

ELETROPORAÇÃO: UMA REVISÃO

ELECTROPORATION: A REVIEW

Revista Fisioterapia Ser – Ano 2 – Nr 2 – abr/mai/jun – 2007

¹Fernanda Fernandes Iorio, ¹Camilla Álvares Di Stasi, ²Fábio dos Santos Borges

¹Programa de pós-graduação lato sensu em Fisioterapia Dermato-Funcional da Universidade Gama Filho – São Paulo-SP

²Mestre em Ciências Pedagógicas, docente da Universidade Estácio de Sá-RJ e Universidade Iguazu-RJ, fisioterapeuta do Hospital Central do Exército.

Endereço para correspondência: Fernanda Fernandes Iorio, Rua Nova Jerusalém, 281 – ap.64 Tatuapé 03410-000 São Paulo-SP. Tel.: (11) 6941-1092 / 9954-7382, E-mail: fernanda.iorio@terra.com.br

RESUMO

Eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de poros aquosos (“aquaporinas”) na bicamada lipídica, permitindo que macromoléculas migrem através desses poros. A eficácia do transporte depende dos parâmetros elétricos (frequência de pulso, formato de onda, intensidade do campo elétrico e outros) e das propriedades físico-químicas das drogas. Este estudo aborda os princípios da eletroporação, assim como suas possibilidades de aplicação prática, através de uma revisão da literatura. As aplicações práticas variam desde transferência genética para plantas, bactérias, leveduras, até transporte de quimioterápicos. Recentemente, a eletroporação foi inserida no mercado estético como um método capaz de permear uma ampla gama de ativos em grandes concentrações. Entretanto, a prática desta técnica carece de respaldo científico que valide seu método de aplicação. Nesta revisão, verificamos a necessidade da realização de estudos práticos detalhados, envolvendo os produtos transdérmicos e os equipamentos utilizados nas áreas de Estética e Fisioterapia Dermato-Funcional.

Palavras-chave: eletroporação, princípios físicos, transdérmica.

ABSTRACT

Electroporation is the application of short-high voltage pulses that increase the transmembrane potential, promoting the formation of temporary aqueous pathways (“pores”) in lipidic bilayer, allowing that molecules driven processes allowing passage through this pores. The efficacy of drive depends of the electric parameters (frequency of pulse, type of wave, electric field power and others) and of chemical-physical proprieties of the drugs. This study broaches the principles of electroporation and the possibilities of practical application, through a literature review. The

practical applications go from genetic transfer to plants, bacteria, yeast, to transfer of cytotoxic drugs. Recently, the electroporation was inserting in esthetic market like a method able to load a variety of different molecules in high concentration. However, the practice of this technique lack of scientific dates that proves your application's method. In this review, we check that there is the necessity of do detailed practical studies, involving the transdermic products and the equipments used in field of Esthetic and Physiotherapy.

Key-words: electroporation, physical principles, transdermical.

INTRODUÇÃO

A pele representa uma importante barreira para a permeação de ativos, contidos em medicamentos de uso tópico, cosméticos e, mais recentemente, em cosmecêuticos. A camada mais externa da pele, o estrato córneo, é usualmente a principal barreira para a penetração de medicamentos¹. É constituída por vários planos de células mortas intimamente ligadas, e por uma matriz extracelular composta por uma bicamada lipídica, formada primariamente, por ceramidas, colesterol e ácidos graxos².

O passo determinante da absorção cutânea é a permeação através do estrato córneo. Teoricamente, existem, então, duas vias potenciais de passagem: a transcelular e a intercelular. Contudo, em ambas as vias de permeação, a estrutura do estrato córneo obriga o fármaco a se difundir através das bicamadas lipídicas intercelulares³.

Com o objetivo de facilitar a permeação cutânea, vários métodos para remover reversivelmente a resistência desta barreira têm sido investigados, como o uso de tensoativos, lipossomas, ou métodos eletrotermoterapêuticos, tais como a iontoforese, a fonoforese e, mais recentemente, através da eletroporação.

A iontoforese é utilizada há mais de meio século, tendo sido mencionada na literatura desde o século XVIII. É capaz de aumentar a penetração de substâncias polares através da pele sob um gradiente potencial constante⁴. Isto ocorre devido à capacidade das cargas elétricas de mesma polaridade repelirem-se entre elas, através da aplicação da corrente galvânica⁵.

A fonoforese ou sonoforese é um termo que descreve a habilidade do ultra-som em incrementar a penetração de agentes farmacologicamente ativos através da pele. Atualmente, o transporte de substâncias mediado por ultra-som é tido como um método eficiente de administração localizada de drogas, genes e outros compostos através das células e tecidos^{4,5}.

A eletroporação designa o uso de pulsos curtos (microssegundos a milissegundos) de alta voltagem, que ultrapassam a barreira da membrana celular, promovendo um rearranjo estrutural desta membrana e, tornando-a altamente permeável a moléculas exógenas, presentes no meio externo. Um progresso significativo tem sido obtido adotando a hipótese de que um destes rearranjos consiste na formação de canais aquosos temporários ("poros"), por um campo elétrico, capazes de potencializar o transporte iônico e molecular através da membrana^{2,6,7,8,9,10}.

O fisioterapeuta, assim como a esteticista, tem feito o uso contínuo das técnicas de iontoforese e fonoforese, objetivando permear cosmecêuticos e fármacos, em regiões delimitadas. Recentemente, a eletroporação foi inserida no mercado estético como um método revolucionário e não-invasivo, capaz de permear uma ampla gama de ativos em grandes concentrações. Entretanto, a prática da técnica na estética carece de respaldo científico que valide seu método de aplicação.

Em virtude do número de artigos publicados envolvendo o uso da eletroporação, seu uso tem crescido de maneira exponencial, desde meados de 1980 e, conseqüentemente, pela existência de uma forte necessidade de se compreender os conceitos da eletroporação.

Este estudo tem por objetivo abordar os princípios da eletroporação, assim como suas possibilidades de aplicação prática, descritos na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico abrangeu periódicos, resgatados através da Internet, via Bireme/ MedLine e Lilacs, além de acesso a sites especializados no assunto, onde foram cruzadas as palavras-chave: eletroporação / *electroporation*; liberação transdérmica de drogas / *transdermal drug deliver*; e permeabilização transcutânea / *permeabilization transcutaneous*. A revisão também contou com livros, pesquisados na Biblioteca de Química da Universidade de São Paulo-USP e, livros de acervo particular.

A pesquisa foi realizada no período de Novembro/2004 a Maio/2006, onde foram selecionados materiais datados de 1985 a 2005.

RESULTADOS

Baseado nos estudos teóricos e experimentais com a bicamada das membranas celulares nos anos de 1960 e 1970, a primeira publicação de transferência genética em células de rato, realizada em uma câmara construída para a eletroporação, foi descrita por Neumann *et al.* em 1996¹¹. Nesta fase inicial alguns pesquisadores usaram um aparato de circuitos curtos de eletroforese, como um equipamento de eletroporação primitivo⁹.

O uso da eletroporação popularizou-se, durante a década de 1980, onde diversos estudos do uso da eletroporação para carrear moléculas para células eucariontes *in vitro* foram publicados; no início dos anos 90, estudos de eletroporação *in vivo* também foram relatados⁹. Inicialmente desenvolvida para a transferência genética, foi então usada para carrear uma ampla variedade de moléculas: de íons a drogas, pigmentos, anticorpos e oligonucleotídeos para DNA e RNA. Após o primeiro relato do uso clínico da eletroporação, inúmeros estudos têm reportado o uso desta técnica para o transporte de quimioterápicos (eletroquimioterapia) em pacientes com câncer. A eletroquimioterapia consiste na aplicação de pulsos de alta voltagem para permeabilizar drogas citotóxicas impermeáveis (bleomicina e cisplatina) em células tumorais e, tem se mostrado mais eficaz que a quimioterapia isolada na eliminação de tumores locais, como os de pele, por exemplo. Inicialmente, os processos de eletroporação causaram considerável lesão celular. Nas últimas décadas, observou-se o aprimoramento da técnica, com a sofisticação dos equipamentos e otimização dos protocolos^{8,9,10,12}.

A eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de um poro, pelo aumento do momento dipolar das cabeças lipídicas hidrofílicas, permitindo que macromoléculas “carregadas” migrem através dos poros e, eventualmente alcancem o núcleo, onde podem promover transformações genéticas^{13,14}. É um método não-invasivo, não-químico e, não altera a estrutura biológica ou função das células-alvo⁶.

Sua aplicação na pele tem mostrado aumentar o transporte transdérmico de drogas em diversas ordens de magnitude. Além disso, a eletroporação, usada sozinha ou em combinação com outros métodos, aumenta o alcance de drogas (pequenas ou macromoléculas, lipofílicas ou hidrofílicas, moléculas polarizadas ou neutras), que possam ser transportadas via transdérmica. A eficácia deste transporte depende dos parâmetros elétricos e das propriedades físico-químicas das drogas. O pulso de alta voltagem *in-vivo* é bem tolerado, mas contrações musculares são geralmente induzidas. O eletrodo e o design do aplicador são importantes para reduzir o desconforto do tratamento elétrico em humanos¹⁰.

A base do fenômeno da eletroporação é, razoavelmente, bem conhecida, entretanto mecanismos moleculares, nos quais campos elétricos interagem com a membrana celular, permanecem em investigação. Basicamente, o potencial de membrana é induzido pela aplicação de um campo elétrico externo. O campo elétrico é, geralmente, induzido por um pulso relativamente

curto. Existem dois tipos de ondas (Figura 1), que pode ser onda quadrada, usualmente com duração menor que 100 μ s, onde sua voltagem e duração permanecem constantes em qualquer que seja a pele ou depósito da droga. O pulso também pode ser de onda exponencialmente decrescente, com uma duração na ordem de milissegundos. O pulso de onda quadrada é usado para obter o melhor controle e melhor reprodutibilidade do transporte da droga. A onda exponencial decrescente apresenta vantagens, pois mantém ou expande o estado de alta permeabilidade da pele induzido pela eletroporação e, promove o movimento eletroporético. Entretanto, a duração dos pulsos exponenciais depende da resistência da pele e do sistema de eletroporação (eletrodos, e meio de condução) ^{6,10}.

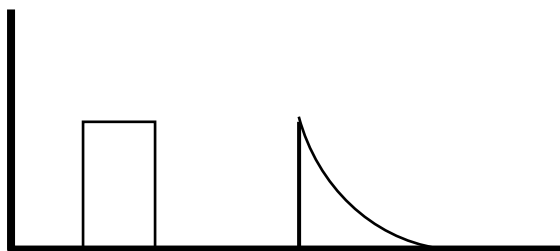


Figura 1- Tipos de ondas usadas em aparelhos de eletroporação (quadrada e exponencial decrescente). Fonte: Chang *et. al.* ⁶

Segundo Denet *et al.* ¹⁰, a onda exponencial decrescente pode causar: aumento na hidratação da pele, desorganização nas camadas bilipídicas do extrato córneo, breve falha na função de “barreira” (aumento na perda de água transepidérmica) e um breve aumento no fluxo sanguíneo. Já a onda quadrada foi recentemente estudada *in vivo*, gerando uma suave falha na função de barreira da pele, como por exemplo, uma dramática diminuição da impedância da pele e aumento da perda de água transepidérmica, rapidamente reversível e, transitória diminuição do fluxo sanguíneo (<10 min).

Os autores relataram ainda que dois diferentes tipos de protocolos de pulso, de acordo com sua apresentação, são usualmente descritos na literatura. Além da forma de onda, eles podem, principalmente, ser distinguidos pela duração do pulso: numerosos (> 100), de curta duração (1-2ms) e pulsos de alta voltagem; ou em número pequeno (< 20), de longa duração (70-1000ms) e pulsos de média voltagem.

Contínuos esforços para otimizar o carreamento de moléculas, preservando a viabilidade das células, através de várias técnicas de otimização, resultaram em novos equipamentos. Nas últimas duas décadas, o equipamento de eletroporação foi refinado, e estes geradores foram construídos podendo modificar o pulso exponencial em pulsos quadrados, onde a amplitude e a duração do pulso podem ser independentemente controladas, um importante pré-requisito para a otimização do processo ⁹.

Quando o potencial induzido alcança um valor crítico, ele causa um desarranjo elétrico na membrana celular. O valor deste potencial crítico é de, aproximadamente, 1V, mas pode variar dependendo da largura do pulso, composição da membrana, etc. Este desarranjo irá proporcionar a formação de canais aquosos na membrana, denominados “poros”, estes por sua vez irão gerar uma força local potencializadora do transporte iônico e molecular trans-epidérmico. Acredita-se que estes poros criados nas camadas lipídicas, pela aplicação de altas voltagens, são pequenos (<10nm), espaçados (0,1% da área da superfície) e geralmente de curta duração (μ s a seg.) ¹⁰.

Quando a duração e o número de pulsos aumentam, o transporte de droga aumenta linearmente. A velocidade do pulso e o fluxo transdérmico aumentam simultaneamente. Um dramático aumento do transporte foi observado para voltagens entre 30-100 V ¹⁰. Segundo Gehl ⁹,

com o uso de pulsos extremamente curtos, na faixa dos nanossegundos, em altíssimas voltagens, organelas celulares podem ser eletroporadas, sem que a membrana celular seja permeabilizada.

Um dos principais parâmetros de modulação ajustados na eletroporação é a intensidade do campo elétrico, medida em V/cm. O campo elétrico é geralmente criado pela aplicação da diferença de potencial (voltagem) entre os eletrodos⁷.

Cada transporte de substâncias depende da voltagem aplicada. Enquanto o transporte molecular parece ser transcelular nos casos de pulsos curtos de alta voltagem, o mesmo parece ser intercelular, com possível implicação dos anexos, quando se vai diminuindo a voltagem e a duração do pulso. O peso molecular da substância eletroporada é outro parâmetro que influencia a rota de transporte: quanto menor o peso molecular, mais intracelular é a penetração¹⁰.

Diversos fatores físicos podem afetar a eficiência da eletro-transferência: o potencial de transmembrana criado pela imposição de um campo elétrico pulsado; a extensão da permeabilização da membrana (número e tamanho dos poros ou áreas afetadas); a duração do estado de permeabilização; o modo e duração do fluxo molecular; a tolerância das células; a permeabilização da membrana e, a heterogeneidade da população celular⁷. Na eletroporação *in vitro*, outras considerações devem ser feitas: o tamanho da célula, temperatura do meio externo, manipulação pós-pulso das células, composição de eletrodos e meio de pulsação e, aquecimento⁹. O design dos eletrodos continua sendo um assunto crítico, tanto em termos de eficácia de transporte de drogas, como de tolerância¹⁰. Dentre os modelos utilizados, identificamos a existência de eletrodos em placa, feitos de cobre; e “eletrodos-agulha”, onde agulhas hipodérmicas são dispostas paralelamente em uma placa sob medida, que assegura bom contato elétrico, assim como estabilidade e paralelismo⁹.

A eletroporação *in vivo* tem sido realizada em diferentes espécies, usando eletrodos de placas ou agulhas. O transporte de drogas e genes *in vivo* tem sido aplicado em fígado, cérebro, músculo e pele⁹.

O transporte molecular, através de uma pele temporariamente permeabilizada pela eletroporação, resulta de diferentes mecanismos em tempos diferentes. Aumento da difusão durante e depois dos pulsos e, transporte direcionado eletricamente (movimento eletroporético e suave eletro-osmose) são os principais mecanismos de transporte. A contribuição da eletroforese e da difusão depende das propriedades físico-químicas da molécula. Efeitos térmicos podem estar envolvidos¹⁰.

Quando o campo elétrico é aplicado à pele, este dissipa energia e aquece^{7,10}. A temperatura não aumenta instantaneamente na superfície da pele, e sim gradativamente, resultando na propagação do calor. Como a voltagem e a duração do pulso aumentam constantemente, a temperatura tende a um platô. Durante o resfriamento, o sistema multilamelar não se restabelece, deixando a existência de água prevalecer, que determina que os caminhos aquosos permaneçam, mesmo após a interrupção do pulso¹⁰.

Sintov *et al.*¹⁵ utilizaram para eletroporar duas moléculas hidrofílicas polares (*hidroclorato de granisetron* e *diclofenaco de sódio*) um gerador de micro-canais de radiofrequência. Este gerador era constituído por dois componentes primários: um dispositivo eletrônico reutilizável similar a um fone telefônico, e microeletrodos inseridos na extremidade deste controle. O dispositivo era conectado a um computador, onde eram programados os parâmetros utilizados e, ao mesmo tempo, informava os parâmetros elétricos obtidos durante a aplicação, assim como: corrente de pico, corrente final, voltagem, tempo e energia. O corpo do dispositivo era feito de policarbonato e eletrodos de aço de 100µm de comprimento e 40µm de diâmetro. Existiam 140 micro-eletrodos espaçados a cada 1mm, em uma matriz quadrada. Estes eletrodos eram designados a gerarem micro-canais de 40µm de largura e 70µm de profundidade. A operação deste sistema era fácil e simples, bastando o contato do dispositivo contra a pele para o gerador de radiofrequência ser ativado e o tratamento iniciar-se automaticamente.

DISCUSSÃO

De acordo com os dados apresentados, observamos que a bibliografia consultada mostrou concordância ao definir o conceito da eletroporação e seus mecanismos de ação, apesar do método apresentar-se como uma forma, relativamente, nova de permear substâncias.

Quanto aos princípios físicos da técnica empregada, encontramos divergências ao estudar a metodologia empregada por cada autor, ou seja, os artigos abordados diferiram quanto à natureza do estudo, *in vitro*, *in vivo* ou em pacientes; quanto ao tipo de substância a ser eletroporada e, suas respectivas propriedades físico-químicas; e quanto ao tipo de equipamento, eletrodos, formatos de onda e outros parâmetros.

Ao comparar a permeação promovida pela eletroporação à permeação obtida através da aplicação do ultra-som (fonoforese) e da corrente galvânica (iontoforese), alguns fatores devem ser destacados.

Segundo Chang et al.⁶, a eletroporação ocorre por um estado de stress biológico da célula por alteração do seu potencial de membrana. Isto ocasiona uma eletroporação dos lípides da bicamada celular, originando a formação de poros em sua membrana e, a abertura de seus canais protéicos. A abertura e fechamento dos poros ocorrem por rotação das moléculas da membrana bilipídica, que dá forma às paredes do poro.

Os autores relataram ainda que o fenômeno da eletroporação se dá no momento em que ocorre o impulso da onda eletromagnética. Com a interrupção do pulso de onda, ocorre a reorientação da camada, com redução ou fechamento dos poros. Desta forma, a célula retorna novamente ao seu estado de normalidade, funcionando este mecanismo como uma chave de liga e desliga, ou on-off .

A fonoforese descreve a habilidade do ultra-som em incrementar a penetração de agentes farmacologicamente ativos através da pele quando estes estão contidos no meio acoplante usado para viabilizar a técnica⁴. Borges¹⁶ fez menção a alguns relatos que indicaram que a fonoforese pode ser efetivamente potencializada a partir dos seguintes pontos: o efeito mecânico do ultra-som, provendo modificações nas ligações intercelulares e aumento da permeabilidade da membrana celular, é capaz de promover a difusão do produto através da pele; o fenômeno de cavitação instável pode ser responsável pela introdução do produto fonoforético, à medida que as bolhas se rompem influenciando na entrega do produto pela pele; os efeitos térmicos do ultra-som aumentam a permeabilidade dos tecidos, e a pressão acústica criada pela transmissão do ultra-som mobiliza o medicamento/cosmético através da pele; o ultra-som é capaz de desorganizar o extrato córneo, diminuindo com isso, a resistência da pele para penetração de produtos por meio da fonoforese; e a ação do ultra-som no extrato córneo, facilitando a permeação do produto fonoforético, poderia ser representada por uma desnaturação da queratina e remoção de células mortas na pele.

A iontoforese é o uso de corrente contínua para aumentar a administração transcutânea de substâncias ionizáveis. No processo iontoforético, a corrente, originária do aparelho, é transferida do eletrodo para a pele por meio da solução de agentes ativos. Os íons do agente ativo são carregados para a pele, através da repulsão contínua e movimentação do agente ativo por onde haja caminhos, como poros, e possivelmente através de frestas do estrato córneo rompido. A finalidade terapêutica da iontoforese dependerá das características das substâncias utilizadas. Não devemos esquecer, porém que o galvanismo (efeitos polares da CC) sempre estará presente e poderá influenciar os efeitos da iontoforese. As substâncias utilizadas se encontram na forma de soluções ionizáveis e, diante do campo elétrico da corrente contínua, são movimentadas de acordo com sua polaridade, assim como da polaridade do eletrodo ativo. A transferência de íons irá acontecer principalmente nos dutos das glândulas sudoríparas, e em menor extensão nos folículos pilosos e nas glândulas sebáceas¹⁷.

Estudos com animais registraram penetrações de medicamentos com fonoforese detectada nos tecidos a profundidades de 5 a 6 cm¹⁶. Foi relatado que a técnica da iontoforese libera a medicação em profundidades que variam de 6 a 20 mm¹⁷. Não encontramos estudos referentes à eletroporação que apresentassem estes dados.

Apesar de não encontrarmos artigos específicos comparando a eletroporação com a iontoforese e/ou fonoforese verificamos que todos esses recursos apresentam limitações de acordo com suas características físicas.

Poucos meios acoplantes apresentam as características apropriadas para a fonoforese, sendo o gel o tipo mais apropriado de formulação para essa terapia. Vários tipos de drogas, como corticóides e antiinflamatórios, têm sido adicionados a uma base gel (usado como meio acoplante) e administrados via fonoforese. Na área dermatológica são utilizadas comumente enzimas de difusão, entretanto, seu uso na fonoforese exige que a intensidade do ultra-som deva ser cuidadosamente selecionada, uma vez que as enzimas se desnaturam em temperaturas acima do limite suportável. Existem evidências de que o ultra-som possa alterar a conformação tridimensional das enzimas, podendo então inativá-las. Soluções enzimáticas foram inativadas por ultra-som na frequência de 3MHz, com intensidades entre 1 e 3W/cm²^[4].

Os produtos, substâncias polares, passíveis de serem utilizados na iontoforese se apresentam na forma sólida. A concentração deve ser baixa, geralmente de 1 a 3%, para se obter um coeficiente de ionização elevado. Com relação à intensidade segura, esta também se limita a 0,1 mA para cada cm² da superfície do eletrodo ativo, sendo a penetração maior durante os seis primeiros minutos⁴. Soriano *et al.*⁵ relataram que esta intensidade não deve ultrapassar 0,05 mA por cm² de área do eletrodo.

A eletroporação é capaz de carrear uma ampla variedade de moléculas: de íons a drogas, pigmentos, anticorpos e oligonucleotídeos para DNA e RNA. A compreensão do comportamento elétrico (voltagem, condutância e capacitância da membrana), do comportamento mecânico (recuperação ou ruptura de membranas planares), e da compreensão do transporte molecular (número de moléculas que atravessam a membrana) tem progredido significativamente. Porém, tem havido um progresso relativamente pequeno sobre a compreensão da recuperação de membrana (restauração da barreira à medida que o tempo passa) e o destino final das células (sobrevivência ou morte)¹⁸.

Gehl⁹ relatou um efeito imunológico benéfico em pacientes com câncer, quando submetidos à eletroporação. A natureza deste efeito não é bem estabelecida, mas a liberação de anticorpos do citoplasma ou mudanças na membrana celular são possíveis hipóteses.

Alguns relatos fundamentam a eficiência da eletroporação para a permeação transdérmica de substâncias em relação aos outros métodos similares, assim como em relação à difusão passiva.

Essa *et al.*¹ aplicaram a eletroporação para aumentar a penetração transdérmica de uma molécula lipofílica neutra (estradiol), contida em uma vesícula lipídica (lipossomada) e, em uma solução aquosa, comparando-as. Concluiu-se que, no caso do estradiol em solução aquosa, tanto a difusão passiva como a eletroporação apresentaram grande absorção, sendo maior quando eletroporada. Já, no caso do estradiol lipossomado, esperava-se que a eletroporação apresentasse valores consideravelmente maiores de permeação, mas surpreendentemente, a permeação do produto lipossomado foi discretamente maior pela eletroporação, comparada à difusão passiva. Isso foi explicado em parte pela dissipação da energia elétrica das vesículas lipídicas e pelo tamanho lipossomal relativamente grande.

Denet & Prát¹⁹ realizaram um estudo com o propósito de alcançar fluxos terapêuticos de timolol por transporte transdérmico através da eletroporação, aplicado em pele retirada de cirurgia plástica, comparada com difusão passiva da substância. Comparado com a iontoforese, muitos minutos ou horas seriam necessárias para se conseguir os efeitos da eletroporação que se observa em segundos.

Weissinger²⁰ realizou um estudo sobre a transferência genética de células-tronco através da eletroporação sem a pré-estimulação com citoquinas para evitar mutação gênica que geralmente ocorre quando as células são estimuladas. Foi concluído que a pré-estimulação não é primordial para a transferência genética e que a eletroporação alcança bons resultados tanto em células estimuladas quanto nas não estimuladas, já que se sabe que nas estimuladas o risco de mutação gênica é grande.

Apesar de verificarmos diversos relatos^{2,7,9,10,11,13,14} dando conta do uso de equipamentos de eletroporação que utilizam correntes do tipo Alta Voltagem, Sintov *et al.*¹⁵ mencionaram o uso de equipamentos que utilizam ondas eletromagnéticas (radiofrequência) para eletroporação. Esses autores realizaram estudo pioneiro, ao demonstrar um novo método de criação de poros visíveis ou micro canais nas camadas mais externas da pele, através de correntes de radiofrequência. O mecanismo pelo qual estes micro-canais foram criados pode ser explicado pelo calor liberado durante um fluxo rápido de íons na epiderme. Os autores estudaram a penetração de duas moléculas hidrofílicas polares (*hidroclorato de granisetron e diclofenaco de sódio*) através da pele de orelha animal, retirada e tratada devidamente e, também através da pele abdominal de ratos vivos. A permeabilidade da pele para ambas as drogas foi significativamente aumentada após a aplicação dos microeletrodos de radiofrequência, quando comparada ao transporte através da pele não-tratada (grupo controle). Um gerador com micro-canais de radiofrequência foi utilizado com os seguintes parâmetros de modulação: voltagem de 200 ou 250V; frequência de 100 KHZ; duração do pulso de 1ms; número de pulsos: 5; tempo entre os pulsos de 15ms. Não houve nenhum dano à pele dos ratos, assim como não fora observado eritema e edema após o procedimento.

As mesmas vantagens são apresentadas por três recursos eletrotermoterapêuticos – ultra-som, corrente galvânica e eletroporação: ausência de efeitos colaterais sistêmicos; ação localizada do medicamento, podendo estar em maior concentração na área tratada; ação mais efetiva e prolongada do fármaco no sítio de aplicação^{4,6,10}.

As combinações de métodos físicos e químicos para aumentar o transporte de drogas transdérmicas têm sido mais efetivas, se comparadas ao uso isolado de uma técnica. O uso da eletroporação associado ao ultra-som seria menos promissor, já que ambos apresentam mecanismos de ação similares. Já, a associação com a iontoforese, mostra um bom resultado, uma vez que a eletroporação age desorganizando a camada lipídica da pele e criando novos caminhos de transporte, facilitando então, a passagem da corrente subsequente da iontoforese e, resultando num aumento do transporte transdérmico¹⁰.

Segundo Borges¹⁶ atualmente, alguns aparelhos empregados pelos profissionais que trabalham na área da estética são construídos associando ultra-som e corrente galvânica com o objetivo de prover a fonoforese e a iontoforese simultaneamente, principalmente nos casos de celulite. Entretanto, alertamos para o grande apelo comercial da técnica, por parte dos fabricantes de aparelhos, e principalmente pela falta de fundamentação científica desta associação terapêutica, principalmente no tocante ao uso da substância de acoplamento, pois a mesma deve possuir propriedades fonoforéticas e iontoforéticas, e não encontramos publicações com dados que comprovem a eficácia de algum produto medicamentoso/ cosmético com essas características.

CONCLUSÃO

Verificamos através desta revisão bibliográfica que a eletroporação apresenta-se como uma técnica eficaz para inúmeras aplicações. A perspectiva desta técnica é de que uma grande variedade de moléculas, como íons, drogas, pigmentos, DNA, proteínas, oligonucleotídeos, possam ser introduzidos diretamente no citoplasma celular *in vitro*, *in vivo* e em pacientes, com suas devidas especificações biofísicas.

A tecnologia da eletroporação encontra-se em constante desenvolvimento, devido tanto à sofisticação dos equipamentos, como ao desenvolvimento dos protocolos de eletroporação, baseados

no maior conhecimento do processo envolvido nesta técnica. Claramente, isto abre inúmeras perspectivas para pesquisadores em vários campos.

No entanto, tamanha científicidade não está sendo observada no desenvolvimento de equipamentos voltados à aplicação no campo da Estética e Terapêutica, onde os parâmetros ajustados e a forma de aplicação não condizem com achados da literatura. Existe, portanto, a necessidade da realização de estudos práticos detalhados, envolvendo os produtos transdérmicos e os equipamentos utilizados nas áreas de Estética e Fisioterapia Dermato-Funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Essa, EA.; Bonner, MC.; Barry, BW. Electroporation and ultraderfomable liposomes; human skin barrier repair by phospholipid. *Jornal of Controlled Release* 2003; 92: 163-172.
2. Prausnitz, MR.; Bose, VG.; Langer, R; Weaver, JC. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 10504-10508.
3. Martins, MRFM; Veiga, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2002; 38: 33-53.
4. Guirro, Elaine; Guirro, Rinaldo. *Fisioterapia Dermato-Funcional*. 3ªed. São Paulo: Editora Manole; 2002. p.129-133; 204-207.
5. Soriano, MC; Pérez, SC; Baquéz, MIC. *Electroestetica profesional aplicada*. Barcelona: SOR International; 2000. p.226.
6. Chang, DC; Chassy, BM; Saunders, JA; Sowers, AE. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego, California: Academic Press, Inc.; 1992. p.1-10.
7. Nickoloff, JA. *Animal cell electroporation & electrofusion protocols*. V.48. Totowa, NJ: edited by Jac A. Nicklloff; 1995. p.3, 4,9,10, 30.
8. Burian, M; Formanek, M; Regele, H. Electroporation therapy in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2003; 123: 264-268.
9. Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 437-447.
10. Denet, AR; Vanbever, R; Préat, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 659-674.
11. Neumann, E; Kakorin, S; Tsoneva, I; Nikolova, B; Tomov, T. Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophysical Journal* 1996; 71: 868-877.
12. Glen Burnie, MD. Electroporpermabilization. Disponível em: www.cytopulse.com. Acesso em: 20/11/2004.
13. Quecini, VM; Oliveira, CA; Alves, AC; Vieira, MLC. Factors influencing eletroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genet Mol Biol* 2002; 25: 1-12.
14. Ugen, K.E.; Heller, R. Electroporation as a method for the efficient in vivo delivery of therapeutic genes. *DNA and Cell Biology* 2003; 22: 753.
15. Sintov, A.C. *et al.* Radiofrequency-driven skin microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release* 2003; 89: 311-320.

16. Borges, F.S. Ultra-Som. In Borges, F. S. Dermato-funcional: Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. 1ª ed. São Paulo: Editora Phorte; 2006. p.55-59; 252-258.
17. Valentin, E. K.; Borges, F.S. Iontoforese. In Borges, F. S. Dermato-funcional: Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. 1ª ed. São Paulo: Editora Phorte; 2006. p. 252-258.
18. Weaver, J.C. Divisão de Ciências da Saúde e Tecnologia da Harvard – MIT. Massachusetts, 1992.
19. Denet, AR; Prétat, V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. *Journal of Controlled Release* 2003; 88: 253-262.
20. Weissinger, F *et al.* Gene transfer in purified human hematopoietic peripheral-blood stem cells by means of electroporation without prestimulation. *J Lab Clin Med* 2002; 14: 138-149.