medeiam o transporte por interações complexas com a membrana. Seu conteúdo intra-vesicular é entregue ao outro lado da membrana. Isso é chamado de transcitose (endo e exocitose). O processo é ativo, o que significa que requer energia e a ação da maquinaria celular.

Leituras e vídeos sugeridos

- <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/cells/transport-across-a-cell-membrane/a/passive-transport-and-active-transport-across-a-cell-membrane-article>
 - <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/vesiclebudding.html>
 - http://www.like2do.com/learn?s=Membrane_vesicle_trafficking
 - Popescu I. Aurel, Biophysics. Current Status and Future Trends, Publishing House of the Romanian Academy, 2016
-



Teissié Justin nasceu em 24 de março de 1947 em Poitiers, França. Graduou-se em Física na École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de Paris (ESPCI) em 1970. Doutorou-se em Química Macromolecular com um projeto de detecção por fluorescência de potencial de ação sob a supervisão do Prof. Monnerie (ESPCI) e Changeux (Institut Pasteur) em 1973. Obteve um doutorado em Biofísica em um projeto de caracterização de fluorescência de filmes de Langmuir Blodgett em Toulouse em 1979. Fez pós-doutorado na Faculdade de Medicina da Universidade John Hopkins em Baltimore em 1979-81. Posição atual: Diretor emerito de pesquisas no CNRS. Autor de mais de 250 artigos.

Capítulo 4

Transferência de Ácidos Nucleicos *In vitro*

Marie-Pierre Rols

Instituto de Farmacologia e Biologia Estrutural, Toulouse, França

Resumo: As membranas celulares podem ser permeabilizadas transitariamente pela aplicação de pulsos elétricos. Esse processo, chamado de eletropermeabilização ou eletroporação, permite que moléculas hidrofílicas, como fármacos anticâncer e ácidos nucleicos, entrem nas células e tecidos-alvo. O conhecimento dos processos envolvidos na permeabilização da membrana e na transferência gênica é imprescindível para que este método promissor seja utilizado de forma eficiente e segura. O comportamento das membranas e das células, durante e após a aplicação do campo elétrico, deve, portanto, ser considerado. A descrição dos mecanismos beneficia-se de estudos realizados em diferentes modelos biológicos (vesículas lipídicas, células em cultura 2D e 3D) e de diferentes ferramentas de microscopia que permitem visualizar os processos. Experimentos de imagem de célula única revelaram que a absorção de moléculas (drogas antitumorais, ácidos nucleicos) ocorre em regiões de membrana bem definidas e dependem de suas propriedades químicas e físicas (tamanho, carga elétrica). Moléculas pequenas podem cruzar livremente a membrana eletropermeabilizada e ter livre acesso ao citoplasma. Moléculas mais pesadas, como o DNA plasmidial, enfrentam barreiras físicas (membrana plasmática, aglomeração de citoplasma, envelope nuclear) que engendram um complexo mecanismo de transferência. A eletrotransferência gênica, de fato, envolve diferentes etapas, ocorrendo em escalas de tempo relativamente grandes. Como será apresentado neste capítulo, essas etapas incluem a interação inicial com a membrana eletropermeabilizada, atravessar a membrana, o transporte dentro da célula em direção ao núcleo e, finalmente, a expressão gênica.

Introdução

A terapia gênica é uma opção de tratamento para uma série de doenças, como distúrbios hereditários e câncer. Apesar de muitos métodos de vetorização terem sido desenvolvidos nas últimas décadas, a técnica ainda precisa ser aprimorada para ser eficiente e segura [1]. Dentre as diferentes abordagens, a eletroporação aparece como a mais promissora. Este método físico pode ser usado com eficiência para a entrega direcionada de moléculas em uma ampla gama de células e tecidos [2]. A eletroporação é hoje uma técnica bem conhecida de transfecção de células usada em laboratórios. A vacinação e a terapia gênica oncológica são os principais campos de aplicação da eletrotransferência de DNA na pesquisa clínica [3, 4]. A translação de estudos pré-clínicos em ensaios clínicos começou há 10 anos. O primeiro ensaio clínico de eletroporação de plasmídeo realizado em pacientes com melanoma metastático mostrou resultados promissores (5). O método também tem sido usado com sucesso no tratamento de animais de companhia. No entanto, apesar do trabalho pioneiro sobre a eletrotransferência de DNA plasmidial em células ter sido iniciado há mais de 30 anos [6], muitos dos mecanismos subjacentes à eletropermeabilização de membrana e eletrotransferência de DNA ainda precisam ser elucidados. Mesmo que a eletrotransferência *in vitro* seja eficiente em quase todas as linhagens celulares, a entrega e a expressão de genes em tumores *in vivo* podem não ser tão eficientes quanto por vetores virais. É, portanto, imprescindível, para aumentar a transferência e expressão gênica preservando a segurança, aumentar o conhecimento sobre os mecanismos. Este capítulo tem como objetivo descrever os aspectos básicos da eletropermeabilização de membrana e entrega de genes às células e, ao fazê-lo, fornece algumas dicas para realizar experimentos e otimizar protocolos.

Eletropermeabilização da membrana

O básico

As células têm um potencial transmembranar em repouso que é uniforme ao longo de toda a sua membrana plasmática. A exposição de células vivas à pulsos elétricos curtos e intensos induz mudanças a depender da posição desse potencial transmembranar. Sendo dependente do ângulo entre a direção do campo elétrico e o normal da membrana, os efeitos do campo elétrico não são uniformes ao longo da membrana. Os efeitos máximos estão presentes nos polos das células voltados para os eletrodos quando o

potencial transmembranar resultante atinge um valor limiar. Acima desse limiar, ocorre a permeabilização da membrana celular. A eletropermeabilização da membrana plasmática é um pré-requisito para a eletrotransferência de genes, uma vez que os ácidos nucleicos são moléculas grandes e altamente carregadas que não conseguem entrar nas células.

A maneira de conduzir um experimento

A eletropermeabilização pode ser realizada de diferentes maneiras, dependendo da forma como as células foram cultivadas. Para células cultivadas em placas de Petri, o meio de cultura pode ser removido e substituído por um tampão iso-osmótico de baixo teor iônico. Este buffer de pulsação permite limitar o efeito Joule e, portanto, ajudar a preservar a viabilidade celular. A composição deste meio é geralmente um tampão de fosfato 10 mM, sacarose 250 mM e $MgCl_2$ 1 mM. Do ponto de vista prático, o fundo da placa de Petri pode servir como câmara de eletropulsão. Para células em suspensão, as células ressuspensas no buffer de pulsação são colocadas em cubetas compradas ou feitas artesanalmente no laboratório, que podem ser facilmente obtidas colocando os eletrodos no fundo da placa de Petri (ver Figura 1). Os pulsos elétricos são fornecidos por meio de um conjunto de eletrodos conectados ao gerador de pulsos. Na maioria dos experimentos, geradores de pulsos elétricos de onda quadrada são usados. Ao contrário dos geradores de decaimento exponencial, eles permitem o controle independente da amplitude dos pulsos do campo elétrico E e de sua duração T . Isso é importante para células de mamíferos que não possuem parede celular e, portanto, são mais afetadas por pulsos elétricos do que bactérias e leveduras. Os parâmetros de pulso elétrico devem ser selecionados considerando as características das células, em particular seu tamanho. Um passo fundamental para garantir ainda mais a eletrotransferência e a expressão do DNA é determinar as melhores condições elétricas, permitindo assim a permeabilização da membrana plasmática e a preservação da viabilidade celular.

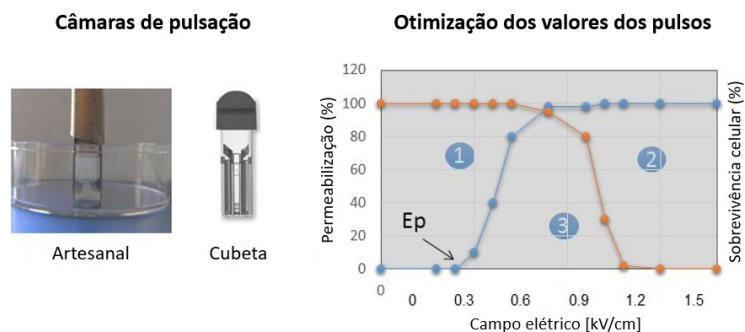


Figura 1: Dicas para seus experimentos. As células são pulsadas em placas de Petri ou em cubetas. As células permeabilizadas e viáveis são plotadas para definir as condições ótimas ((1) $E < E_p$ ou logo acima, permeabilização ineficaz; (2) $E \gg E_p$, perda de viabilidade; (3) melhores valores).

O uso de microscopia de vídeo permite a visualização do fenômeno de permeabilização a nível de uma única célula. Os indicadores fluorescentes de permeabilização da membrana, como o iodeto de propídio (PI), são muito convenientes para detectar a eletrotransferência de moléculas para o citoplasma. Eles podem simplesmente ser adicionados às células antes da aplicação dos pulsos elétricos. A absorção do corante fluorescente nas células é a assinatura da eletropermeabilização da membrana. Qualquer que seja o valor da duração T dos pulsos, a permeabilização só aparece acima de um valor limite de intensidade de pulso E , denominado E_p . Portanto, o primeiro experimento a realizar consiste em submeter as células a valores crescentes de E e determinar a eficiência de permeabilização (ou seja, a porcentagem de células que foram eletropermeabilizadas, células cujos núcleos se tornaram fluorescentes). Para $E < E_p$, que no exemplo da Figura 1 é igual a 0,3 kV/cm, não ocorreu permeabilização. Acima de E , tal aumento leva à permeabilização progressiva de toda a população de células, que é obtida a 0,8 kV/cm. Em seguida, o próximo passo é a determinação da viabilidade celular. Para valores de campo superiores a 0,9 kV/cm, a viabilidade é afetada. Uma vez obtidos, este tipo de resultados permite facilmente definir as melhores condições para a permeabilização da membrana e também para a eletrotransferência gênica. No exemplo mostrado na Figura 1, os valores do campo elétrico que podem ser usados variam de 0,6 a 1,0 kV/cm.

A cinética da permeabilização da membrana celular

A eletropermeabilização de células é um processo rápido que pode ser

detectado imediatamente após a aplicação de pulsos elétricos. Normalmente, o transporte através da membrana não é homogêneo em toda a membrana celular. Ocorre nas laterais das células voltadas para os eletrodos de forma assimétrica, onde é mais pronunciado no lado voltado para o ânodo das células do que no lado voltado para o cátodo (Figura 2), ou seja, ocorre mais na área hiperpolarizada do que na despolarizada, o que está de acordo com as considerações teóricas e experimentais, conforme explicado em outros capítulos. A eletropermeabilização pode ser descrita como um processo de 3 etapas em relação ao campo elétrico: (i) antes da eletropulsão, a membrana plasmática atua como uma barreira física que impede a livre troca de moléculas hidrofílicas entre o citoplasma celular e o meio externo; (ii) durante a eletropulsão, quando os parâmetros dos pulsos são definidos corretamente, $E > E_p$, ocorre a formação de estruturas permeáveis transitórias voltadas para os eletrodos que permite o intercâmbio de moléculas. Observa-se que o iodeto de propídio acessa rapidamente o interior da célula pelas regiões voltadas para os eletrodos, principalmente no local voltado para o ânodo; (iii) após a eletropulsão, a membrana pode permanecer permeável antes que ocorra a resselagem [7]. O tempo de vida de permeabilização pode ser avaliado adicionando os corantes fluorescentes em vários momentos após os pulsos. Se a membrana celular ainda for permeável, a célula ficará fluorescente. A resselagem varia de alguns segundos (quando as células são colocadas a 37 ° C logo após a pulsão) a várias horas (quando as células são mantidas no gelo) de acordo com as condições experimentais (temperatura e parâmetros de pulso). No entanto, deve-se levar em consideração que a viabilidade pode ser afetada, uma vez que ocorrerá a liberação de ATP. Portanto, é melhor evitar manter as células em baixa temperatura após a aplicação do pulso.

Quaisquer que sejam as moléculas usadas para detectar a permeabilização (se forem pequenas e carregadas), uma transferência direta para o citoplasma da célula é observada. Quando adicionadas após a eletropulsão, as moléculas ainda podem penetrar nas células, mas de forma menos eficiente porque o campo elétrico atua tanto na permeabilização da membrana quanto no arraste eletroforético das moléculas do exterior para o citoplasma. O mecanismo de eletrotransferência envolvido é, de fato, específico para as propriedades físico-químicas da molécula [8].

Avançar no conhecimento dos mecanismos envolvidos, em particular na elucidação das estruturas das membranas responsáveis pela transferência de moléculas, ainda é um desafio biofísico. Foi proposto que poros hidrofílicos eram criados e sua formação foram confirmadas através de modelagem por dinâmica molecular. Mas sua existência em células permeabilizadas ainda precisa ser provada. O embaralhamento de fosfolípidios e mudanças na

mobilidade lateral das proteínas têm sido observados, sugerindo que parte da superfície da membrana é ocupada por defeitos ou poros e que essas estruturas se propagam rapidamente sobre a superfície celular [9]. Pode-se também utilizar a microscopia de força atômica (AFM) para visualizar diretamente as consequências da eletropermeabilização e para medir localmente a elasticidade da membrana. Os resultados obtidos em células CHO fixas e vivas evidenciam um efeito interno que afeta toda a superfície celular, que pode estar relacionado à desestabilização do citoesqueleto. Assim, AFM aparece como uma ferramenta útil para investigar o processo básico de eletroporação em células vivas na ausência de qualquer coloração (10, 11).

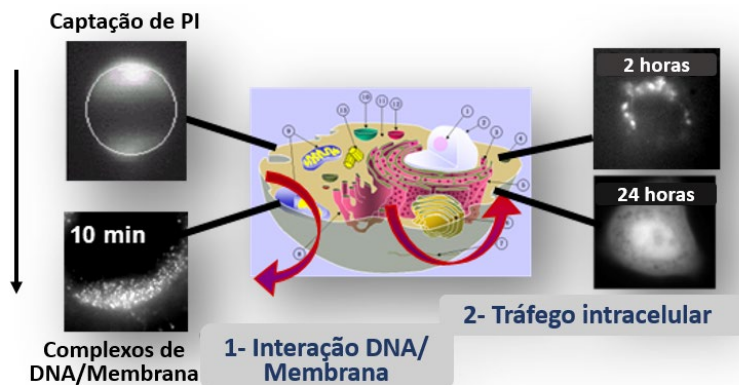


Figura 2: Mecanismos de eletrotransferência da molécula. Esquerda - Durante a aplicação de pulsos elétricos: A membrana plasmática é eletropermeabilizada na região voltada para os 2 eletrodos (captação de iodeto de propídio - PI). Complexos agregados de DNA são formados. Essa interação ocorre apenas na membrana voltada para o cátodo. Direita - Cerca de 2h após a aplicação dos pulsos elétricos, as moléculas de DNA estão presentes ao redor do núcleo. Finalmente, a expressão de eGFP é detectada por horas. A seta indica a direção do campo elétrico.

O fato de que toda a superfície celular é afetada não é tão óbvio, uma vez que a permeabilização só é induzida em regiões específicas das células. Assim, mesmo que nem todos os mecanismos de eletropermeabilização (ou eletroporação) da membrana sejam totalmente compreendidos e a existência das estruturas exatas responsáveis pela captação de moléculas ainda esteja em debate, este método físico de vetorização tornou-se um dos mais eficientes para a entrega de genes.

Mecanismos de eletrotransferência de moléculas de DNA em células

O que é conhecido sobre o processo

O primeiro experimento de transferência de genes mediada por eletroporação foi publicado há mais de 30 anos [6]. A translação para a clínica se beneficiou do aumento do conhecimento dos mecanismos envolvidos na eletrotransferência de ácidos nucleicos deste então. Quanto à eletropermeabilização, estudos de uma única célula ajudaram a descrever o processo de eletrotransferência do DNA.

Além da permeabilização da membrana, a eletrotransferência de DNA é dependente da eletroforese do DNA. O oligonucleotídeo deve estar presente durante o pulso para ser posteriormente transferido ao citoplasma. A mobilidade eletroforética do DNA plasmidial (pDNA) não depende do seu número de pares de bases. Pulsos curtos com alta intensidade de campo podem ser usados, mas são menos eficazes do que pulsos longos com baixa intensidade de campo. Portanto, os parâmetros dos pulsos devem ser determinados para tornar a membrana permeável ($E > E_p$), preservando o máximo possível a viabilidade celular (acima de 30-50%). Genes repórteres são úteis para otimizar o protocolo. Quanto à eletropermeabilização, avaliações por microscopia de célula única e plasmídeos fluorescentes podem ser usados para visualizar e determinar as diferentes etapas da eletrotransfecção. Os plasmídeos podem ser marcados com corantes fluorescentes para permitir a visualização de sua eletrotransferência. Moléculas de DNA, com carga negativa, migram eletroforéticamente quando submetidas ao campo elétrico. Sob campos elétricos que são muito pequenos para permeabilizar a membrana ($E < E_p$), o DNA simplesmente flui ao redor da membrana na direção do ânodo. Acima do valor do campo elétrico crítico, a partir do qual ocorre a permeabilização celular ($E > E_p$), o DNA interage com a membrana plasmática.

Interação DNA/Membrana

A interação ocorre apenas no polo da célula ao lado do cátodo e isso demonstra a importância das forças eletroforéticas na fase inicial da interação DNA/membrana. Quando ocorre a interação DNA/membrana, observa-se a formação de “microdomínios” cujas dimensões estão entre 0,1 e 0,5 μm (Figura 2). Também são vistos aglomerados ou agregados de DNA que crescem durante a aplicação do campo. No entanto, uma vez que o

campo é cortado, o crescimento desses aglomerados é interrompido. A eletrotransferência de DNA pode ser descrita como um processo de várias etapas: o DNA carregado negativamente migra eletroforéticamente em direção à membrana plasmática no lado do cátodo, onde se acumula. Essa interação, que é observada por vários minutos, dura muito mais do que a duração do pulso do campo elétrico. A translocação do plasmídeo da membrana plasmática para o citoplasma e sua passagem subsequente para o envelope nuclear ocorre com uma cinética que varia de minutos a horas.

A dinâmica do processo

A interação DNA/membrana e, como consequência direta, a expressão gênica, dependem da polaridade do pulso elétrico, da frequência de repetição e da duração do pulso. Ambos são afetados pela inversão da polaridade e pelo aumento da frequência de repetição ou da duração dos pulsos. Essas observações revelaram a existência de 2 classes de interação DNA/membrana: (i) um complexo de DNA/membrana metaestável a partir do qual o DNA pode sair e retornar ao meio externo e (ii) um complexo de DNA/membrana estável, onde o DNA não pode ser removido, mesmo aplicando pulsos elétricos de polaridade invertida. Apenas o DNA pertencente à segunda classe leva à expressão gênica efetiva [12]. A dinâmica da formação de membrana/complexos foi mal compreendida porque as observações diretas foram limitadas a escalas de tempo que excedem vários segundos. No entanto, a medição experimental do transporte de DNA plasmidial e iodeto de propídio com resolução temporal de 2 ms foi realizada graças à câmera de alta velocidade e sensibilidade, o que permitiu a visualização do processo de interação DNA/membrana durante a aplicação do pulso [13]. Complexos plasmídicos ou agregados, começam a se formar em locais distintos na membrana celular durante o primeiro pulso. O aumento do número de pulsos não leva à criação de novos sítios, mas ao aumento da quantidade de DNA. A formação de complexos de plasmídeo em locais fixos sugeriu que domínios de membrana podem ser responsáveis pela captação de DNA e sua falta de mobilidade (conforme observado diretamente ao microscópio ou quantificado por medições de Recuperação de Fluorescência Após Fotobranqueamento - FRAP) pode ser devido à sua interação com o citoesqueleto de actina. Como será descrito posteriormente neste capítulo, várias publicações relataram evidências para o envolvimento do citoesqueleto [14, 15]. A dinâmica de todo o processo é relatada na Tabela 1. Se a entrega de pulso ocorre em uma escala de tempo relativamente curta (μs a ms), o tráfego subsequente de DNA plasmidial ocorre durante os minutos e horas após a entrega do pulso.

Tabela 1. Cinética das diferentes etapas envolvidas na entrega do gene.

Escala de tempo	Etapas envolvidas na entrega eletromediada de DNA	Referência
μ s	A membrana plasmática voltada para os eletrodos é permeabilizada	(7)
ms	Migração eletroforética de DNA em direção à membrana	(7, 13)
s	Formação do complexo DNA/membrana	(12)
min	Conversão da forma metaestável do complexo DNA/membrana em uma forma estável	(13)
hora	Difusão/translocação do DNA através da membrana	(14, 15)
dia	Transporte de DNA em direção ao núcleo ao longo do citoesqueleto	(16)

Transferência de DNA através do citoplasma

O processo de transferência do plasmídeo através do citoplasma celular para o envelope nuclear é um processo complexo [17]. A princípio, micro-agregados de DNA ou vesículas cheias de DNA podem ser muito grandes para passar pelos poros formados por eletroporação. No entanto, as moléculas de DNA individuais, embora possam passar pelos eletroporos, têm uma mobilidade limitada dentro da célula e podem ser totalmente degradadas antes de chegarem ao núcleo. É possível e vale a pena investigar a possibilidade de que o citoesqueleto de actina reaja à presença de agregados de DNA e desempenhe um papel importante no transporte intracelular subsequente. Parece razoável que apenas agregados além de um certo tamanho (algumas centenas de nanômetros) podem induzir uma resposta celular biológica e podem ser transportados pela célula. Além disso, o fato de o DNA estar na forma agregada significa que o DNA presente no centro do agregado está relativamente protegido da degradação. Portanto, para fins de terapia gênica, o ideal é que o DNA entre na célula como moléculas únicas, mas o transporte subsequente em direção ao núcleo seja, por razões biológicas (possivelmente induzindo uma resposta do citoesqueleto de actina) e físicas (diminuindo a degradação enzimática), otimizado se o DNA estiver em uma forma agregada de tamanho micro.

Mesmo se o primeiro estágio da eletrotransfecção do gene, ou seja, a migração do DNA do plasmídeo em direção à membrana plasmática eletropermeabilizada e sua interação com ela, se tornar compreendida, as diretrizes para melhorar a eletrotransferência do gene não podem resultar apenas da maneira como os parâmetros de pulso foram selecionados. A

expressão do pDNA é controlada pela viabilidade da população celular pulsada e a expressão bem-sucedida do plasmídeo depende de sua migração subsequente dentro da célula. Portanto, as propriedades difusionais intracelulares do DNA plasmidial, bem como sua instabilidade metabólica e translocação nuclear, representam fatores celulares limitantes que devem ser levados em consideração. O citoplasma é composto por uma rede de sistemas de microfilamentos e microtúbulos, juntamente com uma variedade de organelas subcelulares presentes no citosol. A estrutura em forma de malha do citoesqueleto, a presença de organelas e a alta concentração de proteínas demonstram que há um aglomerado molecular substancial no citoplasma que impede a difusão do DNA plasmidial. Esses resultados aparentemente contraditórios podem ser conciliados com a possibilidade de uma desmontagem da rede do citoesqueleto, que pode ocorrer durante a eletropermeabilização, e é compatível com a ideia de que o citoplasma constitui uma importante barreira difusional à transferência gênica. Nas condições induzidas durante a eletropermeabilização, o tempo que um DNA plasmidial leva para chegar aos núcleos é significativamente maior do que o tempo necessário para uma molécula pequena (horas em comparação com minutos). Portanto, o DNA plasmidial presente no citosol após ser eletrotransferido pode ser perdido antes de atingir o núcleo, por exemplo, devido à divisão celular. Finalmente, após o citoesqueleto, o envelope nuclear representará o último, mas de forma alguma o menos importante, obstáculo para a expressão do DNA do plasmídeo.

Passagem através do envelope nuclear e expressão gênica

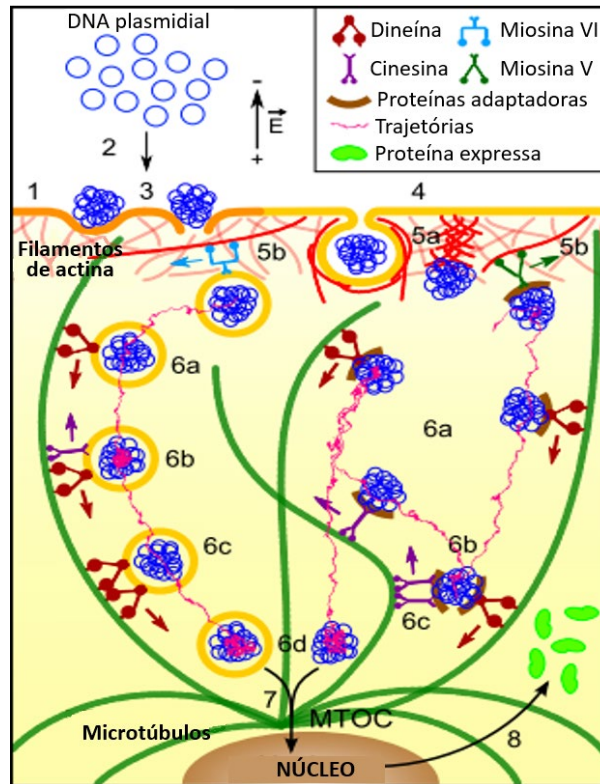


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de eletrotransferência de DNA. Durante os pulsos elétricos, (1) a membrana plasmática é permeabilizada, (2) o DNA é eletroforéticamente empurrado para a membrana celular, o que resulta em (3) interações DNA-membrana. Após a resselagem da membrana, (4) o DNA é internalizado por endocitose e outros meios em que a actina pode assumir a forma polimerizada. (5) Enquanto são ativamente transportados no citoplasma pelas redes de actina e tubulina, os agregados de DNA passam pelos compartimentos endossômicos. O DNA livre interage com a proteína adaptadora para ser transportado pelas proteínas motoras. Para que a expressão gênica ocorra, (6) o DNA precisa escapar dos compartimentos endossômicos. Uma vez na região perinuclear, (7) o DNA cruza o envelope nuclear para ser expresso e (8) produz as proteínas que serão liberadas.

Um alto transporte nem sempre resulta em um alto nível de expressão. O tamanho relativamente grande do DNA plasmidial torna improvável que a entrada nuclear ocorra por difusão passiva. Experimentos de rastreamento

de partícula única de agregados de DNA em células vivas mostraram como o DNA eletrotransferido é transportado no citoplasma em direção ao núcleo. Os modos de movimento dos agregados de DNA em células CHO foram analisados. Um transporte ativo rápido dos agregados de DNA ocorre por longas distâncias. Os experimentos de rastreamento em células tratadas com diferentes fármacos que afetam a rede de actina e tubulina demonstram claramente que o transporte está relacionado à rede de microtúbulos celulares (Figura 3, (16)).

Transporte ativo de agregados de DNA

Vários estudos apontam para a contribuição da endocitose na eletrotransferência de DNA, mas mais investigações devem ser realizadas a fim de entender que tipo(s) de endocitose estariam envolvidos. É preciso entender também como os campos elétricos podem estimular tais processos. Também deve-se destacar que qualquer modelo de endocitose explicaria apenas a internalização de moléculas grandes, uma vez que esta não suporta o livre fluxo de moléculas pequenas através da membrana. Portanto, deve-se considerar que ocorre em paralelo a outro modelo válido para a troca transmembranar de moléculas pequenas. Um modelo que poderia conciliar todos os modelos de internalização do DNA seria que o DNA se acumula onde os poros são formados e que sua inserção eletroforética na membrana puxa o poro e a membrana plasmática ao seu redor. Isso geraria uma curvatura da membrana que poderia ser reconhecida como uma vesícula endocítica emergente e induzir uma resposta da célula semelhante a um processo endocítico, com o recrutamento de actina, clatrina, caveolina, dinamina e outros reguladores endocíticos [18, 19].

As trajetórias do DNA eletrotransferidos possuem momentos de transporte ativo interrompidos por fases de quase imobilidade [15]. Durante as fases de transporte ativo, os agregados de DNA apresentaram movimento com velocidade de 250 nm/s em média, persistindo por 6s, o que gera um deslocamento de 1,3 μm . No entanto, as distribuições foram bastante amplas com velocidades de 50 nm/s a 3400nm/s, deslocamentos de 0,1 μm a 12 μm e durações de transporte ativo de 2s a 30s. Essas faixas estão de acordo com outros tipos de dinâmica de partículas intracelulares, conforme observado em vírus, poliplexos, lipoplexos, receptores, endossomos e mitocôndrias. As velocidades mais baixas correspondem ao transporte associado à actina. De fato, após a ruptura dos microtúbulos usando o fármaco nocodazol, o transporte ativo do DNA ainda ocorreu, e as velocidades medidas estavam na faixa esperada para motores de miosina operando em actina - entre 50 nm/s e 300 nm/s para miosina VI e entre 250 nm/s e 500 nm/s para miosina V. Além do transporte por motores de

miosina, o movimento relacionado a actina também pode ser devido a explosões de polimerização de actina, que foi relatado na condução de vírus, bactérias ou endossomos da membrana plasmática para o citosol com velocidades médias variando de 50 a 600 nm/s.

Novos desafios para aumentar a expressão gênica

Como mencionado acima, a densa estrutura do citoesqueleto impede a difusão livre do DNA no meio intracelular. O DNA plasmidial eletrotransferido, contendo sequências específicas, poderia então usar a rede de microtúbulos e suas proteínas motoras associadas para se mover através do citoplasma para o núcleo [20]. Portanto, limites claros de uma expressão gênica eficiente usando pulsos elétricos são, além da passagem de moléculas de DNA pela membrana plasmática, o aglomerado citoplasmático e a transferência através do envelope nuclear. Um dos principais desafios da terapia gênica mediada por eletroporação é identificar as etapas limitantes nesse processo complexo e encontrar estratégias para superar esses obstáculos. Uma das estratégias possíveis para aumentar a absorção de DNA nas células é usar pulsos curtos (10-300 ns), mas com alta voltagem (até 300 kV/cm), que afetam principalmente as estruturas e funções intracelulares. À medida que a duração do pulso diminui, abaixo da constante de tempo de carregamento da membrana plasmática, os efeitos da membrana plasmática diminuem e os efeitos intracelulares predominam. Uma ideia para melhorar o sucesso da transfecção é, portanto, realizar a permeabilização clássica da membrana, permitindo a eletrotransferência do DNA plasmidial para o citoplasma da célula e, depois, quando o DNA atingir o envelope nuclear, permeabilizar especificamente os núcleos usando esses nanopulsos curtos e fortes. Assim, quando usado em conjunto com a eletropermeabilização clássica, os nanopulsos deram esperança de aumentar a expressão gênica [21]. No entanto, este trabalho ainda não foi replicado. Outra ideia é combinar pulsos elétricos e ultrassom auxiliado por microbolhas de gás. Embora a eletroporação induza a formação de agregados de DNA na membrana celular, a sonoporação induz sua propulsão direta no citoplasma. Vinte e quatro horas depois, as células que receberam eletrosonoporação demonstraram um aumento de quatro vezes no nível de transfecção e um aumento de seis vezes na eficiência de transfecção em comparação com as células que passaram apenas por eletroporação [22]. A sonoporação pode, portanto, melhorar a transferência de agregados de DNA eletro-induzidos, permitindo sua entrada livre e rápida nas células [23].

Vesículas lipídicas e esferoides: outros modelos para estudar a eletrotransferência gênica

Voltando ao ponto de vista mecanicista e devido à complexidade da composição da membrana plasmática, outras ferramentas experimentais podem ser úteis para caracterizar os domínios das membranas observados durante a eletrotransferência gênica. Para tanto, as vesículas unilamelares gigantes (GUV) representam uma maneira conveniente de estudar as propriedades da membrana, como a composição da bicamada lipídica e a tensão da membrana [24]. Estas oferecem a possibilidade de estudar e visualizar processos de membrana devido ao seu tamanho de célula e na ausência de qualquer restrição devido ao citoesqueleto celular. GUVs podem ser obtidas por métodos simples como a eletroformação, e sua composição pode ser muito simples (um único tipo de fosfolípido) ou mais complexa (vários tipos de lipídios, incluindo o colesterol). Os experimentos mostraram uma diminuição do raio da vesícula, que foi analisada como sendo devido à perda de lipídios durante o processo de permeabilização. Três mecanismos responsáveis pela perda lipídica foram observados diretamente: formação de poros, formação de vesículas e formação de túbulos, que podem estar envolvidos na captação de moléculas. No entanto, nenhuma interação entre o DNA plasmidial e a membrana de GUVs pôde ser observada; uma transferência direta de DNA para o interior das GUVs ocorreu durante a aplicação dos pulsos elétricos [25]. Isso dá evidências claras de que uma “bolha lipídica” nem sempre é relevante porque uma célula e um tecido não são uma simples montagem de células únicas. Portanto, é necessário desenvolver e utilizar diferentes modelos, desde simples vesículas lipídicas até modelos multicelulares esferoidais de tumores, mais próximos de situações *in vivo*, para o entendimento do processo de permeabilização da membrana e eletrotransferência do DNA nos tecidos. Cada um desse modelo tem vantagens e limites. Juntos, eles podem ajudar no estudo de todos os processos (Tabela 2).

Tabela 2. Modelos podem abordar a eletropermeabilização e processos de entrega de genes.

Modelo	Permeabilização da membrana	Eletrotransferência do DNA
GUV (Vesículas unilamelares gigantes)	Visualização direta da permeabilização da membrana e suas consequências (deformação, perda de lipídios)	Falha ao abordar a interação DNA/membrana (o DNA é transferido diretamente para dentro da vesícula)

Cultura celular 2D	Cinética da permeabilização e suas consequências (mobilidade lateral e transversal de lipídios e proteínas)	Visualização da formação do complexo DNA/membrana e acesso ao tráfego de DNA dentro das células
Cultura celular 3D	Difusão e transferência de moléculas que simulam situação complexa <i>in vivo</i> (contatos entre células, junções, matriz extracelular)	Permitem abordar a entrega de DNA em 3D e simular o que acontece <i>in vivo</i> (diminuição da expressão gênica a partir periferia até o núcleo celular)

Mesmo que a grande maioria dos estudos subjacentes à transferência de moléculas por campos elétricos tenham sido realizados em cultura de células 2D em placas de Petri ou em células cultivadas em suspensão, os esferóides multicelulares 3D representam um modelo *in vitro* interessante, relevante, barato e fácil de manusear. Após o crescimento, os esferóides exibem um gradiente de células em proliferação. Essas células em proliferação estão localizadas nas camadas celulares externas e as células quiescentes estão localizadas mais centralmente. Essa heterogeneidade celular é semelhante à encontrada em microrregiões avasculares de tumores [26]. A microscopia confocal permitiu visualizar a repartição de células permeabilizadas em esferóides submetidos a pulsos elétricos. Os resultados revelaram que as células foram eficientemente permeabilizadas, qualquer que seja sua localização no esferóide, mesmo aquelas no núcleo, mimetizando situações *in vivo* previamente observadas. Observou-se que a captação de iodeto de propídio estava presente, mas espacialmente heterogênea dentro do esferóide multicelular 3D após a eletroporação, com uma diminuição progressiva entre células periféricas para as do interior do esferóide. No caso de moléculas grandes como o DNA plasmidial, os esferóides permitiram mostrar que a eletroforese, e não a deformação do tecido ou eletrosmose, a força motriz do transporte intersticial. Além disso, ao contrário das células em culturas 2D, apenas as células de um lado da parte externa expressaram o gene repórter [27]. Esta baixa expressão está de acordo com experimentos *in vivo* em tumores. O contato próximo entre as células e a matriz extracelular pode atuar como uma barreira física que limita/impede a distribuição (uniforme) do DNA e explica a ausência de expressão gênica na região interna do esferóide. O acesso limitado do DNA plasmidial à região central do esferóide permanece uma barreira significativa para a entrega eficiente de genes nos tecidos. Tomados em conjunto, esses resultados, em concordância com os obtidos pelo grupo de

R. Heller [28], indicam que o modelo esferóide é mais relevante para uma situação *in vivo* do que células cultivadas em monocamadas e, portanto, podem ser úteis para abordar os mecanismos de eletrotransferência de DNA. A fim de avaliar os efeitos da composição e organização da matriz extracelular, bem como as junções e comunicações intercelulares, outro modelo de tecido conjuntivo humano reconstruído em 3D pode ser usado. Camadas de células, reconstruídas *in vitro* por uma abordagem de engenharia de tecidos, apresentam várias camadas de fibroblastos dérmicos primários incorporados em uma matriz extracelular (ECM) nativa, rica em colágeno, e podem ser uma ferramenta útil para estudar os mecanismos de eletrotransferência do DNA na pele. As células dentro deste tecido 3D padronizado podem ser eletropermeabilizadas com eficiência por pulsos elétricos de milissegundos [29, 30]. Além disso, esse modelo dérmico de engenharia de tecido recapitula as propriedades mecânicas do tecido dérmico nativo humano, ao contrário dos modelos clássicos de monocamada e esferóide [31]. Uma melhor compreensão da eletrotransferência do gene em tal modelo de tecido ajudaria a melhorar as abordagens da eletrogeneterapia, como a entrega sistêmica de proteínas terapêuticas e a vacina com DNA.

Conclusões

A entrega intracelular de materiais se tornou um componente crítico das abordagens de edição de genoma, terapias baseadas em células *ex vivo* e uma diversidade de aplicações de pesquisa fundamentais. As limitações das tecnologias atuais motivam o desenvolvimento de sistemas *next-generation* que podem entregar uma ampla variedade de conteúdos para diversos tipos de células. Todos os dias, em institutos de pesquisa e centros clínicos em todo o mundo, os cientistas usam kits e protocolos baseados em vetores virais, agentes de transfecção de lipídios e eletroporação, entre outras opções. Os mecanismos complexos de métodos estabelecidos e seu impacto muitas vezes imprevisível no comportamento celular limitaram dramaticamente o escopo dos experimentos biológicos e reduziram a eficácia de conceitos de terapia celular potencialmente promissores. A comunidade de pesquisa biomédica beneficiaria muito de uma compreensão mais mecanicista e transparente da entrega intracelular, tanto para promover o desenvolvimento de técnicas mais robustas quanto para realizar as principais aplicações médicas e industriais” [32]. Nesse contexto, a chamada tecnologia de eletroporação é provavelmente a mais promissora.

As teorias clássicas de eletropermeabilização apresentam alguns limites para fornecer uma descrição completa do transporte de moléculas através das membranas. Certos efeitos dos parâmetros do campo elétrico na permeabilização da membrana e no transporte associado de moléculas estão bem estabelecidos, mas muito do que acontece no nível molecular permanece especulativo. Modelos moleculares de bicamadas lipídicas e formação de eletroporos estão dando uma nova visão interessante sobre o processo. A desestabilização eletroinduzida da membrana inclui a redistribuição lateral e transversal de lipídios e proteínas, levando a modificações mecânicas e elétricas que ainda não são totalmente compreendidas. Pode-se sugerir que tais modificações, que podem variar de acordo com o microambiente, podem estar envolvidas no transporte subsequente de moléculas que interagem com elas, como as moléculas de DNA. A verificação experimental dos mecanismos básicos que levam à eletropermeabilização e outras alterações na membrana, células e tecidos continua sendo uma prioridade dada a importância desses fenômenos para processos em biologia celular e em aplicações médicas. A eletrotransferência gênica *in vivo* enfrentará outros desafios, como a necessidade de controlar a distribuição do campo elétrico e a expressão gênica tanto no espaço (entrega de DNA direcionado às células) quanto no tempo. Ainda são necessárias diretrizes para a entrega bem-sucedida de DNA, mas podemos estar otimistas de que trabalhar mais para melhorar os mecanismos de eletrotransferência de genes produzirá tratamentos eficazes.

Referências

- [1] Verma, I. M., and M. D. Weitzman. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74:711-738.
- [2] Yarmush, M. L., A. Golberg, G. Sersa, T. Kotnik, and D. Miklavcic. 2014. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annual review of biomedical engineering* 16:295-320.
- [3] Lambrecht, L., A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Preat, and G. Vandermeulen. 2016. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 13:295-310.
- [4] Sersa, G., J. Teissie, M. Cemazar, E. Signori, U. Kamensek, G. Marshall, and D. Miklavcic. 2015. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*.
- [5] Daud, A. I., R. C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A. I. Riker, V. K. Sondak, P. N. Munster, D. M. Sullivan, K. E. Ugen, J. L. Messina, and R. Heller. 2008. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 26:5896-5903.

-
- [6] Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1:841-845.
- [7] Golzio, M., J. Teissie, and M. P. Rols. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1292-1297.
- [8] Paganin-Gioanni, A., E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, and M. Golzio. 2011. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10443-10447.
- [9] Escoffre, J. M., E. Bellard, C. Faurie, S. C. Sebai, M. Golzio, J. Teissie, and M. P. Rols. 2014. Membrane disorder and phospholipid scrambling in electropermeabilized and viable cells. *Biochim Biophys Acta* 1838:1701-1709.
- [10] Chopinet, L., C. Roduit, M. P. Rols, and E. Dague. 2013. Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1828:2223-2229.
- [11] Chopinet, L., C. Formosa, M. P. Rols, R. E. Duval, and E. Dague. 2013. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI (TM) mode. *Micron* 48:26-33.
- [12] Faurie, C., M. Rebersek, M. Golzio, M. Kanduser, J. M. Escoffre, D. Pavlin, J. Teissie, D. Miklavcic, and M. P. Rols. 2010. Electrically mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/Membrane complex formation. *Journal of Gene Medicine* 12:117-125.
- [13] Escoffre, J. M., T. Portet, C. Favard, J. Teissie, D. S. Dean, and M. P. Rols. 2011. Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 1808:1538-1543.
- [14] Rosazza, C., J. M. Escoffre, A. Zumbusch, and M. P. Rols. 2011. The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Mol Ther* 19:913-921.
- [15] Rosazza, C., A. Buntz, T. Riess, D. Woll, A. Zumbusch, and M. P. Rols. 2013. Intracellular tracking of single plasmid DNA-particles after delivery by electroporation. *Mol Ther*.
- [16] Rosazza, C., H. Deschout, A. Buntz, K. Braeckmans, M. P. Rols, and A. Zumbusch. 2016. Endocytosis and Endosomal Trafficking of DNA After Gene Electrotransfer In Vitro. *Molecular therapy. Nucleic acids* 5:e286.
- [17] Lechardeur, D., and G. L. Lukacs. 2006. Nucleocytoplasmic Transport of Plasmid DNA: A Perilous Journey from the Cytoplasm to the Nucleus. *Hum Gene Ther* 17:882-889.
- [18] Rosazza, C., S. H. Meglic, A. Zumbusch, M. P. Rols, and D. Miklavcic. 2016. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective. *Curr Gene Ther* 16:98-129.
- [19] Rems, L., and A. Miklavcic. 2016. Tutorial: electroporation of cells in complex materials and tissue. *J Appl Phys* 119:201101.
- [20] Vaughan, E. E., and D. A. Dean. 2006. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* 13:422-428.
- [21] Beebe, S. J., J. White, P. F. Blackmore, Y. Deng, K. Somers, and K. H. Schoenbach. 2003. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA Cell Biol* 22:785-796.
- [22] Escoffre, J. M., K. Kaddur, M. P. Rols, and A. Bouakaz. 2010. In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound Med Biol* 36:1746-1755.

- [23] Delalande, A., S. Kotopoulos, M. Postema, P. Midoux, and C. Pichon. 2013. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene* 525:191-199.
- [24] Riske, K. A., and R. Dimova. 2005. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys J* 88:1143-1155.
- [25] Portet, T., C. Favard, J. Teissie, D. Dean, and M. P. Rols. 2011. Insights into the mechanisms of electromediated gene delivery and application to the loading of giant vesicles with negatively charged macromolecules. *Soft Matter* 7:3872-3881.
- [26] Sutherland, R. M. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177-184.
- [27] Gibot, L., and M. P. Rols. 2013. Progress And Prospects: The Use Of 3D Spheroid Model As A Relevant Way To Study And Optimize Dna Electrotransfer. *Curr Gene Ther.*
- [28] Marrero, B., and R. Heller. 2012. The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. *Biomaterials*.
- [29] Madi, M., M. P. Rols, and L. Gibot. 2015. Efficient In Vitro Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue. *J Membr Biol*.
- [30] Madi, M., M. P. Rols, and L. Gibot. 2016. Gene Electrttransfer in 3D Reconstructed Human Dermal Tissue. *Curr Gene Ther* 16:75-82.
- [31] Pillet, F., L. Gibot, M. Madi, M. P. Rols, and E. Dague. 2017. Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model. *Biofabrication* 9:025017.
- [32] Stewart, M. 2016. In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* 538:183-192.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi realizada no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA) e é resultado dos esforços de rede dentro do COST TD1104. As experiências devem-se aos trabalhos dos alunos de doutorado e pós-doutorandos que tenho/tive o prazer de orientar e/ou trabalhar: Muriel Golzio, Cécile Faurie, Emilie Phez, Jean-Michel Escoffre, Thomas Portet, Chloé Mauroy, Louise Chopinet, Elisabeth Bellard, Christelle Rosazza, Amar Tamra, Moinecha Madi, Luc Wasungu, Flavien Pillet, Laure Gibot e Nathalie Joncker.



Marie-Pierre Rols nasceu em Decazeville, a cidade dos “gueules noires” do Duque Decazes, na França, em 1962. Ela recebeu um mestrado em Bioquímica, um doutorado em Biofísica Celular e habilitação para direção de pesquisas da Universidade Paul Sabatier de Toulouse em 1984, 1989 e 1995, respectivamente. Atualmente é Diretora de Pesquisa do laboratório IPBS-CNRS em Toulouse, líder do grupo de “biofísica celular” e chefe do Departamento de “Biologia Estrutural e Biofísica”. É membro do conselho de administração das sociedades SFNano, ISEBTT, BES e do LIA EBAM. Seus interesses de pesquisa estão nas áreas de eletropermeabilização de membrana em células e tecidos, desde o básico até o desenvolvimento de aplicações. Marie-Pierre Rols é autora de mais de 150 artigos em periódicos revisados por pares.

Capítulo 5

Simulações de Dinâmica Molecular da Eletroporação de Membranas Lipídicas

Mounir Tarek

Teoria, Simulações e Modelagem, CNRS- Universidade de Lorraine, França.

Resumo: Atualmente, abordagens computacionais permitem acompanhar, em escala atômica, as perturbações locais porque passam as membranas lipídicas quando são submetidas a um campo elétrico externo. Descrevemos aqui os métodos de simulação de dinâmica molecular concebidos para realizar experimentos *in silico* de membranas sujeitas a campos elétricos pulsados de nanossegundos e megavolt por metro e de membranas sujeitas a desequilíbrio de carga, mimetizando, portanto, a aplicação de baixa voltagem – pulsos de longa duração. No nível molecular, os resultados mostram que os dois tipos de pulsos produzem efeitos semelhantes: desde que o potencial transmembranar criado por esses pulsos seja superior a um certo limite, os poros hidrofílicos estabilizados pelos grupos cabeça do lipídeo da membrana se formam dentro da escala de tempo de nanossegundos através do núcleo lipídico. As simulações são posteriormente utilizadas para caracterizar o transporte de espécies carregadas através desses poros. Acredita-se que os resultados obtidos capturem a essência dos vários aspectos dos fenômenos de eletroporação em membranas de bicamadas e podem servir como uma fonte adicional e complementar de informação ao atual arsenal de ferramentas experimentais.

Introdução

A eletroporação perturba de forma transitória ou permanentemente a integridade das membranas celulares [1-3]. Essas membranas consistem em um conjunto de lipídios, proteínas e carboidratos que se auto-organizam em

uma fina barreira que separa o interior celular do ambiente externo [4]. Os principais constituintes lipídicos das membranas naturais são os fosfolipídios, que se organizam em uma folha de duas camadas (uma camada dupla). Evidências experimentais sugerem que o efeito de um campo elétrico externo aplicado às células é a produção de poros aquosos especificamente na bicamada lipídica [5-9]. As informações sobre a sequência de eventos que descrevem o fenômeno de eletroporação podem, portanto, ser obtidas a partir de medições de correntes elétricas por meio de bicamadas lipídicas planares, juntamente com a caracterização do transporte de moléculas para dentro (ou fora) das células sujeitas aos pulsos de campo elétrico. Pode ser resumido da seguinte forma: pulsos elétricos longos e intensos induzem rearranjos dos componentes da membrana (água e lipídios) que, em última análise, levam à formação de poros hidrofílicos aquosos [5-10] cuja presença aumenta substancialmente o transporte iônico e molecular através de membranas anteriormente impermeáveis [11].

Em membranas de eritrócitos, grandes poros podem ser observados em microscopia eletrônica [12], mas em geral a observação direta da formação de poros nanométricos não é possível com as técnicas convencionais. Além disso, devido à complexidade e heterogeneidade das membranas celulares, é difícil descrever e caracterizar a eletroporação em termos de processos resolvidos atômica e molecularmente. Simulações atômicas em geral, e simulações de dinâmica molecular (MD) em particular, provaram ser eficazes para fornecer informações sobre a estrutura e a dinâmica dos sistemas de membrana lipídica modelo em geral [13-18]. Várias simulações de MD foram recentemente realizadas a fim de modelar o efeito do campo elétrico nas membranas [19-23], fornecendo talvez o modelo molecular mais completo do processo de eletroporação de bicamadas lipídicas.

Simulações MD de membranas lipídicas

A Dinâmica Molecular (MD) refere-se a uma família de métodos computacionais destinados a simular o comportamento macroscópico por meio da integração numérica das equações clássicas de movimento de um sistema microscópico de muitos corpos. Propriedades macroscópicas são expressas como funções de coordenadas de partículas e/ou momentos, que são calculados ao longo de uma trajetória de espaço de fase gerado por dinâmica clássica [24,25]. Quando realizadas em condições correspondentes a cenários de laboratório, as simulações MD podem fornecer uma visão detalhada da estrutura e dinâmica de um sistema macromolecular. MDs também podem ser usadas para realizar

“experimentos de computador” que não podem ser realizados em laboratório, seja porque não representam um comportamento físico ou porque os controles necessários não podem ser alcançados.

As simulações de MD requerem a escolha de uma função de energia potencial, ou seja, termos pelos quais as partículas interagem, geralmente referido como um campo de força. Aqueles mais comumente usados em química e biofísica, por exemplo, GROMOS [26] CHARMM [27] e AMBER [28], são baseados na mecânica molecular e um tratamento clássico de interações partícula-partícula que impede a dissociação de ligação e, portanto, a simulação de reações químicas. Os campos de força MD clássicos consistem em uma soma de forças ligadas associadas a ligações químicas, ângulos de ligação e diédricos de ligação, forças intermoleculares associadas com forças de van der Waals e interações eletrostáticas. Os parâmetros associados a esses termos são otimizados para reproduzir mudanças estruturais e conformacionais de sistemas macromoleculares.

Os campos de força convencionais incluem apenas cargas pontuais e potenciais Coulomb aditivos de pares, que os impedem de descrever efeitos eletrostáticos coletivos realistas, como transferência de carga, excitações eletrônicas ou polarização eletrônica, que muitas vezes é considerada como uma limitação importante dos campos de força clássicos. Observe que esforços constantes são realizados no desenvolvimento de funções potenciais que tratam explicitamente a polarizabilidade eletrônica em campos de força empíricos [29-31], mas nenhum desses campos de força "polarizáveis" é amplamente utilizado em simulações em grande escala por enquanto; as principais razões para isso é o aumento dramático do tempo computacional de simulação e complicações adicionais com sua parametrização. Nesta perspectiva, os campos de força clássicos fornecem uma descrição adequada das propriedades dos sistemas de membrana e permitem investigações semiquantitativas da eletrostática de membranas.

As simulações de MD usam informações (posições, velocidades ou momentos, e forças) em um determinado instante no tempo, t , para prever as posições e os momentos em um momento posterior, $t + \Delta t$, onde Δt é o intervalo de tempo, da ordem de um femtossegundo, considerado constante ao longo da simulação. Soluções numéricas para as equações do movimento são, portanto, obtidas pela interação desta etapa elementar. As simulações de computador geralmente são realizadas em um pequeno número de moléculas (de algumas dezenas a algumas centenas de milhares de átomos), sendo o tamanho do sistema limitado, é claro, pela velocidade de execução dos programas e pela disponibilidade de poder computacional. A fim de eliminar os efeitos de borda e imitar um sistema macroscópico, as

simulações de sistemas de fase condensada consideram um pequeno fragmento de moléculas confinadas em uma célula de simulação central e replicam o último usando condições de contorno periódicas (PBCs) nas três direções do espaço cartesiano. Para membranas, por exemplo, o sistema simulado corresponderia a um pequeno fragmento de um filme preto, um lipossoma ou lipídios multilamelares empilhados depositados em um substrato [32,33].

Tradicionalmente, os fosfolipídios têm servido como modelos para investigar *in silico* as propriedades estruturais e dinâmicas das membranas. De uma perspectiva teórica e experimental, as bicamadas lipídicas de fosfatidilcolina zwitteriônica (PC) constituem os sistemas mais bem caracterizados [34-37]. Estudos mais recentes consideraram uma variedade de lipídios alternativos, apresentando grupos cabeça diferentes, possivelmente carregados [38] [39-42], e mais recentemente composições de bicamada mistas [43-49]. Apesar de sua simplicidade, bicamadas construídas a partir de lipídios de PC representam sistemas de teste notáveis para investigar a metodologia de computação e obter informações adicionais sobre as propriedades físicas das membranas [14,17,50,51].

Modelagem de eletroporação de membranas

Os efeitos de um campo elétrico em uma célula podem ser descritos considerando esta última como uma camada dielétrica (a membrana da superfície celular) embutida em um meio condutor (interno: citoplasma e externo: meio extracelular). Quando pulsos de campo relativamente baixo com duração de microssegundos ou milissegundos são aplicados à esta célula (colocando, por exemplo, a célula entre dois eletrodos e aplicando um pulso de voltagem constante), a corrente resultante causa o acúmulo de cargas elétricas em ambos os lados da membrana celular. O tempo necessário para carregar a membrana de superfície depende dos parâmetros elétricos do meio em que ela está suspensa. Para uma célula esférica, estima-se usando circuitos resistor-capacitor (RC) de rede equivalentes na escala de tempo de 100 ns [19,52–55]. Uma constante de tempo de carga na faixa de centenas de nanossegundos também foi obtida a partir de derivações baseadas na equação de Laplace (ver, por exemplo, [56] para a análise de primeira ordem em uma vesícula esférica; [57] para a análise de segunda ordem; e [58] para a análise de segunda ordem para duas vesículas esféricas concêntricas, ou seja, modelando uma organela). Se, por outro lado, a duração do pulso é curta o suficiente em relação à constante de tempo de carga da rede resistivo-capacitiva formada pelos fluidos

condutores intracelulares e extracelulares, e o dielétrico da membrana celular, que é o caso dos pulsos de nanossegundos, então a resposta do sistema é principalmente dielétrica e está ligado à polarização da água interfacial (veja abaixo).

As simulações permitem realizar experimentos *in silico* em ambas as condições, ou seja, submetendo o sistema a campos elétricos pulsados de nanossegundos, megavolt por metro ou a desequilíbrio de cargas elétricas, mimetizando, portanto, a aplicação de baixa voltagem – pulsos de longa duração. A seguir, descreveremos os resultados de tais simulações.

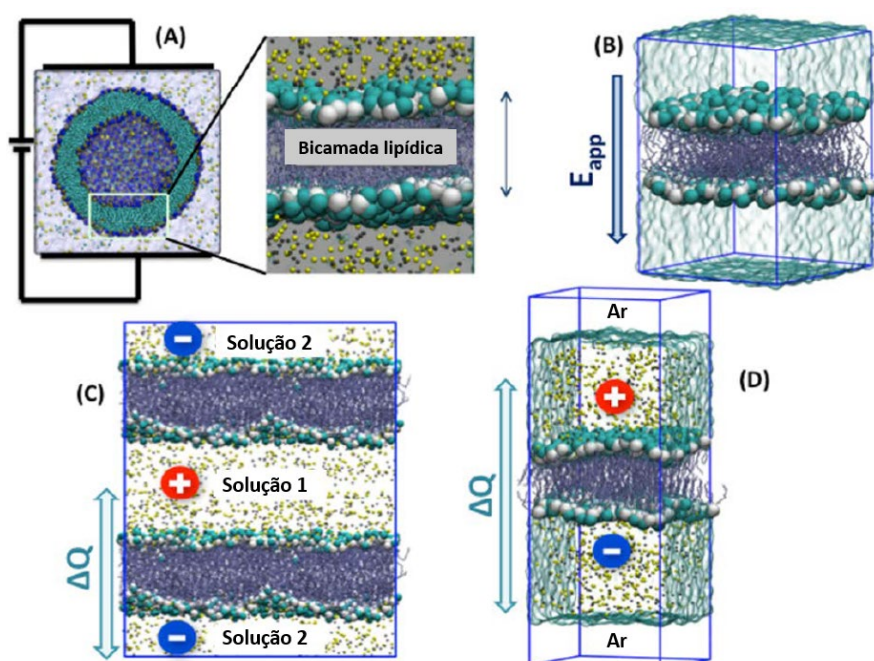


Figura. 1 Protocolos para modelagem atômica de membranas celulares ou bicamadas lipídicas de lipossomas (A) Eletroporação; (B) Protocolo nsPEFs: o sistema é modelado na ausência de sal e sujeito a um campo elétrico E_{app} perpendicular à bicamada (eixo z). Observe que em alguns estudos os íons também foram considerados; (C) Protocolo μ s-msPEFs introduzido na configuração de dupla camada: um desequilíbrio de carga ΔQ é definido em cada bicamada e o esquema é implementado usando PBCs clássicos. Para evitar que os íons migrem através das condições de contorno periódicas, a caixa de simulação (em azul) é estendida na direção perpendicular à bicamada (eixo z) para criar uma placa de vácuo no protocolo de interface ar/água (D).

Eletroporação induzida pelo efeito direto de um campo elétrico

Em simulações, é possível aplicar “diretamente” um campo elétrico \vec{E} constante perpendicular ao plano da membrana (bicamadas lipídicas). Na prática, isso é feito adicionando uma força $\vec{F} = q_i \vec{E}$ a todos os átomos com carga q_i [59-63]. Simulações de MD que adotam tal abordagem tem sido usadas para estudar eletroporação de membrana [19-23], externalização de lipídios [64], para ativar canais de K^+ dependentes de voltagem [65] e para determinar propriedades de transporte de canais de íons [66-69].

A consequência de tal perturbação deriva das propriedades da membrana e das condições de configuração das simulações: as membranas lipídicas puras exibem uma distribuição atômica heterogênea através da bicamada, à qual estão associadas cargas e distribuições de dipolos moleculares. Os grupos cabeça dos fosfolipídios adotam, em geral, uma orientação preferencial. Para bicamadas de PC hidratadas em temperaturas acima da transição do gel para o cristal líquido, os dipolos de fosfatidilcolina apontam em média 30 graus para longe da membrana normal [70]. A organização dos grupos fosfato (PO_4^-), colina ($N(CH_3)_3^+$) e carbonila ($C=O$) do grupo cabeça de lipídeo dá, portanto, origem a um dipolo permanente e as moléculas de solvente (água) ligadas às porções do grupo cabeça de lipídeo tendem a orientar seus dipolos para compensar o último [71]. As características eletrostáticas da bicamada podem ser obtidas a partir de estimativas do perfil eletrostático $\phi(z)$ que decorre da distribuição de todas as cargas no sistema. $\phi(z)$ é derivado de simulações de MD usando a equação de Poisson e expresso como a integral dupla de $\rho(z)$, as distribuições de densidade de carga molecular:

$$\Delta\phi(z) = \phi(z) - \phi(0) = -\frac{1}{\epsilon_0} \iint_0^z \rho(z'') dz'' dz' .$$

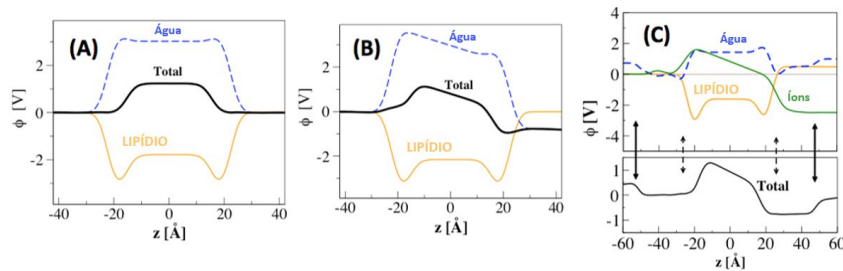


Figura. 2 Perfis de potencial eletrostático $\phi(z)$ ao longo da normal da membrana (eixo z) de uma bicamada lipídica POPC. Bicamada (A) em repouso, (B) sujeita a um campo elétrico transversal (protocolo nsPEF) e (C) bicamada definida com um

desequilíbrio de carga (protocolo μ s-msPEF). $z=0$ representa o centro da bicamada lipídica. As contribuições para o perfil eletrostático da água (azul), lipídio (amarelo), íons (verde) são relatadas ao lado do total (preto). As setas tracejadas no painel C indicam as posições das interfaces lipídio/água e as setas sólidas a posição das interfaces água/ar. Observe que a voltagem TM U_m (diferença de potencial entre os banhos de água superior e inferior) no protocolo nsPEF é principalmente devido à reorientação dos dipolos de água, enquanto no protocolo μ s-msPEF é principalmente devido à distribuição de carga (íons).

Para bicamadas lipídicas, a maioria das quais é modelada sem consideração de uma concentração de sal, um campo elétrico aplicado atua especificamente e principalmente nos dipolos de água interfaciais (pequena polarização de moléculas de água em massa). A reorientação dos grupos cabeça lipídicos parece não ser afetada em escalas de tempo muito curtas [21,72], e não excedendo alguns graus em direção ao campo elétrico em escalas de tempo mais longas [22]. Portanto, dentro de uma escala de tempo muito curta – tipicamente poucos picossegundos [21] – um campo transversal \vec{E} induz um potencial TM geral ΔV (*cf.* Fig. 2). É muito importante notar aqui que, por causa da configuração da simulação MD (e do uso de PBCs), induz uma diferença de voltagem $\Delta V \approx |\vec{E}| \cdot L_z$ sobre todo o sistema, onde L_z é o tamanho da caixa de simulação em a direção do campo. No exemplo mostrado na Fig 2, L_z é ~ 10 nm. O campo elétrico ($0,1 \text{ V} \cdot \text{nm}^{-1}$) aplicado à bicamada POPC induz $\Delta V \sim 1\text{V}$.

Simulações de MD de bicamadas lipídicas puras mostraram que a aplicação de campos elétricos de magnitude alta o suficiente leva à eletroporação de membrana, com uma sequência de poração bastante comum: o campo elétrico favorece muito rapidamente (dentro de algumas centenas de picossegundos) a formação de defeitos de água e fios de água profundos no núcleo hidrofóbico [20]. Em última análise, “dedos” de água que se formam em ambos os lados da membrana unem-se para formar canais de água (frequentemente denominados pré-poros ou poros hidrofóbicos) que abrangem a membrana. Em nanossegundos, poucos grupos cabeça lipídicos começam a migrar da interface membrana-água para o interior da bicamada, estabilizando os poros hidrofílicos (~ 1 a 3 nm de diâmetro).

Todos os estudos de MD relataram expansão dos poros conforme o campo elétrico foi mantido. Em contraste, foi mostrado em um exemplo [21] que um poro hidrofílico poderia selar novamente em alguns nanossegundos quando o campo aplicado fosse desligado. A recuperação completa da membrana, ou seja, migração do grupo cabeça lipídico formando o poro hidrofílico em direção à interface lipídio/água, sendo um processo muito mais longo, não foi observada. Mais recentemente, estudos

sistemáticos de criação de poros e tempo de vida de aniquilação em função da intensidade do campo lançaram mais luz sobre a complexa dinâmica dos poros em bicamadas lipídicas simples [22,73]. Curiosamente, foi demonstrado que a adição de sal modula essas escalas de tempo características [74].

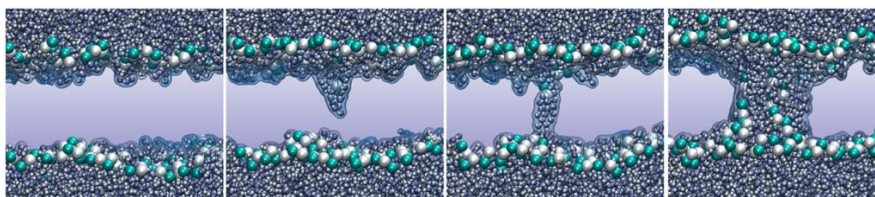


Figura. 3 Evolução de poros em uma bicamada POPC: Os grupos cabeça de POPC são mostrados como pontos cianos e brancos, as caudas de lipídios não são mostradas para maior clareza. A criação de poros, em simulações de MD, ocorre na faixa de nanossegundos.

Para tamanhos típicos em sistemas MD (128 lipídios; seção transversal de membrana de 6 nm x 6 nm), a maioria das simulações relatou uma formação de poro único em intensidades de campo altas. Para sistemas muito maiores, a formação de múltiplos poros com diâmetros variando de alguns poucos a 10 nm pode ser observada [20,21]. Esses poros são, em princípio, largos o suficiente para transportar íons e pequenas moléculas. Até o momento uma tentativa foi feita para investigar tal transporte molecular sob eletroporação [21]. Nesta simulação, pôde-se acompanhar o transporte parcial de uma fita de DNA de 12 pares de bases através da membrana. A fita de DNA foi considerada como difundida em direção ao interior da bicamada quando criou-se um poro abaixo dela e formou-se um complexo estável de DNA/lipídio, no qual os grupos cabeça lipídicos encapsularam a fita. O processo forneceu suporte ao modelo de entrega de genes proposto por Golzio *et al.* [75] em que uma "etapa de ancoragem", que conecta o plasmídeo à membrana das células permeabilizadas, ocorre durante a transferência de DNA auxiliada por pulsos elétricos, e concorda com as últimas descobertas do mesmo grupo [76]. Mais recentemente (ver seções abaixo), foi mostrado que mesmo um único pulso elétrico de 10 ns de magnitude alta o suficiente pode aumentar o transporte de pequenos siRNA através das membranas lipídicas [77].

O processo de eletroporação ocorre muito mais rapidamente em campos elétricos mais elevados, sem uma grande mudança nas características de formação dos poros. As voltagens mais baixas relatadas para eletroporar uma bicamada lipídica PC são ~2 V [22] [72]. Ziegler e Vernier [23] relataram intensidades mínimas de campo externo de poração para quatro

diferentes lipídios PC com diferentes comprimentos de cadeia e composição (número de insaturações). Os autores encontraram uma correlação direta entre os campos mínimos de poração (variando de $0,26 \text{ V}\cdot\text{nm}^{-1}$ a $0,38 \text{ V}\cdot\text{nm}^{-1}$) e a espessura da membrana (variando de $2,92 \text{ nm}$ a $3,92 \text{ nm}$). Observe que as estimativas de limiares de eletroporação de simulações devem, em geral, ser consideradas apenas como indicativas, uma vez que estão relacionadas à escala de tempo que a formação de poros pode levar. Se “supõe” que um limiar de intensidade de campo foi alcançado quando nenhuma ruptura de membrana é formada dentro da escala de tempo de 100 ns .

Eletroporação induzida por gradientes de concentração de sal iônico

Independentemente de como os pulsos elétricos de milissegundos e baixa intensidade são aplicados, a etapa final é o carregamento da membrana devido ao fluxo de íons. O desequilíbrio de carga iônica resultante entre os dois lados da bicamada lipídica é localmente o principal efeito que induz o potencial TM. Em uma configuração clássica de simulações de membrana, devido ao uso de PBCs-3D, a voltagem TM não pode ser controlada impondo um desequilíbrio de carga Q_s na bicamada, mesmo quando estão presentes nos eletrólitos. Vários protocolos de simulação de MD que podem superar essa limitação foram desenvolvidos (Fig.1).

A configuração de dupla camada:

De fato, foi demonstrado que os gradientes de potencial TM podem ser gerados por um desequilíbrio de carga através das bicamadas lipídicas, considerando uma célula unitária MD que consiste em três banhos de água com sais separados por duas bicamadas PBCs-3D [78] (cf. Fig. 1C). Configurar um desequilíbrio de carga líquida entre os dois banhos de água independentes no tempo $t = 0$ induz uma voltagem TM ΔV por dinâmica explícita de íons.

A configuração de camada única:

Delemotte *et al.* [79] introduziram uma variante desse método onde a camada dupla não é necessária, evitando, portanto, o custo excessivo de simular um grande sistema. O método consiste em considerar uma única

bicamada circundada por banhos eletrolíticos, cada um deles terminado por uma interface ar/água [43]. O sistema é configurado conforme indicado na Fig. 1D. Primeiro, uma bicamada hidratada é equilibrada a uma dada concentração de sal usando condições de contorno periódicas 3D. As interfaces ar-água são então criadas em ambos os lados da membrana e um equilíbrio posterior é realizado em volume constante, mantendo, portanto, uma separação entre os eletrólitos superiores e inferiores. Um desequilíbrio de carga Q_s entre os dois lados da bicamada é gerado simplesmente deslocando no tempo $t=0$ um número adequado de íons de um lado para o outro. Na medida em que as placas de água são mais espessas do que 25-30 Å, a presença de interfaces de água e ar não tem incidência nas propriedades da bicamada lipídica e a membrana "parece" como se estivesse embutida em banhos infinitos cujas características são aquelas das soluções finitas modeladas.

A Fig. 2 relata os perfis de potencial eletrostático ao longo da normal à membrana gerada a partir de simulações de MD de uma bicamada POPC em contato com banhos de água salgada de 1M NaCl em vários desequilíbrios de carga Q_s , usando o método de bicamada única. Para todas as simulações, os perfis calculados na fase inicial mostram valores de platô nas regiões aquosas e, para aumentar Q_s , uma diferença crescente de potencial eletrostático entre os dois eletrólitos indicativos de um potencial TM ΔV . Curiosamente, os perfis mostram claramente que, ao contrário do caso do campo elétrico onde a voltagem TM é principalmente devida à reorientação do dipolo da água, a maior parte da queda da voltagem no método do desequilíbrio de carga é devida à contribuição dos íons. Na verdade, o colapso do potencial eletrostático devido a separação do desequilíbrio de carga pelo núcleo de lipídio da membrana é, sozinho, responsável pela maior parte de ΔV .

Usando a configuração de desequilíbrio de carga, foi possível pela primeira vez demonstrar diretamente *in silico* que a bicamada lipídica simulada se comporta como um capacitor [79,80]. Simulações em vários desequilíbrios de carga Q_s mostram uma variação linear de ΔV a partir da qual a capacitância pode ser estimada como $C = Q_s \cdot \Delta V^{-1}$. Espera-se que os valores de capacitância extraídos das simulações dependam da composição lipídica (carregada ou não) e dos parâmetros do campo de força usados e, como tal, constituem uma forma complementar de verificar a precisão dos parâmetros do campo de força lipídico usados na simulação. Aqui, no caso de bicamadas de POPC incorporadas em uma solução 1M de NaCl, a qual corresponde à 0,85 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, está em concordância razoável com o valor geralmente assumido na literatura, isto é, 1,0 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ [78,81] e com

medições recentes para bicamadas lipídicas POPC planares em uma solução de KCl 100 mM ($0,5 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Para voltagens TM induzidas suficientemente altas, os três protocolos conduzem à eletroporação da bicamada lipídica. Como no caso do método de campo elétrico, para ΔV acima de 1,5-2,5 volts, o processo de eletroporação começa com a formação de dedos de água que se projetam dentro do núcleo hidrofóbico da membrana. Em nanossegundos, aparecem fios de água fazendo uma ponte entre os dois lados da membrana que estão sob estresse de voltagem. Se as simulações forem mais desenvolvidas, os grupos cabeça lipídicos migram ao longo de um fio e formam uma via hidrofílica conectada (Fig.3). Como as soluções de sal são explicitamente consideradas nessas simulações, a condução de íons através dos poros hidrofílicos ocorreu após a eletroporação das bicamadas lipídicas. Detalhes sobre o transporte iônico através dos poros formados dentro do núcleo da bicamada na eletroporação podem ser coletados.

As simulações MD do sistema de bicamada dupla [82,83] e os resultados apresentados aqui para a configuração de bicamada única mostram que ambos os cátions e ânions intercambiam através dos poros entre os dois banhos, com um fluxo geral de cargas direcionado a uma diminuição do desequilíbrio de carga. A translocação de íons através dos poros de uma região massiva para outra dura de algumas dezenas a algumas centenas de picossegundos, e leva a uma diminuição do desequilíbrio de carga e, portanto, ao colapso de ΔV . Conseqüentemente, para todos os sistemas, quando o desequilíbrio de carga atingiu um nível onde a voltagem TM caiu para algumas centenas de mV, os poros hidrofílicos “fecham” no sentido de que não ocorre mais translocação iônica (Fig.4F). A topologia final dos poros no final das simulações permanece estável por intervalos de tempo que excedem a escala de 10 nanossegundos, mostrando, como relatado em simulações anteriores [21], que a recuperação completa da estrutura de bicamada original requer uma escala de tempo muito mais longa.

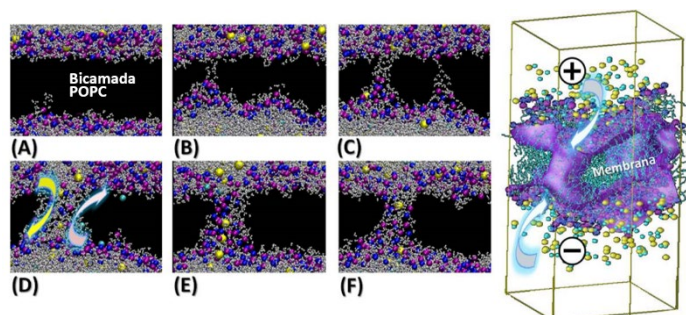


Figura. 4 Esquerda Sequência de eventos após a aplicação de uma voltagem TM a

uma bicamada de lipídios POPC usando o método de desequilíbrio de carga (painéis A à F). Observe a migração dos íons Na^+ (amarelo) e Cl^- (ciano) através dos poros hidrofílicos formados, que são revestidos com átomos de fosfolipídios (magenta) e nitrogênio (azul) do grupo cabeça. O painel F representa o estado não-condutor de um poro, alcançado quando a troca de íons entre os dois banhos diminuiu Q_s e, portanto, ΔV para valores ≈ 200 mV. *Direita* Topologia dos poros hidrofílicos de largura nanométrica formados sob alta ΔV transmembranar imposta pelo método de desequilíbrio de carga na bicamada plana (A). As setas destacam o fluxo iônico subsequente através dos poros.

Observe que, a fim de manter ΔV constante, o modelador precisa manter o desequilíbrio de carga inicial “injetando” cargas (íons) nos eletrólitos em um ritmo equivalente à taxa de translocação de íons através do poro hidrofílico. Este protocolo é, em particular para a configuração de bicamada única, adequado para realizar simulações sob voltagem constante (baixa voltagem, duração de ms) ou em condições de corrente constante, o que é adequado para comparação com experimentos realizados em condições semelhantes [84].

Distribuição interna do campo elétrico interno e origem da eletroporação das membranas

A fim de determinar o mecanismo detalhado da criação do poro, é útil sondar a distribuição do campo elétrico através da bicamada, tanto em repouso quanto sob o efeito de uma voltagem TM. A Figura 5A exibe os perfis de potencial eletrostático para uma bicamada lipídica sujeita a campos elétricos crescentes que geram potenciais TM que variam de 0 V a ~ 3 V. Em 0 V, a bicamada lipídica está em repouso e os perfis revelam, de acordo com o experimento [85], a existência de uma diferença de potencial positiva entre o interior da membrana e as fases aquosas adjacentes.

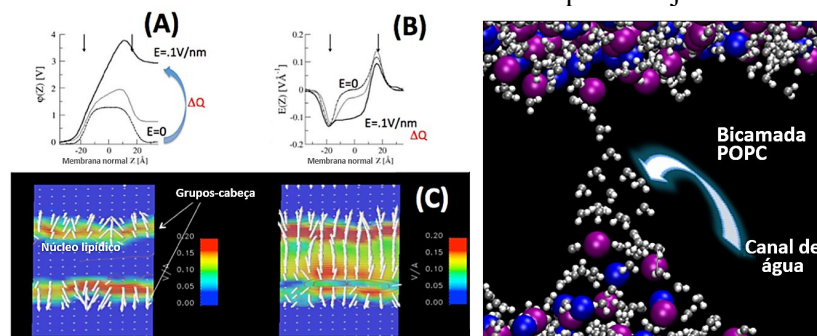


Figura. 5 (A) Perfis de potencial eletrostático através de uma bicamada lipídica

sujeita a campos elétricos de 0 V/nm (linha pontilhada) 0,06 V/nm (linha fina) e 0,30 V/nm (linha em negrito) ou a desequilíbrios de carga ΔQ . (B) Perfis de campo elétrico correspondentes. (C) Mapas 2D (fora do plano) da distribuição do campo elétrico. A direção e intensidade do campo elétrico local são exibidas como setas brancas. Observe que a 0 mV, devido ao potencial dipolo de bicamada em repouso, os campos elétricos maiores estão localizados nas interfaces de água e lipídio e são orientados em direção ao solvente, e nenhum campo elétrico está presente no núcleo de lipídio. Quando a bicamada está sujeita a um potencial TM, um campo elétrico líquido aparece na região do hidrocarboneto. Este último promove a orientação dipolar e a penetração das moléculas de água (painel direito) dentro da bicamada.

Em repouso, a mudança de voltagem através das interfaces de água lipídica dá origem localmente a grandes campos elétricos (no caso presente até $1,5 \text{ V.nm}^{-1}$) orientados para o volume de água, enquanto no centro da bicamada, o campo elétrico local é nulo (Fig. 5B, C). Quando campos elétricos externos de magnitudes respectivamente de 0,06 e $0,30 \text{ V.nm}^{-1}$ são aplicados, a reorientação das moléculas de água dá origem a potenciais TM de respectivamente $\sim 0,75$ e 3 V. As Figs 5B e C revelam a incidência de tal reorganização no campo elétrico local na região interfacial e dentro do núcleo da bicamada. Em particular, nota-se que o campo no núcleo da membrana aumentou para um valor $\sim 1 \text{ V.nm}^{-1}$ para o ΔV mais alto estabelecido.

Para o método de desequilíbrio de carga o quadro geral é semelhante, onde novamente, as voltagens TM criadas dão origem a grandes campos elétricos dentro do núcleo da membrana, orientados perpendicularmente à bicamada.

Qualitativamente, em ambos os métodos, a cascata de eventos após a aplicação da voltagem TM, ocorrendo na membrana, é uma consequência direta de tal distribuição de campo. De fato, as moléculas de água inicialmente restritas a região interfacial, à medida que percolam aleatoriamente dentro do núcleo da membrana, estão sujeitas a um alto campo elétrico e, portanto, inclinadas a orientar seu dipolo ao longo desse campo local. Essas moléculas podem, então, criar ligações de hidrogênio facilmente entre si, o que resulta na criação de filamentos únicos de água. Esses dedos projetam-se através do núcleo hidrofóbico de ambos os lados da membrana. Finalmente, esses dedos se encontram para formar canais de água (geralmente chamados de pré-poros ou poros hidrofóbicos) que atravessam a membrana. Como a voltagem TM é mantida, esses fios de água parecem ser capazes de superar a barreira de energia livre associada à formação de uma linha única de moléculas de água, abrangendo a bicamada (estimada em $\sim 108 \text{ kJ/mol}$ na ausência de campo elétrico externo [86]). À

medida que se mantém a voltagem TM, os grupos cabeça lipídicos migram ao longo dos fios de água estáveis e participam da formação de “poros hidrofílicos” maiores, capazes de conduzir íons e moléculas maiores à medida que se expandem.

Ziegler *et al.* [23] mostraram claramente que a orientação dos grupos cabeça lipídicos (dipolos) não é um fator determinante no processo de EP. A suposição geral de que os grupos cabeça lipídicos têm um papel marginal na formação dos eletroporos é consistente com estudos de eletroporação de octano [20] e placas de vácuo [87]: esses trabalhos mostraram que, como em bicamadas lipídicas, colunas de água pode se formar em qualquer sistema de água/baixo dielétrico/água sujeito a altos campos elétricos.

Evidências experimentais mostram que os poros se fecham quando o campo de pulso elétrico (PEF) é desligado. A cinética desse processo determina quanto tempo pode durar o vazamento ou a entrega de moléculas às células-alvo. As simulações MD indicam que este processo inicia com um colapso do poro (fechamento) devido a um rápido vazamento de água para fora, seguido por uma reorganização muito mais lenta que leva à repartição dos grupos cabeça lipídicos em direção aos folhetos hidrofílicos externos. A cinética de resselagem é independente da magnitude dos campos elétricos de iniciação dos poros. Em geral, a recuperação completa da estrutura da bicamada original requer uma escala de tempo muito mais longa [21,87,88], que vai de alguns nanossegundos a centenas de nanossegundos, e depende criticamente da estrutura da bicamada [89]. Observe que a adição de sal aos sistemas submetidos ao protocolo nsPEF demonstrou modular as escalas de tempo características de todo o ciclo de vida dos poros [88,90].

MODELOS COMPLEXOS DE BICAMADAS: LIMIARES ELETROPORAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO PORO

Limiares de eletroporação

Desde as primeiras simulações [21,91], que consideraram bicamadas lipídicas simples de 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) e dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), uma variedade de bicamadas lipídicas foram modeladas objetivando entender os principais elementos que podem modular seus limiares de eletroporação. O aumento do limiar de EP após adição de colesterol [92-94] foi estudado usando o campo E [95] e protocolos de desequilíbrio de carga [93]. Para o primeiro, um aumento constante do limiar de EP coincide com um aumento na concentração de

colesterol: um campo elétrico duas vezes maior foi necessário para a eletroporação de bicamadas com a adição de 50 mol% de colesterol. Sob condições μ s-msPEFs, o limiar de EP mostrou nivelar acima de 30 mol% de colesterol. Geralmente, o aumento do limiar de EP tem sido relacionado ao aumento da rigidez da bicamada [92,94].

Em uma série de artigos [96,97], o grupo de Tarek investigou o efeito sobre o limiar de EP das ligações éster e éter, de caudas ramificadas (fitanoil) e de grupos cabeça lipídicas volumosas (glucosil-myo e myo inositol). Os autores descobriram que o limiar de EP de uma bicamada lipídica depende não apenas das propriedades "elétricas" da membrana, ou seja, seu potencial dipolo ou capacitância de membrana, mas também sobre a natureza das caudas hidrofóbicas de lipídios. Os autores relatam que existe uma correlação entre a pressão lateral na interface água/lipídio e o limiar de EP. Eles sugerem que um aumento da pressão lateral (na membrana lipídica ramificada em comparação com as bicamadas lipídicas simples) impede a difusão local das moléculas de água em direção ao interior do núcleo hidrofóbico, o que diminui a probabilidade de formação de poros, aumentando, portanto, o limiar de eletroporação.

Comparando especificamente os lipídios arqueais (grupos cabeça de glucosil-myo e myo inositol) com os lipídeos PC normais, limiares de eletroporação mais elevados foram atribuídos para o primeiro grupo [96,97] devido à forte rede de ligações de hidrogênio que estabiliza as interações entre os grupos cabeça. Da mesma forma, Gurtovenko *et al.* [98] relataram maior limiar de EP para bicamadas lipídicas de fosfatidiletanolamina (PE) em comparação com bicamadas lipídicas de fosfatidilcolina (PC). Este efeito foi associado à ligação de hidrogênio inter-lipídico ocorrendo na bicamada de PE, o que leva a uma interface água/lipídio mais densa, e cadeias lipídicas de hidrocarbonetos mais ordenadas. Considerando uma bicamada assimétrica, composta por folhetos lipídicos de PC e PE, os autores observaram que a característica de eletroporação inicial, ou seja, a formação da coluna de água, também é assimétrica, com as etapas iniciais ocorrendo principalmente no folheto PC. Estudando membranas de composição mais complexa, Piggot *et al.* [99] relataram que a membrana celular da bactéria gram-positiva *S. aureus* é menos resistente à poração do que a membrana externa da bactéria gram-negativa *E. coli* (EcOM). O maior limiar de EP do EcOM foi associado à mobilidade reduzida das moléculas de lipopolissacarídeo que estão localizadas no folheto externo. Fatores adicionais, como colesterol, presença de impurezas e outros compostos, podem modificar as propriedades de permeabilização dos modelos de membrana ao agirem em sua estabilidade.

Características dos poros

Os resultados MD suportam a hipótese de que após a aplicação de uma alta voltagem transmembranar a membrana celular é permeabilizada pela formação de poros hidrofílicos condutores, estabilizados pelos grupos cabeça de lipídeos. As propriedades dos lipídeos desempenham um papel determinante no tempo de vida dos eletroporos e em suas características estruturais (por exemplo, tamanho, forma, morfologia) [87]. Outros estudos, considerando várias bicamadas lipídicas, desafiaram a morfologia padrão dos poros. Tarek e coautores sinalizaram que um processo peculiar de EP pode ocorrer, no qual grandes colunas de água de longa duração condutoras de íons não são estabilizadas por grupos de lipídeos [93,97,100]. Esses poros condutores "hidrofóbicos" se originam de restrições de natureza diferente na bicamada lipídica. O primeiro relato [100] focou em uma bicamada de palmitoil-oleil-fosfatidilserina (POPS) caracterizada por grupos cabeça carregados negativamente. Quando este sistema foi sujeito a um desequilíbrio de carga alto o suficiente para eletroporar a bicamada, a migração de lipídios ao longo da coluna de água acabou sendo amplamente prejudicada (Fig. 5, segundo painel [100]). Conclusões semelhantes foram tiradas para bicamadas de lipídios PC contendo mais de 30% molar de colesterol [93] ou para lipídios Archaeal [97] (Fig. 5). Esta morfologia peculiar foi atribuída a uma repulsão de grupos cabeça carregados negativamente no primeiro caso [100], ao efeito de condensação do colesterol no segundo [93], e ao impedimento estérico dos grupos cabeça volumosos acoplados às caudas ramificadas no último [97].

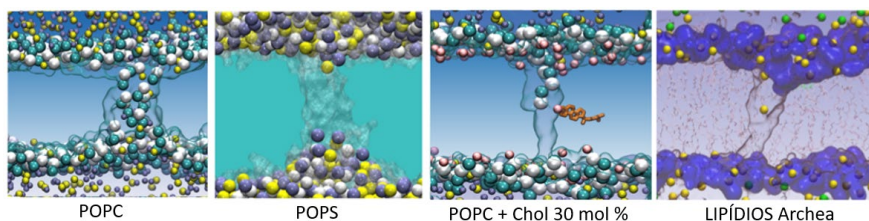


Figura 6. Várias morfologias de poros condutores reveladas por simulações MD. Observe que ao lado dos lipídeos zwitteriônicos POPC, poros formados no POPS, um lipídio carregado negativamente, com adição de colesterol ou nos lipídeos complexos Archaea (grupos cabeça semelhantes à açúcar), os eletroporos não são estabilizados pelos grupos de cabeça de lipídeo.

Estabilização dos poros

Ao lidar com as características dos eletroporos (por exemplo: tamanho, condutância, transporte de moléculas), seria de se esperar que o poro

estivesse em um estado energeticamente favorável, ou seja, aquele que corresponde a uma configuração estável. Para entender se o poro pode ser considerado em um estado estacionário para uma dada voltagem TM e caracterizar seu tamanho e condutância, os dois procedimentos MD (introduzidos nas seções anteriores) precisam ser melhorados. Na verdade, a principal desvantagem desses dois protocolos, normalmente usados, reside na impossibilidade de manter um poro estável. No método do campo elétrico, o poro tende a se expandir, levando à quebra da bicamada quando atinge as dimensões da caixa de células da simulação. O protocolo de desequilíbrio de carga, por outro lado, sofre de uma limitação importante: o desequilíbrio não é reconfigurado durante a simulação. Assim, nos estudos realizados com os esquemas de bicamada dupla ou simples, o desequilíbrio de carga imposto no início diminui significativamente dentro de várias dezenas/centenas de picossegundos (dependendo do tamanho do sistema) de EP, devido a uma troca de íons através do poro. A diminuição do desequilíbrio de carga resulta em uma queda da voltagem TM, que acaba levando ao colapso dos poros e nova resselagem.

Ao utilizar o protocolo nsPEF, a diminuição da intensidade do campo elétrico após a criação dos poros resultou em sua estabilização [22]. Usando a mesma estratégia, Fernández *et al.* [95] conseguiu modular o tamanho do poro e mostrou que ele depende apenas da intensidade do campo elétrico estabilizador. Mais recentemente, nosso grupo [101] usou um esquema para manter um desequilíbrio de carga constante, refinando assim a abordagem μ s-msPEFs para obter poros estáveis de tamanho controlado. O protocolo utilizado é idêntico ao procedimento proposto por Kutzner *et al.* [84] para estudar o transporte em canais iônicos usando o esquema de camada dupla. Neste procedimento, denominado "intercâmbio", o número de íons nos dois banhos de solução é estimado frequentemente e, se este for diferente da configuração inicial, ocorre um evento de "troca": um íon de uma solução é trocado por uma molécula de água do outro banho de solução (consulte o material complementar para mais informações). Observe que para superar a limitação de simular a bicamada no conjunto NVT (volume constante), o procedimento de troca pode ser acoplado ao conjunto NP γ T (tensão superficial constante) para manter a tensão superficial da bicamada constante (nula) e simular, portanto, condições experimentais [101].

Caracterização dos poros

Uma primeira tentativa de vincular evidências experimentais de condutância de poros e estimativa de raio da circunferência foi realizada por Kramar *et al.* usando uma técnica de corrente ascendente linear combinada

com simulações MD realizadas em condições semelhantes [102]. Seus resultados sugerem que a abertura e fechamento de um único poro sob condutância na escala de 100 ns seria possível para um diâmetro de poro de ~5 nm.

Investigações mais sistemáticas, utilizando os protocolos modificados nsPEF [95,103] e μ s-msPEF [101], permitiram caracterizar melhor a condutância dos eletroporos. Para simulações realizadas sob os dois protocolos, ao aplicar voltagens TM abaixo do limite de EP, o poro formado pode ser estabilizado em raios diferentes por dezenas de ns. Curiosamente, os raios dos poros e a condutância dos poros variam quase linearmente com a voltagem aplicada. Além disso, descobriu-se que os poros são mais seletivos para cátions do que para ânions [101,103,104]. Essa seletividade surge da natureza das moléculas de lipídios que constituem o poro: os grupos fosfato carregados negativamente que formam as paredes do poro atraem íons de sódio, o que dificulta sua passagem pela bicamada, mas também torna o interior do poro eletrostaticamente desfavorável para outros íons de sódio [105]. Isso, por si só, sugere que o transporte por eletroporos é sensível ao tipo de soluto, apresentando uma afinidade diferente para as diferentes espécies carregadas.

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS

Embora numerosas moléculas estejam implicadas na EP e/ou sejam de interesse em suas aplicações (por exemplo, fármacos, material genético, corantes, etc.), poucas foram investigadas em simulações de MD. Além de poucos estudos em que o *flip-flop* lipídico mediado por eletroporos de lipídios zwitteriônicos de PC [106-108] foram relatados, a maioria das simulações tratava de espécies carregadas para as quais o transporte envolvia eletroforese [21,77,109]. A seguir, discutimos os resultados obtidos usando os dois protocolos de simulação.

nsPEFs

nsPEFs podem induzir a externalização da fosfatidilserina (PS), um fosfolipídio geralmente confinado ao folheto interno da membrana plasmática que pode desencadear várias funções de reconhecimento, ligação e sinalização. Estudos MD de bicamadas de PS [19,110] mostraram como a externalização de PS é um evento mediado por poros ocorrendo exclusivamente com um desvio eletroforético.

Uma década atrás, Tarek [21] relatou a primeira simulação MD no transporte de uma fita dupla curta de DNA usando campos elétricos de alta intensidade. Foi demonstrado que a captação ocorreu apenas na presença do poro por deriva eletroforética. Desde então, até onde sabemos, apenas dois estudos MD foram relatados sobre o transporte de moléculas sob nsPEFs. Em 2012, Breton *et al.* [77] mostraram que um único pulso elétrico de alta voltagem de 10 ns pode permeabilizar vesículas unilamelares gigantes (GUVs) e permite a entrega de um siRNA de fita dupla (carga $-42e$, 13,89 kDa) através do poro formado, por eletroforese (Fig. 7 [77]). Comparando evidências experimentais com simulações MD, eles puderam mostrar, em particular, que: (i) após a aplicação de um campo elétrico, o siRNA é empurrado em direção aos grupos cabeça lipídicos, formando um complexo de grupos cabeça de siRNA-fosfolipídios que permanece estável mesmo quando o pulso é desligado; (ii) nenhum transporte é detectado para campos elétricos aplicados abaixo do limite de EP; (iii) quando o E_{app} está acima do limiar de EP (E_{th}), o siRNA é eletroforicamente puxado através do eletroporo e translocado em uma escala de tempo de 10 ns; (iv) se o E_{th} for desligado antes da transição completa, o poro colapsa em torno da molécula que fica, conseqüentemente, presa.

Recentemente, Salomone *et al.* [109] usaram uma combinação de nsPEFs e peptídeos quiméricos (CM18-Tat11) como vetores de entrega eficientes para DNA plasmidial usando vesículas endocitóticas. Para fornecer detalhes moleculares sobre os processos que ocorrem, os autores modelaram o peptídeo e seus fragmentos. Eles relataram a partir de simulações MD que, quando sujeito a campos elétricos elevados, Tat11, um pequeno peptídeo catiônico (resíduos 47-57 da proteína Tat do HIV-1; carga $+8e$, 1,50 kDa) pode se translocar através de uma bicamada eletroporada em poucos nanossegundos sem interagir com os grupos cabeça de fosfolipídios. Em contraste, o peptídeo anfipático CM18, mesmo quando localizado próximo a um poro pré-formado, permanece ancorado aos grupos cabeça de lipídeos e não se transloca durante um pulso de campo elétrico alto de 12 ns.

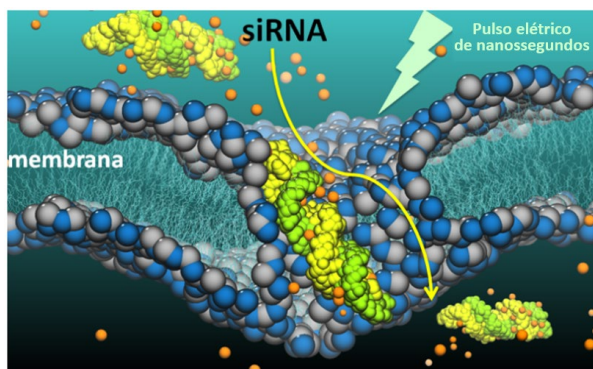


Figura 7: Um único pulso elétrico de alta voltagem de 10 ns pode permeabilizar vesículas lipídicas e permitir a entrega de siRNA ao citoplasma. A combinação de experimentos e simulações de dinâmica molecular nos permitiu fornecer os mecanismos moleculares detalhados de tal transporte e dar orientação prática para o desenho de protocolos que visam o uso de pulsos elétricos de nanossegundos para a entrega de siRNA em aplicações médicas e biotecnológicas [77].

μ s-msPEFs

Apresentamos a seguir os resultados mais recentes de simulações MD da captação de moléculas por bicamadas de lipídios sujeitas a μ s-msPEFs. Focamos nossa atenção no Tat11 e na fita dupla do siRNA para comparar seu mecanismo de transporte ao relato que utilizou nsPEFs [77,109]. Esses dados foram relatados em [111].

Transporte de siRNA

Em 2011, Paganin-Gioanni *et al.* [76] investigaram a captação de siRNA por células de melanoma murino quando submetidas a pulsos elétricos (1 Hz de frequência de repetição) usando microscopia confocal de fluorescência de lapso de tempo. Uma transferência direta do siRNA carregado negativamente para o citoplasma da célula foi observada através da membrana plasmática exclusivamente no lado voltado para o cátodo. Observando que, quando adicionado após a eletropulsão, o siRNA foi ineficiente para o silenciamento gênico por não penetrar na célula, os autores concluíram que o transporte do siRNA ocorre durante o pulso elétrico e se deve à eletroforese através de eletroporos. O mesmo grupo relatou ainda que os pulsos de 0,17 kV/cm - 5 ms, chamados de pulso para eletrogeneterapia (EGT), são mais eficazes em termos de silenciamento do que os pulsos de HV mais intensos e menos duradouros (1,3 kV/cm - 0,1

ms). Eles mostraram, por outro lado, que um procedimento de pulso duplo, consistindo em um HV seguido por um pulso longo abaixo do limiar de EP, não aumenta a eficiência da entrega. Juntas, suas evidências sugerem que, para msPEFs, os fatores-chave para uma entrega eficiente são a voltagem acima do limiar de EP e a duração do pulso.

A fim de investigar a transferência de siRNA para as células em condições semelhantes aos experimentos μ s-msPEFs, realizamos um conjunto de simulações onde o sistema foi sujeito a várias voltagens (ver Tabela 1). Primeiro, eletroporamos um folheto de bicamada, submetendo-o a um desequilíbrio de alta carga. Uma vez que o poro era grande o suficiente (valor arbitrário ~ 2 nm de raio), diminuimos ΔQ s para estabilizá-lo em raios diferentes como em [101]. Essas configurações foram então usadas para iniciar as simulações com siRNA colocado próximo à “boca” dos poros e continuadas na voltagem desejada.

Tabela 1. Raio dos poros (R) e tempo de cruzamento t_c estimado em voltagens TM específicas (U_m) para as duas moléculas consideradas. O raio do poro (diâmetro) é estimado como a distância mínima de lipídio a lipídio ao longo do lúmen do poro

Sistema	t_s (ns)	U_m (V)	R (nm)	t_c (ns)
POPC_1024+siRNA	100	0.16 ± 0.16	2.0 ± 0.6	> 100
	35	0.55 ± 0.19	3.3 ± 0.2	32.5
POPC_1024+Tat11	40	0.43 ± 0.16	1.6 ± 0.2	32.8
	14	0.70 ± 0.24	2.0 ± 0.1	11.3

t_s – tempo de simulação; U_m – voltagem transmembranar criada pelo desequilíbrio de carga; R – raio mínimo do poro, mantido em um dado U_m (ver material suplementar); t_c – tempo de cruzamento da molécula através do eletroporo.

Para a execução com voltagens transmembranares mais baixas U_m , o siRNA aproximou-se da boca do poro grande (~ 4 nm de diâmetro), em seguida, começou a deslizar através dele enquanto interagia com os grupos cabeça de lipídeos que o revestiam. A translocação completa do siRNA não ocorreu, no entanto, nos primeiros 100 ns da execução. Em uma execução completamente independente, repetimos a simulação mantendo uma voltagem mais alta, ou seja, 0,55 V. A aproximação do siRNA, entrada nos poros e deslizamento nessas condições (Fig. 7) foram semelhantes à execução da voltagem mais baixa. No entanto, com 0,55 V, apesar de sua ancoragem aos grupos cabeça de lipídios, uma translocação completa do banho superior para o inferior ocorreu em ~ 30 ns. Dois fatores provavelmente contribuíram para essa aceleração. Em comparação com as condições anteriores, não apenas a força eletroforética que puxa o siRNA é

de fato maior, mas o tamanho dos poros também aumenta sob essa voltagem mais alta.

Em conjunto, as simulações que mimetizam experimentos de μ s-msPEFs demonstram que a translocação de siRNA através do poro induzida pela aplicação de voltagens TM acima de 0,5 V, ocorre na escala de tempo de nanossegundos, conforme relatado para os nsPEFs. Notavelmente, em ambas as simulações realizadas sob o campo elétrico ou sob o desequilíbrio de carga, o siRNA permanece ancorado ao folheto inferior da membrana após a translocação, sem difundir na solução, mesmo que a voltagem seja mantida.

Experimentos realizados em células de melanoma de camundongo aplicando pulsos de comprimento de milissegundos evidenciaram que ajustar a duração do pulso é essencial para uma captação de siRNA eficiente. De fato, os autores acharam mais eficaz a classe de pulsos EGT (0,17 kV / cm, 5 ms) do que a classe HV (1,3 kV / cm, 0,1 ms). Nenhuma medição direta da voltagem TM foi realizada durante esses experimentos e os autores assumem que ela está em torno de 0,25 V, uma vez que foi observado que o valor do limiar de EP é sempre em torno de 0,20 mV para muitos sistemas celulares diferentes [112]. Corroborado por nossos achados, pode-se especular que o transporte de siRNA, quando sujeito a pulsos mais longos, poderia ser facilitado pela formação de uma população de poros com diâmetros maiores. Essa população de poros maiores permitiria que os siRNAs fluíssem através dos poros e acessassem diretamente o citoplasma, aumentando a eficiência de transporte.

Transporte de Tat11

A translocação de Tat11 difere do siRNA altamente carregado porque nenhuma interação específica entre este peptídeo e os grupos cabeça de lipídios ocorre durante o processo, resultando em uma absorção mais rápida. Sob uma voltagem TM $U_m \sim 0,70$ V, a molécula, inicialmente paralela à membrana e localizada perto da abertura do poro, primeiro gira para alinhar seu dipolo ao longo do campo elétrico local (Fig. 10, $t = 0$ ns), então deriva através do centro do poro com raio de 2 nm (Fig. 10, $t = 8$ ns), na mesma escala de tempo relatada pelo procedimento nsPEFs [109]. O Tat11 atinge o banho inferior onde se difunde livremente (Fig. 8, $t = 12$ ns). Em U_m inferior ($\sim 0,43$ V) Tat11 transloca em 32,8 ns (ver Tabela 1), presumivelmente como consequência de um maior impedimento do poro (o raio do poro diminui para 0,4 nm) e de uma redução do arraste eletroforético.

Considerando um folheto de 256 lipídios e aplicando um campo elétrico que gera 1,6 V através da bicamada, Salomone *et al.* [109] relataram que

Tat11 se transloca através de um eletroporo num intervalo de 10 ns. Isso parece inconsistente com nossos resultados, uma vez que se deve esperar que, em nossas condições (ou seja, sujeito a uma voltagem U_m de $\sim 0,43$ V), o tempo necessário para o transporte de Tat11 seria muito mais longo. Na verdade, se considerarmos apenas a proporção da eletroforese, a translocação de Tat11 deve ser três vezes mais lenta na voltagem mais baixa. Além disso, uma segunda inconsistência diz respeito aos tamanhos dos poros criados. De fato, em [109] o poro criado tem um raio de $\sim 1,7$ nm, muito menor do que o esperado em nossos resultados: geramos um poro de raio de $\sim 1,6$ nm sob $U_m \sim 0,43$ V (Tabela 1). Recentemente, relatamos efeitos de tamanho em simulações de eletroporação de bicamadas lipídicas e mostramos especificamente que folhetos de 256 lipídios são muito pequenos para estudar a eletroporação: Os poros gerados em simulações MD usando tais retalhos são muito menores do que aqueles gerados usando patches maiores (1024 lipídios).

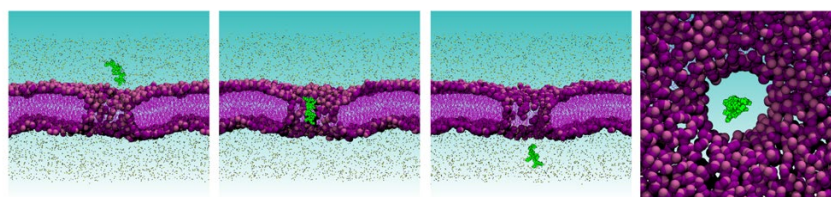


Figura 8: O processo de transporte de Tat11 em três quadros correspondentes a 0, 8 e 12 ns. No painel direito, a vista superior mostra claramente que não há interações entre a molécula e as paredes dos poros. Os grupos cabeça POPC são mostrados como bolas lilases e roxas, as caudas como linhas roxas; os íons sódio e cloreto são coloridos em amarelo e cinza, respectivamente; Tat11 é verde (adaptado de [111]).

Apesar dessas discrepâncias, é muito interessante notar que, tanto ao aplicar um campo elétrico quanto ao desequilíbrio de carga, a translocação de uma pequena molécula carregada como a Tat11 ocorre na escala de dezenas de nanossegundos.

Discussão e perspectivas

Um objetivo atual em melhorar nossa compreensão de EP é o desenvolvimento de uma descrição microscópica abrangente do fenômeno, o que não é uma tarefa fácil devido as dimensões em nanoescala do eletroporo lipídico e a curta escala de tempo (nanossegundos) de criação

dos poros, que apresentam desafios para observações experimentais diretas. Por essas razões, as simulações de dinâmica molecular tornaram-se extremamente importantes para estudar EP em detalhes atômicos. Na última década, um grande número de simulações de MD foram conduzidas a fim de modelar o efeito dos campos elétricos nas membranas, fornecendo talvez o modelo molecular mais completo do processo EP em bicamadas lipídicas.

Nossa investigação da eletrotransferência de pequenas moléculas carregadas, siRNA (-42e) e Tat11 (+8e) por meio de um modelo de membrana celular sujeito a campos elétricos de pulso de microssegundos (μ s-msPEFs), forneceu um novo *insight*. Com voltagens transmembranares de algumas centenas de milivolts, relatamos para siRNA uma translocação completa, de um lado da bicamada para o outro, dentro de várias dezenas de nanossegundos, apesar de sua forte ancoragem com os grupos cabeça de fosfolipídios zwitteriônicos. Por outro lado, o Tat11 é transportado (dentro de \sim 10 ns) sem qualquer interação com o poro. Curiosamente, para ambas as moléculas, descobrimos que o processo de transporte ocorre na mesma escala de tempo (nanossegundos) que pulsos muito mais curtos (nsPEFs) que relatamos anteriormente. É importante lembrar que experimentos são realizados em células, enquanto nossa investigação diz respeito a bicamadas lipídicas. Nas células, deve-se também considerar o citoesqueleto e possíveis interações com moléculas como siRNAs, por exemplo, em seu caminho para o citoplasma, retardando o processo de translocação.

Em resumo, projetamos protocolos MD adequados para a caracterização do transporte de espécies carregadas e descarregadas conduzidas por μ s-msPEFs que podem ajudar a esclarecer o mecanismo de captação de fármacos pelas membranas celulares. Os estudos sistemáticos realizados com este protocolo na presença de outras drogas relevantes (por exemplo, bleomicina) ou corantes (por exemplo, iodeto de propídio, YO-PRO, etc.) devem ampliar drasticamente nossa compreensão do mecanismo de absorção, e assim, fornecer mais informações que podem levar a melhorias em técnicas experimentais relacionadas e eficácia terapêutica.

Vale a pena mencionar outro aspecto que também precisa ser considerado quando se estuda o efeito do campo elétrico nas células. Foi sugerido há mais de uma década que as membranas podem ser oxidadas por eletroporação. Evidências experimentais relatam que, de fato, os campos elétricos pulsados podem aumentar a extensão em que ocorre a peroxidação da cadeia de acila lipídica. Em particular, foi demonstrado que a aplicação de campos elétricos externos altera a composição fosfolipídica e as propriedades dos lipossomas, vesículas e células [113-119]. A presença de lipídios oxidados dentro das biomembranas é conhecida por modificar suas propriedades físicas e, em particular, sua permeabilidade [120-123]. Não podemos, portanto, excluir que a captação de moléculas em experimentos

de PEFs pode estar, pelo menos parcialmente, ocorrendo através da difusão através de bicamadas lipídicas oxidadas/permeabilizadas e não exclusivamente através de eletroporos. Simulações ao longo dessas questões devem melhorar nossa caracterização do eletrotransporte de moléculas através de membranas impulsionadas por campos elétricos.

Referências

- [1] N. Eberhard, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, *Electroporation and electrofusion in cell biology*. New York: Plenum Press, 1989.
- [2] J. A. Nickoloff, *Animal cell electroporation and electrofusion protocols*, vol. 48. Totowa, NJ: Humana Press, 1995.
- [3] S. Li, *Electroporation protocols: preclinical and clinical gene medicine*, vol. 423. Totowa, NJ.: Humana press, 2008.
- [4] R. B. Gennis, *Biomembranes: molecular structure and function*. Heidelberg: Springer Verlag, 1989.
- [5] I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko, and M. P. Tarasevich, "Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 104, no. C, pp. 37–52, 1979.
- [6] R. Benz, F. Beckers, and U. Zimmerman, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes - Charge-pulse relaxation study," *J. Membr. Biol.*, vol. 48, pp. 181–204, 1979.
- [7] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, no. 2. Elsevier Science S.A., pp. 135–160, 1996.
- [8] J. C. Weaver, "Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 10, pp. 754–768, 2003.
- [9] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, and J. A. Evans, "Membrane electroporation theories: A review," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 44, no. 1–2. pp. 5–14, 2006.
- [10] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valic, and D. Miklavcic, "Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, pp. 642–652, 2006.
- [11] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, and T. J., "Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells," *Biophys. J.*, vol. 95, pp. 2837–2848, 2008.
- [12] D. C. Chang, "Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy," in *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Orlando, Florida: Academic Press, 1992, pp. 9–27.
- [13] D. P. Tieleman, S.-J. Marrink, and H. J. C. Berendsen, "A Computer Perspective of Membranes: Molecular Dynamics Studies of Lipid Bilayer

- Systems,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1331, no. 3, pp. 235–270, 1997.
- [14] D. J. Tobias, K. Tu, and M. L. Klein, “Assessment of all-atom potentials for modeling membranes: Molecular dynamics simulations of solid and liquid alkanes and crystals of phospholipid fragments,” *J. Chim. Phys.*, vol. 94, pp. 1482–1502, 1997.
- [15] L. R. Forrest and M. S. P. Sansom, “Membrane simulations: bigger and better,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 10, pp. 174–181, 2000.
- [16] S. E. Feller, “Molecular dynamics simulations of lipid bilayers,” *Curr. Opin. Coll. In.*, vol. 5, pp. 217–223, 2000.
- [17] C. Chipot, M. L. Klein, M. Tarek, and S. Yip, “Modeling lipid membranes,” in *Handbook of Materials Modeling*, S. Yip, Ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2005, pp. 929–958.
- [18] S. J. Marrink, A. H. de Vries, and D. P. Tieleman, “Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves,” *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, vol. 1788, pp. 149–168, 2009.
- [19] Q. Hu, S. Viswanadham, R. P. Joshi, K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, and P. F. Blackmore, “Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 71, no. 3, p. 31914, 2005.
- [20] D. P. Tieleman, “The molecular basis of electroporation,” *BMC Biochem.*, vol. 5, no. 1, p. 10, Jan. 2004.
- [21] M. Tarek, “Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 6, pp. 4045–4053, 2005.
- [22] R. A. Böckmann, B. L. de Groot, S. Kakorin, E. Neumann, and H. Grubmüller, “Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, pp. 1837–1850, 2008.
- [23] M. J. Ziegler and P. T. Vernier, “Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, pp. 13588–13596, 2008.
- [24] M. P. Allen and D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- [25] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, Second Edi. Prentice Hall, 2001.
- [26] L. D. Schuler, X. Daura, and W. F. van Gunsteren, “An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase,” *J. Comp. Chem.*, vol. 22, pp. 1205–1218, 2001.
- [27] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, “All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, pp. 3586–3616, 1998.
- [28] D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. L. Cheng, J. J.

- Vincent, M. Crowley, V. Tsui, R. J. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G. L. Seibel, and U. C. Singh, *AMBER6*. San Francisco: University of California, 1999.
- [29] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. and Mackerell, "CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-Like Molecules Compatible With the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields," *J. Comp. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010.
- [30] A. Warshel, M. Kato, and A. V Pisliakov, "Polarizable force fields: history, test cases, and prospects," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, pp. 2034–2045, 2007.
- [31] T. A. Halgren and W. Damm, "Polarizable force fields," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, pp. 236–242, 2001.
- [32] E. Lindahl and O. Edholm, "Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations," *Biophys. J.*, vol. 79, pp. 426–433, 2000.
- [33] S. J. Marrink and A. E. Mark, "Effect of undulations on surface tension in simulated bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, pp. 6122–6127, 2001.
- [34] S. W. Chiu, M. Clark, E. Jakobsson, S. Subramaniam, and H. L. Scott, "Optimization of hydrocarbon chain interaction parameters: Application to the simulation of fluid phase lipid bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, pp. 6323–6327, 1999.
- [35] T. Rög, K. Murzyn, and M. Pasenkiewicz-Gierula, "The dynamics of water at the phospholipid bilayer: A molecular dynamics study," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 352, pp. 323–327, 2002.
- [36] L. Saiz and M. L. Klein, "Computer simulation studies of model biological membranes," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, pp. 482–489, 2002.
- [37] S. E. Feller, K. Gawrisch, and A. D. MacKerell, "Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, pp. 318–326, 2002.
- [38] M. L. Berkowitz and M. J. Raghavan, "Computer simulation of a water/membrane interface," *Langmuir*, vol. 7, pp. 1042–1044, 1991.
- [39] K. V Damodaran and K. M. Merz, "A comparison of dmpe and dlpe based lipid bilayers," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 1076–1087, 1994.
- [40] J. J. L. Cascales, J. G. a de la Torre, S. J. Marrink, and H. J. C. Berendsen, "Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane," *J. Chem. Phys.*, vol. 104, pp. 2713–2720, 1996.
- [41] P. Mukhopadhyay, L. Monticelli, and D. P. Tieleman, "Molecular dynamics simulation of a palmitoyl-oleoyl phosphatidylserine bilayer with Na⁺ Counterions and NaCl," *Biophys. J.*, vol. 86, pp. 1601–1609, 2004.
- [42] S. W. Chiu, S. Vasudevan, E. Jakobsson, R. J. Mashl, and H. L. Scott, "Structure of sphingomyelin bilayers: A simulation study," *Biophys. J.*, vol. 85, pp. 3624–3635, 2003.
- [43] A. S. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz, "Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl," *Biophys.*

- J.*, vol. 84, pp. 3743–3750, 2003.
- [44] R. Y. Patel and P. V Balaji, “Characterization of symmetric and asymmetric lipid bilayers composed of varying concentrations of ganglioside GM1 and DPPC,” *J. Phys Chem. B*, vol. 112, pp. 3346–3356, 2008.
- [45] M. Dahlberg and A. Maliniak, “Molecular dynamics simulations of cardiolipin bilayers,” *J. Phys Chem. B*, vol. 112, pp. 11655–11663, 2008.
- [46] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, “Effect of NaCl and KCl on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipid membranes: Insight from atomic-scale simulations for understanding salt-induced effects in the plasma membrane,” *J. Phys Chem. B*, vol. 112, pp. 1953–1962, 2008.
- [47] R. Vacha, M. L. Berkowitz, and P. Jungwirth, “Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: Water permeation and ion effects,” *Biophys J*, vol. 96, pp. 4493–4501, 2009.
- [48] T. Rog, H. Martinez-Seara, N. Munck, M. Oresic, M. Karttunen, and I. Vattulainen, “Role of cardiolipins in the inner mitochondrial membrane: Insight gained through atom-scale simulations,” *J. Phys Chem. B*, vol. 113, pp. 3413–3422, 2009.
- [49] Z. Li, R. M. Venable, L. A. Rogers, D. Murray, and R. W. Pastor, “Molecular dynamics simulations of PIP2 and PIP3 in lipid bilayers: Determination of ring orientation, and the effects of surface roughness on a poisson-boltzmann description,” *Biophys J*, vol. 97, pp. 155–163, 2009.
- [50] M. Tarek, D. J. Tobias, S. H. Chen, and M. L. Klein, “Short wavelength collective dynamics in phospholipid bilayers: a molecular dynamics study,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, p. 238101, 2001.
- [51] C. Anézo, A. H. de Vries, H. D. Höltje, D. P. Tieleman, and S. J. Marrink, “Methodological issues in lipid bilayer simulations,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, pp. 9424–9433, 2003.
- [52] S. J. Beebe and K. H. Schoenbach, “Nanosecond pulsed electric fields: A new stimulus to activate intracellular signaling,” *J. Biomed. Biotech.*, vol. 4, pp. 297–300, 2005.
- [53] Z. Vasilkoski, A. T. Esser, T. R. Gowrishankar, and J. C. Weaver, “Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 74, no. 2, 2006.
- [54] R. Sundararajan, “Nanosecond electroporation: another look,” *Mol. Biotech.*, vol. 41, pp. 69–82, 2009.
- [55] J. Deng, K. H. Schoenbach, E. Stephen Buescher, P. S. Hair, P. M. Fox, and S. J. Beebe, “The Effects of Intense Submicrosecond Electrical Pulses on Cells,” *Biophys. J.*, vol. 84, no. 4, pp. 2709–2714, Apr. 2003.
- [56] H. Pauly and H. P. Schwan, “Über Die Impedanz Einer Suspension Von Kugelformigen Teilchen Mit Einer Schale - Ein Modell Für Das Dielektrische Verhalten Von Zellsuspensionen Und Von Proteinlösungen,” *Z Naturforsch B*, vol. 14, no. 2, pp. 125–131, 1959.
- [57] T. Kotnik, D. Miklavcic, and T. Slivnik, “Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields - a method for theoretical analysis and its application,” *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 45, no. 1, pp. 3–16, 1998.

- [58] T. Kotnik and D. Miklavcic, "Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields," *Biophys J*, vol. 90, no. 2, pp. 480–491, 2006.
- [59] Q. Zhong, Q. Jiang, P. B. Moore, D. M. Newns, and M. L. Klein, "Molecular dynamics simulation of a synthetic ion channel," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 3–10, 1998.
- [60] Y. Yang, D. Henderson, P. Crozier, R. L. Rowley, and D. D. Busath, "Permeation of ions through a model biological channel: effect of periodic boundary condition and cell size.," *Molec. Phys*, vol. 100, pp. 3011–3019, 2002.
- [61] D. P. Tieleman, J. H. C. Berendsen, and M. S. P. Sansom, "Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane water interfaces.," *Biophys. J.*, vol. 80, pp. 331–346, 2001.
- [62] P. S. Crozier, D. Henderson, R. L. Rowley, and D. D. Busath, "Model channel ion currents in NaCl extended simple point charge water solution with applied-field molecular dynamics," *Biophys. J.*, vol. 81, pp. 3077–3089, 2001.
- [63] B. Roux, "The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations," *Biophys J*, vol. 95, pp. 4205–4216, 2008.
- [64] P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, W. V Chang, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman, "Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 19, pp. 6288–6289, 2006.
- [65] W. Treptow, B. Maigret, C. Chipot, and M. Tarek, "Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: a model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel.," *Biophys. J.*, vol. 87, pp. 2365–2379, 2004.
- [66] A. Aksimentiev and K. Schulten, "Imaging a-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map," *Biophys. J.*, vol. 88, pp. 3745–3761, 2005.
- [67] F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten, "Dynamics of K⁺ ion conduction through Kv1.2.," *Biophys. J.*, vol. 91, pp. L72–L74, 2006.
- [68] M. Sotomayor, V. Vasquez, E. Perozo, and K. Schulten, "Ion conduction through MscS as determined by electrophysiology and simulation," *Biophys. J.*, vol. 92, pp. 886–902, 2007.
- [69] C. Chimerele, L. Movileanu, S. Pezeshki, M. Winterhalter, and U. Kleinekathofer, "Transport at the nanoscale: temperature dependence of ion conductance," *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, vol. 38, pp. 121–125, 2008.
- [70] D. J. Tobias, "Electrostatic calculations: recent methodological advances and applications to membranes," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, pp. 253–261, 2001.
- [71] K. Gawrisch, D. Ruston, J. Zimmerberg, V. Parsegian, R. Rand, and N. Fuller, "Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces," *Biophys. J.*, vol. 61, pp. 1213–1223, 1992.
- [72] P. T. Vernier and M. J. Ziegler, "Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 45, pp. 12993–12996, 2007.

- [73] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 27–36, 2010.
- [74] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Calcium and phosphatidylserine inhibit lipid electropore formation and reduce pore lifetime," *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 10, pp. 599–610, 2012.
- [75] M. Golzio, J. Teissie, and M.-P. Rols, "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, pp. 1292–1297, 2002.
- [76] a Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, and M. Golzio, "Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 26, pp. 10443–10447, 2011.
- [77] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, and M. Tarek, "Transport of siRNA through lipid membranes driven by nanosecond electric pulses: an experimental and computational study.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 34, pp. 13938–13941, Aug. 2012.
- [78] J. N. Sachs, P. S. Crozier, and T. B. Woolf, "Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients," *J. Chem. Phys.*, vol. 121, pp. 10847–10851, 2004.
- [79] L. Delemotte, F. Dehez, W. Treptow, and M. Tarek, "Modeling membranes under a transmembrane potential," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 18, pp. 5547–5550, 2008.
- [80] L. Delemotte and M. Tarek, "Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation," *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 9, pp. 531–543, 2012.
- [81] B. Roux, "Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein," *Biophys. J.*, vol. 73, pp. 2980–2989, 1997.
- [82] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, "Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge Imbalance: Atomistic Molecular Dynamics Study," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 50, pp. 17570–17571, 2005.
- [83] S. K. Kandasamy and R. G. Larson, "Cation and anion transport through hydrophilic pores in lipid bilayers," *J. Chem. Phys.*, vol. 125, p. 74901, 2006.
- [84] Kutzner C, Grubmüller H, de Groot BL, and Z. U., "Computational electrophysiology: the molecular dynamics of ion channel permeation and selectivity in atomistic detail," *Biophys J*, vol. 101, pp. 809–817, 2011.
- [85] Y. A. Liberman and V. P. Topaly, "Permeability of biomolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions," *Biophys. USSR*, vol. 14, p. 477, 1969.
- [86] S. J. Marrink, F. Jähnig, and H. J. Berendsen, "Proton transport across transient single-file water pores in a lipid membrane studied by molecular dynamics simulations," *Biophys J.*, vol. 71, pp. 632–647, 1996.
- [87] M.-C. Ho, Z. A. Levine, and P. T. Vernier, "Nanoscale, Electric Field-Driven Water Bridges in Vacuum Gaps and Lipid Bilayers," *J. Membr. Biol.*, vol. 246, no. 11, pp. 793–801, May 2013.
- [88] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: Field-dependent

- and field-independent steps in pore creation and annihilation,” *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 27–36, Jul. 2010.
- [89] W. F. D. Bennett and D. P. Tieleman, “The importance of membrane defects—lessons from simulations.,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 2244–51, 2014.
- [90] U. Pliquett, R. P. Joshi, V. Sridhara, and K. H. Schoenbach, “High electrical field effects on cell membranes.,” *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 275–282, 2007.
- [91] D. P. Tieleman, H. Leontiadou, A. E. Mark, and S. J. Marrink, “Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 21, pp. 6382–6383, 2003.
- [92] S. Koronkiewicz and S. Kalinowski, “Influence of cholesterol on electroporation of bilayer lipid membranes: chronopotentiometric studies,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1661, no. 2, pp. 196–203, Mar. 2004.
- [93] M. Casciola, D. Bonhenry, M. Liberti, F. Apollonio, and M. Tarek, “A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: comparison of electroporation protocols.,” *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 11–17, Dec. 2014.
- [94] S. Kakorin, U. Brinkmann, and E. Neumann, “Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles,” *Biophys. Chem.*, vol. 117, no. 2, pp. 155–171, 2005.
- [95] M. L. Fernández, M. Risk, R. Reigada, and P. T. Vernier, “Size-controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 2, pp. 325–330, 2012.
- [96] A. Polak, D. Bonhenry, F. Dehez, P. Kramar, D. Miklavčič, and M. Tarek, “On the electroporation thresholds of lipid bilayers: molecular dynamics simulation investigations.,” *J. Membr. Biol.*, vol. 246, no. 11, pp. 843–850, Nov. 2013.
- [97] A. Polak, M. Tarek, M. Tomšič, J. Valant, N. P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, and D. Miklavčič, “Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations,” *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 18–26, 2014.
- [98] A. A. Gurtovenko and A. S. Lyulina, “Electroporation of asymmetric phospholipid membranes,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 33, pp. 9909–9918, 2014.
- [99] T. J. Piggot, D. A. Holdbrook, and S. Khalid, “Electroporation of the *E. coli* and *S. aureus* membranes: Molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 45, pp. 13381–13388, 2011.
- [100] F. Dehez, L. Delemotte, P. Kramar, D. Miklavčič, and M. Tarek, “Evidence of conducting hydrophobic nanopores across membranes in response to an electric field,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 13, pp. 6752–6757, 2014.
- [101] M. Casciola, M. A. Kasimova, L. Rems, S. Zullino, F. Apollonio, and M. Tarek, “Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance,” *Bioelectrochemistry*, vol. 109, pp. 108–116, 2016.
- [102] P. Kramar, L. Delemotte, A. Maček Lebar, M. Kotulska, M. Tarek, and D.

- Miklavčič, “Molecular-level characterization of lipid membrane electroporation using linearly rising current,” *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 10, pp. 651–659, Oct. 2012.
- [103] M. C. Ho, M. Casciola, Z. A. Levine, and P. T. Vernier, “Molecular dynamics simulations of ion conductance in field-stabilized nanoscale lipid electropores,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 39, pp. 11633–11640, 2013.
- [104] H. Leontiadou, A. E. Mark, and S.-J. Marrink, “Ion transport across transmembrane pores,” *Biophys. J.*, vol. 92, no. 12, pp. 4209–4215, Jun. 2007.
- [105] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, “Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance,” *Biophys. J.*, vol. 92, no. 6, pp. 1878–1890, 2007.
- [106] A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, “Molecular mechanism for lipid flip-flops,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 48, pp. 13554–13559, 2007.
- [107] A. A. Gurtovenko, J. Anwar, and I. Vattulainen, “Defect-Mediated Trafficking across Cell Membranes: Insights from in Silico Modeling,” 2010.
- [108] V. Sridhara and R. P. Joshi, “Numerical study of lipid translocation driven by nanoporation due to multiple high-intensity, ultrashort electrical pulses,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 3, pp. 902–909, 2014.
- [109] F. Salomone, M. Breton, I. Leray, F. Cardarelli, C. Boccardi, D. Bonhenry, M. Tarek, L. M. Mir, and F. Beltram, “High-yield nontoxic gene transfer through conjugation of the CM 18-Tat11 chimeric peptide with nanosecond electric pulses,” *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 7, pp. 2466–2474, 2014.
- [110] P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman, “Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers- in cells and in silico,” *Phys. Biol.*, vol. 3, pp. 233–247, 2006.
- [111] M. Casciola and M. Tarek, “A molecular insight into the electro-transfer of small molecules through electropores driven by electric fields,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2016.
- [112] J. Teissie and M. P. Rols, “An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell-Membrane Electroporation,” *Biophys. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 409–413, 1993.
- [113] L. C. Benov, P. A. Antonov, and S. R. Ribarov, “Oxidative damage of the membrane-lipids after electroporation,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 13, no. 2, pp. 85–97, Apr. 1994.
- [114] B. Gabriel and J. Teissie, “Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 223, no. 1, pp. 25–33, Jul. 1994.
- [115] M. Maccarrone, M. R. Bladergroen, N. Rosato, and A. F. Agrò, “Role of Lipid Peroxidation in Electroporation-Induced Cell Permeability,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 209, no. 2, pp. 417–425, Apr. 1995.
- [116] M. Maccarrone, N. Rosato, and A. F. Agrò, “Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 206, no. 1, pp. 238–245, Jan. 1995.
- [117] Y. Zhou, C. K. Berry, P. A. Storer, and R. M. Raphael, “Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation,”

- Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1298–1306, Feb. 2007.
- [118] O. N. Pakhomova, V. A. Khorokhorina, A. M. Bowman, R. Rodaitė-Riševičienė, G. Saulis, S. Xiao, and A. G. Pakhomov, “Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 527, no. 1, pp. 55–64, Nov. 2012.
- [119] M. Breton, M. Amirkavei, and L. M. Mir, “Optimization of the Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with Unsaturated Phospholipids.,” *J. Membr. Biol.*, vol. 248, no. 5, pp. 827–835, Oct. 2015.
- [120] P. Jurkiewicz, A. Olżyńska, L. Cwiklik, E. Conte, P. Jungwirth, F. M. Megli, and M. Hof, “Biophysics of Lipid Bilayers Containing Oxidatively Modified Phospholipids: Insights from Fluorescence and EPR Experiments and from MD Simulations,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 10, pp. 2388–2402, 2012.
- [121] P. T. Vernier, Z. A. Levine, Y.-H. Wu, V. Joubert, M. J. Ziegler, L. M. Mir, and D. P. Tieleman, “Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane.,” *PLoS One*, vol. 4, no. 11, p. e7966, Jan. 2009.
- [122] L. Beranova, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof, and P. Jungwirth, “Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations.,” *Langmuir*, vol. 26, no. 9, pp. 6140–6144, May 2010.
- [123] S. Kalghatgi, C. S. Spina, J. C. Costello, M. Liesa, J. R. Morones-Ramirez, S. Slomovic, A. Molina, O. S. Shirihai, and J. J. Collins, “Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 192, p. 192ra85, 2013.

Agradecimentos

As simulações apresentadas neste trabalho tiveram apoio aos recursos de HPC do Centre Informatique National de l’Enseignement Supérieur (CINES) FRANCE. Os autores gostariam de agradecer a discussão muito frutífera e perspicaz com Damijan Miklavcic, Luis Mir e Thomas Vernier. Pesquisa realizada no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA). M.T agradece o apoio da Agence Nationale de la Recherche francesa, sob concessão (ANR-10, BLAN-916-03-INTCELL), e o apoio do subprojeto “Contrat Plan État-Region Lorraine 2015-2020” MatDS.



Mounir Tarek nascido em Rabat-Marrocos. Recebeu um Ph.D. em Física pela Universidade de Paris em 1994. É cientista pesquisador sênior (Directeur de Recherches) no CNRS. Nos últimos anos, ele trabalhou em simulações moleculares de última geração em grande escala de membranas lipídicas e proteínas TM sondando sua estrutura e dinâmica

Capítulo 6

Estresse Elétrico de Membrana em Nano, Multiescala e Permeabilização

P. Thomas Vernier

Centro de Pesquisa em Bioeletricidade Frank Reidy, Universidade Old Dominion, Norfolk, VA, EUA

Introdução

Para utilizar os diversos *efeitos* dos campos elétricos nos sistemas biológicos, devemos compreender as *causas*. Em particular, queremos saber os detalhes das *interações* entre campos elétricos e estruturas biomoleculares. Observando escalas de tempo muito curtas (nanossegundos) e eventos únicos (estímulos não repetitivos), reduzimos o número de distúrbios em grande escala e nos concentramos em perturbações reversíveis. A análise é principalmente no domínio do tempo, mas o conteúdo espectral de pulso pode ser importante para algumas aplicações.

Claro, alguns *efeitos* importantes da eletropulsão podem ser consequência de processos irreversíveis impulsionados por exposições de campo elétrico mais longas (microssegundos, milissegundos). Os estudos de pulso curto podem ajudar a dissecar esses processos.

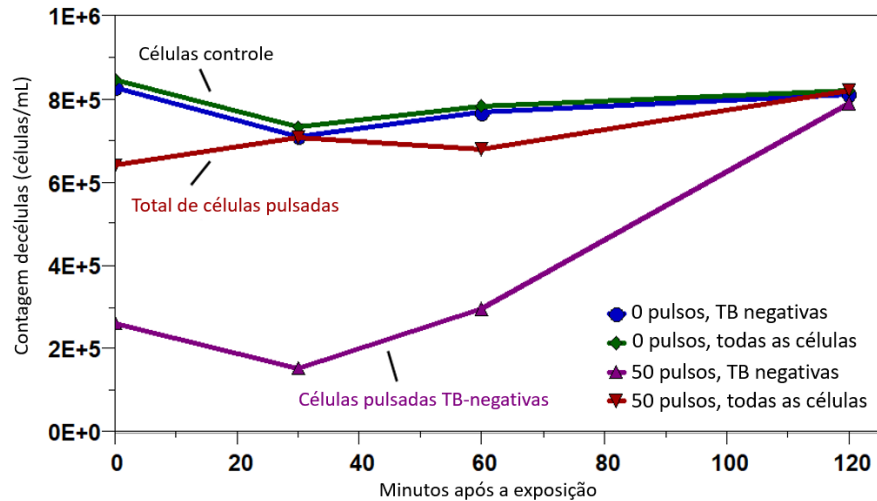


Figura 1. Linfoblastos T Jurkat nanoeletropulsados se recuperam ao longo de 2 horas a partir da permeabilização inicial com azul de Tripan (TB) após exposição à pulsos de 50, 20 ns, 4 MV/m a 20 Hz.

Embora a modelagem seja necessariamente um componente significativo das investigações bioelétricas, observações experimentais são fundamentais, e para conduzir experimentos bioelétricos de **nanossegundos**, deve-se ser capaz de gerar e monitorar, com precisão, os estímulos elétricos apropriados, um desafio não trivial da engenharia. Discutiremos causa e efeito aqui, a partir de **perspectivas científicas e da engenharia**, usando dados de experimentos e simulações. É comum na engenharia elétrica, e cada vez mais na biologia, atacar um problema com uma combinação de modelagem e ferramentas experimentais. Na bioelétrica de nanossegundos, observações (*in vitro* e *in vivo*) dão origem a modelos (moleculares e contínuos), que conduzem experimentos, que ajustam e calibram os modelos, os quais retroalimentam para validação empírica. Este ciclo de *feedback* concentra as investigações em um espaço muito grande de parâmetros nas faixas críticas de valores para as variáveis chave.

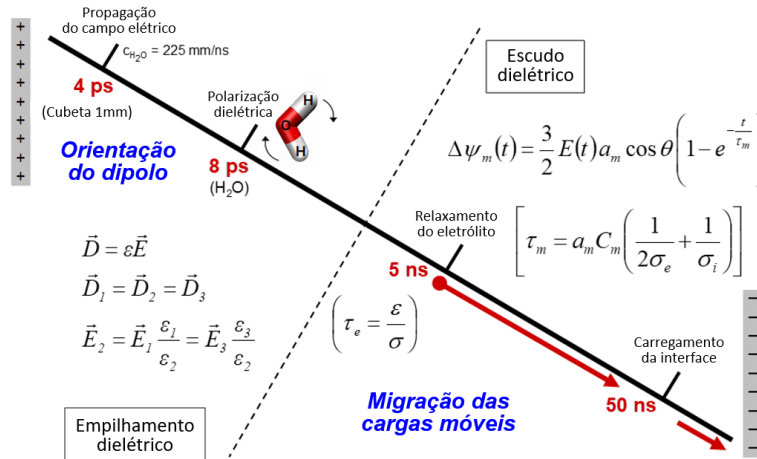


Figura 2. Linha do tempo representando a sequência de eventos após a polarização elétrica de um tecido biológico ou suspensão aquosa de células. As propriedades dielétricas do sistema são importantes no regime de subnanossegundos. Para tempos mais longos, a distribuição de campos e potenciais é dominada pela migração de espécies carregadas.

Bioelétrica de nanossegundos

Da teoria de longa data que modela a célula como uma camada dielétrica [1-4] veio a noção de que pulsos elétricos de submicrosegundos poderiam "contornar" a membrana celular, depositando a maior parte de sua energia dentro da célula, em vez de na membrana plasmática, o alvo primário de pulsos mais longos. Essa ideia foi investigada experimentalmente no final da década de 1990 e aparentemente confirmada [5-6]. Mesmo que um relato inicial indicasse que a quebra condutiva de membranas mediada por campo elétrico pode ocorrer em tão pouco tempo quanto 10 ns [7], e uma análise teórica que demonstrou que pulsos com amplitudes de campo maiores do que cerca de 1 MV/m produzem potenciais transmembranares porativos dentro de cerca de 2 ns [8], e um modelo bem fundamentado que previu "poração em todos os lugares" no regime de nanossegundos [9], os procedimentos usados para detectar a eletroporação da membrana plasmática (e a perda de integridade da membrana em geral) produziram resultados negativos para pulsos com durações menores que a constante de tempo de carregamento de uma célula pequena em meio típico (<100 ns).

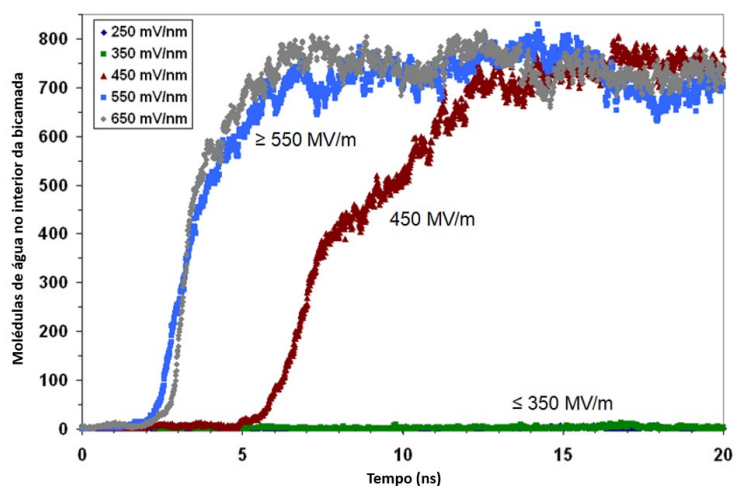


Figura 3. Intrusão de água mediada por campo elétrico em uma simulação de bicamada lipídica.

Além de destacar as limitações dos métodos experimentais tradicionais para a observação da permeabilização da membrana, essa aparente discrepância entre o modelo e a observação aponta também para inadequações no próprio modelo de camada dielétrica, em escalas de tempo abaixo do tempo de carregamento da membrana (célula). Os efeitos de frequências mais altas associados às propriedades dielétricas de meios aquosos de alta permissividade e membranas biológicas de baixa permissividade [10-13] são insignificantes para as condições de eletropermeabilização que são mais comumente estudadas (pulsos de μs , kV/m), mas para pulsos de nanossegundos eles não podem ser ignorados.

Diversas linhas de evidências experimentais indicam que pulsos elétricos de nanossegundos causam mudanças na integridade e organização da membrana celular.

Permeabilização de azul de Tripan. Embora permanecendo negativas para propídio, o volume de células Jurkat T expostas a uma série de pulsos de 50, 20 ns, 4 MV/m aumenta à medida que as células se tornam permeáveis ao azul de Tripan (TB) (Figura 1). Com o aumento do tempo após a exposição ao pulso, essas células fracamente positivas para TB tornam-se novamente impermeáveis à TB. Observações semelhantes foram relatadas para células de melanoma murino B16 expostas a pulsos de subnanossegundos (800 ps) em campos muito altos [14].

Potenciais transmembranares de poração de nanossegundos. A imagem de fluorescência com um corante sensível ao potencial de membrana indica que os potenciais transmembranares porativos são gerados durante a exposição à nanoeletropulsos [15].

Externalização de PS induzida por nanoeletropulso. A perda de assimetria na distribuição de fosfolipídios da membrana resultante da externalização da fosfatidilserina (PS) ocorre imediatamente após a exposição ao nanoeletropulso [16], consistente com a reorganização da membrana conduzida diretamente por campos elétricos de duração de nanossegundos e um mecanismo no qual poros de diâmetro nanométrico fornecem um caminho de baixa energia para a difusão eletroforicamente facilitada de PS do folheto citoplasmático da membrana plasmática para a face externa da célula [8].

Simulações conectam externalização de PS e nanoporação. Em simulações de dinâmica molecular (MD) de eletroporação, poros hidrofílicos surgem dentro de alguns nanossegundos [17], e PS migra eletroforicamente ao longo das paredes dos poros para o lado voltado para o ânodo da membrana [18-19], uma replicação *in silico* de observações experimentais realizadas em células vivas [20].

Nanoeletropermeabilização. A primeira evidência direta de nanoeletropermeabilização foi obtida monitorando o influxo de YO-PRO-1 (YPI) [21], um indicador mais sensível de permeabilização de membrana do que o propídio (PPD) [22]. Evidências diretas adicionais vêm de experimentos de *patch clamp*, que revelam aumentos de longa duração na condutância da membrana após a exposição a pulsos de 60 ns [23-25].

Ativação de células eletricamente excitáveis com pulsos de nanossegundos. As células eletricamente excitáveis fornecem um ambiente altamente responsivo para a biologia do nanoeletropulsos. Células adrenais cromafins [26] e cardiomiócitos [27] reagem fortemente a um único pulso de 4 ns, e a fibra muscular demonstrou responder a um estímulo de 1 ns [28].

Bioelétrica de nanossegundos e o modelo de empilhamento dielétrico. A Figura 2 representa uma linha do tempo de eventos em uma suspensão aquosa de células vivas e eletrólitos entre dois eletrodos após a aplicação de um pulso elétrico. Os dipolos de água se reorientam em um intervalo de cerca de 8 ps. O campo também altera o equilíbrio eletrodifusivo entre as espécies carregadas e suas águas hidratantes, com uma constante de tempo que varia de 0,5 a 7 ns, dependendo das propriedades do meio. Pulsos mais curtos do que o tempo de relaxamento do eletrólito não geram (a menos que o campo seja muito alto) carga interfacial suficiente para produzir potenciais transmembranares porativos. O modelo de camada dielétrica neste regime pode ser substituído por um modelo de empilhamento

dielétrico mais simples, em que o campo elétrico local depende apenas do campo elétrico externo (aplicado) e da permissividade dielétrica de cada componente do sistema.

Nanoeleetropermeabilização e modelos contínuos. As simulações MD atualmente fornecem as únicas janelas em escala molecular disponíveis na formação de eletroporos em bicamadas lipídicas. Os modelos atuais funcionam razoavelmente bem, mas as simulações de eletroporação ainda contêm muitas suposições e simplificações. Para validar esses modelos, procuramos interseções entre conjuntos moleculares de todos os átomos, representações contínuas de suspensões celulares e tecidos, e observações experimentais de células e organismos inteiros. Por exemplo, um modelo contínuo destacado assume uma relação exponencial entre o potencial transmembranar e vários índices de formação de eletroporos [29]. Os resultados de MD na Figura 3, mostrando a intrusão de água no interior da membrana em função do campo elétrico aplicado, demonstram qualitativamente essa mesma relação não linear entre campo e poração. O desafio é alcançar uma congruência quantitativa dos coeficientes.

Experimentos de modelos de nanossegundos

Experimentos e modelos moleculares de permeabilização de membranas. A Figura 4 mostra uma resposta simples e direta das células à exposição ao pulso — dilatação [25,30,31]. A eletropermeabilização da membrana celular resulta em um desequilíbrio osmótico que é combatido pelo influxo de água na célula e um aumento no volume celular. Este fenômeno, iniciado por interações eletrofísicas com constituintes celulares básicos — íons, água e fosfolipídios — em uma escala de tempo muito mais curta (alguns nanossegundos) do que normalmente considerado por eletrofisiologistas e biólogos celulares, fornece uma conexão simples, direta e bem definida entre simulações e sistemas experimentais. Ao correlacionar a cinética observada de permeabilização e dilatação com as taxas de formação de poros e transporte de íons e água obtidas a partir de simulações moleculares e representações contínuas, estamos melhorando a precisão e aplicabilidade dos modelos

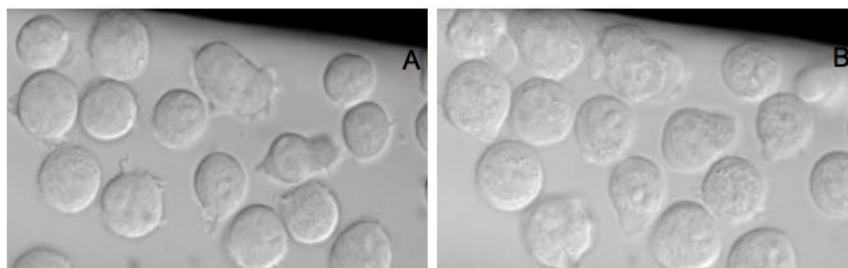


Figura 4. Imagens de contraste de interferência diferencial (DIC) de linfoblastos Jurkat T antes (A) e 30 s após (B) exposição a pulsos elétricos de 5 ns, 10 MV/m (30 pulsos, 1 kHz). Observe o inchaço, bolhas e granulação intracelular e expansão da vesícula, resultados do desequilíbrio osmótico causado pela eletroporabilização da membrana celular.

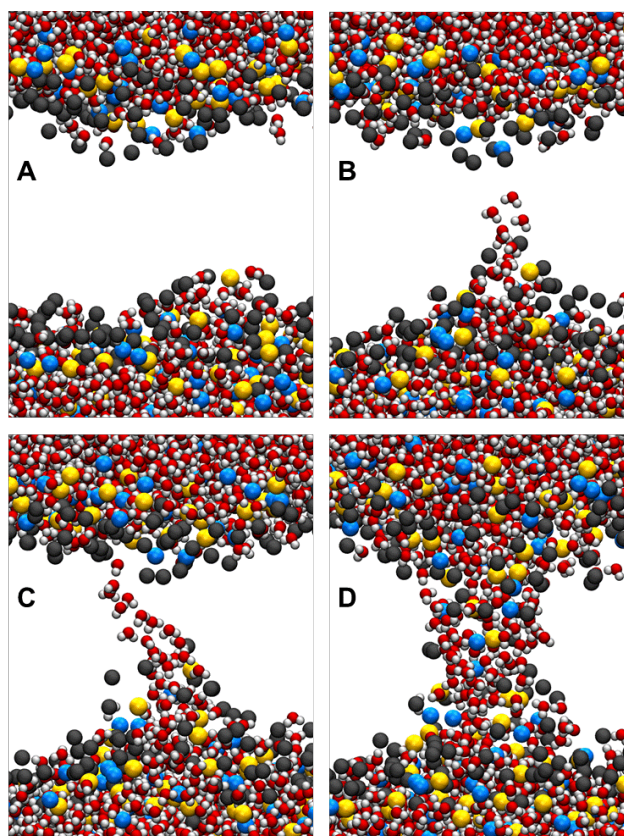


Figura 5. Sequência da criação de eletroporos. (A) Representação da dinâmica molecular de uma bicamada lipídica POPC. Pequenas esferas vermelhas e brancas

na parte superior e inferior do painel são átomos de oxigênio e hidrogênio da água. As esferas douradas e azuis são fósforo e nitrogênio dos grupos cabeça, respectivamente, e as esferas cinza são fosfolipídios acil oxigênios. Para maior clareza, os átomos das cadeias de hidrocarbonetos no interior da bicamada não são mostrados. Na presença de um campo elétrico porativo, uma intrusão de água aparece (B) e se estende através da bicamada (C). Os grupos cabeça seguem a água para formar um poro hidrofílico (D). A sequência de formação do poro, desde o início da ponte de água até a formação do poro revestido com os grupos cabeça, leva menos de 5 ns.

Dinâmica molecular e modelos em macroescala (continuum). A Figura 5 mostra as etapas principais na formação conduzida por campo elétrico de um nanoporo em uma simulação MD típica de uma bicamada de fosfolipídio em processo de poração, parte de um esquema maior para o desenvolvimento (e dissolução) do passo-a-passo dos defeitos eletricamente condutores que contribuem, pelo menos em parte, para o que chamamos de membrana permeabilizada [32]. Essas simulações moleculares nos permitem realizar experimentos virtuais em um amplo espectro de parâmetros atualmente inacessíveis na prática para a observação direta. Embora ainda não possamos alinhar a energética e a cinética detalhada que podem ser extraídas das simulações de MD com os resultados de laboratório, é possível comparar os dados de MD com as previsões dos modelos de macroescala usados para descrever a eletroporação.

A Figura 6 mostra como o tempo de iniciação dos poros [tempo entre a aplicação do campo elétrico porativo e o aparecimento de uma coluna de água que abrange a membrana (Fig. 5C)] varia com a magnitude do campo elétrico em simulações MD [32]. O valor do campo elétrico no interior da membrana, extraído de simulações integrando a densidade de carga em todo o sistema, é usado como uma quantidade normalizadora.

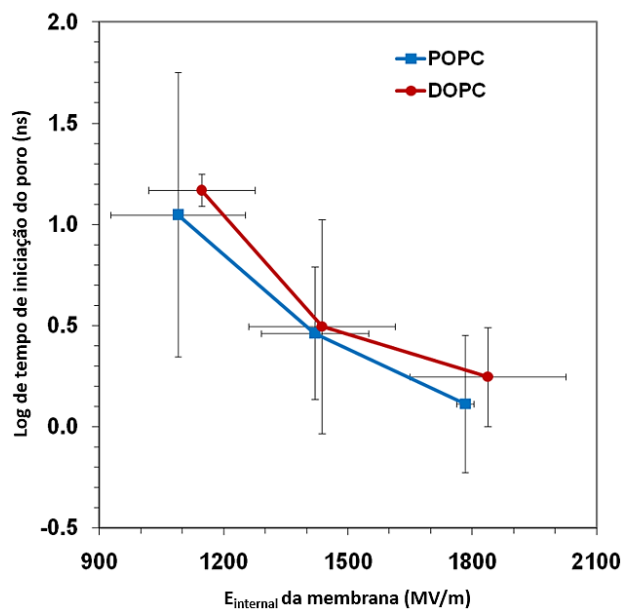


Figura 6. O tempo de iniciação do eletroporo é uma função não-linear da magnitude do campo elétrico porador. O tempo de iniciação dos poros (tempo necessário para formar a ponte de água mostrada na Fig. 1C) é exponencialmente dependente do campo elétrico aplicado, expresso aqui como o campo elétrico observado no interior da bicamada lipídica em simulações de dinâmica molecular. As barras de erro são o erro padrão da média de pelo menos três simulações independentes. Os dados são das Tabelas 4 e 5 de [32].

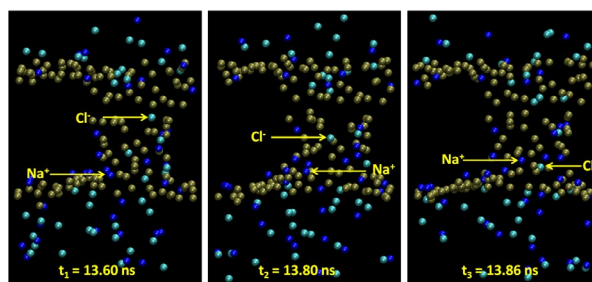


Figura 7. Íons sódio e cloreto migrando através de um nanoporo lipídico na presença de um campo elétrico externo.

Este campo interno da membrana resulta da interação do campo externo aplicado com a interface água e dipolos do grupo cabeça, que também criam o grande potencial dipolo encontrado no interior da membrana, mesmo na ausência de um campo aplicado [33]. A diminuição não-linear no tempo de

iniciação dos poros com o aumento do campo elétrico pode ser interpretada como uma diminuição da energia de ativação para a formação das estruturas de iniciação dos poros descritas acima. Podemos usar resultados de simulação como os da Fig. 6 para conciliar representações de dinâmica molecular com modelos contínuos e, em última análise, ambos, em experimentos. Por exemplo, a relação entre o campo elétrico e a taxa de criação de poros é descrita no modelo estocástico de poros de Krassowska-Weaver na seguinte expressão,

$$K_{pore} = Ae^{-E(r, V_m)/k_B T}, \quad (1)$$

onde K_{pore} é a taxa de criação de poro, A é uma constante de taxa, $E(r, V_m)$ é a energia de um poro com raio r no potencial transmembranar V_m , e k_B , e T são a constante de Boltzmann e a temperatura absoluta [29, 34–36]. Um dos nossos objetivos é conciliar a taxa de criação de poros em (1) com nossos tempos de iniciação de poros simulados, conciliando os dois modelos. Também estamos em processo de validação da expressão do modelo estocástico de poros para densidade de poros,

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\beta(\Delta\psi_m^2)} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}} \right), \quad (2)$$

onde N e N_{eq} são poros por unidade de área, valores instantâneos e de equilíbrio, α e β são parâmetros do modelo de eletroporação empírico, e $\Delta\psi_m$ é o potencial transmembranar.

O poder computacional é necessário não apenas para permitir simulações de sistemas maiores. A grande variabilidade no tempo de início dos poros indicada pelas barras de erro na Fig. 6 significa que simulações independentes de cada condição devem ser repetidas muitas vezes para garantir resultados válidos. (Um número surpreendente de conclusões na literatura existente foi publicado com base em simulações únicas.)

Por causa da complexidade de todas as estruturas, sistemas e processos que compõem a membrana permeabilizada de uma célula viva (o eletropermeoma), a compreensão analítica abrangente da vida útil de permeabilização (poro?) permanece um grande desafio para ambos os modelos e abordagens experimentais.

Modelos melhores podem contribuir também para a nossa compreensão de problemas práticos em bioelétrica. Por exemplo, apesar de anos de estudo, a controvérsia permanece em relação aos efeitos, ou falta de efeitos, de exposições a baixos níveis de campos eletromagnéticos de radiofrequência (RF) [37,38]. Parte da razão para o fracasso em estabelecer certeza sobre esta questão surge da dificuldade de conduzir experimentos

com um número suficiente de variáveis e um número suficiente de amostras para gerar conjuntos de dados confiáveis. Com ferramentas de simulação precisas, aprimoradas pela conciliação com o experimento, podemos explorar o grande espaço variável e estatístico em que os efeitos biofísicos suspeitos podem ocorrer, estreitando a gama de alvos experimentais e focando em sistemas nos quais os efeitos são mais prováveis e nos quais os mecanismos serão mais claros.

Experimentos e modelos moleculares de condutância iônica. Os primeiros indicadores identificados e mais diretos de permeabilização de membrana acionada por campo elétrico são mudanças nas propriedades elétricas, incluindo um aumento na condutância iônica [39,40]. Os dados de um trabalho experimental cuidadoso podem ser interpretados como valores medidos correspondentes à condutância de um único poro [41–44]. Combinando modelos contínuos de eletroporação com esses dados experimentais e com valores estabelecidos para mobilidades eletroforéticas iônicas e afinidades entre íons e fosfolipídios, podemos tirar conclusões sobre a geometria dos poros e densidade de área. Mas a inacessibilidade (até o momento) dos eletroporos de membrana para a observação direta e a manipulação de sua estrutura física nos impede de preencher definitivamente a lacuna entre o modelo e o experimento.

Um método recentemente desenvolvido para estabilizar eletroporos em simulações de dinâmica molecular de bicamadas de fosfolipídios [45] permite a extração da condutância iônica desses sistemas de modelagem e, assim, fornece uma conexão nova e independente entre modelos e experimentos, neste caso, a partir de modelos atômica e detalhadamente de eletroporos lipídicos construídos com dinâmica molecular. A Figura 7 mostra um desses poros estabilizados com íons acionados por campo elétrico passando através dele.

Embora a magnitude da condutância medida nessas simulações seja altamente dependente da precisão dos modelos de íons e água e suas interações com a interface de bicamada fosfolipídica (e há muito espaço para melhorias nesta área), os resultados iniciais são consistentes com as expectativas de modelos contínuos e observações experimentais.

Excitação por pulsos de nanossegundos

Nanoeletroestimulação de células neurosecretoras e neuromusculares. Aplicações de campos elétricos pulsados na clínica, particularmente em eletroquimioterapia e eletrotransferência gênica, são bem conhecidas e

descritas em detalhes em outros capítulos deste livro. Evidenciamos aqui uma potencial aplicação biomédica especificamente de pulsos elétricos de nanossegundos, a ativação e modulação da atividade de processos neurosecretores e neuromusculares, uma área que permanece relativamente inexplorada. A sensibilidade de células eletricamente excitáveis a nanoeletropulsos aumenta a possibilidade de dispositivos de energia muito baixa (pulsos de nanossegundos, megavolt por metro, mas de baixa energia devido à sua curta duração), dispositivos de regulação cardíaca (marcapassos implantados e desfibriladores), ativação muscular remota (lesão do nervo espinhal) e a modulação neurosecretora (controle da dor), sejam construídos com a tecnologia de nanoeletropulso. A Figura 8 demonstra a ativação funcional de uma célula cromafins adrenal após um único pulso de 5 ns, 5 MV/m [46,47].

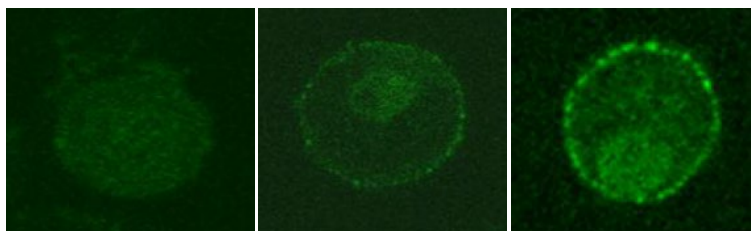


Figura 8. Marcação imunocitoquímica de dopamina- β -hidroxilase (DBH) usando um anticorpo anti-DBH acoplado a um anticorpo secundário marcado com fluorescência. DBH é externalizado por fusão exocitótica de vesículas com a membrana plasmática. Imagem esquerda: controle. Imagem central: 2 min após o tratamento com o estimulante farmacológico DMPP. Imagem direita: 2 min após um único pulso de 5 ns, 5 MV/m.

Agradecimentos

Agradecemos os *insights* colaborativos de Francesca Apollonio, Delia Arnaud-Cormos, Maura Casciola, Gale Craviso, Rumiana Dimova, M. Laura Fernández, Wolfgang Frey, Julie Gehl, Martin Gundersen, Loree Heller, Richard Heller, Volker Knecht, Malgorzata Kotulska, Philippe Leveque, Zacpe Leveque Levine, Micaela Liberti, Carmela Marino, Caterina Merla, Damijan Miklavčič, Lluís Mir, Andrei Pakhomov, Olga Pakhomova, Uwe Pliquet, Ramon Reigada, Marcelo Risk, Marie-Pierre Rols, Stefania Romeo, Maria Rosaria Scarfi, Aude Silve, Esin Sözer, Mounir Tarek, Justin Teissié, Peter Tieleman, Mayya Tokman, Jim Weaver e Olga Zeni (são muito importantes para mim, mas são muitos para nomear cada membro de seus grupos de pesquisa), e contribuíram para este trabalho com modelagem e perícia experimental Maura Casciola, Federica Castellani, Ming- Chak Ho, Zachary Levine, Paolo Marracino, Stefania Romeo, Esin Sözer e Yu-Hsuan Wu. O financiamento foi provido por Frank Reidy Research Center for Bioelectrics da Old

Dominion University e do Air Force Office of Scientific Research (FA9550-15-1-0517, FA9550-14-1-0123). Os recursos de computação foram fornecidos pelo Centro USC para Computação e Comunicações de Alto Desempenho (<http://www.usc.edu/hpcc/>) e Computação de Alto Desempenho da Old Dominion University (<http://www.odu.edu/hpc/>)

Referências

- [1] Sher, L. D., E. Kresch, and H. P. Schwan. 1970. On the possibility of nonthermal biological effects of pulsed electromagnetic radiation. *Biophys. J.* 10:970-979.
- [2] Drago, G. P., M. Marchesi, and S. Ridella. 1984. The frequency dependence of an analytical model of an electrically stimulated biological structure. *Bioelectromagnetics* 5:47-62.
- [3] Plonsey, R., and K. W. Altman. 1988. Electrical stimulation of excitable cells - a model approach. *Proceedings of the IEEE* 76:1122-1129.
- [4] Schoenbach, K. H., R. P. Joshi, J. F. Kolb, N. Y. Chen, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, and S. J. Beebe. 2004. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the IEEE* 92:1122-1137.
- [5] Hofmann, F., H. Ohnimus, C. Scheller, W. Strupp, U. Zimmermann, and C. Jassoy. 1999. Electric field pulses can induce apoptosis. *J. Membr. Biol.* 169:103-109.
- [6] Schoenbach, K. H., S. J. Beebe, and E. S. Buescher. 2001. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* 22:440-448.
- [7] Benz, R., and U. Zimmermann. 1980. Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 597:637-642.
- [8] Vernier, P. T., Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, and M. A. Gundersen. 2004. Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.* 86:4040-4048.
- [9] Gowrishankar, T. R., and J. C. Weaver. 2006. Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supra-electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:643-653.
- [10] Grosse, C., and H. P. Schwan. 1992. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63:1632-1642.
- [11] Gowrishankar, T. R., and J. C. Weaver. 2003. An approach to electrical modeling of single and multiple cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:3203-3208.
- [12] Kotnik, T., and D. Miklavcic. 2000. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47:1074-1081.
- [13] Timoshkin, I. V., S. J. MacGregor, R. A. Fouracre, B. H. Crichton, and J. G. Anderson. 2006. Transient electrical field across cellular membranes: pulsed electric field treatment of microbial cells. *Journal of Physics D-Applied Physics* 39:596-603.
- [14] Schoenbach, K. H., S. Xiao, R. P. Joshi, J. T. Camp, T. Heeren, J. F. Kolb, and S. J. Beebe. 2008. The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36:414-422.
- [15] Frey, W., J. A. White, R. O. Price, P. F. Blackmore, R. P. Joshi, R. Nuccitelli, S. J. Beebe, K. H. Schoenbach, and J. F. Kolb. 2006. Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophys. J.* 90:3608-3615.

- [16] Vernier, P. T., Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, and M. A. Gundersen. 2004. Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. *FEBS Lett.* 572:103-108.
- [17] Tieleman, D. P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem* 5:10.
- [18] Hu, Q., R. P. Joshi, and K. H. Schoenbach. 2005. Simulations of nanopore formation and phosphatidylserine externalization in lipid membranes subjected to a high-intensity, ultrashort electric pulse. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 72:031902.
- [19] Vernier, P. T., M. J. Ziegler, Y. Sun, W. V. Chang, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman. 2006. Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential. *J. Am. Chem. Soc.* 128:6288-6289.
- [20] Vernier, P. T., M. J. Ziegler, Y. Sun, M. A. Gundersen, and D. P. Tieleman. 2006. Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers - in cells and in silico. *Physical Biology* 3:233-247.
- [21] Vernier, P. T., Y. Sun, and M. A. Gundersen. 2006. Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol.* 7:37.
- [22] Idziorek, T., J. Estaquier, F. De Bels, and J. C. Ameisen. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185:249-258.
- [23] Pakhomov, A. G., J. F. Kolb, J. A. White, R. P. Joshi, S. Xiao, and K. H. Schoenbach. 2007. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics* 28:655-663.
- [24] Pakhomov, A. G., R. Shevin, J. A. White, J. F. Kolb, O. N. Pakhomova, R. P. Joshi, and K. H. Schoenbach. 2007. Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch. Biochem. Biophys.* 465:109-118.
- [25] Pakhomov, A. G., A. M. Bowman, B. L. Ibey, F. M. Andre, O. N. Pakhomova, and K. H. Schoenbach. 2009. Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385:181-186.
- [26] Vernier, P. T., Y. Sun, M. T. Chen, M. A. Gundersen, and G. L. Craviso. 2008. Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells. *Bioelectrochemistry* 73:1-4.
- [27] Wang, S., J. Chen, M. T. Chen, P. T. Vernier, M. A. Gundersen, and M. Valderrabano. 2009. Cardiac myocyte excitation by ultrashort high-field pulses. *Biophys. J.* 96:1640-1648.
- [28] Rogers, W. R., J. H. Merritt, J. A. Comeaux, C. T. Kuhnel, D. F. Moreland, D. G. Teltchik, J. H. Lucas, and M. R. Murphy. 2004. Strength-duration curve for an electrically excitable tissue extended down to near 1 nanosecond. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 32:1587-1599.
- [29] DeBruin, K. A., and W. Krassowska. 1998. Electroporation and shock-induced transmembrane potential in a cardiac fiber during defibrillation strength shocks. *Ann. Biomed. Eng.* 26:584-596.
- [30] F. M. Andre, M. A. Rassokhin, A. M. Bowman, and A. G. Pakhomov, "Gadolinium blocks membrane permeabilization induced by nanosecond electric pulses and reduces cell death," *Bioelectrochemistry*, vol. 79, pp. 95-100, Aug 2010.

- [31] O. M. Nesin, O. N. Pakhomova, S. Xiao, and A. G. Pakhomov, "Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1808, pp. 792-801, Dec 20 2010.
- [32] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation," *J Membr Biol*, vol. 236, pp. 27-36, Jul 2010.
- [33] R. J. Clarke, "The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 89-90, pp. 263-81, Jan 29 2001.
- [34] I. P. Sugar and E. Neumann, "Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation," *Biophys Chem*, vol. 19, pp. 211-25, May 1984.
- [35] S. A. Freeman, M. A. Wang, and J. C. Weaver, "Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation," *Biophys J*, vol. 67, pp. 42-56, Jul 1994.
- [36] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores," *Biochim Biophys Acta*, vol. 940, pp. 275-87, May 24 1988.
- [37] J. M. S. McQuade, J. H. Merritt, S. A. Miller, T. Scholin, M. C. Cook, A. Salazar, O. B. Rahimi, M. R. Murphy, and P. A. Mason, "Radiofrequency-radiation exposure does not induce detectable leakage of albumin across the blood-brain barrier," *Radiation Research*, vol. 171, pp. 615-621, May 2009.
- [38] N. D. Volkow, D. Tomasi, G. J. Wang, P. Vaska, J. S. Fowler, F. Telang, D. Alexoff, J. Logan, and C. Wong, "Effects of cell phone radiofrequency signal exposure on brain glucose metabolism," *JAMA*, vol. 305, pp. 808-13, Feb 23 2011.
- [39] Stämpfli, R., and M. Willi. 1957. Membrane potential of a Ranvier node measured after electrical destruction of its membrane. *Experientia* 13:297-298.
- [40] Coster, H. G. L. 1965. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". *Biophys. J.* 5:669-686.
- [41] Chernomordik, L. V., S. I. Sukharev, S. V. Popov, V. F. Pastushenko, A. V. Sokirko, I. G. Abidor, and Y. A. Chizmadzhev. 1987. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim. Biophys. Acta* 902:360-373.
- [42] Kalinowski, S., G. Ibron, K. Bryl, and Z. Figaszewski. 1998. Chronopotentiometric studies of electroporation of bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1369:204-212.
- [43] Melikov, K. C., V. A. Frolov, A. Shcherbakov, A. V. Samsonov, Y. A. Chizmadzhev, and L. V. Chernomordik. 2001. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys. J.* 80:1829-1836.
- [44] Koronkiewicz, S., S. Kalinowski, and K. Bryl. 2002. Programmable chronopotentiometry as a tool for the study of electroporation and resealing of pores in bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1561:222-229.
- [45] Fernandez, M. L., M. Risk, R. Reigada, and P. T. Vernier. 2012. Size-controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423:325-330.
- [46] G. L. Craviso, P. Chatterjee, G. Maalouf, A. Cerjanic, J. Yoon, I. Chatterjee, and P. T. Vernier, "Nanosecond electric pulse-induced increase in intracellular calcium in adrenal chromaffin cells triggers calcium-dependent catecholamine release," *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 16, pp. 1294-1301, Oct 2009.

- [47] G. L. Craviso, S. Choe, P. Chatterjee, I. Chatterjee, and P. T. Vernier, "Nanosecond electric pulses: a novel stimulus for triggering Ca^{2+} influx into chromaffin cells via voltage-gated Ca^{2+} channels," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 30, pp. 1259-65, Nov 2010.



P. Thomas Vernier é professor pesquisador no Frank Reidy Research Center for Bioelectrics da Old Dominion University e professor pesquisador adjunto no Departamento de Engenharia Elétrica Ming Hsieh na University of Southern California. Sua pesquisa e experiência industrial incluem análise de microscopia ultravioleta do metabolismo de S-adenosilmetionina na levedura *Rhodotorula glutinis*, biologia molecular da restrição de hospedeiro sensível à temperatura de vírus bacterianos em *Pseudomonas aeruginosa*, monitoramento de gás ambiental de baixo nível, registro de dados de instrumentação de banda larga, e modelagem de dispositivos semicondutores e caracterização física

e elétrica. Atualmente se concentra nos efeitos de campos elétricos de nanossegundos e megavolt por metro em sistemas biológicos, combinando observações experimentais com simulações de dinâmica molecular e na integração de sensores celulares e biomoleculares, nanotubos de carbono e pontos quânticos com processos de fabricação de circuitos eletrônicos integrados comerciais.

Vernier recebeu seu Ph.D. em Engenharia Elétrica pela University of Southern California em 2004, e é membro da American Chemical Society, American Society for Microbiology, Bioelectromagnetics Society, Biophysical Society, European BioElectromagnetic Association e Institute of Electrical and Electronics Engineers.

Capítulo 7

Eletrtransferência gênica *in vivo*

Maja Čemažar

Instituto de Oncologia, Liubliana, Eslovênia

Resumo: A eletrtransferência gênica consiste na administração de ácidos nucleicos (DNA, RNA, oligonucleotídeos...) no tecido de interesse seguida da aplicação de pulsos elétricos para permitir a entrega dos ácidos nucleicos nas células e, conseqüentemente, a ação terapêutica do material genético entregue. Devido ao tamanho dos ácidos nucleicos, os parâmetros elétricos da eletrtransferência gênica variam muito dependendo do tecido a ser transfectado e também do nível desejado e da duração da expressão, assim como do dano causado ao tecido. Além da otimização de parâmetros elétricos para aplicações específicas, o desenho do DNA plasmidial ou moléculas de RNA terapêuticos também podem influenciar o resultado terapêutico. Os estudos iniciais sobre a eletrtransferência gênica se concentraram principalmente na avaliação de parâmetros elétricos para entrega eficiente de genes a diferentes tecidos, como pele, músculo, fígado e tumores, usando vários genes repórteres que codificam proteínas fluorescentes, luciferase e β -galactosidase. O campo terapêutico da eletrtransferência gênica é principalmente dividido em dois campos: vacina de DNA e terapia gênica do câncer. Vacina de DNA contra doenças infecciosas e câncer, por um lado, e terapias gênicas antiangiogênicas e imunomoduladoras contra o câncer, por outro lado, são as áreas de pesquisa prevalentes. Além disso, números crescentes de ensaios clínicos, especialmente nos EUA, estão registrados usando eletroporação para entrega de DNA plasmidial terapêutico. As perspectivas da eletrtransferência de genes terapêuticos para a terapia do câncer residem principalmente em diferentes combinações com terapias locais convencionais, como a radioterapia ou a eletroquimioterapia, com o objetivo de transformar tratamentos locais em sistêmicos. Além disso, muitos trabalhos pré-clínicos dedicam-se à otimização de DNAs plasmidiais terapêuticos, desenvolvimento de novos eletrodos e avaliação de parâmetros elétricos, o que levará a um melhor planejamento e desenho de ensaios clínicos.

Introdução

A aplicação *in vitro* de eletroporação para a introdução de DNA nas células foi avaliada e testada em 1982 por Neumann *et al.* [1], 6 anos antes do uso de eletroporação para entrega de drogas quimioterápicas antitumorais (eletroquimioterapia) em células tumorais [2]. No entanto, estudos *in vivo* seguiram lentamente e o primeiro estudo *in vivo* foi realizado em 1991 por Titomirov *et al.* [3], avaliando a utilidade de pulsos em declínio exponencial para entrega de genes à pele de camundongos. Mais tarde, a transfecção de cérebro, fígado, tumor e músculo usando diferentes genes repórteres foi demonstrada com sucesso usando diferentes tipos de pulsos elétricos [3-7]. Devido às propriedades físico-químicas e ao tamanho dos ácidos nucleicos em comparação aos pequenos fármacos quimioterápicos, o mecanismo de entrada dos ácidos nucleicos é diferente daquele de pequenas moléculas. Nos tecidos, outros parâmetros relacionados ao tecido e as células também influenciam a eficiência da transfecção, como o tamanho da célula, forma e organização nos tecidos, presença da matriz extracelular e heterogeneidade do tecido (presença de diferentes tipos de células em determinado tecido). Além disso, a construção do plasmídeo e sua administração também podem influenciar o nível de transfecção, bem como sua duração. Portanto, uma grande quantidade de estudos na área de eletrotransferência gênica *in vivo* foi dedicada a avaliação de diferentes parâmetros de pulsos elétricos para diferentes tipos de tecido, bem como para diferentes aplicações (Figura 1). Atualmente, o uso terapêutico da eletrotransferência gênica está focado principalmente em dois campos: vacina com DNA e terapia gênica do câncer [8,9].

Eletrotransferência gênica pré-clínica de genes repórteres

Genes repórteres usados em estudos pré-clínicos sobre eletrotransferência gênica codificavam principalmente luciferase ou outras diferentes proteínas fluorescentes. Ambos permitem visualizar a transfecção de tecidos (expressão gênica em células de tecidos) *in vivo* usando diferentes tipos de imageamento *in vivo*, tanto imagens de corpo inteiro quanto em nível celular [10,11]. A maioria dos estudos foi realizada em músculos e pele, uma vez que esses tecidos são facilmente acessíveis e, portanto, representam um tecido-alvo óbvio para a vacina de DNA. Além de fácil acesso para eletrotransferência de genes, as células musculares têm vida longa e podem produzir quantidades relativamente altas de proteínas

terapêuticas que também são liberadas na corrente sanguínea, agindo assim de forma sistêmica. Por outro lado, a pele também representa um ótimo tecido-alvo, não só pela fácil acessibilidade, mas principalmente pelas inúmeras células imunes presentes na pele que podem provocar uma resposta imune eficaz necessária para a vacina com DNA [12,13] (Figura 2).

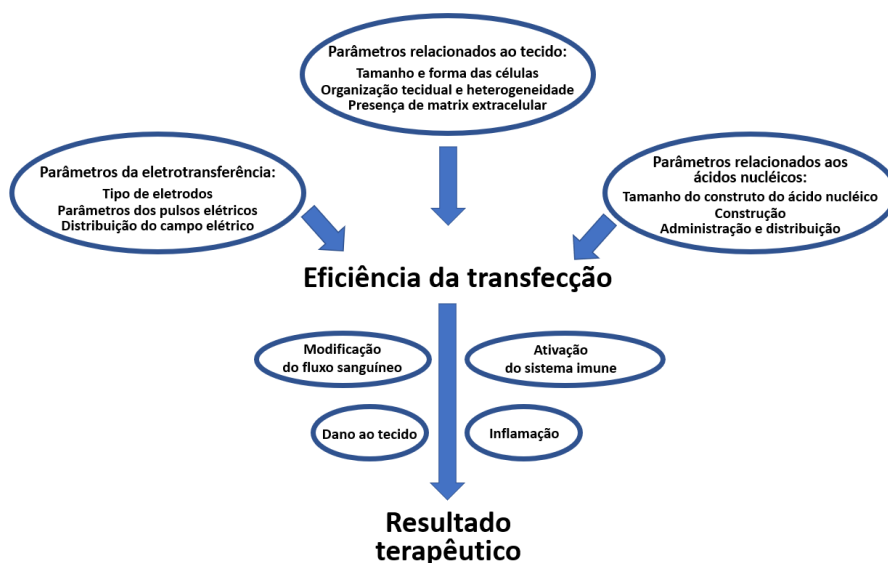


Figura 1: Diferentes parâmetros podem influenciar a eficiência de transfecção e o resultado terapêutico da eletrotransferência de genes.

Conforme mencionado na introdução, vários parâmetros diferentes de pulsos elétricos foram usados, pulsos elétricos de alta voltagem (na faixa de ~1000 V) curtos (~100 μ s) ou pulsos elétricos longos (até 100 ms) de baixa voltagem (até ~100 V). Além disso, até mesmo uma combinação de pulsos de alta e baixa voltagem foram testados e mostraram transfecção melhorada na pele e músculos em comparação com um único tipo de pulso usado para transfecção [14-16]. Em tumores, a combinação de pulsos não resultou em transfecção melhorada [18]. Além disso, a influência da orientação e da polaridade dos pulsos elétricos aplicados também foi avaliada em tumores, demonstrando que o aumento da eficiência de transfecção é obtido apenas pela mudança da orientação do eletrodo, mas não da polaridade do pulso [19].

Os principais tipos de eletrodos utilizados nos estudos foram de eletrodos de placas ou de agulhas e, mais recentemente, arranjos de multieletródos não invasivos [15,19,20]. Outros tipos de eletrodos que foram testados para

eletrotransferência gênica foram eletrodos de espátula para entrega de genes em músculo [22] e outros tipos de eletrodos não invasivos, como eletrodos de contato, sem agulha e meandro para entrega em pele [21-24]. A seleção do eletrodo é muito importante para a distribuição apropriada do campo elétrico no tecido, o que é um pré-requisito para a eletrotransferência efetiva do gene [24, 25].

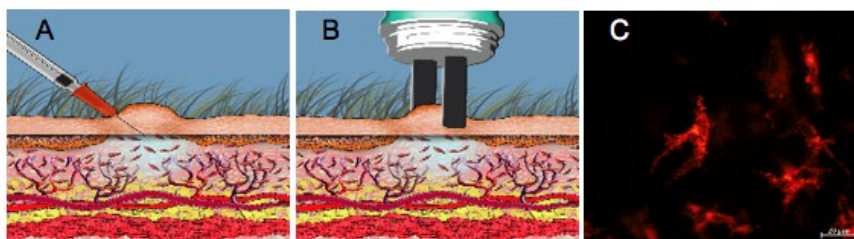


Figura 2: A) Eletrotransferência gênica na pele. Injeção de DNA plasmidial por via subcutânea. Uma bolha na pele se forma. B) Com o uso de eletrodos de placas, estes são posicionados de forma que a bolha fique envolvida entre as duas placas. C) Microscopia confocal intravital de células na pele de camundongo que expressam a proteína fluorescente DsRED na profundidade de 30 µm.

Além dos parâmetros elétricos, o tipo de ácido nucleico usado para eletrotransferência também pode afetar a eficiência da transfecção. Foi demonstrado que um siRNA menor pode atravessar mais facilmente a membrana plasmática em comparação com moléculas de DNA plasmidial maiores, no entanto, a duração da expressão (ou efeito) é mais curta [26-28]. Portanto, o DNA em plasmídeos ainda é o mais utilizado em estudos de eletrotransferência gênica. Para melhorar a segurança e o direcionamento da entrega de DNA plasmidial, bem como para minimizar dano indesejado ao tecido, plasmídeos com promotores específicos de tecido, desprovidos de gene de resistência à antibióticos e com mínimo ou nenhum esqueleto bacteriano foram construídos e avaliados em combinação com eletroporação [29–32].

Devido ao tamanho do DNA plasmidial e a presença de nucleases no sangue e também nos tecidos, a forma mais adequada de administração do DNA plasmidial é por injeção local. A distribuição do DNA plasmidial em diferentes tecidos tem diferentes intervalos de tempo, portanto também é muito importante o tempo entre a injeção do plasmídeo e a aplicação dos pulsos elétricos. Para o músculo, foi demonstrado que deve ser o mais rápido possível, enquanto para os tumores, dependendo do tipo histológico, pode ser até 30 minutos após a injeção do plasmídeo [33-35]. Uma melhor distribuição e, conseqüentemente, melhor eficiência de transfecção podem

ser alcançadas também pelo pré-tratamento de músculos e tumores com enzimas degradantes da matriz extracelular, como hialuronidase e colagenase [36,37].

In vitro, foi demonstrado que o tamanho, a orientação e a forma das células influenciam a permeabilização das membranas celulares e, portanto, também a eficiência de transfecção. O mesmo também é válido *in vivo*. Tecidos com estrutura mais organizada, como o músculo, são mais fáceis de eletrotransfectar do que tecidos altamente heterogêneos, como os tumores [16]. Além disso, em tumores de células grandes foi obtida maior eficiência de transfecção em comparação com tumores de células menores [38-41].

A importância da seleção cuidadosa do DNA plasmidial e dos parâmetros elétricos foi recentemente reforçada por experimentos que mostram que a eletrotransferência gênica de plasmídeos desprovidos de gene terapêutico induziram a regressão completa de tumores, e que os sensores de DNA citosólico que ativam a resposta imune inata foram regulados positivamente após a eletrotransferência do gene [42]. A inflamação e a indução da resposta imune foram demonstradas também para a transfecção de músculo e pele [41-43].

Estudos pré-clínicos e clínicos de eletrotransferência de genes terapêuticos

Estudos pré-clínicos usando genes terapêuticos foram dedicados principalmente à avaliação da eletrotransferência de genes para vacina de DNA ou tratamento de várias doenças, como o câncer, onde as terapias são direcionadas diretamente às células tumorais ou visam aumentar a resposta imunológica do organismo contra as células cancerosas.

Em geral, a terapia gênica pode ser realizada usando duas abordagens diferentes. A primeira é a terapia gênica *ex vivo*, em que células, incluindo células-tronco, são removidas do paciente, transfectadas *in vitro* com o plasmídeo ou vetor viral, selecionadas, amplificadas e, em seguida, reinjetadas de volta no paciente. A outra abordagem é a terapia gênica *in vivo*, onde um DNA exógeno é entregue diretamente no tecido alvo do hospedeiro, por exemplo, localmente no tumor ou peritumoralmente, e para a liberação sistêmica da molécula terapêutica quando aplicada no músculo esquelético, dependendo do tipo de moléculas terapêuticas e da intenção do tratamento [45].

A eletrotransferência gênica foi usada pela primeira vez para vacina de DNA em 1996 [46]. Atualmente, numerosos estudos, usando a

eletrotransferência de genes principalmente em músculos e pele para vacina de DNA contra doenças infecciosas, artrite, esclerose múltipla e inflamação estão em andamento. Além disso, vários ensaios clínicos contra doenças infecciosas, como HIV e hepatite estão em andamento. A eletrotransferência gênica de DNA plasmidial resultou na estimulação de ambos os braços do sistema imune adaptativo: humoral e celular [8,9].

Na terapia gênica do câncer, a eletrotransferência de genes terapêuticos diretamente para os tumores facilita a produção intratumoral local de proteínas terapêuticas, permitindo uma concentração terapêutica suficiente e, portanto, o resultado terapêutico. Isso é especialmente importante no caso de citocinas, onde altas concentrações sistêmicas estão associadas a toxicidade grave.

A primeira avaliação da terapia de eletrotransfecção gênica intratumoral para o tratamento do câncer foi realizada 3 anos após o primeiro estudo de vacina de DNA em 1999 em modelo de tumor de melanoma murino [47]. Desde então, uma variedade de genes terapêuticos, principalmente codificando citocinas, mas também proteínas supressoras de tumor e moléculas de siRNA contra vários alvos, como oncogenes, foram testados em vários modelos de tumor animal. No geral, os resultados dos estudos pré-clínicos indicam que a eletrotransferência do gene terapêutico intratumoral permite uma expressão eficiente do transgene, com produção suficiente de proteínas terapêuticas, o que pode levar até mesmo à regressão completa do tumor e, em alguns casos, a indução de imunidade antitumoral de longo prazo em animais tratados.

Alguns dos efeitos antitumorais mais significativos até agora na terapia gênica do câncer foram alcançados com o emprego de imunoterapia inespecífica ativa, isto é, o uso de citocinas. A eletrogeneterapia codificando diferentes citocinas já mostrou resultados promissores em ensaios pré-clínicos em diferentes modelos de tumor em animais. Os genes de citocinas que mostraram o maior potencial para terapia do câncer são: interleucina (IL)-2, IL-12, IL-18, interferon (IFN) α e GM-CSF [47-52]. Atualmente a terapia mais avançada é o uso de IL-12, que desempenha papel importante na indução da resposta imune celular por meio da estimulação da diferenciação de linfócitos T, produção de IFN- γ e ativação de células *natural killer* [54]. O efeito antitumoral da eletrotransferência do gene IL-12 já foi estabelecido em vários modelos de tumor, por exemplo, melanoma, linfoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de bexiga, adenocarcinoma mamário e carcinoma hepatocelular [53]. Os resultados de estudos pré-clínicos mostram que, além da regressão do tumor em locais primários e distantes, a eletrogeneterapia com IL-12 também promove a indução de memória antitumoral de longo prazo e imunidade terapêutica, suprime a disseminação metastática e aumenta o tempo de sobrevivência de

modelos experimentais tratados [53]. Em nível pré-clínico, a eletrotransferência de genes para tumores também foi empregada na terapia com gene suicida do câncer, substituição de terapias com oncogenes, introdução de genes selvagens supressores de tumor, etc. [47,54-56]. Outra abordagem na terapia gênica do câncer, que está sendo amplamente investigada, é baseada na inibição da angiogênese de tumores. O conceito básico da terapia gênica antiangiogênica é a transfecção de células com genes que codificam inibidores da angiogênese tumoral. A eletrotransferência de plasmídeos que codificam fatores antiangiogênicos (angiostatina e endostanina) demonstrou ser eficaz na inibição do crescimento tumoral e disseminação metastática de diferentes tumores [57-59]. Recentemente, a abordagem com DNA de interferência foi avaliada, usando molécula de siRNA contra endogлина, que é um correceptor do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e é superproduzido em células endoteliais ativadas e também em certas células tumorais. A eletrotransferência gênica de moléculas de siRNA ou shRNA contra a endogлина resultou em efeito vascular direcionado em tumores mamários, bem como efeito antitumoral e antivascular em tumores de melanoma que expressam alto nível de endogлина [60,61].

O tecido muscular é utilizado para, além da vacinação de DNA, também como tecido-alvo devido à possibilidade de alta produção e secreção de proteínas terapêuticas. A eletrotransferência do gene para o músculo foi avaliada com o objetivo de tratar várias doenças musculares, para secreção local de fatores angiogênicos ou neurotróficos, ou para secreção sistêmica de diferentes proteínas terapêuticas, como eritropoietina, fatores de coagulação, citocinas, anticorpos monoclonais, etc. [62-64]. Na terapia gênica do câncer, a eletrotransferência gênica de DNA plasmidial que codifica as citocinas IL-12, IL-24 e fatores antiangiogênicos foram avaliadas com resultados encorajadores.

Estudos clínicos sobre a eletrotransferência de DNA plasmidial que codifica a citocina IL-12 em pacientes com melanoma, bem como em pacientes veterinários, mostram grande promessa para o desenvolvimento dessa terapia [65,66]. No estudo clínico com humanos, 24 pacientes com metástases subcutâneas de melanoma maligno foram tratados 3 vezes. A resposta à terapia foi observada em nódulos tumorais tratados, bem como em nódulos tumorais distantes não tratados. Em 53% dos pacientes, uma resposta sistêmica foi observada resultando em uma doença estável ou em uma resposta objetiva. O principal efeito colateral adverso foi dor transitória após a aplicação de pulsos elétricos. Nas biópsias pós-tratamento, foi observada necrose tumoral e infiltração de células imunes. Este primeiro ensaio clínico em humanos com eletrogeneterapia de IL-12 de melanoma metastático provou que essa terapia é segura e eficaz [66]. Na oncologia

veterinária, 8 cães com mastocitoma foram tratados com eletrotransferência do gene IL-12. Foi obtido um bom efeito antitumoral local com redução significativa do tamanho dos tumores tratados, variando de 15% a 83% (média de 52%) do volume inicial do tumor. Além disso, uma alteração na estrutura histológica dos nódulos tratados foi observada, caracterizada pela redução do número de mastócitos malignos e infiltração de células inflamatórias dos tumores tratados.

Além disso, a liberação sistêmica de IL-12 e IFN- γ em cães tratados foi detectada, sem quaisquer efeitos colaterais locais ou sistêmicos perceptíveis [67]. Novamente, os dados sugerem que a eletrogeneterapia de IL-12 intratumoral pode ser usada para controlar doenças locais e sistêmicas.

Por exemplo, os resultados da eletrotransferência intramuscular do gene IL-12 em pacientes caninos indicam que é um procedimento seguro, que pode resultar na liberação sistêmica de hIL-12 e possivelmente desencadear a resposta de IFN- γ em pacientes tratados, levando a um prolongamento do período livre de doença e da sobrevida dos animais tratados [68].

Perspectivas

Na oncologia, os tratamentos ablativos locais são muito eficazes, porém carecem de um componente sistêmico. Portanto, muito esforço foi dedicado ao desenvolvimento de tratamentos que atuassem de forma sistêmica ou que agregassem um componente sistêmico ao tratamento local. Com o avanço do conhecimento na imunologia tumoral, novas terapias imunomoduladoras foram desenvolvidas para o tratamento do câncer, e atualmente são combinadas com o tratamento padrão com grande sucesso. A vacina de DNA e as terapias de genes imunológicos com citocinas têm como objetivo estimular a imunidade antitumoral e, portanto, são boas candidatas a serem combinadas com terapias locais [68,69].

Vários estudos combinando eletroquimioterapia ou radioterapia com eletrotransferência gênica foram avaliados pré-clinicamente. A terapia imunogênica mais promissora que já chegou aos ensaios clínicos em oncologia veterinária e humana é a eletrotransferência gênica de IL-12. Nos estudos pré-clínicos, a eletrotransferência do gene IL-12 foi combinada com eletroquimioterapia e radioterapia em diferentes modelos de tumor. A eletrotransferência intramuscular do gene de IL-12, combinada com a eletroquimioterapia com cisplatina, aumentou a porcentagem de regressão completa de tumores de fibrossarcoma SA-1 para 60% em comparação com os 17% de regressão completa após a eletroquimioterapia sozinha [71]. Quando combinado com a radioterapia, até mesmo uma resposta completa

de 100% dos tumores LPB foi obtida [72]. A eletrotransferência intratumoral do gene IL-12 resultou em um fator modificador da dose de radiação de ~2.0 [73].

Clinicamente, apenas alguns estudos foram realizados em cães de tutores combinando eletroquimioterapia com bleomicina ou cisplatina e aplicação intratumoral ou peritumoral de eletrotransferência do gene IL-12 [73-76]. Os resultados desses estudos clínicos são muito promissores e mais estudos, esperançosamente também na oncologia humana, estão previstos.

A eletrotransferência gênica possui um grande potencial de desenvolvimento, o que pode levar a novos ensaios clínicos com vacinas de DNA e aplicações de terapia gênica. O desenho do plasmídeo é crucial para a produção e o efeito da proteína terapêutica apropriada, portanto, pesquisas estão focada na otimização do códon, o uso de vários promotores (específicos do tecido e induzíveis), a incorporação de vários imunoestimuladores na sequência do plasmídeo e o uso de plasmídeos desprovidos de gene de resistência à antibióticos, que está em conformidade com as agências reguladoras. Além disso, o fator físico, como a temperatura elevada, também pode levar a uma melhor eletrotransferência do gene. Também, estão em avaliação novos tipos de eletrodos, como microagulhas e arranjos não-invasivos de multi-eletrodos e parâmetros de pulsos elétricos cuidadosamente selecionados, que levarão à uma eficiente eletrotransferência gênica, com efeitos colaterais e desconforto mínimos para os pacientes.

Referências

- [1] E. Neumann, M. Schaeferriidder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider, "GENE-TRANSFER INTO MOUSE LYOMA CELLS BY ELECTROPORATION IN HIGH ELECTRIC-FIELDS," *Embo J.*, vol. 1, no. 7, pp. 841–845, 1982.
- [2] S. Orłowski, J. Belehradec J., C. Paoletti, and L. M. Mir, "Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs," *Biochem Pharmacol*, vol. 37, no. 24, pp. 4727–4733, 1988.
- [3] A. V Titomirov, S. Sukharev, and E. Kistanova, "In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1088, no. 1, pp. 131–134, 1991.
- [4] T. Nishi, K. Yoshizato, S. Yamashiro, H. Takeshima, K. Sato, K. Hamada, I. Kitamura, T. Yoshimura, H. Saya, J. Kuratsu, and Y. Ushio, "High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation.," *Cancer Res*, vol. 56, no. 5, pp. 1050–1055, 1996.
- [5] R. Heller, M. Jaroszeski, A. Atkin, D. Moradpour, R. Gilbert, J. Wands, and C. Nicolau, "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver.," *FEBS Lett*, vol. 389, no. 3, pp. 225–228, 1996.

- [6] M. P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, and J. Teissie, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma.," *Nat Biotechnol*, vol. 16, no. 2, pp. 168–171, 1998.
- [7] L. M. Mir, M. F. Bureau, R. Rangara, B. Schwartz, and D. Scherman, "Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle.," *C R Acad Sci III*, vol. 321, no. 11, pp. 893–899, 1998.
- [8] H. Aihara and J. Miyazaki, "Gene transfer into muscle by electroporation in vivo.," *Nat Biotechnol*, vol. 16, no. 9, pp. 867–870, 1998.
- [9] L. Lambrecht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr at, and G. Vandermeulen, "Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 2, pp. 295–310, 2016.
- [10] R. Heller and L. C. Heller, "Gene electrotransfer clinical trials.," *Adv. Genet.*, vol. 89, pp. 235–62, 2015.
- [11] E. Kinnear, L. J. Caproni, and J. S. Tregoning, "A Comparison of Red Fluorescent Proteins to Model DNA Vaccine Expression by Whole Animal In Vivo Imaging.," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0130375, 2015.
- [12] A. Gothelf, J. Eriksen, P. Hojman, and J. Gehl, "Duration and level of transgene expression after gene electrotransfer to skin in mice.," *Gene Ther.*, vol. 17, no. 7, pp. 839–45, Jul. 2010.
- [13] A. Gothelf and J. Gehl, "Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives," *Curr Gene Ther*, vol. 10, no. 4, pp. 287–299, 2010.
- [14] C. Trollet, D. Scherman, and P. Bigey, "Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 423, pp. 199–214, 2008.
- [15] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, M. P. Rols, and J. Teissie, "Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand?," *Curr Pharm Des*, vol. 12, no. 29, pp. 3817–3825, 2006.
- [16] F. M. Andre, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M. P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie, and L. M. Mir, "Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin," *Hum. Gene Ther.*, vol. 19, no. 11, pp. 1261–1271, 2008.
- [17] N. Pavselj and V. Pr at, "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse.," *J. Control. Release*, vol. 106, no. 3, pp. 407–15, Sep. 2005.
- [18] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, P. Hojman, S. Kranjc, S. Mesojednik, M. P. Rols, and J. Teissie, "Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice," *Gene Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 635–644, 2009.
- [19] V. Todorovic, U. Kamensek, G. Sersa, and M. Cemazar, "Changing electrode orientation, but not pulse polarity, increases the efficacy of gene electrotransfer to tumors in vivo," *Bioelectrochemistry*, vol. 100, pp. 119–127, 2014.
- [20] R. Heller, Y. Cruz, L. C. Heller, R. A. Gilbert, and M. J. Jaroszeski, "Electrically mediated delivery of plasmid DNA to the skin, using a multielectrode array.," *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 357–62, Mar. 2010.
- [21] S. Kos, T. Blagus, M. Cemazar, U. Lamprecht Tratar, M. Stimac, L. Prosen, T. Dolinsek, U. Kamensek, S. Kranjc, L. Steinstraesser, G. Vandermeulen, V. Pr at, and G. Sersa, "Electrotransfer parameters as a tool for controlled and targeted gene expression in skin.," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 5, no. 8, p. e356, Aug. 2016.

- [22] M. Donà, M. Sandri, K. Rossini, I. Dell'Aica, M. Podhorska-Okolow, and U. Carraro, "Functional in vivo gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 312, no. 4, pp. 1132–8, Dec. 2003.
- [23] L. Zhang, E. Nolan, S. Kreitschitz, and D. P. Rabussay, "Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1572, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2002.
- [24] S. Babiuk, M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, L. Baizer, R. Stout, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera, and L. Babiuk, "Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin.," *Mol. Ther.*, vol. 8, no. 6, pp. 992–8, Dec. 2003.
- [25] L. Daugimont, N. Baron, G. Vandermeulen, N. Pavselj, D. Miklavcic, M. C. Jullien, G. Cabodevila, L. M. Mir, and V. Pr at, "Hollow microneedle arrays for intradermal drug delivery and DNA electroporation," *J Membr Biol*, vol. 236, no. 1, pp. 117–125, 2010.
- [26] S. Maz eres, D. Sel, M. Golzio, G. Pucihar, Y. Tamzali, D. Miklavcic, and J. Teissie, "Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery," *J Control Release*, vol. 134, no. 2, pp. 125–131, 2009.
- [27] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, and D. Miklavcic, "Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation," *Biomed Eng Online*, vol. 12, p. 16, 2013.
- [28] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, and M. Golzio, "Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 26, pp. 10443–10447, 2011.
- [29] J.-M. Escoffre, A. Debin, J.-P. Reynes, D. Drocourt, G. Tiraby, L. Hellaudais, J. Teissie, and M. Golzio, "Long-lasting in vivo gene silencing by electrotransfer of shRNA expressing plasmid.," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 7, no. 2, pp. 109–16, Apr. 2008.
- [30] K. E. Broderick, A. Chan, F. Lin, X. Shen, G. Kichaev, A. S. Khan, J. Aubin, T. S. Zimmermann, and N. Y. Sardesai, "Optimized in vivo transfer of small interfering RNA targeting dermal tissue using in vivo surface electroporation," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 1, p. e11, 2012.
- [31] C. Marie, G. Vandermeulen, M. Quiviger, M. Richard, V. Pr at, and D. Scherman, "pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells.," *J. Gene Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 323–32, Apr. 2010.
- [32] G. Vandermeulen, H. Richiardi, V. Escriou, J. Ni, P. Fournier, V. Schirmacher, D. Scherman, and V. Pr at, "Skin-specific promoters for genetic immunisation by DNA electroporation.," *Vaccine*, vol. 27, no. 32, pp. 4272–7, Jul. 2009.
- [33] N. Tesic and M. Cemazar, "In vitro targeted gene electrotransfer to endothelial cells with plasmid DNA containing human endothelin-1 promoter," in *Journal of Membrane Biology*, 2013, vol. 246, no. 10, pp. 783–791.
- [34] S. Chabot, J. Orio, M. Schmeer, M. Schleef, M. Golzio, and J. Teissie, "Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery.," *Gene Ther.*, vol. 20, no. 1, pp. 62–8, Jan. 2013.
- [35] G. Tevz, S. Kranjc, M. Cemazar, U. Kamensek, A. Coer, M. Krzan, S. Vidic, D. Pavlin, and G. Sersa, "Controlled systemic release of interleukin-12 after gene electrotransfer to

- muscle for cancer gene therapy alone or in combination with ionizing radiation in murine sarcomas,” *J Gene Med*, vol. 11, no. 12, pp. 1125–1137, 2009.
- [36] M. Cemazar, D. Pavlin, S. Kranjc, A. Grosel, S. Mesojednik, and G. Sersa, “Sequence and time dependence of transfection efficiency of electrically-assisted gene delivery to tumors in mice,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 3, no. 1, 2006.
- [37] S. Mesojednik, D. Pavlin, G. Sersa, A. Coer, S. Kranjc, A. Grosel, G. Tevz, and M. Cemazar, “The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice,” *Gene Ther.*, vol. 14, no. 17, 2007.
- [38] J. M. McMahon, E. Signori, K. E. Wells, V. M. Fazio, and D. J. Wells, “Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage.,” *Gene Ther.*, vol. 8, no. 16, pp. 1264–1270, 2001.
- [39] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, P. Hojman, S. Kranjc, S. Mesojednik, M. P. Rols, and J. Teissie, “Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice,” *Gene Ther.*, vol. 16, no. 5, pp. 635–644, 2009.
- [40] S. Mesojednik, D. Pavlin, G. Sersa, A. Coer, S. Kranjc, A. Grosel, G. Tevz, and M. Cemazar, “The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice,” *Gene Ther.*, vol. 14, no. 17, pp. 1261–1269, 2007.
- [41] M. Cemazar, G. Sersa, J. Wilson, G. M. Tozer, S. L. Hart, A. Grosel, and G. U. Dachs, “Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, no. 4, 2002.
- [42] K. Znidar, M. Bosnjak, M. Cemazar, and L. C. Heller, “Cytosolic DNA Sensor Upregulation Accompanies DNA Electrotransfer in B16.F10 Melanoma Cells,” *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 5, no. 6, e322. doi: 10.1038/mtna.2016.34.pp. 399-406, 2016.
- [43] Semenova N, Bosnjak M, Markec B, Znidar K, Cemazar M, Heller L. Multiple cytosolic DNA sensors bind plasmid DNA after transfection. *Nucleic Acids Res.* 2019. pii: gkz768. doi: 10.1093/nar/gkz768
- [44] P. Chiarella, E. Massi, M. De Robertis, A. Sibilio, P. Parrella, V. M. Fazio, and E. Signori, “Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration.,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 8, no. 11, pp. 1645–57, Nov. 2008.
- [45] J. J. Drabick, J. Glasspool-Malone, A. King, and R. W. Malone, “Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by *in vivo* electropermeabilization.,” *Mol. Ther.*, vol. 3, no. 2, pp. 249–55, Feb. 2001.
- [46] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, and D. Miklavčič, “Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges.,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, pp. 295–320, Jul. 2014.
- [47] M. Nomura, Y. Nakata, T. Inoue, A. Uzawa, S. Itamura, K. Nerome, M. Akashi, and G. Suzuki, “*In vivo* induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule.,” *J. Immunol. Methods*, vol. 193, no. 1, pp. 41–9, Jul. 1996.

- [48] G. L. Niu, R. Heller, R. Catlett-Falcone, D. Coppola, M. Jaroszeski, W. Dalton, R. Jove, and H. Yu, "Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 20, pp. 5059–5063, 1999.
- [49] F. M. Andre and L. M. Mir, "Nucleic acids electrotransfer in vivo: mechanisms and practical aspects," *Curr Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 267–280, 2010.
- [50] T. Dolinsek, B. Markelc, G. Sersa, A. Coer, M. Stimac, J. Lavrencak, A. Brozic, S. Kranjc, and M. Cemazar, "Multiple Delivery of siRNA against Endoglin into Murine Mammary Adenocarcinoma Prevents Angiogenesis and Delays Tumor Growth," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [51] L. Heller, C. Pottinger, M. J. Jaroszeski, R. Gilbert, and R. Heller, "In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity," *Melanoma Res*, vol. 10, no. 6, pp. 577–583, 2000.
- [52] S. L. Li, X. J. Zhang, and X. Q. Xia, "Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 10, pp. 762–768, 2002.
- [53] L. Heller, V. Todorovic, and M. Cemazar, "Electrotransfer of single-stranded or double-stranded DNA induces complete regression of palpable B16.F10 mouse melanomas," *Cancer Gene Ther.*, vol. 20, no. 12, pp. 695–700, 2013.
- [54] M. Cemazar, T. Jarm, and G. Sersa, "Cancer electrogene therapy with interleukin-12.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 300–311, 2010.
- [55] G. Trinchieri, "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 133–146, 2003.
- [56] L. C. Heller and R. Heller, "In vivo electroporation for gene therapy," *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, no. 9, pp. 890–897, 2006.
- [57] J. M. Escoffre, J. Teissié, and M. P. Rols, "Gene transfer: how can the biological barriers be overcome?," *J Membr Biol*, vol. 236, no. 1, pp. 61–74, 2010.
- [58] M. Cemazar and G. Sersa, "Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues," *Curr Opin Mol Ther.*, vol. 9, no. 6, pp. 554–562, 2007.
- [59] T. Cichoń, L. Jamrozy, J. Glogowska, E. Missol-Kolka, and S. Szala, "Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: inhibition of primary tumor growth and metastatic spread.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, no. 9, pp. 771–7, Oct. 2002.
- [60] M. Uesato, Y. Gunji, T. Tomonaga, S. Miyazaki, T. Shiratori, H. Matsubara, T. Kouzu, H. Shimada, F. Nomura, and T. Ochiai, "Synergistic antitumor effect of antiangiogenic factor genes on colon 26 produced by low-voltage electroporation.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, no. 9, pp. 625–32, Sep. 2004.
- [61] J. M. Weiss, R. Shivakumar, S. Feller, L.-H. Li, A. Hanson, W. E. Fogler, J. C. Fratantoni, and L. N. Liu, "Rapid, in vivo, evaluation of antiangiogenic and antineoplastic gene products by nonviral transfection of tumor cells.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, no. 5, pp. 346–53, May 2004.
- [62] N. Tesic, U. Kamensek, G. Sersa, S. Kranjc, M. Stimac, U. Lamprecht, V. Preat, G. Vandermeulen, M. Butinar, B. Turk, and M. Cemazar, "Endoglin (CD105) Silencing Mediated by shRNA Under the Control of Endothelin-1 Promoter for Targeted Gene Therapy of Melanoma," *Mol. Ther. Acids*, vol. 4, 2015.
- [63] T. Dolinsek, G. Sersa, L. Prosen, M. Bosnjak, M. Stimac, U. Razborsek, and M. Cemazar, "Electrotransfer of plasmid DNA encoding an anti-mouse endoglin (CD105)

- shRNA to B16 melanoma tumors with low and high metastatic potential results in pronounced anti-tumor effects,” *Cancers (Basel)*, vol. 8, no. 1, 2015.
- [64] J. M. McMahon and D. J. Wells, “Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status,” *BioDrugs*, vol. 18, no. 3, pp. 155–65, 2004.
- [65] P. Lefesvre, J. Attema, and D. van Bekkum, “A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 3, p. 12, Aug. 2002.
- [66] N. Perez, P. Bigey, D. Scherman, O. Danos, M. Piechaczyk, and M. Pelegrin, “Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by *in vivo* muscle electroporation,” *Genet. Vaccines Ther.*, vol. 2, no. 1, p. 2, Mar. 2004.
- [67] A. I. Daud, R. C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A. I. Riker, V. K. Sondak, P. N. Munster, D. M. Sullivan, K. E. Ugen, J. L. Messina, and R. Heller, “Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 36, pp. 5896–5903, 2008.
- [68] D. Pavlin, M. Cemazar, A. Cor, G. Sersa, A. Pogacnik, and N. Tozon, “Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors,” *Radiol Oncol*, vol. 45, no. 1, pp. 31–39, 2011.
- [69] D. Pavlin, M. Cemazar, G. Sersa, and N. Tozon, “IL-12 based gene therapy in veterinary medicine,” *J. Transl. Med.*, vol. 10, p. 234, 2012.
- [70] G. Sersa, J. Teissie, M. Cemazar, E. Signori, U. Kamensek, G. Marshall, and D. Miklavcic, “Electrochemotherapy of tumors as *in situ* vaccination boosted by immunogene electrotransfer,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 64, no. 10, pp. 1315–27, Oct. 2015.
- [71] C. Y. Calvet and L. M. Mir, “The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 165–77, Jun. 2016.
- [72] A. Sedlar, T. Dolinsek, B. Markelc, L. Prosen, S. Kranjc, M. Bosnjak, T. Blagus, M. Cemazar, and G. Sersa, “Potentiation of electrochemotherapy by intramuscular IL-12 gene electrotransfer in murine sarcoma and carcinoma with different immunogenicity,” *Radiol. Oncol.*, vol. 46, no. 4, 2012.
- [73] S. Kranjc, G. Tevz, U. Kamensek, S. Vidic, M. Cemazar, and G. Sersa, “Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regimen in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model,” *Radiat Res*, vol. 172, no. 6, pp. 677–685, 2009.
- [74] A. Sedlar, S. Kranjc, T. Dolinsek, M. Cemazar, A. Coer, and G. Sersa, “Radiosensitizing effect of intratumoral interleukin-12 gene electrotransfer in murine sarcoma,” *BMC Cancer*, vol. 13, 2013.
- [75] J. Cutrera, M. Torrero, K. Shiomitsu, N. Mauldin, and S. Li, “Intratumoral bleomycin and IL-12 electrochemogenetherapy for treating head and neck tumors in dogs,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 423, pp. 319–25, Jan. 2008.
- [76] J. Cutrera, G. King, P. Jones, K. Kicenuik, E. Gumpel, X. Xia, and S. Li, “Safety and efficacy of tumor-targeted interleukin 12 gene therapy in treated and non-treated, metastatic lesions,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 15, no. 1, pp. 44–54, Jan. 2015.
- [77] S. D. Reed, A. Fulmer, J. Buckholz, B. Zhang, J. Cutrera, K. Shiomitsu, and S. Li, “Bleomycin/interleukin-12 electrochemogenetherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs,” *Cancer Gene Ther*, vol. 17, no. 8, pp. 571–578, 2010.

- [78] M. Cemazar, J. Ambrozic Avgustin, D. Pavlin, G. Sersa, A. Poli, A. Krhac Levacic, N. Tesic, U. Lampreht Tratar, M. Rak, and N. Tozon, "Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours," *Vet Comp Oncol.* vol. 15, no. 2, pp. 641-654, Jun 2017.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Agência de Pesquisa Eslovena e foi conduzida no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA) e da Ação COST TD1104.



Maja Čemažar recebeu seu PhD em ciências médicas básicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Ljubljana em 1998. Ela foi pós-doutoranda e pesquisadora no Gray Cancer Institute, Reino Unido, de 1999 a 2001. Foi pesquisadora associada no Instituto de Farmacologia e Biologia Estrutural em Toulouse, França, em 2004. Atualmente, trabalha no Departamento de Oncologia Experimental do Instituto de Oncologia de Ljubljana e leciona biologia celular e tumoral em vários cursos na Universidade de Ljubljana e na Universidade de Primorska, Eslovênia. Seus principais interesses de pesquisa são no campo da eletrotransferência de genes, empregando DNA plasmidial que codifica diferentes genes terapêuticos imunomoduladores e antiangiogênicos. Em 2006, ela recebeu o Prêmio da República da Eslovênia por importantes realizações em pesquisa e desenvolvimento científico no campo da oncologia experimental. É autora de mais de 170 artigos em periódicos revisados por pares.

Capítulo 8

Eletrotransferência de vacina de DNA

Véronique Prémat e Gaëlle Vandermeulen

Universidade de Louvain, Bruxelas, Bélgica

Vacinas de DNA

O uso de vacinas de DNA é uma estratégia atraente para induzir a memória imunológica. Plasmídeos bacterianos são construídos e otimizados para expressar *in vivo* uma proteína que irá induzir uma resposta imune. Estudos pré-clínicos demonstraram que o DNA plasmidial que codifica antígenos forneceram proteção imunológica em pequenos animais, e em menor extensão, em grandes animais para uma ampla gama de doenças, por exemplo, profilaxia de infecções virais e bacterianas, bem como vacinas terapêuticas contra o câncer. Várias vacinas de DNA foram licenciadas para uso veterinário ou estão em ensaios clínicos para uso humano.

A vacina de DNA compreende vários elementos-chave. Um promotor é inserido acima da sequência do antígeno de interesse para conduzir a expressão em células de mamíferos e um sinal de poliadenilação está localizado na sequência. A produção de DNA plasmidial requer a presença de uma origem de replicação e de um marcador específico capaz de selecionar bactérias contendo o plasmídeo após a transformação e durante o processo de amplificação. O uso de genes de resistência à antibióticos como marcadores de seleção para a produção de plasmídeos levanta questões de segurança que são frequentemente apontadas pelas autoridades regulatórias, e uma nova geração de construtos de plasmídeo desprovidos de marcador de resistência à antibióticos emergiu.

As vacinas de DNA são atraentes por sua estabilidade, baixo custo, fácil produção e capacidade de induzir uma ampla resposta imune. Ao permitir a

expressão *in vivo* do antígeno pelas células transfectadas, as vacinas de DNA garantem uma semelhança mais próxima com o antígeno do que as proteínas recombinantes, que podem apresentar glicosila o em mamíferos e outras modifica es p s-tradun o. Plasmídeos são capazes de estimular todos os três braços da imunidade adaptativa: anticorpos, células T auxiliares (Th) e linfócitos T citotóxicos (CTL), e contribuem para a estimula o da imunidade inata. O perfil de segurança das vacinas de DNA   geralmente considerado bom, e não há relatos de integra o observável do DNA plasmidial ao genoma do hospedeiro, nem de autoimunidade em ensaios clínicos em humanos.

Vários estudos demonstraram a robustez do DNA plasmidial que codifica o patógeno e antígenos tumorais para induzir a resposta imune. Vacinas de DNA induzem predominantemente resposta Th1, resposta CTL e anticorpos, mas tanto a via de entrega quanto o método de administra o mostraram influenciar o tipo e a magnitude da resposta imune. Para eliciar respostas de CTL, o antígeno precisa chegar ao citoplasma das células apresentadoras de antígeno (APC). A proteína (contendo o antígeno) pode ser produzida diretamente pela APC transfectada ou chegar via endocitose da proteína produzida por outras células transfectadas (apresenta o cruzada). Os peptídeos derivados da degrada o da proteína ligam-se ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ou classe II. A associa o de peptídeos ao MHC de classe I estimula os CTL, enquanto a liga o ao MHC de classe II estimula as células Th. Embora as vacinas de DNA tenham sido inicialmente desenvolvidas para introduzir antígenos na via de processamento do MHC de classe I para induzir CTL, também foi demonstrado que elas geram respostas de anticorpos protetores: uma proteína transmembranar ou secretada pode ativar células B para a produ o de anticorpos.

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos para melhorar sua imunogenicidade e potencial clínico com base no uso de eletropora o, otimiza o de códons das constru es de plasmídeo ou coadministra o de adjuvantes.

Entrega de vacinas de DNA mediada por eletropora o

Mesmo que as vacinas de DNA plasmidial injetadas no músculo possam induzir uma resposta imune, estas geralmente induzem uma resposta de magnitude relativamente baixa em grandes espécies.

A eletroporação aborda duas limitações da baixa imunogenicidade das vacinas de DNA. (i) ao induzir uma permeabilização transitória da membrana e ao promover a eletroforese do DNA carregado negativamente, facilita a absorção de DNA nas células hospedeiras. Desse modo, a expressão do antígeno é fortemente aumentada, geralmente em duas ordens de magnitude, no músculo ou na pele; (ii) ao criar um baixo nível de inflamação no local da injeção/eletroporação, aumenta o recrutamento de células APC para o local da injeção.

Conseqüentemente, a entrega de vacinas de DNA mediada por eletroporação aumenta em até 100 vezes as respostas imunes induzidas em comparação com a injeção simples de plasmídeos. É uma estratégia útil para aumentar as respostas humoral e celular em animais pequenos e de grande porte, incluindo primatas. Uma pesquisa com estudos pré-clínicos demonstrou que a vacinação de DNA mediada por eletroporação induziu respostas celulares robustas e duradouras caracterizadas pela indução de CTL, interferon γ e interleucina-2 por células T CD4+ e CD8+. Anticorpos geralmente são detectados. A combinação com adjuvante (por exemplo, estimulação de TLR-9 por CpG ou interleucina-12) aumenta a potência da vacinação de DNA.

Dois principais órgãos foram investigados para imunização com DNA por eletroporação. A pele é um órgão imunocompetente com muitas APCs residentes, isto é, células de Langerhans cobrem aproximadamente 20% da superfície da pele. A pele é facilmente acessível e a expressão da proteína de interesse é limitada a algumas semanas. Em contraste, o músculo induz uma expressão mais forte e de longo prazo da proteína de interesse, mas contém poucas APCs. A maioria dos estudos pré-clínicos indicam que uma resposta humoral mais forte é observada após a eletrotransferência intramuscular do DNA do que após a eletrotransferência intradérmica.

Várias diferentes vacinas de DNA mediadas por eletroporação estão atualmente em ensaios clínicos como vacinas terapêuticas contra câncer (como melanoma e câncer de próstata, por exemplo) e doenças infecciosas crônicas (como HIV e hepatite, por exemplo). Dados preliminares sugerem que a vacinação mediada por eletroporação é bem tolerada e melhora a potência da vacina de DNA. Os dispositivos também foram otimizados para aumentar a resposta imunológica e/ou melhorar o conforto do paciente.

Leituras recomendadas

Vacinas de DNA

- [1] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):313-29. Review
- [2] Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, Préat V. New Generation of Plasmid Backbones Devoid of Antibiotic Resistance Marker for Gene Therapy Trials. *Mol Ther*. 2011;19(11):1942-9. Review
- [3] Lopes A, Vandermeulen G, Préat V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Apr 5;38(1):146. Review

Electroporação de vacinas de DNA

- [4] Todorova B, Adam L, Culina S, Boisgard R, Martinon F, Cosma A, Ustav M, Kortulewski T, Le Grand R, Chapon C. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Sci Rep*. 2017 Jun 23;7(1):4122.
- [5] Sardesai NY, Weiner DB. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(3):421-9. Review.
- [6] Broderick KE, Humeau LM. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Feb;14(2):195-204. Review
- [7] Vandermeulen G, Staes E, Vanderhaeghen ML, Bureau MF, Scherman D, Préat V. Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release*. 2007;124(1-2):81-7.
- [8] Vandermeulen G, Vanvarenberg K, De Beuckelaer A, De Koker S, Lambricht L, Uyttenhove C, Reschner A, Vanderplasschen A, Grooten J, Préat V. The site of administration influences both the type and the magnitude of the immune response induced by DNA vaccine electroporation. *Vaccine*. 2015 Jun 22;33(28):3179-85.

Ensaio clínico com vacinas de DNA e eletroporação

- [9] Lambricht L, Lopes A, Kos S, Sersa G, Préat V, Vandermeulen G. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(2):295-310.
- [10] El-Kamary SS, Billington M, Deitz S, Colby E, Rhinehart H, Wu Y, Blackwelder W, Edelman R, Lee A, King A. Safety and tolerability of the Easy Vax™ clinical epidermal electroporation system in healthy adults. *Mol Ther*. 2012;20(1):214-20.
- [11] Yang FQ, Yu YY, Wang GQ, Chen J, Li JH, Li YQ, Rao GR, Mo GY, Luo XR, Chen GM. A pilot randomized controlled trial of dual-plasmid HBV DNA vaccine mediated by in vivo electroporation in chronic hepatitis B patients under lamivudine chemotherapy. *J Viral Hepat*. 2012;19(8):581-93.

- [12] Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, Hannaman D, Gardiner DF, Dugin DP, Boente-Carrera M, Vittorino R, Caskey M, Andersen J, Huang Y, Cox JH, Tarragona-Fiol T, Gill DK, Cheeseman H, Clark L, Dally L, Smith C, Schmidt C, Park HH, Kopycinski JT, Gilmour J, Fast P, Bernard R, Ho DD. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One*. 2011;6(5):e19252.
- [13] Chudley L, McCann K, Mander A, Tjelle T, Campos-Perez J, Godeseth R, Creak A, Dobbyn J, Johnson B, Bass P, Heath C, Kerr P, Mathiesen I, Dearnaley D, Stevenson F, Ottensmeier C. DNA fusion-gene vaccination in patients with prostate cancer induces high-frequency CD8(+) T-cell responses and increases PSA doubling time. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 May 22.

Otimização dos métodos de entrega

- [14] Lin F, Shen X, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, Yan J, Kobinger GP, Bello A, Khan AS, Broderick KE, Sardesai NY. Optimization of electroporation-enhanced intradermal delivery of DNA vaccine using a minimally invasive surface device. *Hum Gene Ther Methods*. 2012;23(3):157-68.
- [15] Hallengard D, Bråve A, Isagulians M, Blomberg P, Enger J, Stout R, King A, Wahren B. A combination of intradermal jet-injection and electroporation overcomes in vivo dose restriction of DNA vaccines. *Genet Vaccines Ther*. 2012;10(1):5.
- [16] Kos S, Vanvarenberg K, Dolinsek T, Cemazar M, Jelenc J, Prémat V, Sersa G, Vandermeulen G. Gene electrotransfer into skin using noninvasive multi-electrode array for vaccination and wound healing. *Bioelectrochemistry*. 2017 Apr;114:33-41.

Capítulo 9

Eletroquimioterapia do Laboratório ao Paciente: Princípios, Mecanismos e Aplicações

Gregor Serša

Instituto de Oncologia, Liubliana, Eslovênia

Resumo: A eletroquimioterapia consiste na administração de um fármaco quimioterápico seguida da aplicação de pulsos elétricos no tumor, a fim de facilitar a captação do fármaco pelas células. Apenas dois quimioterápicos são usados atualmente na eletroquimioterapia, bleomicina e cisplatina, que têm seus transportes através da membrana plasmática prejudicados na ausência da eletroporação dos tumores. Além desses dois fármacos, o cálcio também é utilizado na chamada eletroporação de cálcio. Estudos pré-clínicos elaboraram parâmetros de tratamento e vias de administração dos medicamentos e comprovaram sua eficácia em diversos modelos experimentais de tumor. Com base nos mecanismos de ação conhecidos, a eletroquimioterapia foi testada com sucesso em estudos clínicos e agora é considerada tratamento padrão de tumores cutâneos e metástases. A eletroquimioterapia, como plataforma tecnológica, está agora sendo transicionada também para o tratamento de tumores maiores e profundos. Com novos eletrodos e novos geradores de pulsos elétricos, estão em andamento ensaios clínicos para tratamento de tumores primários ou metástases hepáticas, em pâncreas, ósseas e sarcomas de tecidos moles, bem como metástases cerebrais, tumores de esôfago e reto.

Introdução

A eletroquimioterapia consiste na administração do fármaco quimioterápico seguida da aplicação de pulsos elétricos no tumor, a fim de

facilitar a captação do fármaco pelas células. Os protocolos de eletroquimioterapia foram otimizados em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, e os mecanismos básicos foram elucidados, como eletroporação de células, aprisionamento dos fármacos no tumor (*vascular lock*), efeito de ruptura vascular (*vascular-disrupting effect*) e envolvimento da resposta imunológica. Com base em todos esses dados, a eletroquimioterapia com bleomicina e cisplatina foi prontamente avaliada em ensaios clínicos. Até o momento, a eletroquimioterapia se espalhou pela Europa em mais de 160 centros de oncologia. A linha do tempo de desenvolvimento da eletroquimioterapia apresenta os marcos de seu desenvolvimento, com o primeiro estudo multicêntrico – ESOPE (*European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy*), e o primeiro SOP (Procedimentos Operacionais Padrão - *Standard Operating Procedures*), para desenvolvimento de novos eletrodos e inclusão em diretrizes de tratamento de tumores em diferentes países da Europa (Fig. 1). Várias revisões da tecnologia de eletroporação e suas aplicações na biomedicina e na prática clínica foram publicadas [1– 4].

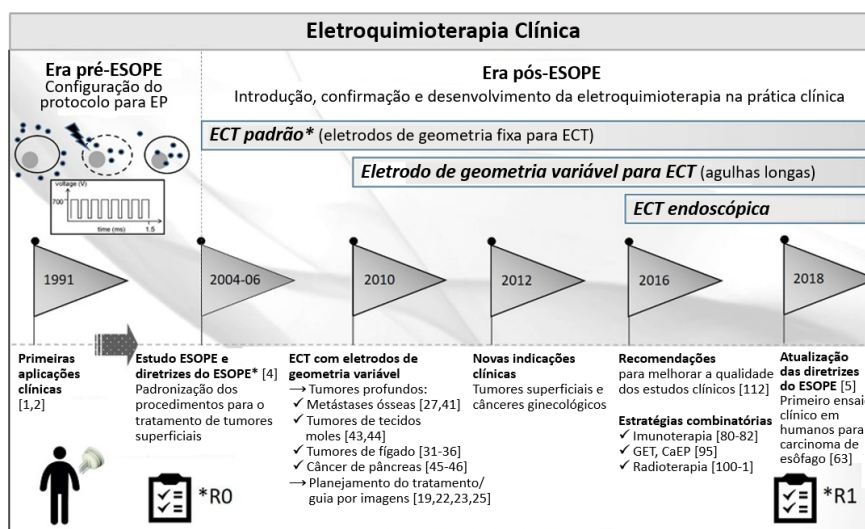


Figura 1: Linha do tempo e desenvolvimento da eletroquimioterapia clínica. Legenda: EP = eletroporação; ESOPE = Procedimentos Operacionais Padrão Europeus da ECT; GET = eletrotransferência gênica; Tx = tratamento; CaEP = eletroporação de cálcio. Com permissão de (4).

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Estudos *in vitro*

A eletroporação provou ser eficaz em facilitar o transporte de diferentes moléculas através da membrana plasmática para diferentes estudos bioquímicos e farmacológicos. Com isso, ao usar drogas quimioterápicas, esse transporte facilitado aumenta o acúmulo intracelular dos fármacos com o objetivo de aumentar sua citotoxicidade. Uma vez que a eletroporação pode facilitar o transporte de fármacos apenas de moléculas que são pouco permeantes ou não permeantes, candidatos adequados para eletroquimioterapia são limitados àquelas drogas que são hidrofílicas e/ou não possuem um sistema de transporte na membrana. Vários medicamentos quimioterápicos foram testados *in vitro* para aplicação potencial em combinação com eletroporação de células. Entre os medicamentos testados, apenas dois foram identificados como potenciais candidatos à eletroquimioterapia de pacientes com câncer. O primeiro é a bleomicina, que é hidrofílica e tem transporte muito restrito através da membrana celular, mas sua citotoxicidade pode ser potencializada em até 1000 vezes pela eletroporação das células. Algumas centenas de moléculas internalizadas de bleomicina são suficientes para matar a célula. A segunda é a cisplatina, cujo transporte através da membrana celular também é dificultado na ausência da eletropermeabilização. Os primeiros estudos sugeriram que a cisplatina é transportada através da membrana plasmática principalmente por difusão passiva, enquanto estudos recentes demonstraram que os transportadores que controlam a homeostase do cobre intracelular estão significativamente envolvidos no influxo (Ctr1) e efluxo (ATP7A e ATP7B) da cisplatina [5]. A eletroporação da membrana plasmática permite maior fluxo e acúmulo da droga nas células, o que resulta em um aumento da citotoxicidade da cisplatina em até 80 vezes [6–8]. Esses dados pré-clínicos promissores obtidos *in vitro* em uma série de linhagens celulares diferentes abriram o caminho para o teste dessas duas drogas em eletroquimioterapia *in vivo* em diferentes modelos de tumor. Recentemente, o cálcio demonstrou ser um medicamento adequado para eletroquimioterapia. Sua citotoxicidade é aumentada e o método é denominado eletroporação de cálcio [9].

Estudos *in vivo*

A bleomicina e a cisplatina foram testadas em um protocolo de eletroquimioterapia em modelos animais *in vivo* (Fig. 2). Estudos

extensivos em diferentes modelos animais com diferentes tipos de tumores, sejam transplantáveis ou espontâneos, também foram realizados [6–8,10].

Nestes estudos, diferentes fatores que controlam a eficácia antitumoral foram determinados:

- ❖ Os medicamentos podem ser administrados por diferentes *vias de administração*, eles podem ser injetados por via intravenosa ou intratumoral. O pré-requisito é que, no momento da aplicação dos pulsos elétricos no tumor, esteja presente no tumor uma quantidade suficiente de fármaco. Portanto, após a administração intravenosa do fármaco em pequenos animais de laboratório (por exemplo 4 mg/kg de cisplatina ou 0,5 mg/kg de bleomicina), apenas alguns minutos de intervalo são necessários para atingir a concentração máxima do fármaco nos tumores. Após a administração intratumoral, esse intervalo é ainda mais curto e a aplicação de pulsos elétricos deve seguir a administração da droga o mais rápido possível (dentro de um minuto) [6–8].
 - ❖ Uma boa eficácia antitumoral pode ser alcançada com uma boa eletroporação do tecido. A eletroporação da membrana plasmática é obtida se a célula for exposta a um campo elétrico suficientemente alto. Isso depende da distribuição do campo elétrico no tecido, que é controlada pela geometria do eletrodo e pela composição do tecido. A distribuição do campo elétrico no tecido na eletroporação celular pode ser melhorada girando o campo elétrico. Tumores superficiais podem ser tratados com eficácia por eletrodos de placa, enquanto a distribuição apropriada do campo elétrico em partes mais profundas do tumor é assegurada pelo uso de eletrodos de agulha [11–13]
 - ❖ A eficácia antitumoral depende da *amplitude, número, frequência e duração* dos pulsos elétricos aplicados. Vários estudos nos quais foram usados eletrodos de placas para tumores de superfície mostraram que é necessária uma relação entre a voltagem e a distância dos eletrodos, e uma voltagem acima de 1000 V/cm para a eletroporação do tumor, e que acima de 1500 V/cm ocorreram alterações irreversíveis nos tecidos saudáveis adjacentes ao tumor. Para outros tipos de eletrodos, a distribuição do campo elétrico e, portanto, também a amplitude necessária dos pulsos elétricos, precisa ser determinada por cálculos numéricos. As frequências de repetição dos pulsos para eletroquimioterapia são de 1 Hz ou 5 kHz, com efeito igual se a concentração do fármaco presente no tumor for alta o suficiente. O número mínimo de pulsos usados é 4; a maioria dos estudos usa 8 pulsos elétricos de 100 μ s [12,14-16].
-

Todos os experimentos conduzidos *in vivo* em animais forneceram dados suficientes para demonstrar que a eletroquimioterapia com bleomicina ou cisplatina é eficaz no tratamento de tumores sólidos, usando concentrações de fármaco que têm nenhum ou mínimo efeito antitumoral sem a aplicação de pulsos elétricos. Um único tratamento por eletroquimioterapia induziu a regressão parcial ou completa dos tumores, enquanto o tratamento com bleomicina ou cisplatina isoladamente ou aplicação de pulsos elétricos isoladamente apresentaram nenhum ou mínimos efeitos antitumorais.

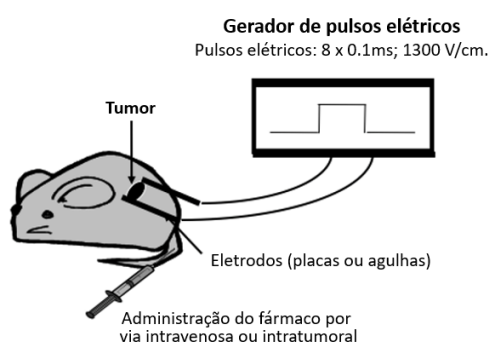


Figura 2: Protocolo de eletroquimioterapia de tumores experimentais apresentado esquematicamente. O fármaco é injetado por via intravenosa ou intratumoral em doses que geralmente não exercem efeito antitumoral. Após um intervalo que permite o acúmulo suficiente da droga nos tumores, pulsos elétricos são aplicados ao tumor através de eletrodos de placas ou agulhas. Os eletrodos são colocados de forma que todo o tumor seja englobado entre eles, proporcionando uma boa distribuição do campo elétrico para uma eletroporação ideal das células do tumor.

Mecanismos de ação

O principal mecanismo da eletroquimioterapia é a *eletroporação* das células tumorais, o que aumenta a eficácia do fármaco ao permitir que este atinja o alvo intracelular. Isso foi demonstrado em estudos que mediram o acúmulo intratumoral da droga e a quantidade de droga ligada ao DNA. Basicamente, as quantidades de bleomicina e cisplatina nos tumores eletroporados foram de 2 a 4 vezes maiores do que naqueles sem aplicação de pulsos elétricos [6–8]. Além da eletroporação de membrana, que facilita o transporte do fármaco e seu acúmulo na célula, foram descritos outros mecanismos que estão envolvidos na eficácia antitumoral da eletroquimioterapia. A aplicação de pulsos elétricos aos tecidos induz uma *redução transitória e reversível do fluxo sanguíneo* [17,18]. A restauração

do fluxo sanguíneo no tecido normal é muito mais rápida do que nos tumores [19,20]. O bloqueio vascular no tumor induz o *aprisionamento do fármaco* no tecido, proporcionando mais tempo para a ação da droga.

O efeito citotóxico da eletroquimioterapia não se limita apenas às células tumorais. A eletroquimioterapia também atua nas células do estroma, incluindo as células endoteliais no revestimento dos vasos sanguíneos do tumor, que sofrem morte celular [20]. Consequentemente, pela ação de ruptura vascular da eletroquimioterapia, ocorre uma cascata de morte das células tumorais devido a hipóxia de longa duração nos vasos afetados. Isso representa ainda outro mecanismo envolvido na eficácia antitumoral da eletroquimioterapia, ou seja, um efeito de ruptura vascular [21-23]. Esta ação de ruptura vascular da eletroquimioterapia é importante em situações clínicas em que nódulos tumorais hemorrágicos precisam ser tratados [24].

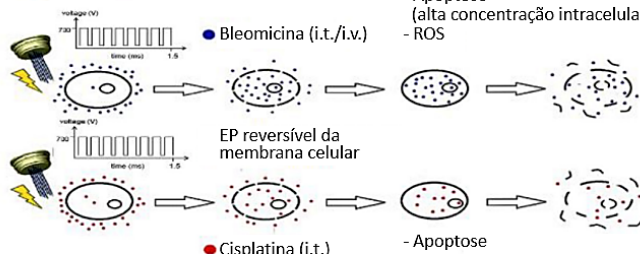
Uma diferença na eficácia antitumoral da eletroquimioterapia foi observada entre modelos experimentais imunocompetentes e imunodeficientes, indicando o envolvimento da resposta imune na eficácia antitumoral [25]. Devido a liberação maciça de antígenos tumorais após a eletroquimioterapia, a imunidade sistêmica pôde ser induzida e também suprarregulada por tratamento adicional com modificadores de resposta biológica como IL-2, IL-12, GM-CSF e TNF- α [25-30].

Em suma, o protocolo de eletroquimioterapia foi otimizado em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, e os mecanismos básicos foram elucidados. Além da eletroporação de células, o bloqueio vascular que leva ao aprisionamento de drogas em tumores, um efeito de ruptura vascular e envolvimento da resposta imune também foram demonstrados. Com base em todos esses dados, a eletroquimioterapia com bleomicina e cisplatina foi prontamente avaliada em ensaios clínicos e agora está em uso rotineiro em oncologia humana e veterinária.

1 - Efeito citotóxico direto:

Quebra de fita simples e dupla do DNA.

- Morte mitótica lenta (baixa concentração intracelular)
- Apoptose (alta concentração intracelular)
- ROS



2 - Efeito antivascular

- IMEDIATO bloqueio vascular (↓ wash-out do quimioterápico)
- Ação RETARDADA de disrupção vascular

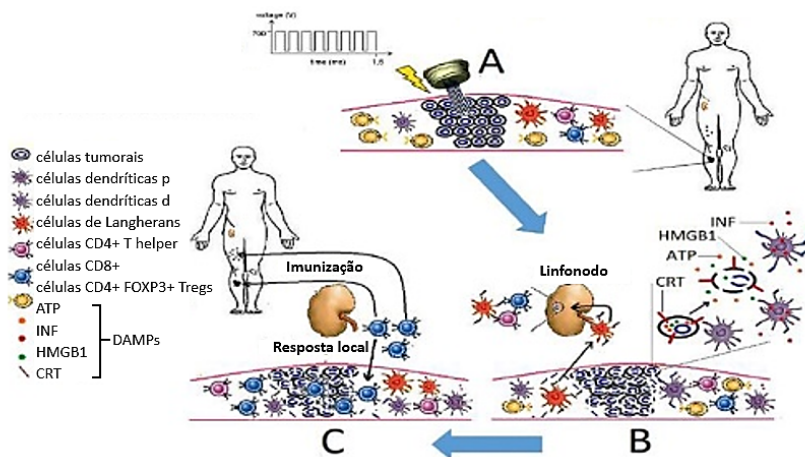
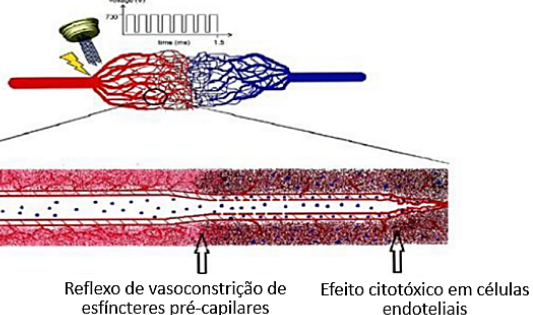


Figura 3: Mecanismos básicos da eletroquimioterapia; efeito citotóxico direto e indireto, desregulação vascular e imunomodulação. Com permissão de [3]

Estudos clínicos

O primeiro estudo clínico foi publicado em 1991, com tumores de cabeça e pescoço [31], seguido posteriormente por vários outros [2]. Esses estudos clínicos demonstraram a eficácia antitumoral da eletroquimioterapia usando bleomicina ou cisplatina, administrada por via intravenosa ou intratumoral. Além de nódulos de melanoma cutâneos ou subcutâneos, únicos ou múltiplos, foi demonstrada também sua eficácia em tumores de mama e de cabeça e pescoço, bem como sarcoma de Kaposi, adenocarcinoma renal, condrossarcoma e carcinoma basocelular. No entanto, esses estudos clínicos foram realizados com protocolos de tratamento ligeiramente variáveis, eletrodos diferentes e geradores de pulso elétrico diferentes. Assim, houve a necessidade de um estudo prospectivo multi-institucional, que foi conduzido por um consórcio de quatro centros oncológicos reunidos no projeto ESOPE (*European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy*) financiado pelo *European Commission's 5th Framework Programme*. Neste estudo, foi analisada a resposta ao tratamento após eletroquimioterapia de acordo com o tipo de tumor, fármaco utilizado, via de administração e tipo de eletrodos [32].

- Uma taxa de resposta objetiva de 85% (73,7% de taxa de resposta completa) foi alcançada para nódulos tumorais tratados com eletroquimioterapia, independente da histologia do tumor, do medicamento utilizado ou via de administração utilizada.
- Aos 150 dias após o tratamento, a taxa de controle antitumoral local foi de 88% com bleomicina administrada por via intravenosa, 73% com bleomicina administrada por via intratumoral e 75% com cisplatina administrada por via intratumoral, demonstrando que todas as três abordagens foram igualmente eficazes no controle do tumor local.
- Os efeitos colaterais foram mínimos e bem tolerados (contrações musculares e sensação de dor).

Os resultados do estudo ESOPE confirmaram os resultados relatados anteriormente sobre a eficácia da eletroquimioterapia e os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para eletroquimioterapia foram preparados [33].

O estudo ESOPE preparou o terreno para a introdução da eletroquimioterapia na Europa. Após os resultados encorajadores do estudo ESOPE, vários centros de câncer começaram a usar eletroquimioterapia e relataram os resultados de seus estudos. Coletivamente, os resultados foram novamente semelhantes aos relatados no estudo ESOPE. No entanto, alguns avanços no tratamento foram relatados. Predominantemente, foi relatado

que tumores maiores que 3 cm de diâmetro podem ser tratados com sucesso por eletroquimioterapia em sessões sucessivas de eletroquimioterapia [34,35]. Em geral, a eletroquimioterapia oferece um benefício aos pacientes, especialmente na qualidade de vida [35].

Uso clínico e procedimentos para tratamentos com eletroquimioterapia

Com base em todos esses relatos, a eletroquimioterapia foi reconhecida como uma opção de tratamento para melanoma cutâneo disseminado, e aceita em muitas diretrizes nacionais e internacionais para o tratamento do melanoma [36].

As vantagens do tratamento e o uso clínico da eletroquimioterapia podem ser resumidos da seguinte forma:

- Efetividade no tratamento de tumores de diferentes histologias em regiões cutânea e subcutâneas.
- Tratamento paliativo com melhora da qualidade de vida do paciente.
- Tratamento de escolha para tumores refratários a tratamentos convencionais.
- Tratamento citorrredutor anterior a ressecções cirúrgicas, com ação de preservação de órgãos.
- Tratamento de metástases hemorrágicas.

O tratamento após uma única sessão de eletroquimioterapia, na maioria dos casos, resulta na erradicação completa do tumor. Quando necessário, o tratamento pode ser repetido em intervalos de 4-8 semanas com igual eficácia antitumoral. O tratamento tem um bom efeito cosmético sem deixar cicatrizes no tecido tratado.

Em resumo, a eletroquimioterapia foi reconhecida como uma abordagem de tratamento válida; mais de 160 centros de oncologia começaram a utilizá-la e relataram resultados positivos. Até agora, a eficácia da terapia está em evidências baseadas em casos e mais estudos controlados e randomizados são necessários para a tradução desta tecnologia em uma prática clínica padrão e mais ampla. Para uma maior aceitação da eletroquimioterapia na comunidade médica, o primeiro passo importante foi dado, uma vez que a eletroquimioterapia para o tratamento de metástases cutâneas de melanoma e para o tratamento de carcinoma basocelular primário e carcinoma espinocelular primário foi recentemente listada nas

diretrizes do Instituto Nacional de Excelência em Saúde e Cuidados (*National Institute for Health and Care Excellence - NICE*).

Recentemente, todos os estudos publicados até 2012 sobre eletroquimioterapia no tratamento de nódulos superficiais foram analisados em uma revisão sistemática e meta-análise [37]. A análise dos dados confirmou que a eletroquimioterapia teve uma eficácia significativamente ($p < 0,001$) maior (em mais de 50%) do que o uso da bleomicina ou a cisplatina sozinhas, onde apenas 8% dos tumores estavam em remissão completa (RC). Após uma única eletroquimioterapia, o tratamento pode ser repetido com eficácia semelhante. A eficácia geral da eletroquimioterapia foi de 84,1% de respostas objetivas (OR), sendo que destas 59,4% foram de respostas completas (CR).

Com base na ampla aceitação da eletroquimioterapia como técnica ablativa local eficaz, o grupo de especialistas que esteve envolvido na preparação do primeiro SOP preparou uma versão atualizada do SOP [38]. São descritas as indicações, potenciais efeitos colaterais e procedimentos para a execução segura e eficaz da eletroquimioterapia. A escolha da administração do medicamento e da anestesia depende do tamanho e do número de nódulos tumorais a serem tratados (fig. 4).

	Considerar anestesia local / Aplicação local do fármaco	Considerar anestesia geral/ Aplicação intravenosa do fármaco
Tamanho do tumor	≤ 3 cm	> 3 cm
Nº de tumores	≤ 7	> 7 cm
Região adequada para anestesia local	Sim	Não

Figura 4: Decisão sobre a estratégia de tratamento com base no número e tamanho dos tumores a serem tratados. Com permissão de [38].

Novas aplicações clínicas da eletroquimioterapia

Tendo como base a experiência clínica de que a eletroquimioterapia pode ser efetivamente utilizada no tratamento de cânceres com diferentes histologias, quando adequadamente executada, propôs-se também sua

utilização para o tratamento de tumores profundos. O pré-requisito para isso é um maior desenvolvimento da tecnologia a fim de alcançar e tratar eficazmente os tumores localizados em músculos, fígado, ossos, esôfago, reto, cérebro e demais órgãos internos.

Os primeiros relatos já foram publicados no tratamento de metástases hepáticas colorretais (Fig. 5) [39], carcinoma hepatocelular [40], tumores pancreáticos, metástases ósseas e tumores colorretais [4]. Essas abordagens têm sido realizadas durante a cirurgia aberta, porém a perspectiva futura é do uso por tratamento percutâneo. Algumas tentativas já foram publicadas como relatos de casos [41–43].

Uma nova indicação clínica importante do tratamento é seu uso em tumores de cabeça e pescoço. Nesta indicação encontra-se o maior número de tumores tratados recentemente [44,45]. A eletroquimioterapia também está ganhando importância no tratamento do carcinoma basocelular, onde respostas completas mais elevadas (> 90%) são obtidas [44].

O futuro da eletroquimioterapia também está no tratamento combinado com a imunoterapia. A eletroquimioterapia induz a morte celular imunogênica, que pode servir como imunização *in situ* para a combinação com inibidores de checkpoint imunológico. Esse conceito já está sendo verificado em estudos clínicos [26,46]. Outra abordagem é também combiná-la com terapias gênicas, por exemplo, com eletrotransferência gênica de plasmídeo que codifiquem IL-12 [47]. Este conceito já foi testado em estudos pré-clínicos, mas aguarda verificação também na oncologia humana.

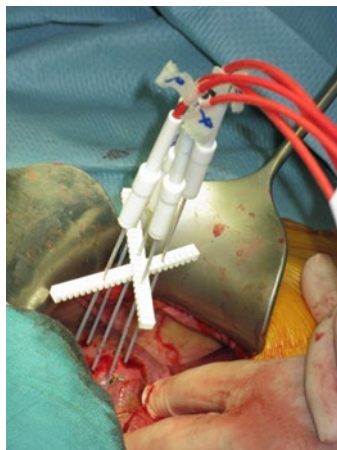


Figura 5: Eletroquimioterapia de metástases hepáticas. Eletrodos foram inseridos no tumor e ao redor do tumor em tecido hepático saudável e conectados ao gerador

de pulsos elétricos. Pulsos elétricos foram administrados entre os pares de eletrodos de acordo com o plano de tratamento.

Conclusão

A eletroquimioterapia é uma das aplicações biomédicas da eletroporação. Seu desenvolvimento alcançou aplicação clínica e é um exemplo de medicina translacional de sucesso. No entanto, seu desenvolvimento ainda não foi concluído; novos desenvolvimentos técnicos certamente permitirão usos clínicos adicionais e, eventualmente, benefícios clínicos para os pacientes. Outra aplicação da eletroporação ainda aguarda essa translação, a terapia gênica baseada na eletrotransferência gênica.

Referências

- [1] Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16(1):295–320.
 - [2] Miklavcic D, Mali B, Kos B, Heller R, Sersa G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online.* 2014;13(1):29.
 - [3] Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, Marconato R, Valpione S, Imarisio I, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors - Current status:: Basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. *Semin Oncol.* 2019 Apr;46(2):173–91.
 - [4] Campana LG, Edhemovic I, Soden D, Perrone AM, Scarpa M, Campanacci L, et al. Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. *Eur J Surg Oncol.* 2019 Feb;45(2):92–102.
 - [5] Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol Pharmacol.* 2010 Jun;77(6):887–94.
 - [6] Mir LM. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry.* 2001 Jan;53(1):1–10.
 - [7] Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(4):437–47.
 - [8] Mir LM. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl.* 2006 Nov 1;4(11):38–44.
 - [9] Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Tramm T, Eriksen J, Gehl J. Direct Therapeutic Applications of Calcium Electroporation to Effectively Induce Tumor Necrosis. *Cancer Res.* 2012 Mar 15;72(6):1336–41.
 - [10] Vásquez JL, Ibsen P, Lindberg H, Gehl J. In vitro and in vivo experiments on electrochemotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 2015 Mar;193(3):1009–15.
-

- [11] Miklavcic D, Beravs K, Semrov D, Cemazar M, Demsar F, Sersa G, et al. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys J*. 1998;74(5):2152–8.
- [12] Miklavcic D, Corovic S, Pucihar G, Pavselj N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy. *Eur J Cancer, Suppl*. 2006;4(11):45–51.
- [13] Corovic S, Al Sakere B, Haddad V, Miklavcic D, Mir LM. Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2008;7(5):393–400.
- [14] Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(2):232–40.
- [15] Miklavcic D, Pucihar G, Pavlovic M, Ribarič S, Mali M, Maček-Lebar A, et al. The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*. 2005;65(2):121–8.
- [16] Sersa G, Kranjc S, Scancar J, Krzan M, Cemazar M. Electrochemotherapy of mouse sarcoma tumors using electric pulse trains with repetition frequencies of 1 Hz and 5 kHz. *J Membr Biol*. 2010;236(1):155–62.
- [17] Sersa G, Cemazar M, Parkins CS, Chaplin DJ. Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer*. 1999;35(4):672–7.
- [18] Bellard E, Markelc B, Pelofy S, Le Guerroué F, Sersa G, Teissie J, et al. Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electroporation. *J Control Release*. 2012 Nov 10;163(3):396–403.
- [19] Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2002 Jan;1569(1–3):51–8.
- [20] Cemazar M, Parkins CS, Holder AL, Chaplin DJ, Tozer GM, Sersa G. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *Br J Cancer*. 2001 Feb 15;84(4):565–70.
- [21] Jarm T, Cemazar M, Miklavcic D, Sersa G. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(5):729–46.
- [22] Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer a, Podkrajsek M, Sentjurc M, et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer*. 2008;98(2):388–98.
- [23] Markelc B, Bellard E, Sersa G, Pelofy S, Teissie J, Coer A, et al. In vivo molecular imaging and histological analysis of changes induced by electric pulses used for plasmid DNA electrotransfer to the skin: a study in a dorsal window chamber in mice. *J Membr Biol*. 2012 Sep 27;245(9):545–54.
- [24] Gehl J, Geertsen PF. Palliation of haemorrhaging and ulcerated cutaneous tumours using electrochemotherapy. *Eur J Cancer Suppl*. 2006 Nov 1;4(11):35–7.
- [25] Serša G, Miklavcic D, Čemazar M, Belehradek J, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochemistry Bioenerg*. 1997;43:279–83.
- [26] Calvet CY, Mir LM. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with

- immunotherapy [Internet]. Vol. 35, Cancer metastasis reviews. Springer; 2016 [cited 2016 May 19]. p. 165–77.
- [27] Sersa G, Cemazar M, Menart V, Gaberc-Porekar V, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy is increased by TNF- α on SA-1 tumors in mice. *Cancer Lett.* 1997;116:85–92.
- [28] Mir LM, Roth C, Orłowski S, Quintin-Colonna F, Fradelizi D, Belehradek J, et al. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2. *J Immunother.* 1995 Jan;17(1):30–8.
- [29] Heller L, Pottinger C, Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumor immunity. *Melanoma Res.* 2000;10(6):577–83.
- [30] Cemazar M, Todorovic V, Scancar J, Lamprecht U, Stimac M, Kamensek U, et al. Adjuvant TNF- α therapy to electrochemotherapy with intravenous cisplatin in murine sarcoma exerts synergistic antitumor effectiveness. *Radiol Oncol.* 2015 Mar;49(1):32–40.
- [31] Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orłowski S, Poddevin B, Belehradek J, et al. [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III.* 1991;313(13):613–8.
- [32] Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer, Suppl.* 2006;4(11):3–13.
- [33] Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer, Suppl.* 2006;4(11):14–25.
- [34] Campana LG, Mocellin S, Basso M, Puccetti O, De Salvo GL, Chiarion-Sileni V, et al. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(1):191–9.
- [35] Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M, Illengo M, Rissone M, et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(8):2215–22.
- [36] Testori a., Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild a., et al. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol.* 2009;20(SUPPL. 4):22–9.
- [37] Mali B, Jarm T, Snoj M, Sersa G, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Jan;39(1):4–16.
- [38] Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol (Madr).* 2018 Jul 3;57(7):874–82.
- [39] Edhemovic I, Breclj E, Gasljevic G, Marolt Music M, Gorjup V, Mali B, et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol.* 2014 Sep 1;110(3):320–7.
-

- [40] Djokic M, Cemazar M, Popovic P, Kos B, Dezman R, Bosnjak M, et al. Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study. *Eur J Surg Oncol*. 2018 May 1;44(5):651–7.
- [41] Tarantino L, Busto G, Nasto A, Nasto RA, Tarantino P, Fristachi R, et al. Electrochemotherapy of cholangiocellular carcinoma at hepatic hilum: A feasibility study. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Oct;44(10):1603–9.
- [42] Cornelis FH, Korenbaum C, Ben Ammar M, Tavoraro S, Nouri-Neuville M, Lotz JP. Multimodal image-guided electrochemotherapy of unresectable liver metastasis from renal cell cancer. *Diagn Interv Imaging*. 2019 May;100(5):309–11.
- [43] Cornelis FH, Ben Ammar M, Nouri-Neuville M, Matton L, Benderra MA, Gligorov J, et al. Percutaneous Image-Guided Electrochemotherapy of Spine Metastases: Initial Experience. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2019 Aug 22;
- [44] Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, Occhini A, Plaschke CC, Grosej A, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *Eur J Cancer*. 2016 Aug;63:41–52.
- [45] Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, Grau JJ, de Bree R, Sersa G, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer*. 2017 Dec;87:172–81.
- [46] Sersa G, Teissie J, Cemazar M, Signori E, Kamensek U, Marshall G, et al. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Oct;64(10):1315–27.
- [47] Milevoj N, Tratar UL, Nemec A, Brožič A, Žnidar K, Serša G, et al. A combination of electrochemotherapy, gene electrotransfer of plasmid encoding canine IL-12 and cytoreductive surgery in the treatment of canine oral malignant melanoma. *Res Vet Sci*. 2019 Feb;122:40–9.

Agradecimentos

Esta investigação foi financiada pela Agência de Pesquisa da República Eslovêna e foi realizada no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA) e resultou dos esforços de colaborações da Ação COST TD1104 (www.electroporation.net).



Gregor Serša, formou-se na Faculdade de Biotécnica da Universidade de Liubliana em 1978, onde atualmente é professor de biologia molecular. Trabalha no Instituto de Oncologia de Liubliana como chefe do Departamento de Oncologia Experimental. Seu campo de interesse específico é o efeito do campo elétrico em células tumorais e tumores como sistema de entrega de fármaco e genes em diferentes abordagens terapêuticas. Além do trabalho experimental, ele está ativamente envolvido na educação de alunos de graduação e pós-graduação na Universidade de Liubliana.

Capítulo 10

Eletroquimioterapia na Prática Clínica - Lições de Desenvolvimento, Implementação e Perspectivas Futuras

Julie Gehl

Oncologia Clínica da Universidade de Copenhague, Dinamarca.

Resumo: Em apenas duas décadas, a eletroquimioterapia evoluiu de um tratamento experimental para uma terapia padrão. Este capítulo descreve esse desenvolvimento e também detalha como uma nova tecnologia pode ser implementada para beneficiar pacientes. A eletroquimioterapia é uma tecnologia que envolve o uso de pulsos elétricos e quimioterapia. Assim, o desenvolvimento desta tecnologia exigiu que especialistas em biologia, engenharia e medicina se unissem para alcançar essa conquista. Este capítulo descreve o desenvolvimento de equipamentos, bem como procedimentos operacionais padrão, para tratamentos com eletroquimioterapia. Este capítulo também trata do compartilhamento do conhecimento sobre o uso da tecnologia, garantindo o acesso dessas informações pelos pacientes.

Desenvolvimento da eletroquimioterapia

Os estudos iniciais sobre a organização da membrana celular e sobre a deformação dessa membrana por forças elétricas foram realizados ao longo das décadas de 1960 e 1970, principalmente. Em 1977, a ruptura de eritrócitos foi descrita em um artigo da Nature [1], e outro artigo altamente influente foi o estudo de Neumanns de 1982 [2], demonstrando a

eletrotransferência de DNA, que é agora um dos métodos laboratoriais mais frequentemente usados em biologia molecular.

Um campo muito ativo na terapia do câncer nas décadas de 1970 e 80 era a resistência a terapias medicamentosas, e havia grande otimismo de que a compreensão da resistência à terapia poderia levar à cura do câncer. Diferentes sistemas importantes de resistência celular foram descobertos, por exemplo, o transportador de múltiplas drogas Glicoproteína-P, que permite às células cancerosas exportar quimioterápicos de seu interior [3]. Neste cenário, a eletroporação era uma nova tecnologia que permitia contornar a resistência baseada em membrana simplesmente abrindo um canal através da membrana celular, permitindo que drogas não permeáveis entrassem.

Uma série de estudos foram publicados sobre o aumento da citotoxicidade do fármaco devido a eletroporação *in vitro* [4,5], e também *in vivo* [6], principalmente pelo grupo de Lluís Mir no Institut Gustave-Roussy, na França. Foi por este grupo também que, em um notável curto espaço de tempo, o primeiro estudo clínico foi relatado, os resultados preliminares em francês em 1991 e a publicação final em 1993 [7]. Alguns anos depois [8], surgiram os primeiros estudos dos Estados Unidos, bem como estudos da Eslovênia [9] e da Dinamarca [10].

Com o intuito de criar um equipamento de eletroporação para uso clínico, que fosse capaz de realizar tanto a terapia gênica quanto eletroquimioterapia, que pudesse ser adaptado pelo usuário para acomodar desenvolvimentos, que fosse um instrumento útil para o médico aplicador, isto é, que mostrasse com precisão registros da voltagem e corrente elétrica do tratamento, formou-se o consórcio Cliniporator. Este consórcio europeu desenvolveu e testou o eletroporador Cliniporator [11,12].

Posteriormente se estabeleceu o consórcio europeu denominado ESOPE (*European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy*), que buscou obter a aprovação do Cliniporator para uso clínico, a fim de produzir eletrodos para este equipamento, para testar o sistema em um protocolo clínico, bem como para fazer procedimentos operacionais padrão.

Quatro grupos entraram no estudo clínico, dos quais três tinham experiência anterior com eletroquimioterapia. E os métodos usados diferiram entre esses três centros.

Na França, foi utilizado um eletrodo hexagonal com 7,9 mm entre os eletrodos, e uma sequência de disparos permitindo que cada um dos sete eletrodos fosse acionado aos pares 8 vezes, num total de 96 pulsos entregues em alta frequência, com voltagem de 1,3 kV/cm (voltagem para relação da distância dos eletrodos). Os pacientes foram sedados, a bleomicina foi administrada por via endovenosa e o procedimento foi realizado em uma sala de cirurgia [7].

Nos estudos eslovenos, os pacientes foram tratados com cisplatina por via intratumoral, e com eletrodos de placas, usando 1,3 kV/cm, anestesia não descrita. Os pulsos foram administrados em duas sequências de quatro pulsos cada [9].

Na Dinamarca, utilizou-se bleomicina por via intratumoral, um eletrodo de agulhas de matriz linear de duas fileiras opostas, usando 1,2 kV/cm, 8 pulsos a 1 Hz. Foi utilizada anestesia local com lidocaína [10].

Em outras palavras, houve acordo sobre o propósito geral, mas três abordagens diferentes. O estudo ESOPE [13] reuniu essas três abordagens e, do ponto de vista técnico, os três diferentes eletrodos foram fabricados, e a conclusão final sobre o uso dos diferentes métodos e eletrodos foi definida em colaboração.

Os procedimentos operacionais padrão (POPs) [14] são muito detalhados, permitindo que um recém-chegado ao campo implemente o procedimento imediatamente. Assim, é descrito como administrar o medicamento e pulsos, como tomar decisões de tratamento e como avaliar a resposta e realizar o acompanhamento.

Os POPs, juntamente com a disponibilidade de equipamentos certificados, marcaram uma mudança dramática no uso da eletroquimioterapia. Assim, quando os procedimentos operacionais padrão foram publicados em 2006, apenas alguns centros europeus utilizavam a técnica, e após a publicação dos procedimentos o número de centros aumentou rapidamente e hoje é superior a 140. Estima-se que este número continue a crescer, e que os geradores, agora colocados em várias instituições, serão cada vez mais utilizados também para novas futuras indicações.

Implementação

Em um mundo ideal, novos desenvolvimentos na terapia do câncer tornam-se imediatamente disponíveis para os pacientes. Mas a experiência mostra que a partir do desenvolvimento da tecnologia, e do surgimento dos primeiros resultados, ainda há um longo caminho a ser percorrido para que um paciente possa ser encaminhado ao tratamento, caso este seja relevante para o caso em questão. Em primeiro lugar, o equipamento eletroporador deve estar presente em cada instituição, juntamente com cirurgiões experientes e oncologistas treinados para realizar o tratamento. A montagem logística deve ser feita, e isso inclui disponibilidade de tempo nas salas de cirurgia e suporte de enfermagem competente. Os pacientes precisam saber que o tratamento é uma opção. Como a eletroquimioterapia

é uma opção para pacientes que sofrem de diversos tipos de câncer, é necessário um trabalho contínuo para direcionar especialistas nas diferentes áreas. As informações disponíveis na internet podem ser um importante recurso tanto para os pacientes quanto para os profissionais.

Vários países têm diferentes mecanismos de aprovação para novos tratamentos e o endosso pode ser uma tarefa demorada. A agência nacional europeia mais renomada, o Instituto Nacional de Excelência em Saúde e Cuidados (*National Institute for Health and Care Excellence - NICE*), no Reino Unido, tem um escrutínio rigoroso de novas tecnologias e disponibiliza gratuitamente seus documentos centrais. O NICE tem orientações para eletroquimioterapia para metástases cutâneas e cânceres de pele primários, respectivamente [15,16]. Essas recomendações nacionais, bem como a integração da eletroquimioterapia em diretrizes específicas (ver, por exemplo, [17]) são muito importantes para melhorar a acessibilidade ao tratamento.

Pesquisa

Um ponto muito importante é que os procedimentos operacionais padrão foram uma base de muito valor - mas devem se manter com experiências mais detalhadas e desenvolvimentos adicionais. Vários grupos publicaram estudos adicionais sobre eletroquimioterapia, ampliando a base de conhecimento e respondendo a questões específicas de importância clínica [18-26].

Além disso, a eletroquimioterapia está sendo desenvolvida para uma série de novas indicações, incluindo câncer de mucosa de cabeça e pescoço, câncer gastrointestinal, câncer de pulmão (primário e secundário), cânceres ginecológicos, sarcoma, metástases ósseas, bem como metástases cerebrais. Para cada uma dessas indicações, procedimentos operacionais padrão precisarão ser desenvolvidos, a fim de permitir a disseminação do tratamento.

Referências

- [1] Kinosita K, Tsong TY. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 1977;268:438-41.
- [2] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982;1(7):841-45.
- [3] Skovsgaard T, Nissen NI. Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacol Ther* 1982;18(3):293-311.

- [4] Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *JpnJCancer Res* 1987;78(0910-5050 SB - M SB - X):1319-21.
 - [5] Orłowski S, Belehradec Jr J, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology* 1988;37(24):4727-33.
 - [6] Mir LM, Orłowski S, Belehradec J, Jr., Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991;27(1):68-72.
 - [7] Belehradec M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradec Jr J, Mir LM. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 1993;72(12):3694-700.
 - [8] Heller R. Treatment of cutaneous nodules using electrochemotherapy. [Review] [32 refs]. *Journal of the Florida Medical Association* 1995;82(2):147-50.
 - [9] Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Jancar B, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *European Journal of Cancer* 1998;34(8):1213-18.
 - [10] Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000;10(6):585-9.
 - [11] Andre FM, Gehl J, Sersa G, Preat V, Hojman P, Eriksen J, et al. Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin. *Human Gene Therapy* 2008;19(11):1261-71.
 - [12] Hojman P, Gissel H, Andre F, Cournil-Henrionnet C, Eriksen J, Gehl J, et al. Physiological effect of high and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *HumGene Ther* 2008(1557-7422 (Electronic)).
 - [13] Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Ejc Supplements* 2006;4(11):3-13.
 - [14] Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements* 2006;4(11):14-25.
 - [15] National Institute for Health and Care Excellence. Electrochemotherapy for metastases in the skin from tumours of non-skin origin and melanoma. <http://publications.nice.org.uk/electrochemotherapy-for-metastases-in-the-skin-from-tumours-of-non-skin-origin-and-melanoma-ipg446> 2013.
 - [16] (NICE) NIfHaCE. Electrochemotherapy for primary basal cell carcinoma and primary squamous cell carcinoma. www.nice.org.uk 2014.
 - [17] Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51(14):1989-2007.
 - [18] Matthiessen LW, Chalmers RL, Sainsbury DC, Veeramani S, Kessell G, Humphreys AC, et al. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2011;50:621-29.
-

- [19] Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW, Moss T, Kamby C, Gehl J. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial. *Acta Oncologica* 2012;51(6):713-21.
- [20] Campana LG, Valpione S, Falci C, Mocellin S, Basso M, Corti L, et al. The activity and safety of electrochemotherapy in persistent chest wall recurrence from breast cancer after mastectomy: a phase-II study. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134:1169-78.
- [21] Campana LG, Bianchi G, Mocellin S, Valpione S, Campanacci L, Brunello A, et al. Electrochemotherapy treatment of locally advanced and metastatic soft tissue sarcomas: results of a non-comparative phase II study. *World JSurg* 2014;38:813-22.
- [22] Campana LG, Mali B, Sersa G, Valpione S, Giorgi CA, Strojancic P, et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. *BrJ Oral Maxillofac Surg* 2014.
- [23] Curatolo P, Mancini M, Clerico R, Ruggiero A, Frascione P, Di Marco P, et al. Remission of extensive merkel cell carcinoma after electrochemotherapy. *Arch Dermatol* 2009;145(4):494-5.
- [24] Curatolo P, Quaglino P, Marengo F, Mancini M, Nardo T, Mortera C, et al. Electrochemotherapy in the treatment of Kaposi sarcoma cutaneous lesions: a two-center prospective phase II trial. *Ann Surg Oncol* 2012;19(1):192-8.
- [25] Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M, Illengo M, Rissone M, et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2215-22.
- [26] Quaglino P, Matthiessen LW, Curatolo P, Muir T, Bertino G, Kunte C, et al. Predicting patients at risk for pain associated with electrochemotherapy. *Acta Oncol* 2015;54(3):298-306.



Julie Gehl chefia o Centro de Eletrotransferência Experimental de drogas e genes do Departamento de Oncologia do Hospital Herlev da Universidade de Copenhagen. O centro realiza investigações pré-clínicas e clínicas do uso de eletrotransferência na entrega de medicamentos e genes. Julie Gehl é médica e especialista em oncologia. Dra. Gehl tem um extenso registro de publicações, é uma investigadora principal experiente e orientou vários alunos de PhD e demais acadêmicos.

Capítulo 11

Desenvolvimento de aparelhos e eletrodos

Damijan Miklavčič, Matej Reberšek

Universidade de Liubliana, Faculdade de Engenharia Elétrica, Liubliana, Eslovênia

Resumo: Desde os primeiros relatos sobre eletroporação, surgiram inúmeras aplicações biotecnológicas e biomédicas tendo a técnica como base. Os geradores de pulsos elétricos necessários são caracterizados pela forma dos pulsos e suas características: amplitude e duração do pulso. Além disso, os eletrodos são a “conexão” importante entre as células/tecido e o gerador de pulso. A geometria dos eletrodos, juntamente com as propriedades das células/tecidos determinam a potência de saída necessária e a energia que os eletroporadores precisam fornecer. A escolha do eletroporador depende da aplicação biotecnológica e biomédica, mas também está intrinsecamente ligado à escolha dos eletrodos.

Introdução

Desde os primeiros relatórios sobre eletroporação (irreversível e reversível), uma série de aplicações desenvolvidos e a lista de possibilidades baseadas em eletroporação estão aumentando constantemente. Os primeiros geradores de pulso eram de construção simples, e forneceram pulsos com declínio exponencial de até vários milhares de volts. Além disso, os eletrodos eram muito simples em seu design - geralmente eletrodos de placas paralelas com alguns milímetros de distância entre eles eram usados e células em suspensão eram colocadas entre eles [1]. Mais tarde, novos geradores de pulso foram desenvolvidos, os quais eram/são capazes de fornecer quase todas as formas de pulso, e também os eletrodos que podem ser comprados são extremamente diversos

[2-6]. É importante notar que atualmente na maioria dos dispositivos que estão sendo usados geram pulsos retangulares.

A amplitude dos pulsos e sua duração dependem fortemente da aplicação biotecnológica/biomédica. Para a eletroquimioterapia, na maioria das vezes, são necessários pulsos de 1000 V com duração de 100 μ s. Para a transferência efetiva de genes, são usados pulsos mais longos de 5-20 ms, mas de amplitude inferior, ou uma combinação de pulsos curtos de alta e mais longos de baixa voltagem. Para outras aplicações, como ablação de tecidos por meio de eletroporação irreversível ou esterilização de água ou alimentos líquidos, milhares de pulsos voltaicos são necessários. Além da amplitude e duração do pulso, um parâmetro importante a ser levado em consideração é também a potência e a energia que precisam ser fornecidas pelo gerador.

A energia que precisa ser fornecida é governada pela voltagem, corrente e duração do pulso e/ou número de pulsos. A corrente, se a voltagem for ajustada, é governada pela carga, e isso é determinado pela geometria da carga, e a carga é determinada pela geometria da amostra de tecido/célula e sua condutividade elétrica. A geometria do tecido a ser exposto aos pulsos elétricos determina predominantemente a forma dos eletrodos, a distância entre eles, a profundidade de penetração/imersão do eletrodo no tecido. A condutividade elétrica da suspensão de células/tecido depende do tipo de tecido ou das propriedades da amostra celular, e pode ser consideravelmente aumentada enquanto tecido/células são expostos a pulsos elétricos de amplitude suficiente.

Com base nas considerações acima, nenhum único gerador de pulsos atenderá a todas as aplicações e necessidades de um pesquisador [7]. Pode-se buscar um gerador de pulsos especializado que fornecerá apenas os pulsos especificamente para essa aplicação biotecnológica ou biomédica, ou um gerador de pulsos de uso geral que permitirá gerar “quase” tudo o que o pesquisador achar interessante em sua pesquisa. Independentemente da escolha, ela deve estar ligada também à escolha dos eletrodos [8–10].

Aplicações terapêuticas e tecnológicas da eletroporação

Atualmente a eletroporação é amplamente utilizada em várias aplicações biológicas, médicas e biotecnológicas [11-16]. A ablação de tecidos baseada na eletroporação irreversível tem menos de uma década, mas sua eficácia é promissora, especialmente no tratamento de tecidos não malignos, na área de tratamento de água (onde a eficácia do tratamento químico é aumentada pela eletroporação) e na preservação de alimentos,

onde a eletroporação foi comprovada, em alguns casos, como sendo tão eficaz quanto a pasteurização [17]. Em contraste, as aplicações baseadas em eletroporação reversível estão atualmente mais difundidas e estabelecidas em diferentes protocolos experimentais e/ou práticos. Provavelmente, o mais importante deles é a introdução de uma quantidade definida de moléculas pequenas ou grandes no citoplasma através da membrana plasmática. Além disso, uma ligeira variação dos parâmetros do campo elétrico pode resultar em uma utilização onde moléculas podem ser inseridas diretamente na própria membrana plasmática ou as células podem ser efetivamente fusionadas.

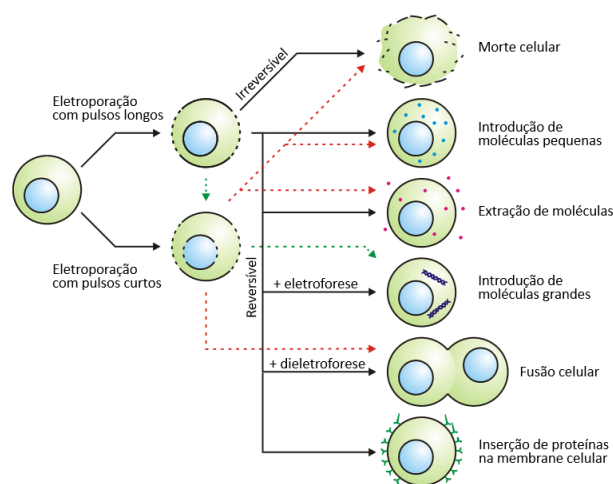


Figura 1: A exposição de uma célula a um campo elétrico pode resultar na permeabilização da membrana celular ou em sua destruição. Neste processo, os parâmetros do campo elétrico desempenham um papel fundamental. Se esses parâmetros estiverem dentro de certa faixa, a permeabilização é reversível; portanto, pode ser usado em aplicações como introdução de moléculas pequenas ou grandes no citoplasma, inserção de proteínas na membrana celular ou até mesmo fusão celular.

Eletroquimioterapia

A aplicação mais representativa da entrega de pequenas moléculas por meio de membrana eletroporada é a eletroquimioterapia. Foi demonstrado em vários estudos pré-clínicos e clínicos, tanto em humanos quanto em animais, que a eletroquimioterapia pode ser usada como tratamento de escolha no tratamento do câncer local [18]. Na maioria das vezes, uma série

de pulsos retangulares curtos de 100 μ s com amplitudes de até 1000 V são aplicados. O número de pulsos normalmente administrados é 8. Eles podem ser administrados na frequência de repetição de pulso de 1 Hz ou 5 kHz [19]. Novos desenvolvimentos tecnológicos foram disponibilizados para o tratamento de tumores profundos, onde pulsos de 3000 V, 50 A e 100 μ s são entregues [20]. Avanços recentes no tratamento de metástases hepáticas e ósseas e sarcoma de tecidos moles foram relatados [20-23]. Recentemente, foi demonstrado que a eletroquimioterapia *in vitro* é possível com pulsos de eletroporação bipolares de alta frequência que têm 1-1-1 μ s de comprimento (pulso positivo - pausa - pulso negativo - pausa) e têm amplitude 2,5 vezes maior do que pulsos de 100 μ s [23].

Ablação tecidual por eletroporação irreversível não-térmica (IRE)

A ablação de tecidos indesejáveis por meio do uso de eletroporação irreversível foi recentemente sugerida como um método minimamente invasivo para remoção de tumores, mas também pode ser usada na ablação de tecido cardíaco em vez de ablação térmica do tecido por radiofrequência (RF) ou outras técnicas de ablação de tecido [12-24,25]. Da mesma forma que a eletroquimioterapia, pulsos de 50 ou 100 μ s com amplitudes de até 3000 V são usados [26]. O número de pulsos entregues ao tecido-alvo é, no entanto, consideravelmente maior. Se na eletroquimioterapia são administrados 8 pulsos, nesta técnica são usados 90 ou mais pulsos. A frequência de repetição do pulso deve ser baixa, entorno de 1 ou 4 Hz, para evitar aquecimento excessivo [27]. Para evitar a contração muscular durante a IRE, foi sugerido o uso de pulsos de eletroporação de alta frequência H-FIRE [28]. A duração dos pulsos H-FIRE é de cerca de 1 μ s e são usadas amplitudes cerca de 2 vezes maiores do que para pulsos de 50 ou 100 μ s.

Eletrotransferência gênica

Um material genético exógeno pode ser entregue às células usando métodos não virais, como a eletropermeabilização, por exemplo [29]. A eletrotransfecção pode ser alcançada usando: pulsos de decadência exponencial; pulsos de onda quadrada com sinais de RF sobrepostos; ou apenas pulsos de onda quadrada longa, de até 20 ms, e com amplitudes variando de 200 a 400 V [30]. Embora nenhum consenso seja alcançado

ainda, pode-se afirmar que pulsos mais longos são geralmente mais usados na transfecção de genes do que na eletroquimioterapia, com poucas exceções [31]. Além disso, dois papéis distintos de pulsos elétricos foram descritos. Em experimentos onde vários pulsos curtos de alta voltagem (por exemplo, $8 \times 100 \mu\text{s}$ de 1000 V) foram seguidos por longos pulsos de baixa voltagem (por exemplo, $1 \times 100 \text{ms}$ de 80 V) [32], foi demonstrado que pulsos curtos de alta voltagem permeabilizam a membrana, enquanto os pulsos de baixa voltagem e mais longos têm um efeito eletroforético no próprio DNA, facilitando a interação do plasmídeo com a membrana [33].

Eletrofusão

Até agora, apresentamos aplicações de eletroporação que são usadas para introduzir diferentes moléculas no citoplasma ou na membrana plasmática da célula. Mas a eletroporação da membrana plasmática também pode resultar na fusão das células. Este processo foi denominado eletrofusão. Os primeiros relatos de eletrofusão de células *in vitro* datam de 1980. Nestes relatos, foi demonstrado que a fusão entre duas células pode ocorrer apenas se as células estiverem em contato antes ou imediatamente após a eletroporação. O contato entre as células pode ser obtido tanto pela conexão dieletrorética de células vizinhas, que é seguida por eletroporação, quanto por centrifugação da suspensão celular após exposição ao campo elétrico. Em ambos os casos as células devem ser reversivelmente permeabilizadas, caso contrário, perdem a viabilidade e não há eletrofusão [34]. A eletrofusão *in vitro* é possível devido à alta possibilidade de movimento celular enquanto as células nos tecidos são mais ou menos fixas; no entanto, a eletrofusão *in vivo* foi observada em tumores de melanoma B16, bem como fusão de células à tecidos [35, 36]. A eletrofusão de células de diferentes tamanhos pode ser alcançada por campos elétricos pulsados em nanossegundos [37].

Eletroextração

A eletroporação pode ser usada para extrair substâncias (por exemplo, suco, açúcares, pigmentos, lipídios e proteínas) de tecidos ou células biológicas (por exemplo, frutas, beterraba sacarina, microalgas, vinho e levedura). A eletroextração pode ser mais eficiente em termos de energia e extração, e mais rápida do que os métodos clássicos de extração (pressão, desnaturação térmica e fermentação) [38-42]. Uma avaliação econômica da

produção de bioenergia baseada em microalgas foi feita recentemente [43]. Foram elaboradas recomendações sobre as principais informações a serem relatadas em estudos biotecnológicos devido à variabilidade nos resultados obtidos em diferentes laboratórios [44].

Eletropasteurização e Eletroesterilização

A eletroporação irreversível pode ser usada em aplicações onde a destruição de microrganismos se faz necessária, ou seja, processamento de alimentos e tratamento de água [45]. Ainda assim, o uso de eletroporação irreversível nessas aplicações significa que a substância sob tratamento é exposta a um campo elétrico limitado, uma vez que é desejável que não ocorram mudanças na substância tratada (por exemplo, mudança de sabor do alimento) e que nenhum subproduto surja devido ao campo elétrico da exposição (por exemplo, subprodutos causados pela eletrólise). Esta é uma das razões pelas quais pulsos curtos (em comparação com aplicações médicas) na faixa de 1-3 μ s são usados. Especialmente os sistemas de exposição em lotes ou fluxo-contínuo em escala industrial podem exigir grandes geradores de energia com amplitudes de até 40 kV e correntes de pico de até 500 A. Embora tanto processos em lotes e como de fluxo-contínuo sejam encontrados em escala industrial, o fluxo-contínuo é considerado superior pois permite o tratamento de grandes volumes. Tal modo de operação requer funcionamento constante exigindo maior potência de saída dos geradores de pulso [13], [46].

Distribuição do campo elétrico *in vivo*

Na maioria das aplicações de permeabilização de tecido, é necessário expor o volume do tecido a intensidades E entre os dois "limiares", ou seja, escolher com antecedência uma configuração adequada de eletrodo e parâmetros de pulso para uma eletroporação eficaz do tecido [47]. Portanto, a distribuição do campo elétrico no tecido deve ser avaliada antes do tratamento, o que pode ser obtido combinando resultados de testes rápidos ou monitoramento *in situ* [48] com modelos de distribuição de campo elétrico [49-53]. No entanto, a modelagem da distribuição do campo elétrico no tecido é difícil devido às propriedades heterogêneas do tecido e, geralmente, à geometria complexa. Modelos analíticos podem ser empregados apenas em geometrias simples. Normalmente são desenvolvidos para problemas 2D e tecidos com propriedades elétricas

homogêneas. Portanto, na maioria dos casos, as técnicas de modelagem numérica são ainda mais aceitáveis, pois podem ser usadas para modelar geometrias 3D e propriedades de tecido complexas. Para esse efeito, são aplicados principalmente o método dos elementos finitos e o método das diferenças finitas. Ambos os métodos numéricos foram aplicados e validados com sucesso através de comparações da distribuição do campo elétrico calculado e medido. Além disso, foram construídos modelos numéricos avançados, que levam em consideração também o aumento da condutividade do tecido devido à eletroporação do tecido ou da célula. Esses modelos avançados descrevem a distribuição E como uma função da condutividade $\sigma(E)$. Desta forma, os modelos representam mudanças de condutividade do tecido de eletroporação de acordo com a distribuição de intensidades de campo elétrico [54, 55].

Eletrodos para aplicações *in vitro* e *in vivo*

A eficácia da eletroporação *in vitro*, *in vivo* ou em ambiente clínico depende da distribuição do campo elétrico dentro da amostra tratada. A saber, o parâmetro mais importante que rege a permeabilização da membrana celular é o campo elétrico local ao qual a célula será exposta [47]. Para conseguir isso, temos que usar um conjunto apropriado de eletrodos e um dispositivo de eletroporação, o eletroporador, que gera os sinais de voltagem ou corrente necessários. Embora ambas as partes do equipamento mencionado sejam importantes e necessárias para uma eletroporação eficaz, o eletroporador tem um papel substancialmente mais importante, uma vez que deve ser capaz de entregar o sinal necessário à sua saída carregada pela impedância da amostra entre os eletrodos.

Hoje em dia, existem vários tipos de eletrodos que podem ser usados para eletroporação em qualquer uma das aplicações existentes [56–60]. De acordo com a geometria, os eletrodos podem ser classificados em vários grupos, ou seja, eletrodos de placas paralelas, arranjos de agulhas, eletrodos de arames, eletrodos de pinça, eletrodos coaxiais, etc. (Fig. 2). Cada grupo compreende vários tipos de eletrodos que podem ser divididos de acordo com as aplicações, dimensões, material do eletrodo, etc. Em qualquer caso, a seleção do tipo de eletrodo desempenha um papel importante na caracterização da carga que está conectada à saída do eletroporador. Durante o projeto de um eletroporador, a caracterização da carga representa o ponto de partida, e representa um problema considerável de engenharia porque as características elétricas da substância entre os eletrodos (por exemplo, suspensão de células, tecido, etc.) variam de experimento para

experimento e mesmo durante o curso do experimento. Em geral, a carga entre os eletrodos tem um componente resistivo e um capacitivo. O valor de cada componente é definido pela geometria e material dos eletrodos, e pelas propriedades elétricas e químicas da amostra tratada. Em condições *in vitro*, esses parâmetros que influenciam a impedância da carga podem ser bem controlados, uma vez que o tamanho e a geometria da amostra são conhecidos, especialmente se forem utilizadas cubetas. Além disso, usando meios celulares especialmente preparados, as propriedades elétricas e químicas são definidas ou podem ser medidas. Por outro lado, em condições *in vivo*, o tamanho e a geometria ainda podem ser controlados até certo ponto, mas as propriedades elétricas e químicas só podem ser estimadas, especialmente se forem usados eletrodos de agulha que penetram em diferentes tecidos. No entanto, mesmo que consigamos definir essas propriedades de forma confiável durante o desenvolvimento do dispositivo, é praticamente impossível prever mudanças nas propriedades elétricas e químicas da amostra devido à exposição a pulsos elétricos de alta voltagem [61-63]. Além da eletropermeabilização das membranas celulares, que aumenta a condutividade elétrica da amostra, os pulsos elétricos também causam efeitos colaterais como aquecimento Joule e contaminação eletrolítica da amostra [64], o que leva ainda mais ao aumento da condutividade da amostra [65].

Pulsos elétricos

Para uma melhor compreensão e leitura crítica de vários relatos sobre o fenômeno de eletroporação e aplicações baseadas em eletroporação, a divulgação completa dos parâmetros dos pulsos precisa ser fornecida. Os pulsos elétricos nunca são “quadrados” ou “retangulares”, mas são caracterizados por seu tempo de subida, duração/largura, tempo de queda e frequência de repetição do pulso. O tempo de subida e o tempo de queda são determinados como o tempo necessário para aumentar de 10% a 90% da amplitude, e cair de 90% a 10% da amplitude, respectivamente. A largura de pulso é mais frequentemente definida como o tempo entre 50% da amplitude na subida e 50% na queda. A frequência de repetição do pulso é o inverso da soma da largura do pulso e a pausa entre dois pulsos consecutivos. Isso pode parecer trivial quando se discute pulsos de 1 ms, mas se tornam um problema quando se discute pulsos ns ou mesmo ps [66]. O dano à membrana celular e a absorção de íons podem ser significativamente reduzidos ao usar pulsos ns bipolares em vez de monopolar [67]. Formas diferentes de “retangulares” foram investigadas com relação à eficiência de eletroporação [68]. Foi sugerido que a exposição

das células a amplitudes de pulso acima de determinada amplitude crítica e a duração desta exposição acima deste valor crítico, parecem determinar o nível de eletroporação da membrana, independentemente da forma do pulso. Pulsos em decadência exponencial são difíceis de serem considerados como tal, mas eram predominantemente usados na década de 80 para eletrotransferência de genes. Sua forma era conveniente pois a primeira parte do pulso, ou seja, o pico, atua como a parte permeabilizante e a cauda do pulso atua como parte eletroforética, empurrando o DNA em direção, e potencialmente através, da membrana celular [32].

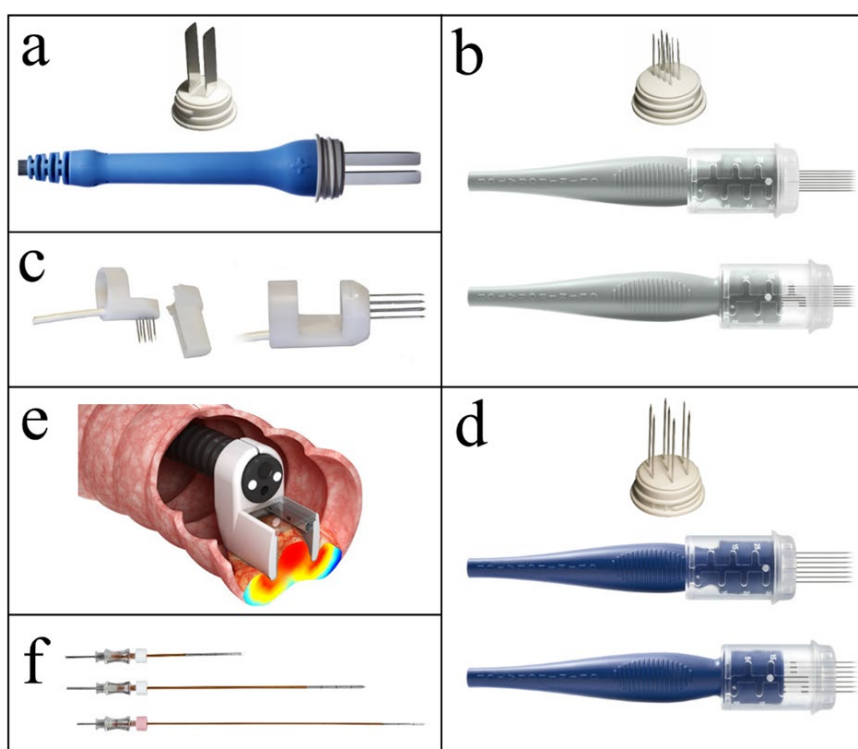


Figura 2: Exemplos de eletrodos comercialmente disponíveis para eletropermeabilização. Os eletrodos pertencem aos seguintes grupos: (a) eletrodos de placas paralelas, (b): arranjos de agulhas, (c): eletrodos de dedo, (d): arranjo de agulhas, (e): eletrodo endoluminal, e (f) grupo de eletrodos de agulha independentes. Os eletrodos (a), (b), (c) e (d) são produzidos pela IGEA, Itália; o eletrodo (e) é produzido pela Mirai Medical, Irlanda; sendo usados em aplicações clínicas de eletroquimioterapia e eletrotransferência gênica [31].

Eletrporadores – os geradores dos pulsos necessários

O eletrporador é um dispositivo eletrônico que gera sinais, geralmente ondas quadradas ou pulsos com declínio exponencial, necessários para a eletrporação [1]. Os parâmetros do sinal entregue aos eletrodos com a amostra tratada variam de aplicação para aplicação. Portanto, na investigação do fenômeno de eletrporação e no desenvolvimento de tecnologias e tratamentos baseados em eletrporação, é importante que o eletrporador seja capaz de fornecer sinais com a maior variedade possível de parâmetros elétricos, se usado em pesquisas. No entanto, se usado apenas para uma aplicação específica, por ex. tratamento clínico, como eletroquimioterapia, o gerador de pulsos deve fornecer os parâmetros de pulso exatamente necessários e de maneira confiável. Além disso, o eletrporador deve ser seguro e fácil de operar e deve oferecer algumas possibilidades de melhorias funcionais. Os eletrporadores clínicos usados na eletroquimioterapia de tumores profundos ou na ablação não-térmica de tecidos também são equipados com algoritmos de sincronização de eletrocardiograma (ECG) que minimizam a possível influência do fornecimento dos pulsos elétricos na função cardíaca [69].

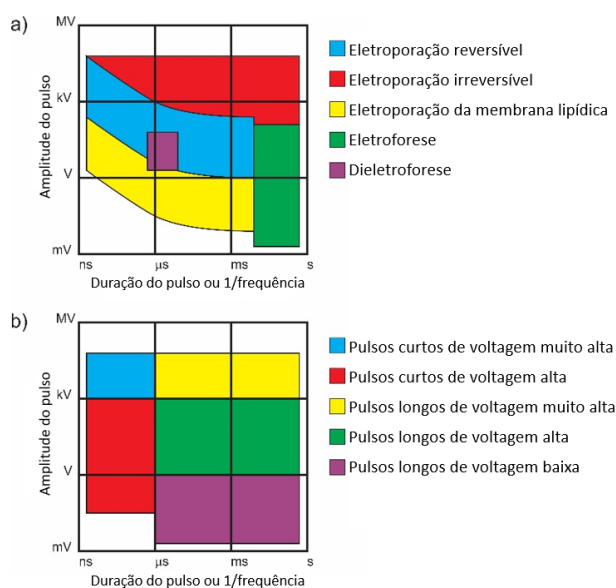


Figura 3: Áreas de amplitude e duração de pulsos elétricos que são usadas na pesquisa de eletrporação e efeitos relacionados. (a) Cinco áreas diferentes de geração de pulso de eletrporação. (b) Para amplificar ou gerar pulsos de

eletroporação de voltagem muito alta (acima de alguns kV), são usados centelhadores e elementos semelhantes, para alta voltagem (alguns V a alguns kV) transistores, e amplificadores operacionais para baixa voltagem. Pulsos de nanossegundos (curtos) são gerados com técnicas diferentes de pulsos com mais de 1 μ s. Originalmente publicado em Técnicas de Eletroporação Avançadas em Biologia e Medicina, por Reberšek e Miklavčič 2010 [3].

Em princípio, os eletroporadores podem ser divididos em vários grupos dependendo das aplicações biológicas, mas do ponto de vista elétrico existem apenas dois tipos de eletroporadores: dispositivos com saída de voltagem (a saída um é sinal de voltagem $U(t)$) e dispositivos com saída de corrente (a saída é um sinal de corrente $I(t)$). Ambos os tipos de dispositivos têm suas vantagens e desvantagens, mas um ponto definitivamente se mostra a favor dos dispositivos com saída de voltagem. Por exemplo, se realizarmos experimentos *in vitro* com eletrodos de placas paralelas com lados da placa substancialmente maiores do que a distância entre eles, a intensidade do campo elétrico E que é aplicada à amostra pode ser aproximada pela relação voltagem-distância U/d , onde d é a distância entre os eletrodos e U a amplitude do sinal aplicado obtido de um eletroporador com saída de voltagem. Por outro lado, se um eletroporador com saída de corrente for usado, a mesma aproximação poderia ser usada apenas se uma medição adicional da diferença de voltagem entre os eletrodos for realizada ou se a impedância Z da amostra for conhecida, medida ou aproximada e a diferença de voltagem entre os eletrodos ser estimado usando a lei de Ohm $U = I \cdot Z$. Todavia, existem vários eletroporadores disponíveis no mercado que atendem a diferentes faixas de parâmetros e podem ser usados em diferentes aplicações. Uma lista de eletrodos e eletroporadores disponíveis comercialmente foi apresentada em 2004 por Puc e colegas [70], atualizada em 2010 [3] e em 2017 [71].

Para ter certeza de que os pulsos aplicados são adequados, temos que medir a voltagem e a corrente aplicadas durante a entrega do pulso.

Em aplicações de nanossegundos, o tempo de subida do pulso às vezes é menor do que o comprimento elétrico (o tempo em que um sinal elétrico viaja pela linha) entre a fonte e a carga. Nesse caso, a impedância da carga e da linha de transmissão deve corresponder à impedância do gerador, de forma que não haja fortes reflexos de pulso e consequentemente prolongamentos de pulso.

Com base nos estudos relatados na literatura é muito difícil extrair um conselho geral sobre como projetar experimentos ou tratamentos com eletroporação. Em princípio, podemos dizer que a amplitude do pulso (relação voltagem-distância) deve estar tipicamente na faixa de 200 V/cm a 2000 V/cm. A duração do pulso deve estar na faixa de centenas de

microssegundos para moléculas menores e de vários milissegundos até várias dezenas de milissegundos para macromoléculas como o DNA plasmidial (no último caso, devido à duração muito longa do pulso, a amplitude ideal do pulso pode até ser inferior a 100 V/cm). Se houver alguma possibilidade de se obter o equipamento que gera pulsos bipolares ou se houver a possibilidade de alterar a orientação do campo elétrico na amostra, esses tipos de pulsos/eletroporadores devem ser usados porque os pulsos bipolares geram um limiar de poração mais baixo, maior captação, reduzem o desgaste do eletrólito e contaminação eletrolítica da amostra, e tem uma viabilidade similar quando comparados com pulsos unipolares de mesma amplitude e duração. Melhor permeabilização ou eficiência de transfecção de genes e sobrevivência também podem ser obtidas mudando a orientação do campo na amostra usando circuitos de comutação especiais, que trocam os pulsos de eletroporação entre os eletrodos [56, 58, 71]. Pulsos de eletroporação bipolares curtos de alta frequência HF-EP também foram analisados, pois eles mitigam a estimulação nervosa/muscular, e a distribuição do campo elétrico de tais pulsos é mais homogênea no tecido [72-74], mas esses pulsos podem estar próximos do "efeito de cancelamento" [74]. No entanto, o desenvolvimento de eletroporadores de alta frequência é muito mais desafiador, e eletroporadores de alta frequência comerciais não estão disponíveis, portanto, infelizmente, a pesquisa de HF-EP é limitada à apenas alguns grupos [75], [76].

Esta visão geral dos parâmetros elétricos deve, entretanto, ser considerada apenas como um ponto de partida para um projeto de experimentos ou tratamentos. Os valores ótimos dos parâmetros também dependem fortemente do tipo de célula utilizada, da molécula a ser introduzida e de condições experimentais específicas. As características do pulso, determinadas como ótimas ou pelo menos eficientes, e o tecido/amostra, irão então determinar a arquitetura do gerador de pulsos, seja ele um gerador de Marx, Blumlein ou algum outro modelo [7].

Conclusões

A eletroporação foi estudada extensivamente até agora, e uma série de aplicações foram desenvolvidas. A eletroquimioterapia tem sido demonstrada como um tratamento local eficaz de tumores sólidos e é a aplicação terapêutica mais madura atualmente. A eletroporação para transfecção de genes, entretanto, tem sido usada há muito tempo em situações *in vitro*. A eletroporação representa uma alternativa não viral à clássica transfecção viral, sendo também viável para a transfecção de genes

in vivo. As aplicações clínicas e a expansão da eletroquimioterapia e ablação de tecidos têm sido prejudicadas pela falta de eletroporadores adequados e sua certificação na Europa (CE Medical Device) e pela aprovação limitada pelo FDA nos EUA [1]. O Cliniporator (IGEA, s.r.l. Carpi, Itália) foi certificado na UE (selo CE) como um dispositivo médico e é oferecido no mercado junto com POPs para eletroquimioterapia de tumores cutâneos e subcutâneos. NanoKnife (AngioDynamics, Queensbury, EUA) foi certificado na UE e aprovado pelo FDA para ablação cirúrgica de tecidos moles. Alguns eletroporadores estão agora disponíveis sob a licença para fins de avaliação clínica: Celectra, Elgen, Medpulser, Cliniporator VITAE, BetaTech, DermaVax, EasyVax, Ellisphere, TriGrid [4].

O desenvolvimento de novas aplicações garante um maior desenvolvimento de geradores de pulso e eletrodos. Com base nas considerações acima, no entanto, um único gerador de pulso não atenderá a todas as aplicações e todas as necessidades dos pesquisadores. Pode-se buscar um gerador de pulsos especializado que fornecerá apenas os pulsos para sua aplicação biotecnológica ou biomédica específica, ou um gerador de pulsos de uso geral que permitirá gerar “quase” tudo o que o pesquisador pode achar interessante/necessário em sua pesquisa. Independentemente da escolha, isso deve estar relacionado também à escolha dos eletrodos e à condutividade do tecido/amostra.

Referências

- [1] M. Reberšek, D. Miklavčič, C. Bertacchini, and M. Sack, “Cell membrane electroporation-Part 3: the equipment,” *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, vol. 30, no. 3, pp. 8–18, 2014.
- [2] K. Flisar, M. Puc, T. Kotnik, and D. Miklavcic, “Cell membrane electroporation with arbitrary pulse waveforms,” *IEEE Eng Med Biol Mag*, vol. 22, no. 1, pp. 77–81, Feb. 2003.
- [3] M. Reberšek and D. Miklavčič, “Concepts of Electroporation Pulse Generation and Overview of Electric Pulse Generators for Cell and Tissue Electroporation,” in *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, A. G. Pakhomov, D. Miklavčič, and M. S. Markov, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2010, pp. 323–339.
- [4] L. G. Staal and R. Gilbert, “Generators and Applicators: Equipment for Electroporation,” in *Clinical Aspects of Electroporation*, S. T. Kee, J. Gehl, and E. W. Lee, Eds. New York: Springer, 2011, pp. 45–65.
- [5] G. A. Hofmann, “Instrumentation and electrodes for *in vivo* electroporation,” in *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery*, M. J. Jaroszeski, R. Heller, and R. Gilbert, Eds. Totowa: Humana Press, 2000, pp. 37–61.

- [6] E. Pirc, M. Reberšek, and D. Miklavčič, “Dosimetry in electroporation based technologies and treatments,” in *Dosimetry in bioelectromagnetisc*, M. S. Markov, Ed. London: Taylor & Francis, In press.
- [7] M. Reberšek and D. Miklavčič, “Advantages and Disadvantages of Different Concepts of Electroporation Pulse Generation,” *Automatica*, vol. 52, no. 1, pp. 12–19, Mar. 2011.
- [8] M. Reberšek *et al.*, “Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro,” *Biomed Eng Online*, vol. 6, p. 25, 2007.
- [9] P. Kramar, D. Miklavcic, and A. M. Lebar, “A system for the determination of planar lipid bilayer breakdown voltage and its applications,” *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, vol. 8, no. 2, pp. 132–138, 2009.
- [10] J. M. Sanders, A. Kuthi, Yu-Hsuan Wu, P. T. Vernier, and M. A. Gundersen, “A linear, single-stage, nanosecond pulse generator for delivering intense electric fields to biological loads,” *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 16, no. 4, pp. 1048–1054, Aug. 2009.
- [11] S. Haberl, J. Teissié, W. Frey, and D. Miklavčič, “Cell Membrane Electroporation – Part 2: The Applications,” *IEEE Electrical Insulation Magazine*, vol. 29, no. 1, pp. 19–27, Feb. 2013.
- [12] C. Jiang, R. V. Davalos, and J. C. Bischof, “A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 62, no. 1, pp. 4–20, Jan. 2015.
- [13] S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, and D. Miklavčič, “Electroporation in Food Processing and Biorefinery,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 247, no. 12, pp. 1279–1304, Dec. 2014.
- [14] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, and D. Miklavčič, “Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 16, no. 1, pp. 295–320, Jul. 2014.
- [15] T. Kotnik, W. Frey, M. Sack, S. Haberl Meglič, M. Peterka, and D. Miklavčič, “Electroporation-based applications in biotechnology,” *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 8, pp. 480–488, Aug. 2015.
- [16] A. Golberg *et al.*, “Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 9, no. 1, Dec. 2016.
- [17] M. Morales-de la Peña, P. Elez-Martínez, and O. Martín-Belloso, “Food Preservation by Pulsed Electric Fields: An Engineering Perspective,” *Food Engineering Reviews*, vol. 3, no. 2, pp. 94–107, Mar. 2011.
- [18] D. Miklavčič, B. Mali, B. Kos, R. Heller, and G. Serša, “Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice,” *Biomedical engineering online*, vol. 13, no. 1, p. 29, 2014.
- [19] B. Mali, T. Jarm, M. Snoj, G. Sersa, and D. Miklavcic, “Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis,” *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 39, no. 1, pp. 4–16, Jan. 2013.
- [20] I. Edhemovic *et al.*, “Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases: Electrochemotherapy of Liver Metastases,” *Journal of Surgical Oncology*, vol. 110, no. 3, pp. 320–327, Sep. 2014.
- [21] D. Miklavčič *et al.*, “Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors,” *Med Biol Eng Comput*, vol. 50, no. 12, pp. 1213–1225, Dec. 2012.

- [22] A. Gasbarrini, W. K. Campos, L. Campanacci, and S. Boriani, "Electrochemotherapy to Metastatic Spinal Melanoma: A Novel Treatment of Spinal Metastasis?," *Spine*, vol. 40, no. 24, pp. E1340-1346, Dec. 2015.
- [23] M. Scuderi, M. Rebersek, D. Miklavcic, and J. Dermol-Cerne, "The use of high-frequency short bipolar pulses in cisplatin electrochemotherapy in vitro," *Radiology and Oncology*, vol. 53, no. 2, pp. 194-205, Jun. 2019.
- [24] J. Lavee, G. Onik, P. Mikus, and B. Rubinsky, "A novel nonthermal energy source for surgical epicardial atrial ablation: irreversible electroporation," *Heart Surg Forum*, vol. 10, no. 2, pp. E162-167, 2007.
- [25] P. G. Wagstaff *et al.*, "Irreversible electroporation: state of the art," *Onco Targets Ther*, vol. 9, pp. 2437-2446, Apr. 2016.
- [26] C. Bertacchini, P. M. Margotti, E. Bergamini, A. Lodi, M. Ronchetti, and R. Cadossi, "Design of an irreversible electroporation system for clinical use," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 6, no. 4, pp. 313-320, Aug. 2007.
- [27] R. E. Neal, P. A. Garcia, J. L. Robertson, and R. V. Davalos, "Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible Electroporation Treatment Planning," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 59, no. 4, pp. 1076-1085, Apr. 2012.
- [28] C. B. Arena *et al.*, "High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction," *Biomed Eng Online*, vol. 10, p. 102, Nov. 2011.
- [29] L. Lambrecht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr eat, and G. Vandermeulen, "Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 13, no. 2, pp. 295-310, 2016.
- [30] A. Gothelf and J. Gehl, "What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines," *Hum Vaccin Immunother*, vol. 8, no. 11, pp. 1694-1702, Nov. 2012.
- [31] R. Heller, Y. Cruz, L. C. Heller, R. A. Gilbert, and M. J. Jaroszeski, "Electrically mediated delivery of plasmid DNA to the skin, using a multielectrode array," *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, no. 3, pp. 357-362, Mar. 2010.
- [32] S. Satkauskas *et al.*, "Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis," *Mol. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 133-140, Feb. 2002.
- [33] M. Kandu er, D. Miklav i , and M. Pavlin, "Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses — An in vitro study," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 2, pp. 265-271, Feb. 2009.
- [34] M. Usaj, K. Flisar, D. Miklavcic, and M. Kanduser, "Electrofusion of B16-F1 and CHO cells: The comparison of the pulse first and contact first protocols," *Bioelectrochemistry*, vol. 89, pp. 34-41, Feb. 2013.
- [35] H. Mekid and L. M. Mir, "In vivo cell electrofusion," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1524, no. 2-3, pp. 118-130, Dec. 2000.
- [36] R. Heller and R. J. Grasso, "Reproducible layering of tissue culture cells onto electrostatically charged membranes," *Journal of Tissue Culture Methods*, vol. 13, no. 1, pp. 25-29.
- [37] L. Rems, M. U aj, M. Kandu er, M. Reber ek, D. Miklav i , and G. Pucihar, "Cell electrofusion using nanosecond electric pulses," *Scientific Reports*, vol. 3, Nov. 2013.

- [38] M. Zakhartsev, C. Momeu, and V. Ganeva, "High-Throughput Liberation of Water-Soluble Yeast Content by Irreversible Electroporation (HT-irEP)," *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 12, no. 2, pp. 267–275, Jan. 2007.
- [39] M. Sack *et al.*, "Electroporation-Assisted Dewatering as an Alternative Method for Drying Plants," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 36, no. 5, pp. 2577–2585, Oct. 2008.
- [40] M. Sack *et al.*, "Research on Industrial-Scale Electroporation Devices Fostering the Extraction of Substances from Biological Tissue," *Food Engineering Reviews*, vol. 2, pp. 147–156, Mar. 2010.
- [41] E. Puértolas, G. Saldaña, S. Condón, I. Álvarez, and J. Raso, "Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle," *Food Chemistry*, vol. 119, no. 3, pp. 1063–1070, Apr. 2010.
- [42] S. Haberl, M. Jarc, A. Štrancar, M. Peterka, D. Hodžić, and D. Miklavčič, "Comparison of Alkaline Lysis with Electroextraction and Optimization of Electric Pulses to Extract Plasmid DNA from *Escherichia coli*," *The Journal of Membrane Biology*, Jul. 2013.
- [43] A. L. Gonçalves, M. C. M. Alvim-Ferraz, F. G. Martins, M. Simões, and J. C. M. Pires, "Integration of Microalgae-Based Bioenergy Production into a Petrochemical Complex: Techno-Economic Assessment," *Energies*, vol. 9, no. 4, p. 224, Mar. 2016.
- [44] J. Raso *et al.*, "Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Aug. 2016.
- [45] J. R. Beveridge, S. J. MacGregor, L. Marsili, J. G. Anderson, N. J. Rowan, and O. Farish, "Comparison of the effectiveness of biphasic and monophasic rectangular pulses for the inactivation of micro-organisms using pulsed electric fields," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 30, no. 4, pp. 1525–1531, Aug. 2002.
- [46] S. Toepfl, "Pulsed electric field food processing industrial equipment design and commercial applications," *Stewart Postharvest Review*, vol. 8, no. 2, pp. 1–7, 2012.
- [47] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavcic, and M. Tarek, "Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon," *IEEE Electrical Insulation Magazine*, vol. 28, no. 5, pp. 14–23, Oct. 2012.
- [48] M. Kranjc *et al.*, "In Situ Monitoring of Electric Field Distribution in Mouse Tumor during Electroporation," *Radiology*, vol. 274, no. 1, pp. 115–123, Jan. 2015.
- [49] D. Miklavcic, K. Beravs, D. Semrov, M. Cemazar, F. Demsar, and G. Sersa, "The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues," *Biophys J*, vol. 74, no. 5, pp. 2152–2158, May 1998.
- [50] N. Pavselj, Z. Bregar, D. Cukjati, D. Batiuskaite, L. M. Mir, and D. Miklavcic, "The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 8, pp. 1373–1381, Aug. 2005.
- [51] D. Sel, D. Cukjati, D. Batiuskaite, T. Slivnik, L. M. Mir, and D. Miklavcic, "Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporation," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 5, pp. 816–827, May 2005.
- [52] D. Miklavcic, S. Corovic, G. Pucihar, and N. Pavselj, "Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy," *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, no. 11, pp. 45–51, Nov. 2006.

- [53] D. Miklavcic *et al.*, "Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy," *Biomed Eng Online*, vol. 9, no. 10, pp. 1–12, 2010.
- [54] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, and D. Miklavcic, "Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation," *Biomedical engineering online*, vol. 12, no. 1, p. 16, 2013.
- [55] J. Langus, M. Kranjc, B. Kos, T. Šuštar, and D. Miklavčič, "Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue," *Sci Rep*, vol. 6, p. 26409, May 2016.
- [56] R. A. Gilbert, M. J. Jaroszeski, and R. Heller, "Novel electrode designs for electrochemotherapy," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1334, no. 1, pp. 9–14, Feb. 1997.
- [57] S. Mazères *et al.*, "Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery," *J Control Release*, vol. 134, no. 2, pp. 125–131, Mar. 2009.
- [58] M. Reberšek, S. Čorović, G. Serša, and D. Miklavčič, "Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution," *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 26–31, Nov. 2008.
- [59] J. Čemažar, D. Miklavčič, and T. Kotnik, "Microfluidic devices for manipulation, modification and characterization of biological cells in electric fields - a review," *Informacije MIDEM*, vol. 43, no. 3, pp. 143–161, Sep. 2013.
- [60] P. F. Forde *et al.*, "Preclinical evaluation of an endoscopic electroporation system," *Endoscopy*, vol. 48, no. 5, pp. 477–483, May 2016.
- [61] M. Pavlin *et al.*, "Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension," *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 6, pp. 4378–4390, Jun. 2005.
- [62] D. Cukjati, D. Batiuskaite, F. André, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 501–507, May 2007.
- [63] M. Kranjc, F. Bajd, I. Serša, and D. Miklavčič, "Magnetic resonance electrical impedance tomography for measuring electrical conductivity during electroporation," *Physiological Measurement*, vol. 35, no. 6, pp. 985–996, Jun. 2014.
- [64] M. Phillips, L. Rubinsky, A. Meir, N. Raju, and B. Rubinsky, "Combining Electrolysis and Electroporation for Tissue Ablation," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 14, no. 4, pp. 395–410, Aug. 2015.
- [65] I. Lackovic, R. Magjarevic, and D. Miklavcic, "Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer," *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 16, no. 5, pp. 1338–1347, 2009.
- [66] K. Mitsutake, A. Satoh, S. Mine, K. Abe, S. Katsuki, and H. Akiyama, "Effect of pulsing sequence of nanosecond pulsed electric fields on viability of HeLa S3 cells," *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 19, no. 1, pp. 337–342, 2012.
- [67] B. L. Ibey *et al.*, "Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporabilization and killing cells than monopolar pulses," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 443, no. 2, pp. 568–573, Jan. 2014.
- [68] T. Kotnik, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Cell membrane electroporabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part II. Reduced electrolytic contamination," *Bioelectrochemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 91–95, Aug. 2001.

- [69] B. Mali *et al.*, “Electrochemotherapy of colorectal liver metastases-an observational study of its effects on the electrocardiogram,” *Biomedical engineering online*, vol. 14, no. Suppl 3, p. S5, 2015.
- [70] M. Puc, S. Čorovič, K. Flisar, M. Petkovšek, J. Nastran, and D. Miklavčič, “Techniques of signal generation required for electroporation: Survey of electroporation devices,” *Bioelectrochemistry*, vol. 64, no. 2, pp. 113–124, Sep. 2004.
- [71] E. Pirc, M. Reberšek, and D. Miklavčič, “Dosimetry in Electroporation-Based Technologies and Treatments,” in *Dosimetry in Bioelectromagnetics*, M. Markov, Ed. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487–2742: CRC Press, 2017, pp. 233–268.
- [72] M. Reberšek, M. Kanduđer, and D. Miklavčič, “Pipette tip with integrated electrodes for gene electrotransfer of cells in suspension: a feasibility study in CHO cells,” *Radiology and Oncology*, vol. 45, no. 3, pp. 204–208, 2011.
- [73] M. B. Sano *et al.*, “Bursts of Bipolar Microsecond Pulses Inhibit Tumor Growth,” *Scientific Reports*, vol. 5, p. 14999, Oct. 2015.
- [74] D. C. Sweeney, M. Reberšek, J. Dermol, L. Rems, D. Miklavčič, and R. V. Davalos, “Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, no. 11, pp. 2689–2698, Nov. 2016.
- [75] V. Novickij *et al.*, “High-frequency submicrosecond electroporator,” *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, pp. 1–7, Feb. 2016.
- [76] A. Grainys, V. Novickij, and J. Novickij, “High-power bipolar multilevel pulsed electroporator,” *Instrumentation Science & Technology*, vol. 44, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2016.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi parcialmente apoiada pela Agência de Pesquisa Eslovena e por programas da Comissão Europeia por meio de várias bolsas. A investigação foi conduzida no âmbito do Laboratório Associado Europeu EBAM (LEA).



Damijan Miklavčič nasceu em Liubliana, Eslovênia, em 1963. Recebeu seu mestrado e doutorado em Engenharia Elétrica pela Universidade de Liubliana em 1991 e 1993, respectivamente. Atualmente é Professor e Chefe do Laboratório de Biocibernética da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Liubliana. Suas áreas de pesquisa são engenharia biomédica e estudo da interação de campos eletromagnéticos com sistemas biológicos. Nos últimos anos, se concentrou nos aspectos de engenharia da eletroporação como a base da administração de drogas em células de modelos de tumor *in vitro* e *in vivo*. Sua pesquisa inclui experimentação biológica, modelagem numérica e desenvolvimento de hardware para eletroquimioterapia, eletroporação irreversível, entrega transdérmica de drogas e eletrotransferência gênica.



Matej Reberšek, nasceu em Liubliana, Eslovênia, em 1979. Recebeu o doutorado em engenharia elétrica pela Universidade de Liubliana, Eslovênia. É Professor Assistente e Pesquisador Associado no Laboratório de Biocibernética da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Liubliana. Seus principais interesses de pesquisa são o campo da eletroporação, especialmente o design de dispositivos de eletroporação e investigação de respostas biológicas a diferentes parâmetros de pulso elétrico.

Capítulo 12

Eletroporação e eletropermeabilização – montando o quebra-cabeça

Lluis M Mir

Vetorologia e Terapias Anticâncer, UMR 8203, CNRS, Univ. Paris-Sud,
Université Paris-Saclay, Gustave-Roussy, 114, Rua Edouard Vaillant, F-
94805 Villejuif Cédex, França.

Laboratório Associado Europeu (LEA), Campos Elétricos Pulsados em
Biologia e Medicina (LEA EBAM).

Até agora, duas abordagens genéricas principais têm sido usadas para detectar a permeabilização celular após a aplicação de pulsos elétricos em células ou tecidos. Eles são baseados na detecção de mudanças elétricas do tecido/células (medições de bioimpedância ou simplesmente determinações de condutância) ou em trocas moleculares através da membrana (difusão ou eletrotransferência de marcadores, como pequenas moléculas fluorescentes, compostos radioativos, plasmídeos que codificam para genes repórter, etc.). Esta última abordagem, baseada no transporte de uma dada espécie molecular, é muito dependente das características físico-químicas do marcador usado (peso molecular, carga, rendimento de fluorescência, interações marcador-alvo (se houver), modo de transporte [1], etc.).

Os modelos construídos para descrever os fenômenos que ocorrem na membrana celular (mesmo em membranas artificiais, sejam essas membranas artificiais planares ou de vesículas de diferentes tamanhos e composições) foram baseados principalmente nos princípios físicos que poderiam explicar o transporte de moléculas através da membrana. A informação proporcionada com as medidas de bioimpedância, embora

muito útil em termos práticos, tem trazido uma contribuição limitada para a compreensão desses fenômenos. Porém, nos fenômenos de transporte, existem parâmetros não relacionados às características estruturais da membrana nos períodos antes, durante e após os pulsos. Na verdade, como já mencionado, há um impacto do tamanho das moléculas, sua carga, o gradiente de concentração entre o interior e o exterior, a sensibilidade de sua detecção dentro das células, etc. Existem vários exemplos, qualquer que seja a duração dos pulsos, pulsos de nanossegundos ou pulsos de microssegundos, que podem ser relatados. Nesse contexto, é importante destacar que a penetração de íons cálcio pode ser detectada em amplitudes de campos elétricos para os quais muitos outros marcadores de eletropermeabilização ainda não revelam a eletropermeabilização das células. Isso permite a manipulação do conteúdo de cálcio citosólico em condições em que a sobrevivência das células é razoavelmente bem protegida [2,3].

Várias novas técnicas foram aplicadas recentemente para explorar as mudanças na própria membrana, independentemente de qualquer fenômeno de transporte. Algumas dessas técnicas vêm de tecnologias que não eram usadas anteriormente para analisar os efeitos dos pulsos elétricos nas bicamadas lipídicas ou nas membranas celulares.

Por um lado, o uso de vesículas unilamelares gigantes (compostas por uma espécie lipídica definida e do tamanho de uma célula animal) tem permitido analisar as alterações químicas que ocorrem nas bicamadas lipídicas durante a entrega dos pulsos [4]; a dinâmica molecular começou a trazer explicações para que ocorram essas reações. É importante notar que essas duas abordagens (experimental e *in silico*) restringem sua análise à parte lipídica de membranas celulares complexas.

Por outro lado, usando células em cultura, métodos óticos não-lineares estão produzindo novos elementos do quebra-cabeça. A microespectroscopia espontânea Raman trouxe novas informações sobre modificações de proteínas que poderiam ocorrer durante (ou, talvez, após) a entrega dos pulsos elétricos [5]. Microscópios confocais Raman trouxeram informações dinâmicas e espaciais sobre as mudanças nos espectros Raman que refletem essas mudanças nas proteínas [6].

Como os objetos biológicos estão imersos em meio à base de água, os microscópios Raman Confocal devem ser usados para eliminar a contribuição Raman não ressonante da água. Microespectroscopias Coherent Raman, como a microespectroscopia Coherent AntiStockes Raman Scattering, parece mais atraente devido ao realce do sinal causado pela “coerência” fornecida pelo uso de dois lasers devidamente ajustados. O aumento do sinal em relação ao sinal Raman espontâneo pode chegar à 10^8 vezes. A microespectroscopia Coherent AntiStockes Raman Scattering recentemente nos forneceu informações sobre

mudanças na água interfacial (as poucas camadas de moléculas de água organizadas na superfície das membranas) e até mesmo na água intersticial. Após a aplicação dos pulsos, é registrada uma perda importante do sinal interfacial da água, o que significa que as alterações da estrutura da membrana consequentes à aplicação dos pulsos também afetam a água que circunda a membrana (trabalho a ser submetido para publicação). Estamos, assim, adquirindo informações sobre as mudanças que ocorrem nas membranas independentemente de qualquer fenômeno de transporte. Esta informação tem agora de ser introduzida nos modelos que descrevem provisoriamente os fenômenos que ocorrem nas membranas, para continuar a melhorar o conhecimento da eletroporação/eletropermeabilização de células, bem como de objetos biológicos ainda menores [7].

No entanto, há outro nível de perturbações que também deve ser levado em consideração, para o qual as informações estão se acumulando rapidamente: as reações das células ao estresse causado pela liberação de pulsos elétricos. Estas correspondem ao conjunto dos aspectos biológicos ligados à liberação dos pulsos elétricos, com cinética que pode ser ordens de magnitude maior que a duração dos pulsos elétricos e até mesmo da duração da recuperação da impermeabilidade das células aos marcadores clássicos de eletropermeabilização.

A construção de qualquer novo modelo está, portanto, se tornando incrivelmente complexa. Isso apenas reflete a complexidade dos fenômenos que foram apresentados nas aulas do curso Tecnologias e Tratamentos Baseados em Eletroporação (*Electroporation-Based Technologies and Treatments*). Os modelos viscosos, elásticos e viscoelásticos de quebra elétrica das membranas estão ultrapassados. Os modelos que descrevem a geração de poros estáveis também são insuficientes hoje em dia. Modelos incluindo vários termos para explicar a evolução da permeabilidade e da condutividade das membranas celulares estão surgindo [8]. É uma esperança que eles sejam capazes de dar pistas sobre as muitas questões que ainda não foram resolvidas. Por exemplo, considerando a "eletroporação irreversível", ainda não se sabe o que é o evento "irreversível"...

Todos os aspectos desenvolvidos aqui acima serão discutidos no marco de um novo modelo dos fenômenos que ocorrem nas membranas das células expostas a pulsos elétricos. Este modelo será apresentado, e se entregará uma terminologia para o correto uso de termos até então são utilizados indistintamente. Portanto, uma distinção entre “eletroporação” e “eletropermeabilização” será trazida no contexto da “eletropulsção” das células, como peças de um quebra-cabeça que coletivamente queremos montar.

Referências

- [1] A. Azan, F. Gailliègue, L.M. Mir and M. Breton. Cell Membrane Electropulsation: Chemical Analysis of Cell Membrane Modifications and Associated Transport Mechanisms. In: *Adv's Anatomy*, Vol. 227, Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy, eds. J. Kulbaka and S. Satkauskas. ISBN : 978-3-319-56894-2
- [2] H. Hanna, A. Denzi, M. Liberti, F.M. Andre and L.M. Mir. Electroporabilization of inner and outer membranes of cells with microsecond pulsed electric fields: Quantitative study with calcium ions. *Scientific Reports* in press 2017
- [3] H. Hanna, F.M. Andre and L.M. Mir. Electrical control of calcium oscillations in mesenchymal stem cells using microsecond pulsed electric fields. *Stem cell research and therapy*, vol 8, art 91, 2017, DOI: 10.1186/s13287-017-0536-z
- [4] M. Breton and L. M. Mir. Investigation of the Chemical Mechanisms Involved in the Electropulsation of Membranes at the Molecular Level. *Bioelectrochemistry* 119 (2018) e7966; doi:10.1016/j.bioelechem.2017.09.005
- [5] A. Azan, V. Untereiner, C. Gobinet, G. D. Sockalingum, M. Breton, O. Piot and L. M. Mir. Demonstration of Protein Involvement in Living Cell Electropulsation using Confocal Raman Microspectroscopy. *Scientific Reports* 7. 297–306, 2017. doi:10.1038/srep40448.
- [6] A. Azan, V. Untereiner, L. Descamps, C. Merla, C. Gobinet, M. Breton, O. Piot and L. M. Mir. Comprehensive Characterization of the Interaction between Pulsed Electric Fields and Live Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. *Analytical Chemistry* in press 2017.
- [7] A. Denzi, E. della Valle, G. Esposito, L. M. Mir, F. Apollonio and Micaela Liberti. Technological and Theoretical Aspects for Testing Electroporation on Liposomes. *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 5092704, 10 pages, 2017. doi:10.1155/2017/5092704.
- [8] D.Voyer, A. Silve, L. M. Mir, R. Scorretti and C. Poignard. Dynamic modeling of tissue electroporation. *Bioelectrochemistry* in press 2017



Lluís M. Mir nasceu em Barcelona, Espanha, em 1954. Recebeu o mestrado em Bioquímica em 1976 na Ecole Normale Supérieure, Paris, e doutorado em Biologia Celular em 1983. Em 1978 entrou para o Centro Nacional de Pesquisa Científica (CNRS) como Pesquisador Associado no Laboratório de Farmacologia Básica e Toxicologia, em Toulouse. Em 1983 foi promovido a oficial pesquisas do CNRS, e em 1985 mudou-se para o Laboratório de Oncologia Molecular do CNRS-Instituto Gustave-Roussy e Univ. Paris Sud (Villejuif). Em 1989 mudou-se para o Laboratório de Farmacologia Molecular (Villejuif), e em 2002 para o Laboratório de Veterologia e Transferência Gênica (Villejuif). Em 1999, foi promovido a Diretor de Pesquisas no CNRS.

Lluís M. Mir foi um dos pioneiros na pesquisa de eletroporabilização (eletroporação) e nas aplicações dessa técnica para eletroquimioterapia antitumoral e eletrotransferência de

DNA. Ele é autor de 193 artigos em periódicos revisados por pares, 21 capítulos de livros e mais de 500 apresentações em encontros nacionais e internacionais, palestras a convite em encontros internacionais e seminários. Ele recebeu o Prêmio para as aplicações médicas de eletricidade do *Institut Electricité Santé* em 1994, o Prêmio Anual de Cancerologia da *Ligue contre le Cancer* (comitê Val-de-Marne) em 1996, o Prêmio da Pesquisa de *Rhône-Poulenc-Rorer* em 1998, a medalha do CNFRS sob os auspícios da Academia Francesa de Ciências em 2012, o Prêmio Frank Reidy de Bioelétrica em 2015 e a Medalha de Ouro Balthazar van der Pol da União Internacional de Radiociências em 2017. É um Senador Honorário da Universidade de Liubiana (2004). Também é membro do Instituto Americano de Engenharia Biológica e Médica. Foi professor visitante das Universidades de Berkeley (EUA), Bielefeld (Alemanha) e Jerusalém (Israel). Atualmente é o diretor do laboratório de Vetorologia (UMR 8203 do CNRS, University Paris-Sud e Institut Gustave-Roussy), e também é o fundador e codiretor do Laboratório Associado Europeu de Eletroporação em Biologia e Medicina do CNRS, em conjunto com as Universidades de Ljubljana, Primorska, Toulouse e Limoges, o Instituto de Oncologia de Ljubljana e o Institut Gustave-Roussy.

