



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Jéssica Rodrigues da Silva

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA DINÂMICA DE POROS NA
APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM CÉLULAS
BIOLÓGICAS: MEMBRANA, NÚCLEO, PAREDE
CELULAR E DIFUSÃO MOLECULAR**

Florianópolis/SC
2023

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA DINÂMICA DE POROS
NA APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM
CÉLULAS BIOLÓGICAS: MEMBRANA, NÚCLEO,
PAREDE CELULAR E DIFUSÃO MOLECULAR**

Jéssica Rodrigues da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Daniela Ota Hisayasu Suzuki

Florianópolis/SC
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Jéssica Rodrigues da

Avaliação in silico da dinâmica de poros na aplicação de campos elétricos em células biológicas: membrana, núcleo, parede celular e difusão molecular / Jéssica Rodrigues da Silva ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2023.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroporação. 3. Eletropermeabilização. 4. Campo elétrico. I. Suzuki, Daniela Ota Hisayasu . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Jéssica Rodrigues da Silva

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA DINÂMICA DE POROS
NA APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM
CÉLULAS BIOLÓGICAS: MEMBRANA, NÚCLEO,
PAREDE CELULAR E DIFUSÃO MOLECULAR**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. César Ramos Rodrigues, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Márcio José Rossi, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernanda dos Santos Costa Leomil, Dr.(a)
Global Foundries

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Elétrica

Telles Brunelli Lazzarim, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2023.

Ao Nelson

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marisa, e a minha avó, Elvira, que jamais me deram qualquer ideia de que eu não poderia ser o que eu quisesse. Agradeço também ao meu avô, Atanásio, que se recusa a entrar no barco de Caronte enquanto minha jornada acadêmica não estiver completa.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, pela oportunidade e exaustiva batalha em minha admissão ao Programa de Pós-Graduação, pela dedicação e paciência. Obrigada pela disposição, generosidade.

Aos colegas do Laboratório em Instrumentação Biomédica do IEB-UFSC. Obrigada, queridos amigos, pelas imensas contribuições recebidas por esta pesquisa. É com satisfação que eu compartilho com vocês o meu tempo, o meu trabalho e o meu sucesso.

Sou grata a Universidade pública, um sistema de formação de recursos humanos altamente qualificados e de produção científica e tecnológica indispensável para o desenvolvimento econômico e social do país. A mesma Universidade pública, que carrega o árduo desafio de ser o ponto de inflexão para a ruptura dos tecidos sociais. A educação tem o papel primordial de garantir os debates para o confronto da sociedade com a realidade que nos cerca, é o que nos separa da barbárie e é um privilégio dedicar o meu tempo à construção do futuro que o povo brasileiro reivindica.

Finalmente, sou grata a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por fornecer estrutura necessária para a realização desta pesquisa, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação da célula como um circuito de componentes passivos. 32
- Figura 2 Modelo idealizado do nível molecular (superior) e simulação dinâmica molecular em nível atômico (inferior) de uma aplicação de eletroporação. (a) Bicamada intacta. (b) Moléculas de água começam a penetrar a camada, formando um caminho aquoso, (c) Os fosfolípídios adjacentes ao caminho aquoso se reorientam, estabilizando o poro e permitindo a passagem de mais água ou mais substâncias. 34
- Figura 3 Representação da estrutura da parede celular em fungos. 37
- Figura 4 Energia dos poros hidrofóbicos ($r < r_*$) e hidrofílicos ($r > r_*$) como função dos raios dos poros quando $V_m = 0$ (em linhas sólidas). Os raios r_* e r_d indicam os limites para a criação dos poros hidrofílicos e para a expansão dos poros, respectivamente, enquanto r_p representa o raio de energia mínima. E_* , E_p e E_d correspondem às energias para os poros r_* , r_p e r_d , respectivamente. 38
- Figura 5 Modelo geométrico implementado no COMSOL. L representa a distância entre os eletrodos e W representa o raio dos eletrodos. Na área em destaque estão representados 1) a solução externa, 2) a parede celular, 3) a membrana plasmática e 4) o citoplasma. 42
- Figura 6 Esquemático dos pontos amostrados na membrana plasmática. Os pontos estão dispostos com 15 graus entre si. Os números em vermelho equivalem aos domínios da célula: 1) nucleoplasma; 2) membrana nuclear; 3) citoplasma; 4) membrana plasmática e 5) solução extracelular. 48
- Figura 7 Distribuição angular do potencial transmembrana relativo. Efeitos da variação da distância entre os eletrodos em relação à equação analítica de V_m . A linha tracejada em preto representa o potencial teórico. Em rosa, a distância entre os eletrodos foi de $100 R$; em verde, a distância foi de $1000 R$ com a seta indicando as maiores variações no polo em comparação com a solução analítica; e em amarelo, a distância foi de $2,5 R$ e a seta indica variações por

toda a célula.	53
Figura 8 Evolução temporal dos raios dos poros (curva vermelha) e do potencial transmembrana (curva azul). A região em rosa destaca o intervalo de tempo de $10 \mu s$ em que o pulso foi aplicado. Os pontos em azul e em vermelho apresentam, respectivamente, os pontos do potencial transmembrana e dos raios dos poros retirados de Yao et al. (2017).....	55
Figura 9 Potencial transmembrana teórico a partir da equação analítica.....	55
Figura 10 Dinâmica dos raios dos poros. A região em rosa destaca o tempo de aplicação do pulso com intensidade de $150 kV/m$ e largura de $10 \mu s$. As curvas A, B, C, D, E, F e G correspondem aos pontos da Figura 6.	56
Figura 11 Distribuição tempo-espacial dos raios dos poros para um pulso com largura de $5 \mu s$ e intensidades de a) $500 kV/m$ e b) $1000 kV/m$. As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram computados.	57
Figura 12 Distribuição tempo-espacial dos raios dos poros para um pulso com largura de $15 \mu s$ e intensidades de a) $500 kV/m$ e b) $1000 kV/m$. As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram computados.	58
Figura 13 Evolução temporal das moléculas de bleomicina que entraram na célula. A parte rosa do gráfico destaca a existência de moléculas de bleomicina que induziu citotoxicidade e a seta aponta para o instante em que esse limite foi ultrapassado.....	59
Figura 14 Evolução temporal da concentração de bleomicina no interior da célula. A parte rosa do gráfico destaca a existência de moléculas de bleomicina que induziu citotoxicidade e a seta aponta para o instante em que esse limite foi ultrapassado.....	60
Figura 15 Corte transversal 2D e zoom na membrana plasmática. A região destacada aponta para a variação da concentração através da membrana na área de maior entrada de bleomicina na célula...	60
Figura 16 Cortes da figura 3D da variação da concentração de bleomicina. As regiões coloridas da célula mostram onde houve maior influxo através dos poros formados na membrana plasmática.	61

Figura 17 Raios máximos dos poros em $t = 300 \mu s$	61
Figura 18 Potencial transmembrana nas membranas plasmática e nuclear para um pulso $500 kV/m$ de intensidade e largura $100 ns$. A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa o potencial na membrana nuclear a curva em vermelho representa ao potencial na membrana plasmática.	62
Figura 19 Condutividades nas membranas nas membranas plasmática e nuclear para um pulso com intensidade de $500 kV/m$ e largura $100 ns$. A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa a condutividade na membrana nuclear a curva em vermelho representa a condutividade na membrana plasmática.	63
Figura 20 Raios máximos dos poros para um pulso com intensidade de $500 kV/m$ e largura de $100 ns$. A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa o poros na membrana nuclear a curva em vermelho representa os poros na membrana plasmática.	63
Figura 21 Distribuição angular dos raios dos poros na membrana nuclear para um pulso com largura de $100 ns$ e intensidade de $500 kV/m$. As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram coletados.	64
Figura 22 Distribuição superficial dos poros na membrana nuclear. A região do polo, em vermelho, apareceu como a área com os maiores poros.	65
Figura 23 Raios máximos dos poros na membrana nuclear em função do campo aplicado para larguras de pulso de $1 ns$, $10 ns$, $25 ns$, $50 ns$ e $100 ns$. A largura de pulso de $100 ns$ apresentou os maiores raios.	65
Figura 24 Potencial transmembrana para pulsos com $100 \mu s$ de largura. As intensidades simuladas foram de $100 kV/m$, $200 kV/m$, $300 kV/m$, $400 kV/m$ e $500 kV/m$	66
Figura 25 Diferença de potencial elétrico na parede celular para pulsos com $100 \mu s$ de largura. As intensidades simuladas foram de $100 kV/m$, $200 kV/m$, $300 kV/m$, $400 kV/m$ e $500 kV/m$	67
Figura 26 Máximas concentrações internas de BLM para pulsos com largura de $100 \mu s$ e intensidades de $100 kV/m$ até $500 kV/m$.	

A seta aponta para o campo elétrico que induziu citotoxicidade mínima para a BLM. A área em rosa destaca concentrações citotóxicas. 67

Figura 27 Imagens tiradas do MET. As pontas de flecha em azul indicam regiões com danos nas membranas plasmáticas e as pontas de flechas em vermelho indicam danos nas paredes celulares..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros da eletroporação para o modelo de expansão dos poros.....	43
Tabela 2	Parâmetros da eletroporação. Os valores indicados dos parâmetros servem para todos os tipos de células.....	45
Tabela 3	Erro relativo entre as simulações e a solução analítica. .	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EP	Eletroporação.....	27
DNA	<i>Ácido Disoxirribonucléico</i>	27
RNA	<i>Ácido Ribonucléico</i>	27
SARS	Síndrome respiratória aguda grave.....	27
Covid-19	Doença do coronavírus.....	27
BLM	Bleomicina.....	28
PEF	<i>Pulsed electric fields</i>	28
RE	Eletroporação reversível.....	33
IRE	Eletroporação irreversível.....	34
nsEP	<i>nanosecond electroporation</i>	35
ECT	Eletroquimioterapia.....	36
AC	Corrente Alternada.....	41
DC	Corrente Contínua.....	41
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina.....	50
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>	50
ESOPE	<i>European Standard Operating Procedures in ECT</i>	51
IEB	Instituto de Engenharia Biomédica.....	51
LCME	Laboratório Central de Microscopia.....	51
MET	Microscópio eletrônico de transmissão.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS

V_m	Potencial transmembrana.....	33
d_m	Espessura da membrana.....	33
E_0	Campo elétrico aplicado entre os eletrodos.....	33
θ	Ângulo formado entre a direção do campo com o vetor normal da membrana.....	33
τ_m	Tempo de carregamento da membrana.....	33
σ_o	condutividade do meio externo.....	35
σ_i	condutividade do meio interno.....	35
C_m	capacitância da membrana.....	35
G_m	condutância da membrana.....	35
W	Largura do microcanal cilíndrico simulado.....	41
L	Distância dentre os eletrodos.....	41
$N(t)$	densidade de poros.....	44
V_{ep}	Tensão característica da eletroporação.....	44
N_0	Densidade de poros de equilíbrio.....	44
q	Coeficiente de eletroporação.....	44
α	Coeficiente de taxa de criação de poros.....	44
σ_{m_0}	Condutividade da membrana anterior a eletroporação.....	44
σ_p	Condutividade do meio do poro.....	44
r_p	Raio do poro.....	44
K	coeficiente dependente do potencial transmembrana adimensional.....	44
w_0	Barreira de energia dentro do poro.....	44
ν	Profundidade relativa dos poros nas membranas.....	44
σ_p	Condutividade do poro na membrana.....	44
σ_o	Condutividade externa.....	44
σ_i	Condutividade interna.....	44
J	Fluxo por área.....	47
A_p	Área total dos poros.....	47
P	Permeabilidade da droga atravessando os poros.....	47
D_B	Coeficiente de difusão.....	47
N_m	Número de moléculas que entra na célula.....	47

N_A constante de Avogadro..... 47

ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

1. Pintarelli, Guilherme B. ; **DA SILVA, JESSICA R.** ; YANG, WUQIANG ; Suzuki, Daniela O. H. . Dielectric Dispersion Modulated Sensing of Yeast Suspension Electroporation. *SENSORS*, v. 22, p. 1811, 2022.
2. PINTARELLI, G. B. ; RAMOS, C. T. S. ;**DA SILVA, J. R.** ; ROSSI, M. J. ; SUZUKI, D. O. H. . Sensing of Yeast Inactivation by Electroporation. *IEEE SENSORS JOURNAL*, v. 1, p. 1-1, 2021.
3. COSTA, JORGE A. ; DE OLIVEIRA, PEDRO X. ; PEREIRA, LUCENARA S. ; **RODRIGUES, JESSICA** ; Suzuki, Daniela O. H. . Sensitivity Analysis of a Nuclear Electroporation Model-A Theoretical Study. *Ieee Transactions On Dielectrics And Electrical Insulation*, v. 28, p. 1850-1858, 2021.
4. **da Silva, Jéssica R.**; Guedert, Raul ; Pintarelli, Guilherme B. ; Suzuki, Daniela O. H. . Computational Study of Parameters of Needle Electrodes for Electrochemotherapy. *IFMBE Proceedings*. 1ed.: Springer Singapore, 2020, v. , p. 193-200.
5. **da Silva, Jéssica R.**; Guedert, Raul ; Pintarelli, Guilherme B. ; Suzuki, Daniela O. H. . A Short Review of Membrane Models for Cells Electroporation. *IFMBE Proceedings*. 1ed.: Springer Singapore, 2020, v. , p. 67-74.
6. PAGANO, P. ; **SILVA, J. R.** ; ANDRADE, D. L. L. S. ; PINTARELLI, G. B. ; SUZUKI, D. O. H. . Computational Study of Electric Field Treatment at Bone-neighboring Tumors. In: COBEM, 2021, Florianópolis. *Proceedings of the 26th International Congress of Mechanical Engineering*, 2021.
7. ANDRADE, D. L. L. S. ; **SILVA, J. R.** ; GUEDERT, R. ; PINTARELLI, G. B. ; BERKENBROCK, J. A. ; ACHENBACH, S. ; SUZUKI, D. O. H. . Electrochemotherapy Effectiveness Loss due to Electrode Bending: An In silico and In vitro Study. In: XXVII Congresso brasileiro de engenharia biomédica, 2020, Vitória. *XXVII Brazilian Congress in Biomedical Engineering*, 2020.
8. G. B. Pintarelli, **J. R. Silva** e D. O. H. Suzuki. .Analysis of Dielectric Properties in Yeast Suspension using Finite-Element Model. Aceito no X Latin American Congress of Biomedical Engineering (CLAIB 2022) e XXVIII Brazilian Congress of Biomedical Engineering (CBEB 2022).

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	28
1.1.1 Objetivo Geral	29
1.1.2 Objetivos Específicos	29
1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 CARACTERÍSTICAS DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA ...	31
2.1.1 Modelo elétrico equivalente	31
2.1.2 Migração de carga	32
2.2 ELETROPORAÇÃO E CRIAÇÃO DE POROS	33
2.2.1 Nanoeletroporação	35
2.2.2 Parede celular	36
2.3 EXPANSÃO DOS POROS	37
2.4 BLEOMICINA	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 DEFINIÇÃO DA GEOMETRIA E PARÂMETROS INICIAIS	41
3.2 DESCRIÇÃO MATEMÁTICA DA ELETROPORAÇÃO....	44
3.2.1 Modelo matemático da expansão dos poros	45
3.2.2 Modelo matemático de difusão	46
3.3 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS	47
3.3.1 Validação geométrica do modelo celular	47
3.3.2 Validação do modelo de expansão dos poros	48
3.3.3 Validação do modelo matemático de difusão	49
3.3.4 Aplicação do modelo matemático na membrana nuclear	49
3.3.5 Aplicação do modelo matemático em leveduras....	50
3.3.6 Estudo <i>in vitro</i> com leveduras	50
3.3.6.1 Suspensão de leveduras	50
3.3.6.2 Configuração da eletroporação	50
3.3.6.3 Estudo piloto por Microscopia Eletrônica	51
4 RESULTADOS	53
4.1 VALIDAÇÃO GEOMÉTRICA	53
4.2 VALIDAÇÃO DA EXPANSÃO DOS POROS	54
4.3 VALIDAÇÃO DA DIFUSÃO	59
4.4 APLICAÇÃO NA MEMBRANA NUCLEAR	62

4.5 APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO EM LEVE- DURAS	66
4.5.1 Estudo piloto por Microscopia Eletrônica	68
5 DISCUSSÃO	71
5.1 TRANSPORTE DE MOLÉCULAS MEDIADO POR EP ...	73
6 CONCLUSÕES	75
6.1 TRABALHOS FUTUROS	75
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Devido ao avanço da engenharia, a utilização da tecnologia tornou-se indispensável para melhorar a qualidade de vida e reduzir as taxas de mortalidade. Neste contexto, a utilização de pulsos elétricos pulsados (PEFs) tem sido largamente estudada em diferentes processos, tais como tratamentos de câncer, em inativação de vírus, como método de conservação e esterilização de alimentos. A eletroporação é um fenômeno físico caracterizado pelo aumento da permeabilidade celular quando células e tecidos são expostos a campos elétricos de alta intensidade e curta duração. O controle da permeabilidade é explicado pela abertura de poros nas membranas celulares. Compreender a relação entre campo elétrico, abertura de poros e permeabilidade de moléculas pelas membranas foram alguns dos objetivos do presente trabalho. Para isto, um modelo matemático de célula esférica foi implementado no COMSOL, que considerou a expansão de poros nas membranas plasmática e nuclear, assim como o processo de difusão. O modelo passou por validação da geometria, da formação dos poros e difusão da bleomicina. O comportamento dinâmico dos poros foi analisado nas membranas plasmática e nuclear, assim como o transporte de um quimioterápico (bleomicina) em leveduras. Um ensaio para fixação de células de leveduras para microscopia eletrônica avaliou o efeito do campo elétrico na levedura. Os resultados revelaram que, conforme a intensidade do campo aumenta, a região onde os poros se formam também aumenta. A intensidade do pulso apresentou impacto mínimo na expansão dos raios dos poros. Entretanto, pulsos longos produziram maiores poros. Pulsos de nanossegundos deslocaram a eletroporação para a membrana nuclear. Campos elétricos superiores a 400 kV/m provocaram danos na parede celular e asseguraram concentração citotóxica mínima de bleomicina no citosol.

Palavras-chave: Eletroporação. COMSOL Multiphysics ®. Membrana plasmática. Membrana nuclear. Potencial transmembrana. Densidade de poros. Condutividade. Campo elétrico. Parede celular.

ABSTRACT

Due to the advancement of engineering, the use of technology has become indispensable for improving the quality of life and reducing mortality rates. Pulsed electric fields have been widely investigated in cancer ablation treatment (*e.g.* electrochemotherapy), as a technique for the inactivation of SARS-CoV-2 and other viruses, and as a method for preservation and cold pasteurization of food. Electroporation is a physical phenomenon that consists of structural rearrangement and pore creation due to an electric field. An *in silico* model was developed in COMSOL to investigate the dynamic behavior of pore expansion and membrane permeabilization during electroporation. The model explores the pore expansion in the plasma and nuclear membranes, and the process of mass-transfer diffusion of a chemotherapeutic drug (bleomycin) into yeast cells. An assay for electron microscopy was also performed. The results demonstrate that stronger pulses increase pore area, but the magnitude of the pulse has a negligible effect on pore expansion. Long pulses produce larger pores and nanosecond pulses target electroporation of the nuclear membrane. Electric fields above 400 kV/m cause damage to the cell wall and provide a minimal cytotoxic concentration of bleomycin in the cytosol.

Keywords: Electroporation. COMSOL Multiphysics [®]. Cell membrane. Nuclear envelope. Transmembrane voltage. Pore density. Conductivity. FEM. Cell wall. Pulsed electric field.

1 INTRODUÇÃO

A eletroporação (EP) é um fenômeno físico caracterizado pela abertura de poros na membrana celular através da aplicação de campos elétricos de alta intensidade por curtos períodos de tempo (IVORRA, 2010). O procedimento se popularizou na década de 1980, quando diversos estudos destinavam-se ao transporte de moléculas em células eucariontes *in vitro*. No início da década de 1990, estudos de eletroporação *in vivo* também foram relatados (ESSA; BONNER; BARRY, 2003).

Originalmente desenvolvida para a transferência genética, a eletroporação passou a ser utilizada no transporte de uma ampla variedade de moléculas: íons, drogas, pigmentos, anticorpos e oligonucleotídeos para DNA e RNA.

Nas últimas décadas, a eletroporação alcançou notabilidade, devido a estudos e aplicações. Um tipo de eletroporação denominado irreversível pode ser usado na esterilização de alimentos (GOLBERG; BELKIN; RUBINSKY, 2009). A eletroporação reversível pode ser usada em tratamentos de câncer como um método de inserção de agentes quimioterápicos em células tumorais cutâneas e subcutâneas, em eletroquimioterapia (SERSA; CEMAZAR; SNOJ, 2009) ou para aumentar a eficiência das vacinas de DNA (RICE; OTTENSMEIER; STEVENSON, 2008), sobretudo pós-pandemia de SARS-CoV2 (WALTZ, 2021). Suas aplicações justificam o tema pelo seu caráter promissor e de alto impacto social.

Na recente era pandêmica, pesquisas terapêuticas com ácidos nucleicos, tais como vacinas de DNA e terapia genética, atraíram atenção expressiva (BAE et al., 2022). No contexto da Covid-19, a vacinação revelou-se o método apropriado para o controle dos vírus (THEOBALD, 2020). O principal desafio enfrentado por vacinas de DNA/RNA é assegurar a aceitação do material genético inserido na célula hospedeira. Existem dois métodos comuns de introdução do DNA/RNA em células imunitárias: a utilização de vetores virais ou um sistema de entrega que transporta o DNA/RNA através da membrana plasmática e promove a síntese da proteína spike. A eletroporação está presente nesse cenário com o objetivo de potencializar a eficiência das vacinas.

A eletroporação, um método de criação de poros em membranas, é geralmente realizada em meios biológicos. Frequentemente surge a necessidade de adotar medidas alternativas à utilização de animais em ensaios de novos métodos e equipamentos na área científica. Leve-

duras são organismos unicelulares de rápido crescimento, baixo custo e fácil manipulação quando comparadas a células animais e apresentam a maioria das mutações causadoras de câncer. Essas mutações ocorrem em genes que exercem função na regulação do ciclo celular, ou no processo de réplica de DNA e divisão celular (PRAY, 2008; SPRADLING et al., 2006). Por estas razões, as leveduras apresentam vantagens para a prática científica.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura utilizada como modelo de célula cancerígena no ambiente científico (MATUO et al., 2012), atuando principalmente como modelo para terapias anti câncer (KURTZ et al., 2005). Além disso, também se estabeleceu como uma poderosa ferramenta para identificação e produção de novas drogas e tem sido empregada na produção de medicamentos como insulina, vacinas de hepatite B e na prevenção de câncer (ARDIANI; HIGGINS; HODGE, 2010). Também possui aplicação industrial em bioprocessos e fermentações.

Existe uma dúvida na literatura sobre a contribuição da parede celular, presente nas leveduras, como uma barreira para a passagem de moléculas através da eletroporação (STIRKE et al., 2019; AOUIDA et al., 2003). As barreiras celulares, parede celular e membrana plasmática, apresentam resistência parcial para o influxo da bleomicina (BLM) em células de leveduras. A BLM é um dos principais medicamentos para o tratamento do câncer via eletroquimioterapia (PODDEVIN et al., 1991), e atua na quebra e eliminação do DNA da célula durante a mitose. Por se tratar de uma molécula polar (BELEHRADEK et al., 1994; STREKOWSKI et al., 1988), a BLM apresenta dificuldade para atravessar a membrana plasmática. Tais dificuldades são causadas pelas cargas das moléculas, tamanho das moléculas, hidrofobicidade, e tantas outras propriedades físico-químicas (MIR; ORLOWSKI, 1999).

Este estudo investigou a permeabilização da BLM através das barreiras celulares em células de leveduras como resultado da ação de pulsos elétricos pulsados (PEF). Várias configurações de pulsos - intensidade e largura - foram simuladas com a finalidade de identificar a influência da parede celular no processo de eletroporação.

1.1 OBJETIVOS

São listados os seguintes objetivos gerais e específicos.

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi construir um modelo de eletropermeabilização de moléculas através de poros criados na membrana celular.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Revisão bibliográfica sobre a eletroporação e sobre os modelos matemáticos;
- Identificar como as aberturas dos poros nas membranas se relacionam com o potencial transmembrana;
- Implementar um modelo de expansão de poros no modelo clássico da eletroporação;
- Implementar um modelo de difusão por transferência de massas;
- Aplicar o modelo de expansão de poros na membrana nuclear;
- Aplicar o modelo em simulações de células *Saccharomyces cerevisiae* e comparar os resultados com a literatura.

1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Inicialmente são apresentados alguns conceitos básicos sobre a ocorrência de eletroporação e suas aplicações, justificando a necessidade de incluir modelos matemáticos como objetos de estudo em conjunto com resultados experimentais. Em sequência, para a compreensão da construção do modelo, são apresentadas as características de uma célula biológica e da biofísica das membranas. Nessas seções, o processo de eletroporação é retomado, e alguns conceitos são analisados com mais profundidade.

Posteriormente, o desenvolvimento do modelo é descrito e implementado. São abordadas as definições de geometria, descrevendo o modelo matemático a ser utilizado e como foram os procedimentos de testes.

Os resultados são analisados da seguinte forma: implementação com validação e estudo de caso. A discussão faz um confronto com a

literatura e compara os resultados obtidos do modelo implementado. Por fim, a conclusão e os trabalhos futuros são apresentados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo são apresentados os conceitos necessários para o desenvolvimento da metodologia proposta.

2.1 CARACTERÍSTICAS DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA

As membranas são bicamadas fosfolipídicas constituídas por fosfatos (hidrofilicos) localizados nas extremidades externas; e por lipídios (hidrofóbicos) nas camadas internas das membranas. Além disso, existem proteínas ATPases ou transportadoras, que ao se ligarem a íons, permitem o transporte através da bicamada, formando canais iônicos. Alguns exemplos de canal iônico são os canais de sódio, potássio, cálcio e cloreto (MAZZANTI; BUSTAMANTE; OBERLEITHNER, 2001).

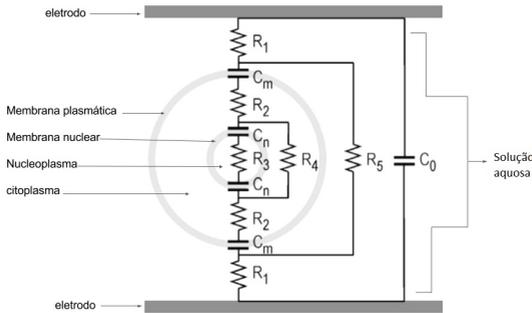
O fluxo de íons pela membrana através dos canais aquosos gera uma corrente elétrica. O registro dessas correntes pode ser capturado por uma técnica denominada *patch clamp* que consiste na excitação de um pequeno fragmento da membrana, assim como de todo o sistema de transporte que atua na região, mantendo o fragmento selado à ponta de uma pipeta e realizando as medições requeridas (WANG et al., 2010). Os dois tipos básicos de sinais fisiológicos responsáveis pelo transporte de materiais através da membrana podem ser químicos ou elétricos (TANG et al., 2006).

2.1.1 Modelo elétrico equivalente

O modelo que analisa os efeitos dos campos elétricos nas células consiste em uma casca dielétrica na qual a célula tem uma membrana contendo um fluido com uma determinada condutividade e está suspensa em um meio condutor. As membranas são descritas com baixas permissividade e condutividade, suspensas em um meio de condutividade e permissividade relativamente elevadas (PAKHOMOV; MIKLAVCIC; MARKOV, 2010).

A célula é descrita por um circuito elétrico formado por componentes passivos. A representação esquemática do circuito equivalente da célula está demonstrado na Figura 1. O modelo considera os valores de permissividade, condutividade e capacitância das membranas plasmática e nuclear além do citoplasma e nucleoplasma.

Figura 1 – Representação da célula como um circuito de componentes passivos.



Fonte: (SCHOENBACH et al., 2007)

Conforme o modelo apresentado na Figura 1 os capacitores representam as membranas celular e nuclear, enquanto os resistores representam o citoplasma e o nucleoplasma.

A resistência da membrana plasmática é provocada por oposição ao movimento de cargas, e sua capacitância é gerada devido aos lipídios existentes nas membranas, que atuam como dielétricos de um capacitor. As condutividades das membranas plasmática e nuclear são consideradas baixas devido ao comportamento isolante dos lipídios, assim como suas permissividades.

As resistências do citoplasma e nucleoplasma também se originam pela oposição das cargas, enquanto as capacitâncias se originam pela capacidade dos meios de armazenar campos elétricos (KANER; BRASLAVSKY; RUBINSKY, 2014). A capacidade de conduzir corrente elétrica no citoplasma e no nucleoplasma é maior do que nas membranas, portanto possuem níveis mais elevados de condutividade e permissividade.

2.1.2 Migração de carga

Na presença de campos elétricos, os íons e cargas diluídos em meio aquoso, tanto intracelular quanto extracelular, tendem a migrar e se acumular nas interfaces da membrana, gerando uma diferença de potencial através da membrana. Essa diferença de potencial resultante

é chamada potencial transmembrana V_m e pode ser representada pela equação 2.1:

$$V_m = V_{in} - V_{out} \quad (2.1)$$

Denomina-se potencial de repouso o estado de equilíbrio, quando a célula não sofre a ação de nenhum estímulo elétrico, apresentando um potencial transmembrana equivalente ao potencial elétrico em seu interior.

A tensão induzida na membrana de uma célula esférica de raio R , espessura d_m , inserida em um campo elétrico uniforme E_0 pode ser modelada a partir da equação 2.2, com base na equação de Laplace no domínio do tempo, válida para a forma dielétrica fina imersa em meio condutivo. A equação do potencial transmembrana V_m é dada por:

$$V_m = 1,5 \times E_0 \times R \times \cos\theta(1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}) \quad (2.2)$$

no qual θ é o ângulo formado entre a direção do campo aplicado com o vetor normal da membrana e 1,5 é o fator que reflete as propriedades geométricas e elétricas da membrana quando imersa em meio de condutividade maior que a membrana, tanto em seu interior quanto exterior. O tempo de carregamento da membrana é dado por τ_m e o tempo t é a quantidade de tempo no qual a célula esteve exposta ao campo elétrico.

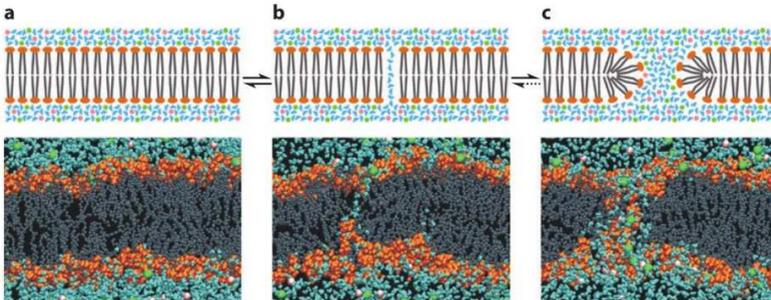
A indução de V_m depende de características do campo aplicado, como: intensidade e frequência (MARTINSEN; GRIMNES, 2011). Para a indução de V_m , geralmente aplica-se campos pulsados com onda quadrada mono/bipolar (BOTTER; MERLETTI, 2016). A intensidade e a largura do pulso são os parâmetros de campo manipulados para este estudo.

2.2 ELETROPORAÇÃO E CRIAÇÃO DE POROS

O mecanismo teórico da eletroporação descreve que células expostas a campos elétricos de alta intensidade podem ter suas membranas rompidas por ação da pressão de moléculas de água. Como consequência, a membrana se reajusta e se estabiliza formando nanoporos. A Figura 2 ilustra os passos da formação dos nanoporos.

Existem dois diferentes efeitos resultantes vinculados a intensidade do campo aplicado. O primeiro caso, a Eletroporação Reversível (RE), é observada quando a intensidade do campo elétrico é suficientemente alta para ultrapassar o limiar de eletroporação, mas a célula

Figura 2 – Modelo idealizado do nível molecular (superior) e simulação dinâmica molecular em nível atômico (inferior) de uma aplicação de eletroporação. (a) Bicamada intacta. (b) Moléculas de água começam a penetrar a camada, formando um caminho aquoso, (c) Os fosfolípidios adjacentes ao caminho aquoso se reorientam, estabilizando o poro e permitindo a passagem de mais água ou mais substâncias.



Fonte: (CASTELLVÍ; BANÚS; IVORRA, 2016)

mantém sua capacidade de retornar ao estado inicial. Já o segundo caso, a Eletroporação Irreversível (IRE) ocorre quando a intensidade do campo é tão alta que a célula perde sua capacidade de reestruturação, resultando na morte celular em consequência da perda da homeostase (apoptose) ou por desequilíbrio osmótico. Um terceiro efeito, não relacionado diretamente à eletroporação, ocorre quando correntes iônicas causam aquecimento devido ao efeito Joule, especialmente em condições acima da IRE (KOTNIK et al., 2012).

Na eletroporação convencional, pulsos com largura de microssegundos (μs) e intensidade de algumas centenas de kilovolts por metro (kV/m) são aplicados em células em um meio osmoticamente balanceado. Sob essas condições, a membrana carrega rapidamente e poros são criados, tornando possível a passagem de materiais hidrofílicos pela membrana.

Estudos revelaram que a RE é alcançada quando V_m excede um potencial crítico, entre $0,2 V$ e $1 V$, embora esse valor possa variar em diferentes células (COSTA et al., 2021). Ao atingir o potencial crítico, o processo de formação de poros se inicia na membrana. Ao final do pulso, os poros podem se fechar, dependendo de sua intensidade e de

sua largura. Se V_m ultrapassa o valor crítico, a deformação se torna permanente e a eletroporação é convertida em irreversível.

Os efeitos na membrana plasmática são minimizados caso os pulsos sejam suficientemente curtos, devido ao modelo de casca dielétrica, em que V_m resulta da migração da carga. O processo de migração de carga apresenta uma constante de tempo característica de carregamento dependente das condutividades do meio externo σ_o e interno σ_i , da capacitância da membrana C_m , da condutância da membrana intacta g_m e do raio da célula R_c , conforme demonstrado na equação 2.3 (SUZUKI, 2009):

$$\tau_m = R_c \times C_m \times \frac{\sigma_i + 2\sigma_o}{2\sigma_i\sigma_o + R_c G_m(\sigma_i + 2\sigma_o)} \quad (2.3)$$

O valor de C_m é obtido por 2.4:

$$C_m = \frac{\varepsilon_m \varepsilon_0}{d_m} \quad (2.4)$$

em que ε_0 e ε_m representam as permissividades do vácuo e da membrana, respectivamente, e d_m a espessura da membrana.

G_m é obtida pela equação 2.5

$$G_m = \frac{\sigma_m}{d_m} \quad (2.5)$$

Neste trabalho foram utilizados pulsos retangulares e monopolares que permitem maior controle e reprodutibilidade para o transporte.

2.2.1 Nanoeletroporação

O conceito de nanoeletroporação (nsEP) foi elaborado sob a justificativa de reduzir o calor induzido na célula, aumentar a permeabilidade das estruturas intracelulares (NUCCITELLI, 2022), e induzir à morte celular por apoptose (COSTA et al., 2021).

Os efeitos de campos elétricos em mitocôndrias foram estudados sobretudo mediante a aplicação de pulsos com largura de nanossegundos. Em oposição à eletroporação convencional, com pulsos de micro e milissegundos, inicialmente acreditava-se que a eletroporação de nanossegundos só poderia criar pequenos poros em membranas de organelas celulares, com impacto desprezível na membrana plasmática (NAPOTNIK; POLAJŽER; MIKLA VČIČ, 2021).

A apoptose é uma morte celular regulada e não-inflamatória, ca-

racterizada por propriedades morfológicas e mecanismos bioquímicos (S, 2007). De acordo com a literatura, é um tipo de morte celular frequente em ablações provocadas pela eletroporação, tais como IRE, eletroquimioterapia (ECT) e nsEP (NAPOTNIK; POLAJŽER; MIKLAVČIČ, 2021). A apoptose causada por nsEP foi extensivamente estudada para tratamentos *in vitro* e *in vivo* desde a sua confirmação. O efeito da morte celular sem o uso de compostos químicos levou ao tratamento de tumores à base de nsEP.

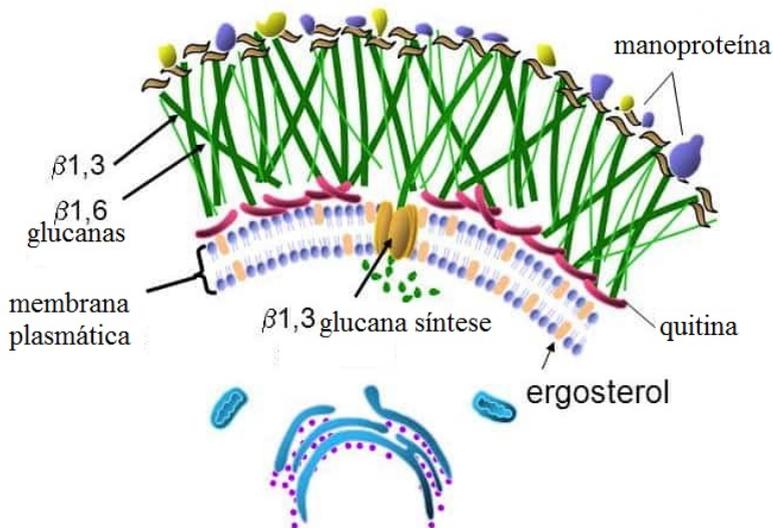
Embora a teoria preveja que a membrana plasmática seja ignorada quando exposta a pulsos de nanossegundos, mudanças foram observadas em análises de microscopia com fluorescência (BEEBE et al., 2002), espectroscopia dielétrica (GARNER et al., 2007) ou *patch clamp* (PAKHOMOV et al., 2007).

2.2.2 Parede celular

Á exceção do Reino animal, todos os demais reinos apresentam células envolvidas por parede celular. A parede celular é uma estrutura permeável, na ordem de centenas de nanômetros, que desempenha inúmeras funções em diferentes células. Sua presença confere sobretudo resistência estrutural à célula (MADIGAN et al., 2016), mas também age como a primeira barreira seletiva para nutrientes, biomoléculas e íons. Há diversas formas de regular a taxa com a qual moléculas podem atravessar a barreira da parede celular. Este processo pode ser feito por tratamento químico com solventes orgânicos e detergentes ou por cisalhamento mecânico, ou por tratamento com PEF (STIRKE et al., 2019).

Cada microorganismo possui uma composição própria da parede celular. As leveduras, objeto deste estudo, possuem suas paredes compostas principalmente por quitina, um polissacarídeo derivado da glicose. Em bactérias, as paredes são formadas majoritariamente por complexos de carboidratos e peptidoglicano, enquanto que plantas e algas possuem a celulose como principal substância (CARVALHO H. F. AND RECCO-PIMENTEL, 2004). A Figura 3 ilustra uma composição da parede celular em fungos.

Figura 3 – Representação da estrutura da parede celular em fungos.



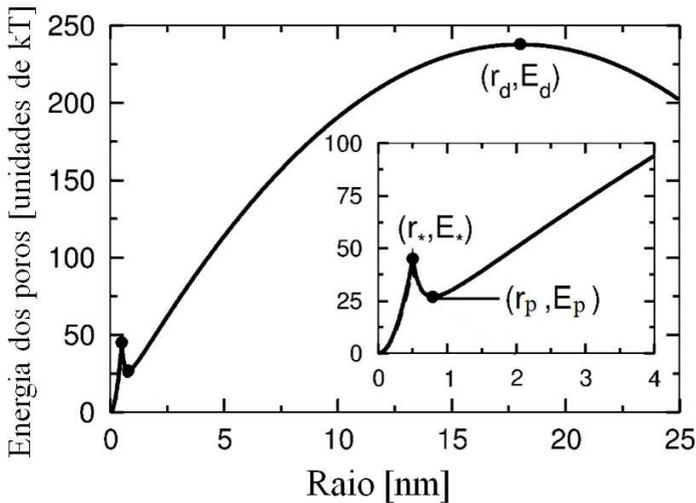
Adaptado de nammex.com

2.3 EXPANSÃO DOS POROS

A teoria da eletroporação estabelece que, inicialmente, todos os poros são hidrofóbicos e são criados a uma taxa determinada por sua energia (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996) (ver Fig.4). A maioria deles são rapidamente destruídos, porém, caso algum poro ultrapasse um valor crítico ($r \geq r^*$), ele será convertido em poro hidrofílico, sendo esse o objeto deste estudo.

Na ausência de campo elétrico, há um balanceamento dinâmico entre a repulsão causada pelas cabeças dos lipídios, a tensão de linha agindo no perímetro do poro e a tensão de superfície da membrana. Enquanto a repulsão estérica e tensão de superfície promovem um aumento do raio do poro, a tensão de linha age como uma contra-força. O campo elétrico promove aumento do raio do poro e um desbalanceamento nesse equilíbrio dinâmico.

Figura 4 – Energia dos poros hidrofóbicos ($r < r_*$) e hidrofílicos ($r > r_*$) como função dos raios dos poros quando $V_m = 0$ (em linhas sólidas). Os raios r_* e r_d indicam os limites para a criação dos poros hidrofílicos e para a expansão dos poros, respectivamente, enquanto r_p representa o raio de energia mínima. E_* , E_p e E_d correspondem às energias para os poros r_* , r_p e r_d , respectivamente.



Adaptado de Smith, Neu e Krassowska (2004)

2.4 BLEOMICINA

A bleomicina é um glicopeptídeo com efeito antibacteriano e antiviral, porém sua maior utilidade deve-se ao efeito citotóxico. Aparece na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde, sendo um dos medicamentos mais importantes em um sistema básico de saúde (ORGANIZATION et al., 2020).

A BLM é uma molécula pequena (com área superficial polar de 685 Å²) de carga positiva. Vários transportadores são responsáveis pela absorção da BLM em leveduras (BROSSEAU; ANDREEV; RAMOTAR, 2015). Uma vez dentro das células, as atividades anticancerosas da

BLM dependem de sua habilidade para produzir RNA e quebras de DNA, levando assim à morte da célula (LIU; WU; ZOU, 2007).

Em muitos casos, a bleomicina é administrada clinicamente por injeção em forma livre (CROOKE et al., 1977). Entretanto, um estudo feito por Yu et al. (2015) mostrou que a quantificação da absorção se revelou cerca de duas vezes mais eficiente quando associado com cobre(III) ou ferro(II) do que a BLM sem metal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar as simulações e analisar o comportamento das membranas durante o processo de eletroporação, foi utilizado o COMSOL Multiphysics[®] (COMSOL Inc., Burlington, MA), um software para análise de elementos finitos. Nele, é possível criar um objeto de estudo com geometria com até 3 dimensões, adicionar os parâmetros e os efeitos físicos necessários para o estudo.

Ao começar um projeto no COMSOL, foi utilizada a opção “*wizard model*”, que cria um novo arquivo “.mph”.

O primeiro passo é selecionar a dimensão espacial que será utilizada no projeto. Para este trabalho, escolheu-se uma geometria de eixo 2D-axisimétrico, por sua simplicidade computacional.

A seguir, deve-se identificar o módulo que tenha a física necessária para simular o comportamento desejado. A física utilizada neste trabalho é a ‘*Electric Currents (EC)*’ que faz parte do módulo AC/DC e contém as condições para simular campos elétricos e tensões necessárias para o processo de eletroporação. Para simplificação computacional, foi usado o modelo resultante da equação diferencial parcial de Smoluchowski (SMITH; WEAVER, 2008), caracterizada como uma equação diferencial ordinária.

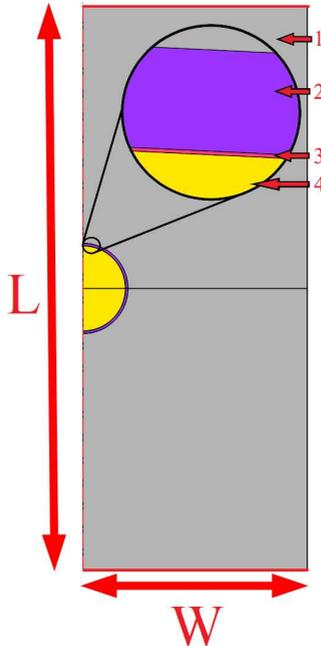
3.1 DEFINIÇÃO DA GEOMETRIA E PARÂMETROS INICIAIS

Este estudo assume uma geometria celular conforme o diagrama esquemático da Figura 5, disposto em um eixo 2D, e considera apenas citoplasma, membrana e meio extracelular. As organelas foram desconsideradas por não serem objeto desse estudo, cujo enfoque é simular o transporte molecular do ambiente externo para o interior da célula na presença de campo.

A Figura 5 mostra uma célula esférica isolada e imersa em solução condutiva que preenche um microcanal cilíndrico de largura W e altura L , cujas paredes contêm eletrodos de placas paralelas responsáveis por gerar um campo elétrico uniforme. Nesta configuração, o modelo matemático é aplicado nas membranas para se obter o potencial transmembrana, a densidade de poros, a condutividade, a expansão dos poros e a concentração na região.

Os valores dos parâmetros envolvidos no processo de modelagem variam de acordo com cada estudo e serão descritos posterior-

Figura 5 – Modelo geométrico implementado no COMSOL. L representa a distância entre os eletrodos e W representa o raio dos eletrodos. Na área em destaque estão representados 1) a solução externa, 2) a parede celular, 3) a membrana plasmática e 4) o citoplasma.



mente.

Os estudos no domínio do tempo utilizando este sistema foram implementados utilizando o software COMSOL *Multiphysics*, versão 5.1, e importados para o Matlab para serem manipulados graficamente.

Formas geométricas - círculos e retângulo - foram adicionadas e representam as membranas e a região entre os eletrodos, respectivamente. O projeto da geometria utiliza como base os valores adicionados como parâmetros globais da Tabela 1.

Embora o COMSOL disponha de uma biblioteca composta por alguns materiais como madeiras e polímeros, por exemplo, nenhum contém as propriedades de uma célula biológica, tornando necessária a criação dos materiais que compõem uma célula. Na biblioteca de itens disponíveis para *Electric currents*, as opções de permissividade e condutividade foram adicionadas com os valores da Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros da eletroporação para o modelo de expansão dos poros.

Símbolo	Valor	Definição
R_c ¹	10 μm	raio celular
R_n	5 μm	raio nuclear
d_m ²	5 nm	espessura da membrana
d_n ²	40 nm	espessura no envelope nuclear
σ_e ³	0,2 $S.m^{-1}$	condutividade extracelular
σ_c ⁵	0,3 $S.m^{-1}$	condutividade do citoplasma
σ_{mn} ⁶	6e - 3 $S.m^{-1}$	condutividade da membrana nuclear
σ_{mp} ⁴	3e - 7 $S.m^{-1}$	condutividade da membrana
σ_{np} ⁶	1,35 $S.m^{-1}$	condutividade do nucleoplasma
σ_p	0,22 $S.m^{-1}$	condutividade da solução no poro
ε_e ³	80 ε_0	permissividade do meio
ε_{mp} ⁷	8,57 ε_0	permissividade da membrana
ε_c ⁸	154,4 ε_0	permissividade do citoplasma
ε_{mn} ⁶	28 ε_0	permissividade da membrana nuclear
ε_{np} ⁶	52 ε_0	permissividade do nucleoplasma
r^* ⁹	0,51 nm	raio mínimo dos poros hidrofílicos
D ⁹	$5 \times 10^{-14} m^{-2} s^{-1}$	coeficiente de difusão para poros
β ⁹	$1,4 \times 10^{-19} J$	energia de repulsão estérica
γ ⁹	$1,8 \times 10^{-11} J.m^{-1}$	energia limite
δ_0 ⁹	$1 \times 10^{-6} J.m^{-2}$	tensão da bicamada sem poros
δ' ⁹	$2 \times 10^{-2} J.m^{-2}$	tensão da interface hidrocarboneto-água
F_{max} ⁹	$0,7 \times 10^{-9} N.V^{-2}$	máxima força elétrica para $V_m = 1V$
r_h ⁹	$0,97 \times 10^{-9} m$	constante
r_t ⁹	$0,31 \times 10^{-9} m$	constante

Fonte: ¹PUCIHAR; MIKLAVCIC; KOTNIK ²ALBERTS et al., ³IVORRA; RUBINSKY, ⁴GASCOYNE et al., ⁵YAO et al., ⁶SANO et al., ⁷SANO et al., ⁸YANG et al., ⁹KRASSOWSKA; FILEV .

As configurações de pulso - intensidade e largura de pulso - empregadas foram modificadas no decorrer desta dissertação conforme o objetivo de cada estudo. Entretanto, os tempos de subida e descida dos pulsos foram configurados para 1% do valor de sua duração.

3.2 DESCRIÇÃO MATEMÁTICA DA ELETROPORAÇÃO

Uma vez que V_m ultrapassa o seu valor crítico, a taxa de criação de poros aumenta, assim como a condutividade da membrana.

O modelo assintótico da eletroporação simplifica a equação de Smoluchowski (NEU; KRASSOWSKA, 1999) para descrever a densidade de poros $N(t)$ como:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha e^{(\frac{V_m(t)}{V_{ep}})^2} \left(1 - \frac{N(t)}{N_0} e^{-q(\frac{V_m(t)}{V_{ep}})^2} \right) \quad (3.1)$$

em que V_{ep} é a tensão característica da eletroporação, N_0 é a densidade de poros de equilíbrio e q e α são constantes da eletroporação.

As regiões onde os poros são formados apresentam condutividade média de (SMITH; WEAVER, 2008):

$$\sigma_m(t) = \sigma_{m_0} + N(t)\sigma_p\pi r_p^2 A \quad (3.2)$$

na qual σ_{m_0} é a condutividade da membrana anterior à eletroporação, σ_p é a condutividade do poro e r_p é o raio do poro. O termo A é um coeficiente dependente de v_m , que é o potencial transmembrana adimensional $v_m = V_m \frac{q_e}{kT}$ e é obtido pela equação 3.3. w_0 é a barreira de energia dentro do poro e ν é a profundidade relativa dos poros nas membranas.

$$A = \frac{e^{v_m} - 1}{e^{v_m} \frac{w_0 e^{w_0 - \nu v_m}}{w_0 - \nu v_m} - \frac{w_0 e^{w_0 + \nu v_m + \nu v_m}}{w_0 + \nu v_m}} \quad (3.3)$$

A condutividade σ_p do poro é dada por (REMS et al., 2013):

$$\sigma_p = \frac{\sigma_o - \sigma_i}{\ln\left(\frac{\sigma_o}{\sigma_i}\right)} \quad (3.4)$$

em que σ_o e σ_i representam as condutividades do meio externo e interno, respectivamente.

A Tabela 2 mostra os parâmetros da eletroporação utilizados para a implementação.

Tabela 2 – Parâmetros da eletroporação. Os valores indicados dos parâmetros servem para todos os tipos de células.

Símbolo	Parâmetro	Valor
q	Constante de eletroporação ^{2,3,4}	2,46
α	Coefficiente da taxa de criação dos poros ^{2,3,4}	$10^9 m^2 s^{-1}$
q_e	Carga do elétron (q_e)	$1,6 \times 10^{-19} C$
N_0	Densidade de poros no equilíbrio ^{2,4}	$1,5 \times 10^9 m^{-2}$
V_{EP}	Tensão característica da eletroporação ³	258 mV
w_0	Barreira de energia no poro ^{2,3}	2,65 J
n	Profundidade relativa dos poros ^{2,5}	0,15
r_p	Raio dos poros ²	0,8 nm
k	Constante de Boltzmann	$1,38 \times 10^{-23}$
T	Temperatura ⁵	295 K

Fonte: ¹RUYTER-SPIRA et al. ²PUCIHAR; MIKLAVCIC; KOTNIK, ³REMS et al., ⁴RETELJ; PUCIHAR; MIKLAVČIČ, ⁵ DEBRUIN; KRASSOWSKA.

3.2.1 Modelo matemático da expansão dos poros

A maioria dos poros hidrofílicos criados possuem raios com valor aproximado de r^* e imediatamente expandem para raio de energia mínima r_p . Este estudo assume que todos os poros são criados inicialmente com r_p a uma taxa governada por 3.1. Uma vez criados, os poros estão sujeitos à expansão e são regidos pela equação 3.5.

Para uma célula com um número total de K poros, a taxa de variação do raio r_j é determinada pela seguinte EDO (KRASSOWSKA; FILEV, 2007):

$$\frac{dr_j}{dt} = \frac{D}{kT} \left(\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + \frac{r_h}{r+r_t}} + 4\beta \left(\frac{r^*}{r} \right)^4 \frac{1}{r} - 2\pi\gamma + 2\pi r \delta_{eff} \right)$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, K. \quad (3.5)$$

A equação 3.5 é válida para poros hidrofílicos ($r \geq r^*$). O primeiro termo é referente a força elétrica induzida pelo V_m local; o segundo termo representa a repulsão estérica das cabeças dos lipídios; o terceiro termo é a tensão de linha agindo no perímetro do poro; e o quarto termo é a tensão superficial da membrana. D é o coeficiente de difusão para o raio do poro, k é a constante de Boltzmann, F_{max} é a força elétrica máxima para $V_m = 1 V$, e δ_{eff} é o coeficiente para

a tensão efetiva da membrana, que pode ser computada pela seguinte função:

$$\delta_{eff}(A_p) = 2\delta' - \frac{2\delta' - \delta_0}{\left(1 - \frac{A_p}{A}\right)^2} \quad (3.6)$$

nas quais δ_0 , δ' e A são a tensão da membrana sem os poros, a energia por poro da interface hidrocarboneto-água, e a área superficial da célula, respectivamente. $A_p = \sum_{j=1}^K \pi r_j^2$ computa a área combinada de todos os poros existentes.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros utilizados neste estudo. Avaliações acerca da intensidade e largura do pulso foram realizadas.

3.2.2 Modelo matemático de difusão

O modelo matemático descrito é capaz de prever o número de poros e seus tamanhos durante protocolos de pulsos variados. Incluir o processo de difusão é uma forma de aproximar o modelo matemático de resultados experimentais. A modelagem do transporte de moléculas foi desenvolvido pensando no contexto da utilização da bleomicina durante a eletroporação. Ele combina e resolve simultaneamente o modelo assintótico da eletroporação, a expansão dos poros e a difusão do meio extracelular para o meio intracelular. A solução do modelo matemático prediz a concentração da bleomicina, assim como o fluxo de moléculas pela membrana. Os resultados podem ser traduzidos em probabilidade de morte celular.

O processo de difusão foi implementado por Granot e Rubinsky (2008), em que a segunda Lei de Fick foi utilizada para descrever o processo de transferência de massa durante a eletroporação reversível. Os métodos e dados fornecidos pelo artigo foram utilizados para calibração do modelo matemático. Os parâmetros usados são os mesmos da Tabela 1, com exceção da solução extracelular, que possui condutividade de $1,2 \text{ S.m}^{-1}$ e permissividade de $72 \varepsilon_0$, mesmos valores utilizados pelos autores do artigo.

De acordo com Segunda Lei da Termodinâmica, haverá fluxo de massa de uma região de maior concentração para outra de menor concentração. A não uniformidade da distribuição de concentrações é garantida inicialmente ao assumir que toda a massa de bleomicina está no meio extracelular, enquanto a concentração no interior da célula é nula. A bleomicina que atravessa os poros por difusão pode ser com-

putada por $J \times A_p$, com A_p a área total dos poros na membrana e J representando o fluxo por área, apresentado na equação:

$$J = -P \cdot (C_{ex} - C_{in}) \quad (3.7)$$

na qual P é a permeabilidade da droga que atravessa os poros na membrana, admitida como a razão do coeficiente de difusão D_B pela espessura da membrana d_m . É uma aproximação assumida para poros grandes e moléculas pequenas, uma vez que não existem valores confiáveis para a permeabilidade em membranas eletroporadas.

A concentração no espaço é calculada pela equação de difusão:

$$\frac{\partial c}{\partial t} - \nabla(D_B \nabla c) = R \quad (3.8)$$

com $R = \frac{JA_p}{V_0}$ representando a taxa de reação para uma célula contida em um volume V_0 definido pela geometria da simulação.

Essa análise permite calcular o número de moléculas N_m que entra em cada célula a partir da equação:

$$N_m = N_A \cdot C_{in} \cdot V_0 \quad (3.9)$$

com N_A designando a constante de Avogadro, C_{in} a concentração de BLM no interior da célula.

3.3 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS

3.3.1 Validação geométrica do modelo celular

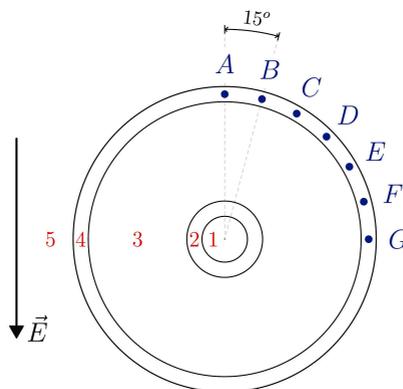
Inicialmente, o modelo matemático da eletroporação foi validado na implementação geométrica do modelo celular através da equação analítica de V_m (Equação 2.2). Os resultados do COMSOL foram comparados com os valores teóricos. O estudo geométrico baseou-se em uma varredura de valores de L em função do raio da célula de R . O pulso utilizado foi de 100 kV/m e largura de $100 \mu\text{s}$. As bordas externas foram consideradas isolantes. No COMSOL, a malha de elementos finitos triangulares foi gerada como "*extremely fine*" para as membranas e "*finer*" para as outras geometrias e consistiu de 498173 elementos finitos.

3.3.2 Validação do modelo de expansão dos poros

A inexistência de medições experimentais quanto às dimensões dos poros formados na membrana representa um obstáculo para validar o modelo matemático. A microscopia ótica é incapaz de observar o diâmetro dos poros, ao passo que a preparação da amostra para microscopia eletrônica decorre lentamente, inviabilizando observações sobre quaisquer alterações transitórias na membrana. Consequentemente, as investigações restringem-se a análises teóricas sobre os fenômenos de formação e evolução dos poros.

O método adotado consistiu em implementar o modelo matemático da eletroporação com expansão de poros no COMSOL e explorar a relação entre o potencial transmembrana e o tamanho dos poros gerados nos pontos demonstrados na Figura 6. Os resultados foram comparados com os estudos realizados por Yao et al. (2017), nos quais foram avaliados: o processo dinâmico de desenvolvimento dos poros, a distribuição dos poros e as suas regiões, assim como as configurações dos pulsos. A Tabela 1 apresenta o conjunto de parâmetros adotados neste estudo.

Figura 6 – Esquemático dos pontos amostrados na membrana plasmática. Os pontos estão dispostos com 15 graus entre si. Os números em vermelho equivalem aos domínios da célula: 1) nucleoplasma; 2) membrana nuclear; 3) citoplasma; 4) membrana plasmática e 5) solução extracelular.



Inicialmente, todos os poros criados são hidrofóbicos. Muitos deles rapidamente se fecham, contudo caso qualquer destes poros ul-

trapasse o seu valor crítico, ele se converte em hidrofílico. Uma vez criados os poros hidrofílicos, estes expandem-se a um valor de energia mínima r_p (SMITH; NEU; KRASSOWSKA, 2004). Neste estudo, todos os poros foram criados com valor inicial de $0,8 \text{ nm}$ (Tabela 2)

A fim de detectar as fases de expansão dos poros, a simulação consistiu em expor a célula a campo com 150 kV/m de intensidade e largura de $10 \mu\text{s}$.

3.3.3 Validação do modelo matemático de difusão

Tendo a eletroporação reversível em foco, um modelo de difusão foi implementado por Granot e Rubinsky (2008) utilizando a segunda Lei de Fick para descrever o processo. Os métodos e os dados fornecidos pelo artigo foram utilizados como calibração para o estudo. Os parâmetros usados são os mesmos apresentados na Tabela 1.

Em adição à calibração, uma validação comparativa do modelo implementado foi realizada por meio do estudo experimental de citotoxicidade da bleomicina introduzida em culturas de células realizado por Poddevin et al. (1991), em que células DC-3F (células apresentadoras de antígeno do sistema imune) foram mantidas em presença de bleomicina por 5 minutos. Em células eletroporadas com pulsos de 150 kV/m de intensidade, a concentração mínima que registrou morte celular foi de aproximadamente de 1 nM , uma concentração 1000 vezes menor do que a concentração correspondente para as células não eletroporadas. Os autores concluíram que, em uma concentração de 70 nM , todas as células eletroporadas com 150 kV/m morreram.

A validação ocorreu utilizando 70 nM como concentração externa, cuja exposição garantiu a morte celular quando a célula foi exposta a um campo de 150 kV/m e $100 \mu\text{s}$ (PODDEVIN et al., 1991). O processo de transporte molecular implementado nas simulações foi puramente difusivo e desconsiderou as cargas elétricas da BLM e o processo de condução elétrica.

3.3.4 Aplicação do modelo matemático na membrana nuclear

A primeira etapa de aplicação do modelo desenvolvido é composta por um estudo da membrana nuclear, e busca analisar se a expansão dos poros é relevante para a nanoeletroporação. Para isto, utilizou-se pulsos de 100 kV/m a 1000 kV/m e largura de 10 ns até 100 ns . Os

potenciais transmembrana, as condutividades e os raios máximos dos poros formados nas membranas plasmática e nuclear foram computados e comparados. A distribuição dos raios formados na membrana nuclear e a evolução dos raios máximos formados para os diferentes campos aplicados também foram analisados.

3.3.5 Aplicação do modelo matemático em leveduras

A próxima etapa analisa a eletroporação em leveduras, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como estudo de caso para aplicação do modelo matemático. Pulsos com largura de 100 μs e intensidades de 100 kV/m a 500 kV/m foram simulados. Os parâmetros da simulação com leveduras foram os utilizados por Pintarelli et al. (2021).

A diferença de potencial na membrana plasmática e na parede celular para as diferentes intensidades de campo foram analisadas para identificar os efeitos da eletroporação na levedura. O estudo também analisou a influência da eletroporação no transporte da bleomicina para o interior da célula.

3.3.6 Estudo *in vitro* com leveduras

3.3.6.1 Suspensão de leveduras

Células *Saccharomyces cerevisiae* ATCC ® 36900™ foram utilizadas para o ensaio *in vitro*. As cepas foram obtidas de um repositório do Laboratório de Bioprocessos (Microbiologia, MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Essas células foram cultivadas em 15 mL de meio líquido YPD (do inglês, *Yeast peptone dextrose*) esterilizado (autoclavagem a 120 °C, 15 minutos) (2% de peptona, 2% de extrato de levedura, 2% de glicose, pH 5,74) e incubadas por 24 h a 30 °C. Esse intervalo é necessário para a reprodução das leveduras. Todos os experimentos foram executados a temperatura ambiente de 25 °C.

3.3.6.2 Configuração da eletroporação

O protocolo da EP utilizado consistiu em 8 pulsos retangulares com intensidades de 400 kV/m e 500 kV/m e largura de 100 μs a uma taxa de repetição de 1 Hz (intervalo de 1 segundo entre pulsos). É

um protocolo similar ao Padrão Europeu de Procedimentos Operacionais em Eletroquimioterapia (ESOPE, do inglês, *European Standard Operating Procedures in Electrochemotherapy*).

O protocolo de pulsos do ESOPE foi aplicado utilizando um equipamento desenvolvido no IEB-UFSC. Os eletrodos consistem em duas placas paralelas de aço inoxidável AISI 304 de 6×7 mm, separadas por 1 mm (d) e montadas em um suporte de PVC. A superfície dos eletrodos é maior do que a superfície de contato das amostras, o que evita a difração do campo elétrico. Dessa forma, todas as células foram expostas a intensidades de campo elétrico semelhantes.

Os eletrodos foram limpos e secos com álcool etílico 70%, e uma gota da suspensão de células com o tampão YPD (40 μ L) foi pipetada entre os eletrodos. O conteúdo foi removido com uma micropipeta após a aplicação do PEF (ou não, no caso do controle) e seguiu para os estudos de microscopia (estudos de morfologia celular).

3.3.6.3 Estudo piloto por Microscopia Eletrônica

Células de leveduras dos grupos controle e tratados com eletroporação foram observados e fotografados no Microscópio de Transmissão Eletrônica, modelo *JEM – 1011 TEM*, para análise da morfologia das células e das paredes celulares.

As leveduras foram fixadas na própria lâmina, em solução de glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4 %, sacarose 0,2 M, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por aproximadamente 12 h. A fixação foi seguida por 3 lavagens, de 20 minutos cada, com concentrações decrescentes de sacarose, no mesmo tampão. Então, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO_4), a 2 %, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 4 horas, à temperatura ambiente. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M, por três vezes, de 15 minutos cada, e desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), por 20 minutos em cada concentração, exceto as acetonas 30 % e 50 %, com trocas de 15 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas lentamente em resina SPURR em uma seqüência de 7 etapas, com acetona 100 % + resina 3:1 (24 horas), 2:1 (24 horas), 1:1 (16 horas), 1:2 (12 horas) e 1:3 (12 horas), e 2 vezes, em resina pura, durante 24 horas cada vez.

Os cortes ultrafinos foram feitos no Laboratório Central de Microscopia - LCME - da UFSC. Posteriormente, os cortes foram observados e fotografados no MET, com uma tensão de aceleração dos elétrons

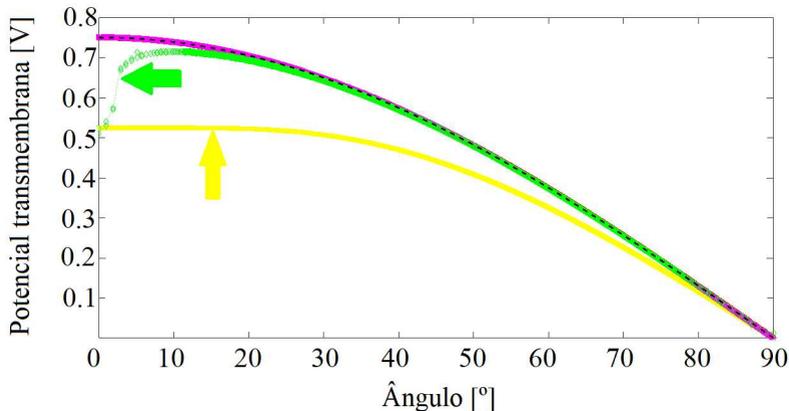
de 80 *kV*.

4 RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO GEOMÉTRICA

A Figura 7 mostra a distribuição do potencial transmembrana como uma função do ângulo entre a direção do campo incidente e a direção normal da membrana para 3 valores de L , que representa a distância entre os dois eletrodos. O tracejado em preto representa o potencial transmembrana teórico da solução analítica (Eq. 2.2).

Figura 7 – Distribuição angular do potencial transmembrana relativo. Efeitos da variação da distância entre os eletrodos em relação à equação analítica de V_m . A linha tracejada em preto representa o potencial teórico. Em rosa, a distância entre os eletrodos foi de $100 R$; em verde, a distância foi de $1000 R$ com a seta indicando as maiores variações no polo em comparação com a solução analítica; e em amarelo, a distância foi de $2,5 R$ e a seta indica variações por toda a célula.



Uma distorção aparece, principalmente, na região dos pólos da célula, $\theta = 0$, onde o campo incidente é máximo. Os erros relativos correspondentes às distâncias entre eletrodos para erros maiores que 3 % estão indicados na Tabela 3.

Os resultados referentes à geometria indicaram a existência de uma gama de valores que reduziram os desvios de leitura quando a

Tabela 3 – Erro relativo entre as simulações e a solução analítica.

Ângulo [°]	2,5R	5R	1000R
0	0,2700	0,0920	0,0100
5	0,2970	0,0200	0,0630
10	0,2899	0,0191	0,0320
15	0,2761	0,0189	0,0214
20	0,2589	0,0187	0,0175
25	0,2400	0,0194	0,0129
30	0,2196	0,0182	0,0120
35	0,2002	0,0189	0,0098
40	0,1822	0,0176	0,0084
45	0,1665	0,0179	0,0085
90	0	0	0,0273

distância entre eletrodos variou de 10 R até 500 R . Para essas distâncias, os erros relativos apresentaram valores menores que 3 %. No caso de L inferior a 10 R , os erros distribuíram-se por praticamente toda a célula, ao passo que, para distâncias superiores a 500 R , os erros concentraram-se nas regiões dos pólos.

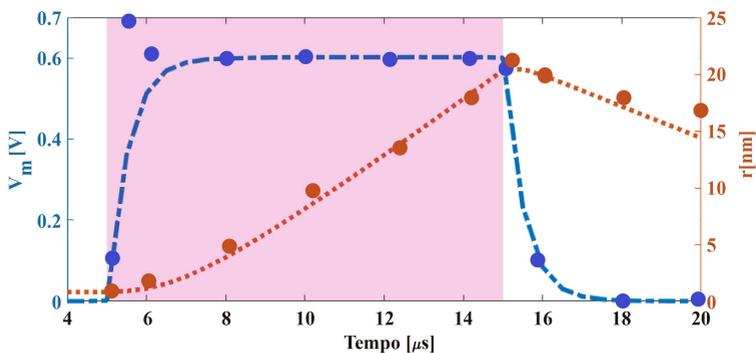
Com base nos dados obtidos, fixou-se L em 100 R , e esse valor se manteve para todas as aplicações utilizadas neste trabalho, sendo suficiente para garantir um campo elétrico uniforme. O tamanho dos eletrodos coincide com a largura do micro-canal W e foi definido em 2 L , com a célula localizada no centro, evitando qualquer interferência das extremidades, consideradas dielétricas.

4.2 VALIDAÇÃO DA EXPANSÃO DOS POROS

Até o instante da aplicação do pulso, $V_m = 0$ e todos os poros possuem um raio r_p que minimiza a energia da bicamada lipídica. A aplicação do campo elétrico em $t = 5 \mu s$ iniciou a fase de carregamento, quando os poros se expandiram assim que V_m excedeu o seu valor limiar (ver Figura 8).

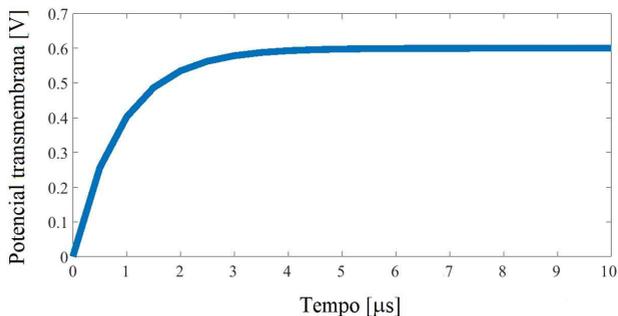
A curva da Figura 9 apresenta V_m teórico a partir da equação analítica temporal 2.2 para um ângulo $\theta = 0$. O objetivo dessa curva foi comparar com o gráfico da Figura 8, ao apontar V_m máximo de 0,6

Figura 8 – Evolução temporal dos raios dos poros (curva vermelha) e do potencial transmembrana (curva azul). A região em rosa destaca o intervalo de tempo de $10 \mu s$ em que o pulso foi aplicado. Os pontos em azul e em vermelho apresentam, respectivamente, os pontos do potencial transmembrana e dos raios dos poros retirados de Yao et al. (2017).



V e o tempo de carga da membrana de $0,9 \mu s$ sem a eletroporação.

Figura 9 – Potencial transmembrana teórico a partir da equação analítica.

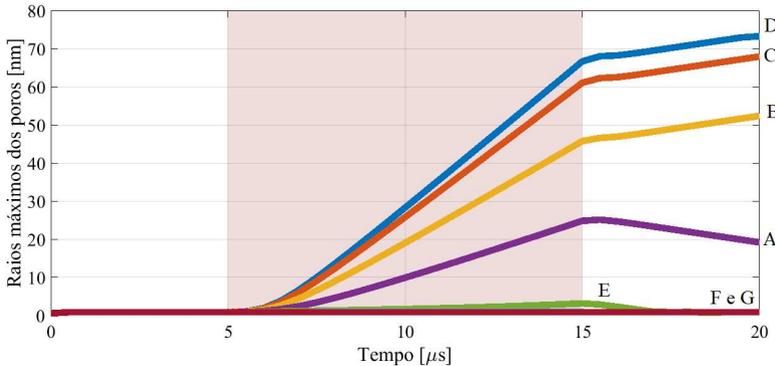


Quando V_m se estabilizou, teve início o estágio de expansão dos poros, cuja dimensão aumentou devido à dependência de V_m^2 para a força elétrica (primeiro termo da Equação 3.5). O seu aumento ocorreu até ao final da aplicação do pulso, momento em que os poros se

tornaram recuperáveis (quando são reduzidos ao estado de menor energia) ou irrecuperáveis (quando a tensão superficial é demasiadamente grande, o poro expande indefinidamente e a eletroporação se torna irreversível).

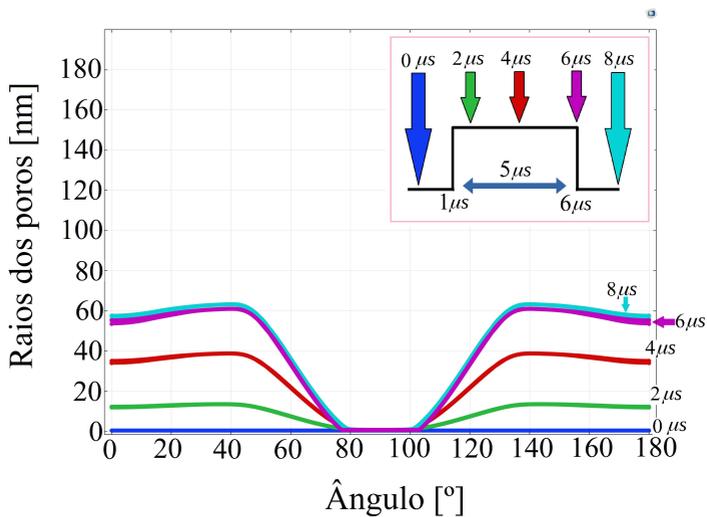
A Figura 10 mostra a evolução dos raios dos poros para os pontos indicados da Figura 6. O gráfico temporal mostra que ao final do pulso, alguns raios recuaram (A,E,F,G), ao passo que D, C e B seguiram em expansão.

Figura 10 – Dinâmica dos raios dos poros. A região em rosa destaca o tempo de aplicação do pulso com intensidade de 150 kV/m e largura de $10\ \mu\text{s}$. As curvas A, B, C, D, E, F e G correspondem aos pontos da Figura 6.

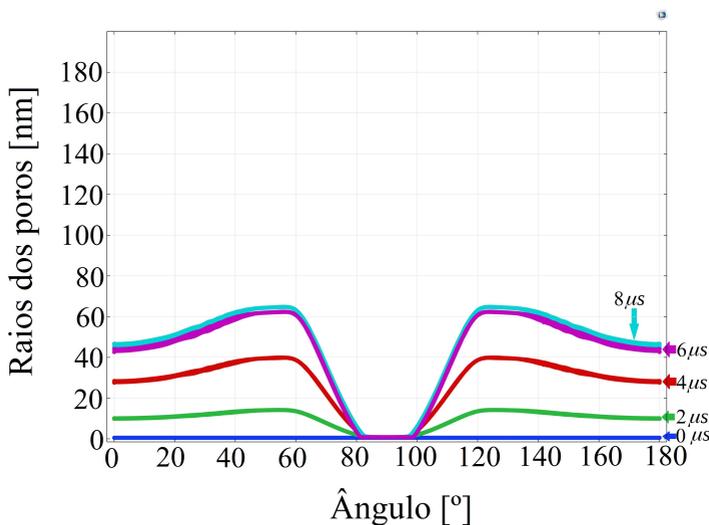


A distribuição espacial da eletroporação na membrana plasmática é apresentada nas Figuras 11 e 12. Não se observou eletroporação na região equatorial da membrana, em contraste com a região de eletroporação registrada de 0° até $\sim 80^\circ$. As curvas ilustram os efeitos de intensidade e largura do pulso. Para pulsos de mesma largura, a intensidade afetou principalmente a região onde os poros se formaram, exercendo pouca influência nos tamanhos dos poros. Para larguras de pulso iguais, os maiores raios surgiram próximos ao equador para maiores intensidades. Consequentemente, a intensidade repercute na distribuição de áreas dos poros recuperáveis e irrecuperáveis. Por outro lado, com o aumento da largura de pulso os poros se dilataram, mas houve pouca alteração na região eletroporada, ou seja, a largura do pulso influenciou somente o tamanho dos poros.

Figura 11 – Distribuição tempo-espacial dos raios dos poros para um pulso com largura de $5 \mu\text{s}$ e intensidades de a) 500 kV/m e b) 1000 kV/m . As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram computados.

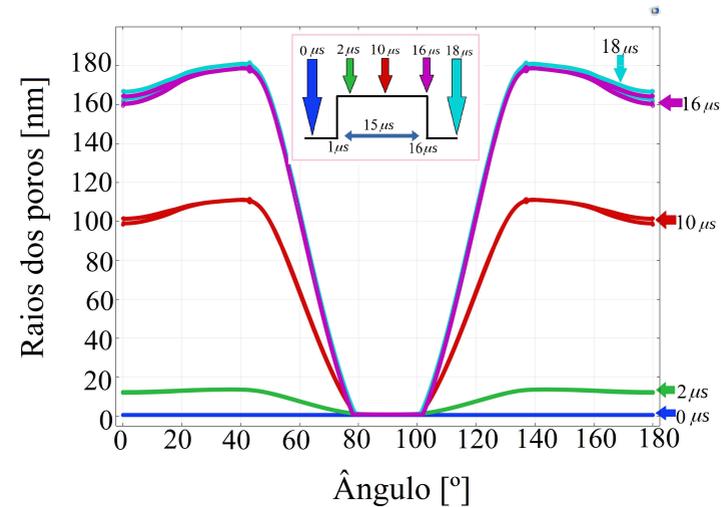


(a) 500 kV/m

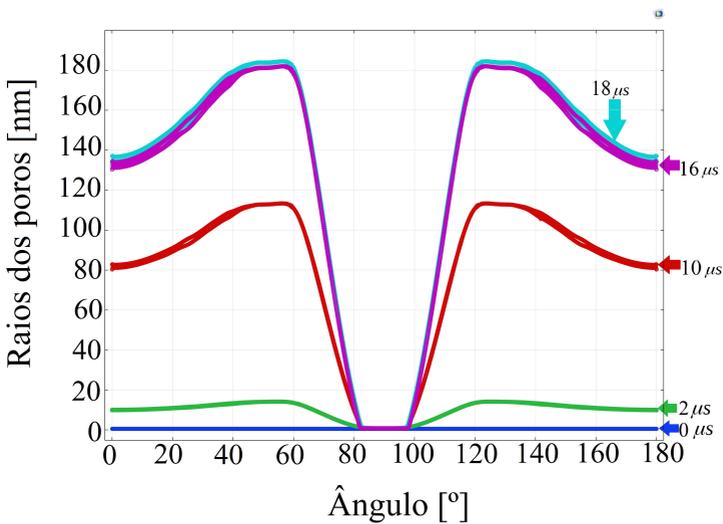


(b) 1000 kV/m

Figura 12 – Distribuição tempo-espaial dos raios dos poros para um pulso com largura de $15 \mu s$ e intensidades de a) 500 kV/m e b) 1000 kV/m . As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram computados.



(a) 500 kV/m

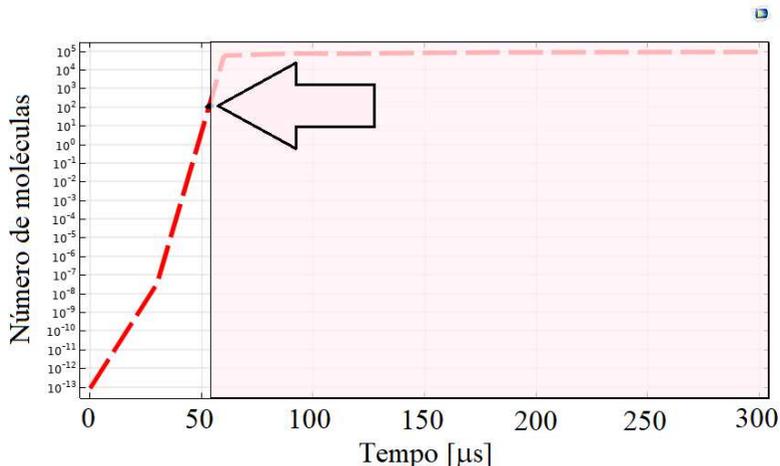


(b) 1000 kV/m

4.3 VALIDAÇÃO DA DIFUSÃO

A Figura 14 ilustra a variação da concentração interna de bleomicina e a Figura 13 mostra a quantidade de moléculas de bleomicina que entrou na célula. Em $t \sim 53 \mu s$, a quantidade mínima de moléculas de bleomicina necessária para induzir a citotoxicidade de 100 moléculas foi ultrapassada, sendo considerada suficiente. Essa quantidade de moléculas equivale a uma concentração interna de $\sim 4 \times 10^{-7} \text{ mol}/\text{m}^3 s$ ou 4 nM .

Figura 13 – Evolução temporal das moléculas de bleomicina que entram na célula. A parte rosa do gráfico destaca a existência de moléculas de bleomicina que induziu citotoxicidade e a seta aponta para o instante em que esse limite foi ultrapassado.



A validação do modelo matemático ocorreu utilizando 70 nM como concentração externa, cuja exposição garantiu a morte celular quando a célula foi exposta a um campo de $150 \text{ kV}/\text{m}$ e $100 \mu s$ (PODDEVIN et al., 1991).

A representação espacial da concentração de bleomicina na Figura 15 em $t = 300 \mu s$ reforça a hipótese de que a concentração obtida foi suficiente para o presente estudo. Os cortes da Figura 16 apresentam as áreas de maior fluxo de bleomicina em direção ao interior da célula.

Figura 14 – Evolução temporal da concentração de bleomicina no interior da célula. A parte rosa do gráfico destaca a existência de moléculas de bleomicina que induziu citotoxicidade e a seta aponta para o instante em que esse limite foi ultrapassado.

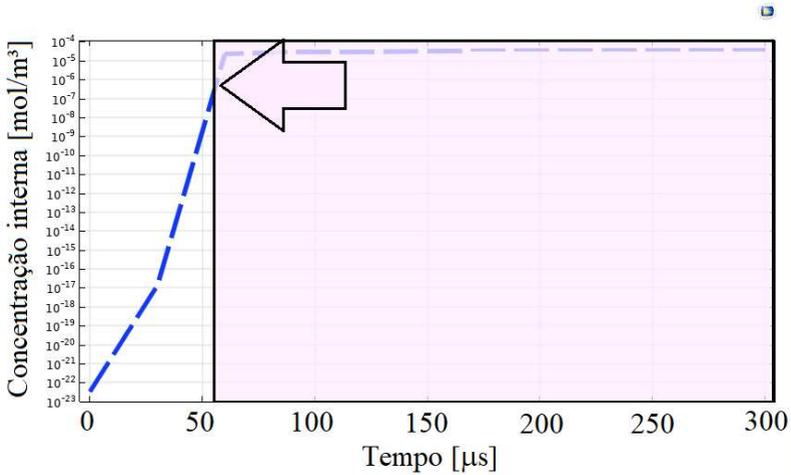
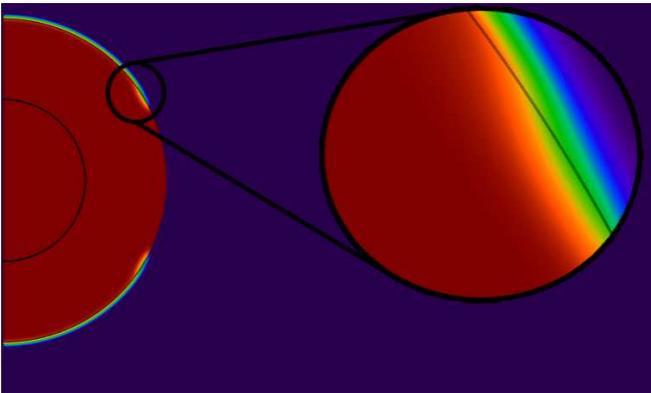
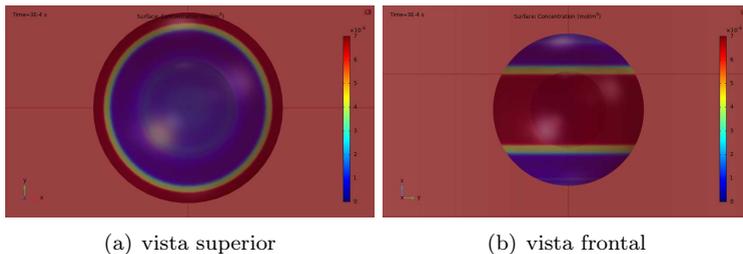


Figura 15 – Corte transversal 2D e zoom na membrana plasmática. A região destacada aponta para a variação da concentração através da membrana na área de maior entrada de bleomicina na célula.



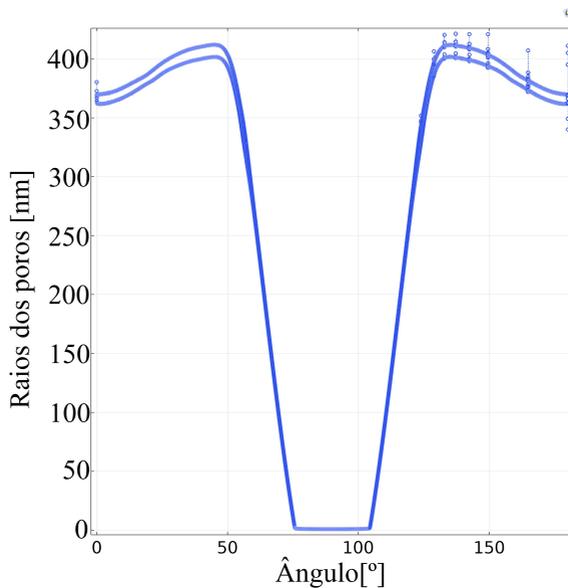
A região de maior influxo de bleomicina através da membrana

Figura 16 – Cortes da figura 3D da variação da concentração de bleomicina. As regiões coloridas da célula mostram onde houve maior influxo através dos poros formados na membrana plasmática.



aconteceu em $\theta = 50$. A Figura 17 apresenta os raios máximos criados na membrana plasmática na mesma região e justifica a localização onde ocorreu o maior transporte molecular.

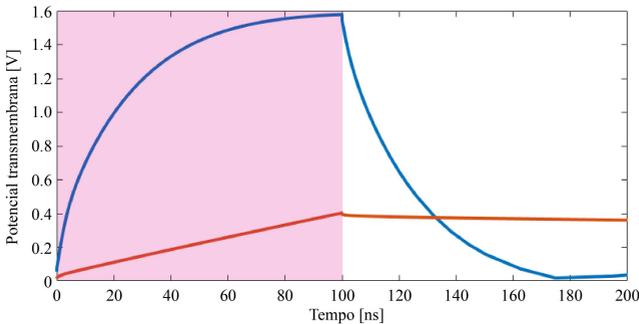
Figura 17 – Raios máximos dos poros em $t = 300 \mu s$.



4.4 APLICAÇÃO NA MEMBRANA NUCLEAR

Inicialmente, o modelo matemático calculou os potenciais transmembrana e as condutividades nas membranas para um pulso com intensidade de 500 kV/m e largura 100 ns . A Figura 18 apresenta V_m nas membranas, coletadas no pólo. Notou-se que, para um mesmo pulso, o potencial induzido na membrana nuclear foi maior. Os comportamentos das condutividades nas membranas foram observados na Figura 19. O aumento da condutividade da membrana nuclear é explicado sobretudo pelo aumento do número de poros formados.

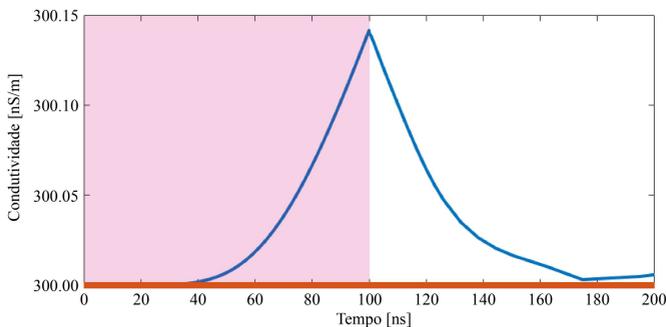
Figura 18 – Potencial transmembrana nas membranas plasmática e nuclear para um pulso 500 kV/m de intensidade e largura 100 ns . A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa o potencial na membrana nuclear a curva em vermelho representa ao potencial na membrana plasmática.



Verificou-se o predomínio da eletroporação na membrana nuclear, para essa configuração de pulso. Em razão de seu maior tempo de carga, V_m na membrana plasmática é menos sensível ao campo em comparação com a membrana nuclear e leva mais tempo para carregar e descarregar, provocando uma alteração praticamente nula em sua condutividade.

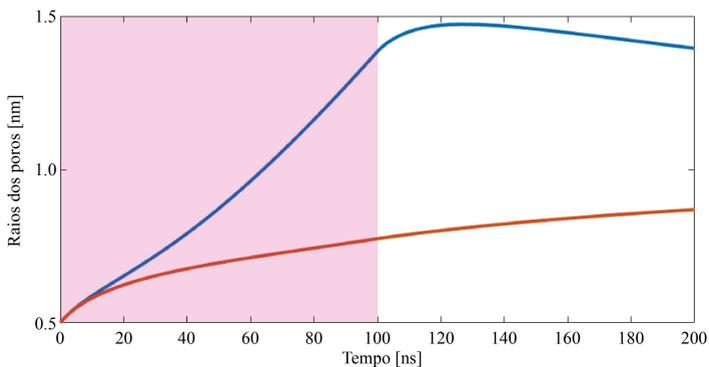
Diferenças no comportamento de potenciais transmembrana em pulsos com largura menor produziram poros menores quando comparados a pulsos com larguras maiores (ver Figura 11). A Figura 20 exhibe o desenvolvimento dos poros nas membranas e reforça a noção sobre a largura do pulso como principal agente na expansão dos poros, inclusive com a exposição a campos elétricos de maior intensidade. Ainda que a membrana nuclear tenha apresentado maior sensibilidade aos cam-

Figura 19 – Condutividades nas membranas nas membranas plasmática e nuclear para um pulso com intensidade de 500 kV/m e largura 100 ns . A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa a condutividade na membrana nuclear a curva em vermelho representa a condutividade na membrana plasmática.



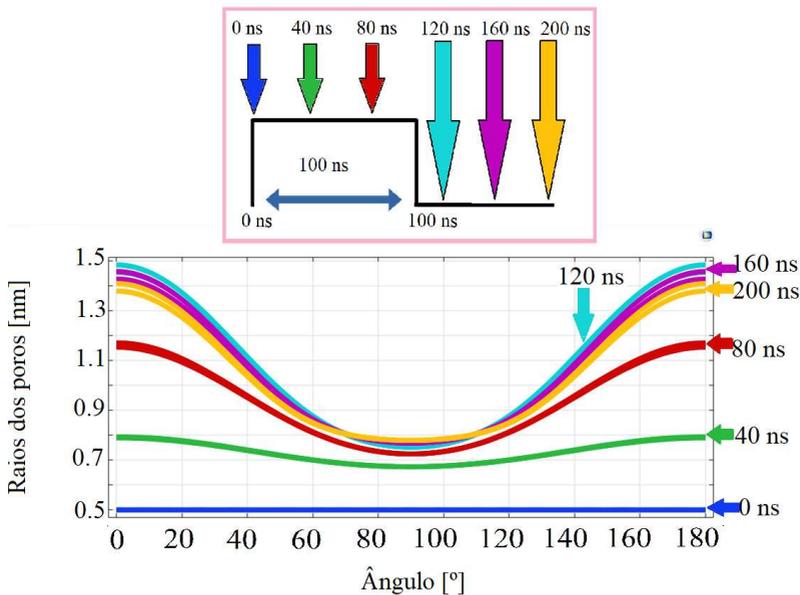
pos de nanossegundos, o crescimento dos poros não foi tão relevante quando comparado ao modelo clássico da eletroporação, que supõe o mesmo tamanho em todos os poros.

Figura 20 – Raios máximos dos poros para um pulso com intensidade de 500 kV/m e largura de 100 ns . A região em rosa destaca a aplicação do pulso. A curva em azul representa o poros na membrana nuclear a curva em vermelho representa os poros na membrana plasmática.



As Figuras 21 e 22 apresentam as distribuições espaciais e superficial, respectivamente, na membrana nuclear. Identificou-se que, à semelhança da membrana plasmática, os poros não se distribuíram uniformemente pela membrana e se restringiram à região polar.

Figura 21 – Distribuição angular dos raios dos poros na membrana nuclear para um pulso com largura de 100 ns e intensidade de 500 kV/m. As curvas correspondem ao tempo em que os dados foram coletados.



Uma varredura de intensidades de campos foi feita para algumas larguras de pulso, como mostra a Figura 23. Os dados coletados sugerem que uma solução possível para a permeabilização de moléculas grandes na membrana nuclear, a exemplo do DNA, consistiria em aplicar um pulso de, no mínimo, 10 kV/cm com largura de 100 ns. A Figura 23 sintetizou os resultados anteriores ao identificar uma relação entre as configurações de pulso e as dimensões dos poros e explicitou a relevância em considerar a expansão dos poros na permeabilização de moléculas grandes.

Figura 22 – Distribuição superficial dos poros na membrana nuclear. A região do polo, em vermelho, apareceu como a área com os maiores poros.

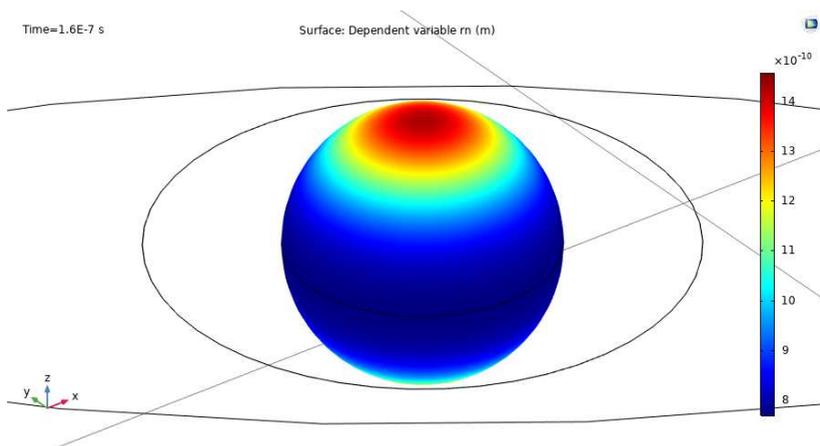
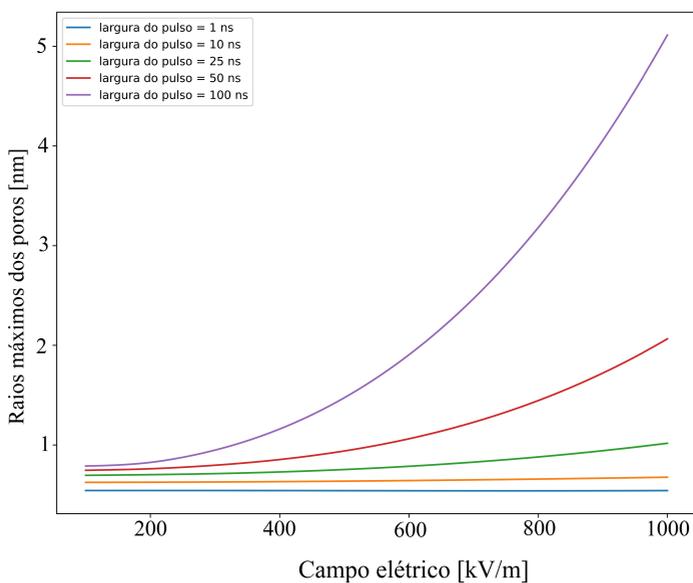


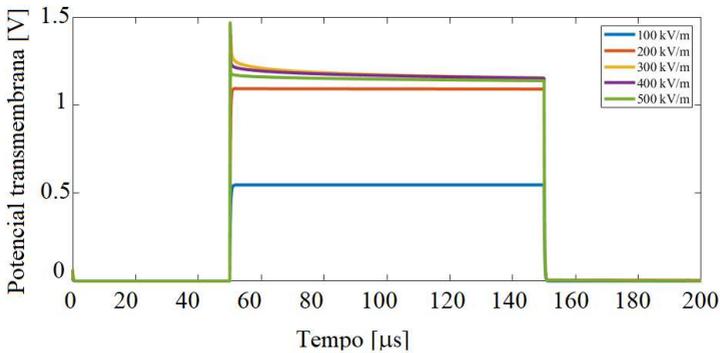
Figura 23 – Raios máximos dos poros na membrana nuclear em função do campo aplicado para larguras de pulso de 1 ns, 10 ns, 25 ns, 50 ns e 100 ns. A largura de pulso de 100 ns apresentou os maiores raios.



4.5 APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO EM LEVEDURAS

A Figura 24 apresenta a curva temporal de V_m para diferentes intensidades de um pulso com largura de $100 \mu s$. A elevação das intensidades do pulso a partir de 200 kV/m saturaram em um potencial próximo a 1 V , valor afirmado pela teoria como barreira entre a eletroporação reversível e irreversível.

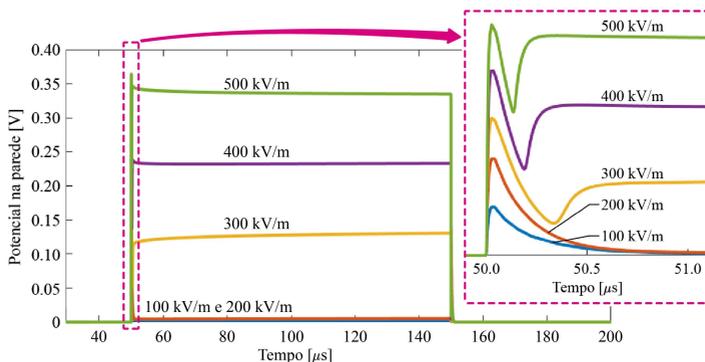
Figura 24 – Potencial transmembrana para pulsos com $100 \mu s$ de largura. As intensidades simuladas foram de 100 kV/m , 200 kV/m , 300 kV/m , 400 kV/m e 500 kV/m .



As curvas da Figura 25 mostram as diferenças de potencial na parede celular com um destaque no transiente. Nos campos de 100 kV/m e 200 kV/m , observou-se um pico no início do pulso, que rapidamente retornou ao seu estado de repouso. Os pulsos com intensidades de 300 kV/m , 400 kV/m e 500 kV/m mostraram-se suficientemente grandes ao manter a diferença de potencial durante a aplicação de pulso, e então danificar a parede celular.

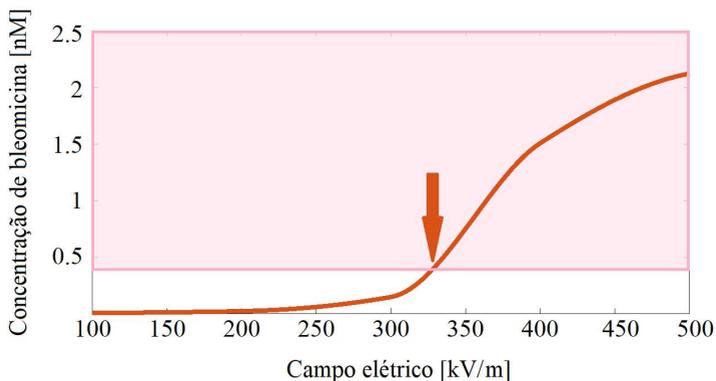
As simulações do modelo de difusão possibilitaram a construção de um gráfico de concentração de BLM no interior da célula em função do campo elétrico aplicado. A Figura 26 permite justificar as mortes celulares ocorridas somente para pulsos com intensidades de 400 kV/m e 500 kV/m , considerando que a concentração mínima de BLM interna que provocou citotoxicidade foi $\sim 4 \times 10^{-7} \text{ mol/m}^3$. Embora os resultados sugiram que a largura do pulso tenha maior efeito sobre os tamanhos dos poros e, conseqüentemente, na concentração, a esco-

Figura 25 – Diferença de potencial elétrico na parede celular para pulsos com $100 \mu\text{s}$ de largura. As intensidades simuladas foram de 100 kV/m , 200 kV/m , 300 kV/m , 400 kV/m e 500 kV/m .



lha de utilizar as intensidades dos pulsos no eixo x se deu devido ao vasto uso do protocolo ESOPE com largura de pulso de $100 \mu\text{s}$ em experimentos descritos na literatura.

Figura 26 – Máximas concentrações internas de BLM para pulsos com largura de $100 \mu\text{s}$ e intensidades de 100 kV/m até 500 kV/m . A seta aponta para o campo elétrico que induziu citotoxicidade mínima para a BLM. A área em rosa destaca concentrações citotóxicas.



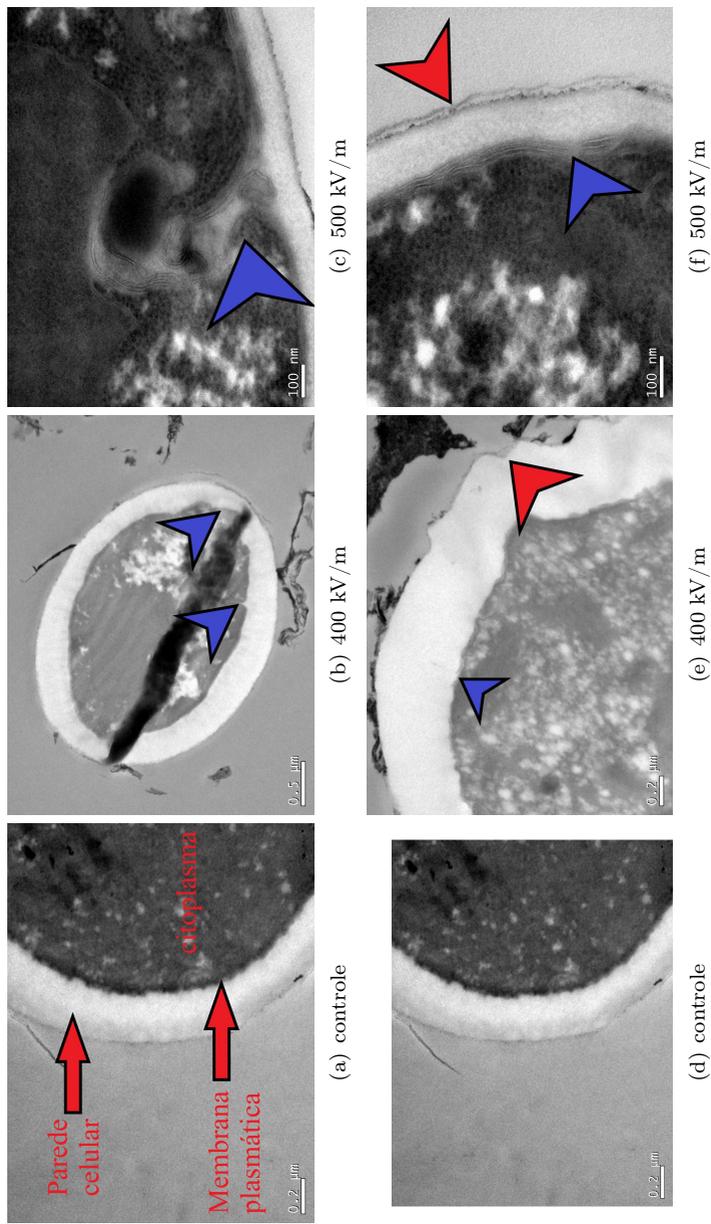
Um dos objetivos do presente estudo foi simular o transporte de BLM em células de levedura por difusão mediante eletroporação. Como consequência, utilizar pulsos com intensidade e largura adequadas para não induzir inviabilidade celular causada por eletroporação irreversível foi essencial. Por esse motivo, a máxima intensidade utilizada foi 500 kV/m .

4.5.1 Estudo piloto por Microscopia Eletrônica

A Figura 27 mostra as fotografias do grupo controle (a e d) e aplicações de PEFs com intensidades de 400 kV/m e 500 kV/m em leveduras. As fotografias são apresentadas com observações e marcações. As deformidades (recuos que representam dano celular) nas membranas plasmáticas e paredes celulares foram selecionadas manualmente e foram marcadas pelas setas em azul e vermelho, respectivamente.

O protocolo de fixação utilizado foi o mesmo adotado em células vegetais. O procedimento de fixação de leveduras no MET apresentou limitações metodológicas, como o acréscimo de áreas com detritos (pedaços dispersos de célula), pedaços de células mortas e cicatrizes geradas nos processos de secagem ou mesmo de correntes elétricas geradas pela própria microscopia eletrônica. No entanto, estas limitações não impediram a visualização dos efeitos dos campos elétricos na parede celular.

Figura 27 – Imagens tiradas do MET. As pontas de flecha em azul indicam regiões com danos nas membranas plasmáticas e as pontas de flechas em vermelho indicam danos nas paredes celulares.



5 DISCUSSÃO

O modelo apresentado nesta dissertação permitiu investigar a contribuição dos tamanhos dos poros formados nas membranas no transporte de moléculas pelo mecanismo de difusão. Foi avaliado como os resultados apresentados se relacionam com experimentos descritos na literatura.

A implementação apresentada por Yao et al. (2017) considerou que a eletroporação ocorreu quando V_m excedeu o limiar de 1 V e depois decaiu para um valor estacionário. Embora sua curva tenha o mesmo valor de V_m estacionário que a apresentada na Figura 8, os tempos de carga da membrana são distintos. O gráfico da Figura 9 evidenciou o perfil de carga da membrana, que aconteceu em $\approx 0,9 \mu s$ e assegurou a validade do modelo. O pico de tensão apresentado no artigo sugere a aplicação de um campo elétrico maior do que o declarado.

Outra diferença significativa na implementação do modelo está relacionada a malha utilizada. Enquanto Yao et al. (2017) utilizou uma malha adaptativa com aproximadamente 5000 elementos finitos, o modelo construído para este trabalho foi feito de forma diferente para cada domínio (*extremely fine* para estruturas de menor dimensão, como as duas membranas; *finer* para domínios maiores, como a solução extracelular, citoplasma e nucleoplasma) com um número de elementos aproximadamente 10 vezes maior.

A retração e o alargamento dos poros podem corresponder a eletroporação reversível e irreversível, respectivamente (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Esses perfis foram observados na Figura 10 e as curvas reiteraram a afirmação descrita por Yao et al. (2017) de que poros de raios acima de 40 nm se tornam irrecuperáveis, levando à IRE.

Os aspectos elétricos se relacionam intrinsecamente com o objetivo da eletroporação. Assim como a membrana plasmática, ao ser exposta a campos elétricos, a membrana nuclear sofre o processo de carregamento da membrana em função de suas características capacitivas. O tempo de carga descreve o tempo necessário para a membrana atingir seu potencial transmembrana máximo em um dado campo, e depende das características geométricas da célula. Portanto, as membranas plasmática e nuclear possuem tempos de carga distintos e requerem configurações de campo diferenciadas para a ocorrência de eletroporação. O emprego da eletroporação da membrana nuclear habitualmente exige intensidades de pulso maiores do que a eletroporação de mem-

brana plasmática, ao passo que o inverso ocorre com a largura do pulso - pulsos mais longos eletroporam a membrana plasmática (COSTA et al., 2021).

A consequência dos tempos distintos de cargas das membranas é que a nsEP tem como foco a eletroporação da membrana nuclear. Entretanto, os resultados apresentados nas Figuras 20 e 23 reforçam o conceito de que pulsos de largura de nanossegundos geram poros menores. Tal resultado revela um inconveniente, uma vez que é essencial assegurar que os poros atinjam o tamanho apropriado para a aplicação requerida, mantendo-se abertos pelo tempo suficiente. Como exemplo, os poros devem ter, no mínimo, 5 *nm* de raio e devem permanecer abertos além de 1 *ms*, caso o objetivo seja a passagem de moléculas de DNA (RYBENKOV; VOLOGODSKII; COZZARELLI, 1997). Dentre as configurações de pulso estudadas para a eletroporação da membrana nuclear, o único pulso que cumpriu esse requisito foi o pulso de 1000 *kV/m* com largura de 100 *ns* (ver Figura 23).

A existência de uma estrutura como a parede celular adicionou complexidade para o desenvolvimento do modelo. Sabe-se da existência de uma relação entre a pressão hiperosmótica sofrida pela membrana plasmática e a integridade da parede celular. Além disso, há evidências de que a fluidez da membrana altera propriedades mecânicas da parede celular devido às proteínas da parede ligadas à membrana (AOUIDA et al., 2003). Entretanto, os mecanismos de ligação entre as duas estruturas não estão completamente elucidados.

Os resultados experimentais para 200 *kV/m* e 300 *kV/m* descritos por Pintarelli et al. (2021) não causaram morte celular e seu experimento de viabilidade indicou que, ainda que existam danos na parede celular provocados por pulso de 300 *kV/m*, a morte celular foi observada apenas em pulsos cujas intensidades atingiram 400 *kV/m* e 500 *kV/m*. As curvas apresentadas na Figura 25 demonstraram que o campo elétrico de 300 *kV/m* foi capaz de manter o potencial na parede, mas não foi suficientemente grande ao ponto de desencadear morte celular, em contraste com o campo de 400 *kV/m*. Tais resultados sugerem uma regidez dielétrica da parede celular no intervalo de 0,4 *MV/m* a 1,2 *MV/m*, referentes aos campos de 300 *kV/m* e 400 *kV/m*, respectivamente. A verificação dessa hipótese pode se tornar objeto de estudo para investigações futuras

5.1 TRANSPORTE DE MOLÉCULAS MEDIADO POR EP

A parede celular possui uma estrutura porosa e dita permeável, porém se apresenta como a maior barreira no trânsito de íons. Os principais sistemas de transporte de íons para a célula de levedura incluem bombas de íons, transportadores, um canal de potássio e uma corrente catiônica não seletiva. Este estudo buscou investigar a influência da eletroporação como agente ativo para o transporte difusivo.

A duração dos poros, assim como sua destruição, é essencial para compreender o mecanismo de permeabilização das células de levedura induzida pela EP. Observações microscópicas revelaram que o transporte mediado por eletroporação é dependente do tamanho e da carga das moléculas. Pequenas moléculas conseguem penetrar na célula tanto durante como após o pulso, em áreas da membrana onde V_m é suficientemente alto (KOTNIK et al., 2019). Tal afirmação reitera os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12 e os conectam às Figuras 15 e 16, que mostraram que o maior fluxo de bleomicina aconteceu nas regiões onde os maiores poros se formaram.

Tratando-se de espécies com carga elétrica, a maioria das passagens durante o pulso é eletroforética, ao passo que após o pulso, a passagem é difusiva em ambas as direções, apesar de experimentos recentes sugerirem uma contribuição não negligenciável de recuperação pós-pulso da membrana plasmática no transporte de pequenas espécies com carga elétrica (SÖZER; POCKETT; VERNIER, 2018). Moléculas grandes entram apenas durante a aplicação do pulso. No caso de moléculas ainda maiores, tais como plasmídeos de DNA, a eletroporação apenas desencadeia o transporte, e exige pulsos mais longos (milissegundos) para um carregamento eletroforético adequado de DNA (KOTNIK et al., 2019).

O modelo da eletroporação desenvolvido considerou a bleomicina como uma molécula pequena e desconsiderou as cargas e o processo de condução elétrica, portanto o influxo da bleomicina neste trabalho foi puramente difusivo.

A *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma proteína acoplada em sua membrana plasmática que poderia ser responsável pela absorção da BLM e toxicidade da levedura. Em seu estudo, Aouida et al. (2003) concluiu que ambas as barreiras celulares (parede celular e membrana plasmática), limitam a absorção de pequenas moléculas hidrofílicas (é o caso da BLM) em leveduras. Entretanto, as restrições que cada uma causa quanto a permeabilização são independentes entre si. Isso sugere que a parede celular não afeta a eletropermeabilização da membrana e

vice-versa.

É importante ressaltar a fase do ciclo de vida da célula em que as leveduras se encontram para a realização do estudo. Aouida et al. (2003) utilizou a BLM durante a fase estacionária da *S.cerevisiae*. Essa é uma informação relevante, uma vez que a porosidade da parede é regulada e dependente do ciclo da célula.

Este estudo apresentou a informação de que não existe nenhum efeito de permeabilização para campos elétricos com intensidades abaixo de 200 kV/m e esse resultado coincide com os apresentados nessa dissertação. Ele também utiliza PEFs com intensidade inferior a 600 kV/m para não afetar a viabilidade das células, ou seja, a maioria das células retornam ao seu estado inicial, e concluiu que a eletropermeabilização pode aumentar os níveis de absorção de pequenas moléculas hidrofílicas em leveduras. O estudo da permeabilização da BLM em leveduras apresentado nesta dissertação, corroborado pelo gráfico da Figura 26, reafirmou a hipótese de que a aplicação de PEFs aumenta o influxo de moléculas através da formação de poros na membrana.

Os resultados apresentados por Stirke et al. (2019) informaram que altas intensidades de PEFs aumentaram a taxa de absorção de íons, e que a saturação foi alcançada rapidamente. Foram utilizados pulsos com largura de $150 \mu\text{s}$ e intensidades abaixo de 600 kV/m para não afetar a viabilidade das células. O estudo assumiu que o campo que facilita a difusão é proporcional a área total de poros formados (coerente com as equações apresentadas na subseção 3.2.2 Modelo de difusão) e concluiu que o tratamento de leveduras com EP induziu, simultaneamente, permeabilização pelas barreiras celulares (membrana plasmática e parede celular).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho examinou alguns aspectos importantes para o processo de formação de poros em membranas plasmática e nuclear. Tal análise permitiu mapear as configurações de pulso para determinadas células. A intensidade do campo elétrico aplicado caracterizou a eletroporação em reversível ou irreversível. A intensidade do pulso determinou a área onde os poros se formaram - maior intensidade gerou maior área de formação de poros. A largura do pulso determinou a membrana a ser eletroporada (largura de nanossegundos eletroporou a membrana nuclear, enquanto larguras maiores, de microssegundos privilegiaram a membrana plasmática) e o tamanho dos poros criados (pulsos mais longos criaram poros maiores).

A implementação do modelo de difusão possibilitou compreensão sobre resultados experimentais descritos na literatura e forneceu informações adicionais sobre mecanismos ainda não completamente elucidados, como um possível intervalo de rigidez dielétrica da parede celular em *Saccharomyces cerevisiae*.

O modelo de difusão proposto reduziu e simplificou alguns aspectos ao considerar apenas a difusão simples. O processo de condução elétrica não foi modelado em moléculas com cargas (poros grandes e moléculas pequenas). O transporte dessas moléculas exige um modelo mais elaborado. O estudo piloto por meio do MET não dispõe de um protocolo adequado ao preparo de amostras com leveduras.

O estudo com o modelo de difusão permitiu verificar que o influxo da quantidade mínima de bleomicina que induziu a morte celular ocorreu em campos superiores a 400 kV/m , compatível com resultados experimentais. Este resultado torna o modelo proposto satisfatório para análises com eletropermeabilização de moléculas pequenas.

6.1 TRABALHOS FUTUROS

Almeja-se em trabalhos futuros:

- Utilizar metodologia semelhante para estudo de condutividade da parede celular;
- Inclusão de condução elétrica no modelo de difusão;
- Estudo detalhado sobre possíveis características eletrostáticas da parede celular;

- Estudo de protocolos de fixação específicos para leveduras.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Molecular biology of the cell 3e. Garland Science, 1994.
- AOUIDA, M. et al. Comparative roles of the cell wall and cell membrane in limiting uptake of xenobiotic molecules by *saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 47, n. 6, p. 2012–2014, 2003.
- ARDIANI, A.; HIGGINS, J. P.; HODGE, J. W. Vaccines based on whole recombinant *saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS yeast research*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 10, n. 8, p. 1060–1069, 2010.
- BAE, S. J. et al. Safe and efficient rna and dna introduction into cells using digital electroporation system. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 148, p. 108268, 2022.
- BEEBE, S. J. et al. Nanosecond pulsed electric field (nspef) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on plasma science*, IEEE, v. 30, n. 1, p. 286–292, 2002.
- BELEHRADEK, J. J. et al. Electroporpermabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1190, n. 1, p. 155–163, 1994.
- BOTTER, A.; MERLETTI, R. Emg of electrically stimulated muscles. *Surface Electromyography: Physiology, Engineering, and Applications*, Wiley Online Library, p. 311–332, 2016.
- BROSSEAU, N.; ANDREEV, E.; RAMOTAR, D. Complementation of the yeast model system reveals that *caenorhabditis elegans* oct-1 is a functional transporter of anthracyclines. *PLoS One*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 10, n. 7, p. e0133182, 2015.
- CARVALHO H. F. AND RECCO-PIMENTEL, S. *A célula*. Tamboré, SP: Editora Manole, 2004. Capítulo 28 – Paredes celulares p.
- CASTELLVÍ, Q.; BANÚS, J.; IVORRA, A. 3d assessment of irreversible electroporation treatments in vegetal models. In:

SPRINGER. *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*. [S.l.], 2016. p. 294–297.

COSTA, J. A. et al. Sensitivity analysis of a nuclear electroporation model—a theoretical study. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, IEEE, v. 28, n. 6, p. 1850–1858, 2021.

CROOKE, S. et al. Effects of variations in renal function on the clinical pharmacology of bleomycin administered as an iv bolus. *Cancer Treatment Reports*, v. 61, n. 9, p. 1631–1636, 1977.

DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling electroporation in a single cell. i. effects of field strength and rest potential. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 77, n. 3, p. 1213–1224, 1999.

ESSA, E. A.; BONNER, M. C.; BARRY, B. W. Electroporation and ultradeformable liposomes; human skin barrier repair by phospholipid. *Journal of controlled release*, Elsevier, v. 92, n. 1, p. 163–172, 2003.

GARNER, A. L. et al. Ultrashort electric pulse induced changes in cellular dielectric properties. *Biochemical and biophysical research communications*, Elsevier, v. 362, n. 1, p. 139–144, 2007.

GASCOYNE, P. R. et al. Membrane changes accompanying the induced differentiation of friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1149, n. 1, p. 119–126, 1993.

GOLBERG, A.; BELKIN, M.; RUBINSKY, B. Irreversible electroporation for microbial control of drugs in solution. *Aaps Pharmscitech*, Springer, v. 10, n. 3, p. 881, 2009.

GRANOT, Y.; RUBINSKY, B. Mass transfer model for drug delivery in tissue cells with reversible electroporation. *International journal of heat and mass transfer*, Elsevier, v. 51, n. 23–24, p. 5610–5616, 2008.

IVORRA, A. Tissue electroporation as a bioelectric phenomenon: Basic concepts. In: *Irreversible electroporation*. [S.l.]: Springer, 2010. p. 23–61.

IVORRA, A.; RUBINSKY, B. In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 70, n. 2, p. 287–295, 2007.

- KANER, A.; BRASLAVSKY, I.; RUBINSKY, B. Model of pore formation in a single cell in a flow-through channel with micro-electrodes. *Biomedical microdevices*, Springer, v. 16, n. 2, p. 181–189, 2014.
- KOTNIK, T. et al. Cell membrane electroporation-part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, IEEE, v. 28, n. 5, p. 14–23, 2012.
- KOTNIK, T. et al. Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annual review of biophysics*, Annual Reviews, v. 48, p. 63–91, 2019.
- KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 92, n. 2, p. 404–417, 2007.
- KURTZ, J. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a genetic model in anticancer therapy. *Current Pharmacogenomics*, Bentham Science Publishers, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2005.
- LIU, Y.; WU, F.; ZOU, G. Electrophoresis mobility shift assay and biosensor used in studying the interaction between bleomycin a5 and dna. *Analytica chimica acta*, Elsevier, v. 599, n. 2, p. 310–314, 2007.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock-14^a Edição*. [S.l.]: Artmed Editora, 2016.
- MARTINSEN, O. G.; GRIMNES, S. *Bioimpedance and bioelectricity basics*. [S.l.]: Academic press, 2011.
- MATUO, R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, Springer, v. 70, n. 4, p. 491–502, 2012.
- MAZZANTI, M.; BUSTAMANTE, J. O.; OBERLEITHNER, H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiological Reviews*, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 81, n. 1, p. 1–19, 2001.
- MIR, L. M.; ORLOWSKI, S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, Elsevier, v. 35, n. 1, p. 107–118, 1999.
- NAPOTNIK, T. B.; POLAJŽER, T.; MIKLAVČIČ, D. Cell death due to electroporation—a review. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 141, p. 107871, 2021.

NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. *Physical review E, APS*, v. 59, n. 3, p. 3471, 1999.

NUCCITELLI, R. Nano-pulse stimulation, a nonthermal energy modality for targeting cells. In: *Principles and Technologies for Electromagnetic Energy Based Therapies*. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 349–362.

ORGANIZATION, W. H. et al. Selection of essential medicines at country level: using the who model list of essential medicines to update a national essential medicines list. World Health Organization, 2020.

PAKHOMOV, A. G.; MIKLAVCIC, D.; MARKOV, M. S. *Advanced electroporation techniques in biology and medicine*. [S.l.]: CRC Press, 2010.

PAKHOMOV, A. G. et al. Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Archives of biochemistry and biophysics*, Elsevier, v. 465, n. 1, p. 109–118, 2007.

PINTARELLI, G. B. et al. Sensing of yeast inactivation by electroporation. *IEEE Sensors Journal, IEEE*, v. 21, n. 10, p. 12027–12035, 2021.

PODDEVIN, B. et al. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochemical pharmacology*, Elsevier, v. 42, p. S67–S75, 1991.

PRAY, L. L. Hartwell's yeast: a model organism for studying somatic mutations and cancer. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 183, 2008.

PUCIHAR, G.; MIKLAVCIC, D.; KOTNIK, T. A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering, IEEE*, v. 56, n. 5, p. 1491–1501, 2009.

REMS, L. et al. Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 3, 2013.

RETELJ, L.; PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation of intracellular liposomes using nanosecond electric pulses—a theoretical study. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering, IEEE*, v. 60, n. 9, p. 2624–2635, 2013.

RICE, J.; OTTENSMEIER, C. H.; STEVENSON, F. K. Dna vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 2, p. 108–120, 2008.

RUYTER-SPIRA, C. et al. The biology of strigolactones. *Trends in plant science*, Elsevier, v. 18, n. 2, p. 72–83, 2013.

RYBENKOV, V. V.; VOLOGODSKII, A. V.; COZZARELLI, N. R. The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled dna. i. sedimentation analysis. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 267, n. 2, p. 299–311, 1997.

S, E. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, Sage Journal, v. 35, p. 495–516, 2007.

SANO, M. B. et al. In-vitro bipolar nano-and microsecond electro-pulse bursts for irreversible electroporation therapies. *Bioelectrochemistry*, Elsevier, v. 100, p. 69–79, 2014.

SANO, M. B. et al. Contactless dielectrophoretic spectroscopy: examination of the dielectric properties of cells found in blood. *Electrophoresis*, Wiley Online Library, v. 32, n. 22, p. 3164–3171, 2011.

SCHOENBACH, K. H. et al. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, IEEE, v. 14, n. 5, 2007.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; SNOJ, M. Electrochemotherapy of tumours. *Current Oncology*, Multimed Inc., v. 16, n. 2, p. 34, 2009.

SMITH, K. C.; NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Model of creation and evolution of stable electropores for dna delivery. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 86, n. 5, p. 2813–2826, 2004.

SMITH, K. C.; WEAVER, J. C. Active mechanisms are needed to describe cell responses to submicrosecond, megavolt-per-meter pulses: cell models for ultrashort pulses. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 95, n. 4, p. 1547–1563, 2008.

SÖZER, E. B.; POCETTI, C. F.; VERNIER, P. T. Transport of charged small molecules after electropermeabilization—drift and diffusion. *BMC biophysics*, Springer, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.

- SPRADLING, A. et al. New roles for model genetic organisms in understanding and treating human disease: report from the 2006 genetics society of america meeting. *Genetics*, Oxford University Press, v. 172, n. 4, p. 2025–2032, 2006.
- STIRKE, A. et al. The link between yeast cell wall porosity and plasma membrane permeability after pef treatment. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- STREKOWSKI, L. et al. Molecular basis for bleomycin amplification: conformational and stereoelectronic effects in unfused amplifiers. *Journal of medicinal chemistry*, ACS Publications, v. 31, n. 6, p. 1231–1240, 1988.
- SUZUKI, D. O. H. Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação. Florianópolis, SC, 2009.
- TANG, Y. et al. A finite element framework for studying the mechanical response of macromolecules: application to the gating of the mechanosensitive channel mscl. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 91, n. 4, p. 1248–1263, 2006.
- THEOBALD, N. Emerging vaccine delivery systems for covid-19: Functionalised silica nanoparticles offer a potentially safe and effective alternative delivery system for dna/rna vaccines and may be useful in the hunt for a covid-19 vaccine. *Drug Discovery Today*, Elsevier, v. 25, n. 9, p. 1556, 2020.
- WALTZ, E. Vaccines go electric: A handheld gadget could usher in a new era of vaccines. *IEEE Spectrum*, IEEE, v. 58, n. 6, p. 24–31, 2021.
- WANG, M. et al. Single-cell electroporation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Springer, v. 397, n. 8, p. 3235–3248, 2010.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, Elsevier, v. 41, n. 2, p. 135–160, 1996.
- YANG, J. et al. Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 76, n. 6, p. 3307–3314, 1999.
- YAO, C. et al. Analysis of dynamic processes in single-cell electroporation and their effects on parameter selection based on the

finite-element model. *IEEE Transactions on Plasma Science*, IEEE, v. 45, n. 5, p. 889–900, 2017.

YU, Z. et al. Structural features facilitating tumor cell targeting and internalization by bleomycin and its disaccharide. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 54, n. 19, p. 3100–3109, 2015.