



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**LUCIANA MACEDO BRITO**

ALTERAÇÕES CELULARES E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR CORRENTE  
ELÉTRICA CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS HUMANAS  
LEUCÊMICAS

Rio de Janeiro

2009

B862a

Brito, Luciana Macedo

Alterações celulares e bioquímicas induzidas por corrente elétrica  
contínua de baixa intensidade em células humanas leucêmicas /

Luciana Macedo Brito; orientadores Mauro Sola-Penna, Carla Holandino  
Quaresma. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.

xx, 108 f.: il. (algumas col.) ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade  
de Farmácia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Eletroterapia. 2. Câncer. 3. Metabolismo glicolítico. 4. Células HL-60  
I. Sola-Penna, Mauro. II. Quaresma, Carla Holandino. III. Título.

CDD 615.845

LUCIANA MACEDO BRITO

“ALTERAÇÕES CELULARES E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR CORRRENTE  
ELÉTRICA CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS HUMANAS  
LEUCÊMICAS”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadores: Prof. Dr. Mauro Sola-Penna**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino Quaresma**

**Rio de Janeiro**

**2009**

**LUCIANA MACEDO BRITO****“ALTERAÇÕES CELULARES E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR CORRRENTE  
ELÉTRICA CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS HUMANAS  
LEUCÊMICAS”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

---

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino Quaresma  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Marcos Telló  
Pontifícia Universidade Católica – PUC/RS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Zancan  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dr. Leonardo Nimrichter  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

---

Prof. Dr. Marcelo Morales  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

---

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

*Aos meus pais, Luiz e Flávia; aos meus irmãos,  
Angela e Geraldo pelo carinho e apoio  
incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Carla Holandino**, minha querida orientadora, pessoa fundamental para realização deste trabalho. Obrigada por todos os conselhos, pela confiança, pelo carinho e principalmente pela paciência.

Ao prof. Dr. **Mauro Sola-Penna**, orientador deste trabalho, obrigada por contribuir grandemente para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, **Flávia e Luiz**, pelo apoio financeiro e psicológico, pelo sacrifício, pelo carinho e atenção dados mesmo de longe, nos momentos mais difíceis, nestes últimos anos.

Aos meus irmãos, em especial minha irmã **Angela**, que sempre esteve ao meu lado apoiando todas as decisões, obrigada pelo incentivo. Espero que continue me apoiando, porque eu sei que você não aguenta mais me ouvir chorando no telefone! Mumuzinha, esta conquista é nossa!

A todos que passaram pelo Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas enquanto estive desenvolvendo meu trabalho. Amigos que foram responsáveis por muitos momentos de alegria, conversas e companheirismo. Obrigada pelos almoços, lanchinhos e festinhas das quais nunca deixarei de fazer parte. Agradecimento especial a **Gleyce Maria** por participar de todo o meu crescimento, sempre por perto dando conselhos e me acompanhando desde o início. Amo todos vocês!

Ao **Venício** pelo excelente trabalho, pelas horas explicando como funciona um microscópio, pela ajuda com a edição das imagens, pela paciência.

A todos os laboratórios e técnicos pelo apoio e suporte nos tempos necessários.

A todos os amigos que me apoiaram; principalmente minha amiga **Camila**, você é indispensável em todos os momentos, obrigada pelo carinho!

*A banca de acompanhamento, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Patrícia Zancan** e prof. Dr. **Eduardo Ricci**, pelas correções e contribuições dadas durante a realização deste trabalho.*

*A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa dessa dissertação.*

*A todos os funcionários e professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, pelo carinho e respeito.*

*A Capes, pela bolsa de mestrado.*

*“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível e de repente  
você estará fazendo o impossível”.*

(São Francisco de Assis)

## RESUMO

BRITO, Luciana Macedo. **Alterações celulares e bioquímicas induzidas por corrente elétrica contínua de baixa intensidade em células humanas leucêmicas**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Correntes elétricas contínuas (CE) vêm sendo utilizadas no tratamento de diversos tipos de tumores com significativos resultados clínicos, caracterizando a chamada Eletroterapia Tumoral (ETT). Na ETT um ou mais eletrodos são inseridos localmente no tecido ou órgão a ser tratado e o uso de uma fonte de corrente elétrica constante ou de tensão constante, induz uma série de alterações celulares que culminam com a destruição completa ou parcial do tumor. Resultados experimentais com modelos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado que os danos induzidos pela ETT parecem ser decorrentes principalmente dos efeitos de produtos de eletrólise gerados pelo fluxo anódico (FA) e catódico (FC). No presente trabalho, investigamos os efeitos celulares e bioquímicos induzidos pelo FA, FC e por uma região isoelétrica representada pelo fluxo eletro-iônico (FEI), sobre células humanas leucêmicas (HL-60). Nossos resultados indicaram que em todas as situações experimentais ocorreram alterações significativas da viabilidade celular, detectadas pelo ensaio com MTT. Paralelamente aos danos de viabilidade celular foram verificadas alterações morfológicas, dentre as quais o aparecimento de bolhas de superfície celular (*blebs*), rarefação de matriz citoplasmática, edema nas mitocôndrias com perda das cristas mitocondriais, por microscopia óptica e eletrônica. Entretanto, o estudo das alterações induzidas pelo FEI evidenciou aspectos celulares e bioquímicos até então inéditos na literatura, o que nos motivou a focar o presente estudo nesta situação experimental específica. Para o FEI foi possível verificar uma diminuição da viabilidade celular à medida que se varia o tempo e a intensidade de corrente aplicada. O ensaio realizado pelo corante azul de tripan mostrou que o estímulo pelo FEI retardou de maneira significativa a taxa de crescimento celular, sendo tanto maior esta

inibição quanto maior o número de estímulos aplicados. Além disso, foram detectadas alterações no metabolismo glicolítico, indicando que a enzima fosfofrutocinase-1 é um alvo importante deste agente físico. Finalmente, as células tratadas apresentaram um aumento de cerca de 20 % do seu consumo de glicose, após as primeiras 24 horas de estimulação, sem alterações na produção de lactato. Desta forma, o FEI é capaz de modificar aspectos celulares e bioquímicos de células humanas leucêmicas, podendo ser esta uma nova estratégia terapêutica para a destruição de tumores desta natureza.

Palavras-chave: eletroterapia; câncer; metabolismo glicolítico; células HL-60.

## ABSTRACT

BRITO, Luciana Macedo. **Cellular and biochemical changes induced by a continuous electric current of low intensity in human leukemic cells.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Direct electric current (DC) has been used to treat various types of tumors with significant clinical results, characterizing the so called tumor Electrotherapy (EChT). In this therapy, one or more electrodes are inserted locally in the tissue or organ and a source of direct electric current induces a series of cellular changes that culminate in the complete or partial tumor destruction. Results with *in vitro* and *in vivo* experimental models have shown that the damage induced by EChT appears to be mainly due to the effects of electrolysis products generated by the anodic flow (AF) and the cathodic flow (CF). In this study, we investigated the cellular and biochemical effects on human leukemic cells (HL-60) induced by the AF, the CF and another experimental situation that represents an isoelectric region called electro-ionic flow (EIF). Our results indicated that in all experimental situations there were significant changes in cell viability, detected by MTT test. Along with damage to cell viability, were observed by optical and electron microscopy morphological changes, among which we can mention the appearance of bubbles from the cell surface (*blebs*), rarefaction of cytoplasmic matrix, and mitochondria swelling with loss of mitochondrial crests. However, the variations induced by EIF showed cellular and biochemical aspects not yet described in the literature, which motivated us to focus on this specific experimental situation. For the EIF it was possible to verify a decrease in cell viability as the time and intensity of DC applied vary. The test conducted by the trypan blue dye showed that the stimulation by the EIF significantly delayed cell growth rate: the higher the number of stimuli applied, the greater the inhibition. Furthermore, we detected changes in glycolytic metabolism, indicating that the enzyme phosphofructokinase is an important target of this physical agent. Finally, the treated

cells showed an increase of about 20% in their glucose consumption after the first 24 hours of stimulation and no changes in the production of lactate. Thus, the EIF is able to modify cellular and biochemical aspects of human leukemic cells, making it a potential therapeutic strategy to destroy tumors of this nature.

Keywords: electrotherapy; cancer; glycolytic metabolism; HL-60 cells.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Esquema de cubetas com as situações experimentais separadas.	37
Figura 2. Esquema do princípio da eletroquimioterapia.	39
Figura 3. Tipos de eletrodos (A-eletrodo em placas, B-eletrodo em agulhas), distribuição da corrente elétrica e aplicação de pulsos elétricos em tumores.	42
Figura 4. Via glicolítica em células normais (à esquerda), via glicolítica em células tumorais (à direita).	48
Figura 5. Sistema experimental para estímulo elétrico.	56
Figura 6. Viabilidade de células HL-60 após 2 min/2 mA de estímulo elétrico.	62
Figura 7. Viabilidade de células HL-60 após 4 min / 2 mA de estímulo elétrico.	62
Figura 8. Viabilidade de células HL-60 após 6 min /2 mA de estímulo elétrico.	63
Figura 9. Viabilidade de células HL-60 após 8 min / 2 mA de estímulo elétrico.	64
Figura 10. Atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 eletro-estimuladas.	66
Figura 11. Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa após estímulo de 2 mA/ 4 min.	67
Figura 12. Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa 24 após estímulo elétrico de 2 mA/ 4 min.	68
Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de células HL-60 após estímulo elétrico de 2 mA/ 4 min.	69
Figura 14. Percentual da viabilidade de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI).	70
Figura 15. Percentual da viabilidade de células HL-60 24 horas após estímulo elétrico (FEI).	71
Figura 16. Percentual da viabilidade de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) com diferentes doses.	73
Figura 17. Crescimento de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) de 10 min/ 2mA e incubação por diferentes horas.	74
Figura 18. Crescimento de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) de 10 min/ 2 mA, incubação por 24 horas seguida de um segundo tratamento e incubação por diferentes horas.	75

Figura 19. Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10 min.	76
Figura 20. Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10min seguido de incubação por 24 horas.	77
Figura 21. Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10min seguido de incubação por 48 horas	77
Figura 22. Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 quantificada após 24 horas do segundo estímulo pelo FEI (2 mA/ 10 min).	78
Figura 23. Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 quantificada após 24 horas do segundo estímulo pelo FEI (2 mA / 10 min).	79
Figura 24. Consumo relativo de glicose de células HL-60 quantificado imediatamente após estímulo do FEI (2 mA/ 10 min).	80
Figura 25. Consumo relativo de glicose de células HL-60 quantificado após segundo estímulo pelo FEI (2 mA/ 10 min).	80
Figura 26. Produção de lactato de células HL-60 após 1° estímulo pelo FEI com 2 mA por 10 minutos.	81
Figura 27. Produção relativa de lactato de células HL-60 após 2° estímulo do FEI com 2 mA por 10 minutos.	82
Figura 28. Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa. FEI: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 10 min).	83
Figura 29. Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa e incubação por 24 h. FEI: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 10 min).	83

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação.	103
Tabela 2 – Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação.	103
Tabela 3 – Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação	104
Tabela 4- Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação	104
Tabela 5 – Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 0 h de eletroestimulação com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	105
Tabela 6 - Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 24 h de eletroestimulação com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	105
Tabela 7 – Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação por 10 minutos com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	106
Tabela 8 - Valores médios do número de células ( $\times 10^4$ ) quantificado por azul de tripan após primeiro estímulo de 10 min/ 2 mA com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	106
Tabela 9 - Valores médios do número de células ( $\times 10^4$ ) quantificado por azul de tripan após segundo estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	107
Tabela 10 - Valores médios da atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 após primeiro estímulo de 10 min/ 2 mA com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	107
Tabela 11 - Valores médios da atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 após segundo estímulo de 10 min/ 2 mA com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	108
Tabela 12 - Valores relativos de consumo de glicose de células HL-60 após estímulo de 10 min/ 2 mA com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	108
Tabela 13 – Valores relativos da produção de lactato de células HL-60 após estímulo de 10 min/ 2 mA com o fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).	108

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CE	Corrente Elétrica
CECBI	Corrente Elétrica Contínua de Baixa Intensidade
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
Cl <sub>2</sub>	Cloro
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população testada
DMEM	Dulbeco Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EQT	Eletroquimioterapia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETT	Eletroterapia tumoral
FA	Fluxo Anódico
FC	Fluxo Catódico
FEI	Fluxo Eletro-Iônico
HClO	Ácido Hipocloroso
HEPES	N-(2-hydroxyethyl-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MO	Microscópio óptico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Estreptomicina e penicilina
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
UV –Vis	Ultra-violeta e visível

**LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES**

%	Percentual
nm	Nanômetro(s)
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro(s)
g/l	Gramas por litro
cm <sup>3</sup>	Centímetro(s) cúbico(s)
mA	Miliampére
mg/ml	Miligramas por mililitro(s)
µl	Microlitro(s)
mM	Milimolar (milimoles / litro)
mg	Miligramas(s)
n	Número de amostras
µm	Micrômetro(s)
% (p/v)	Percentual peso (g) / volume (ml)
% v/v	Percentual volume (ml) / volume (ml)
T	Temperatura constante
λ	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	24
2.1 CÂNCER	24
2.1.2 <b>Leucemia</b>	26
2.1.3 <b>Células humanas leucêmicas: linhagem HL-60</b>	29
2.1.4 <b>Tipos de tratamentos para o câncer</b>	29
2.2. CORRENTE ELÉTRICA	33
2.2.1 <b>Aplicações de correntes elétricas contínuas</b>	33
2.2.2 <b>Eletroterapia tumoral</b>	35
2.2.3 <b>Eletroquimioterapia</b>	38
2.2.4 <b>Mecanismos de ação da eletroterapia tumoral</b>	41
2.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO	45
2.3.1 <b>Glicólise</b>	45
2.3.2 <b>Fosfofrutocinase-1 e o controle da glicólise</b>	48
<b>3 OBJETIVOS</b>	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	51
4.1 MATERIAIS	51

4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura	51
4.2 EQUIPAMENTOS	52
4.3 MÉTODOS	53
4.3.1 Preparo do meio DMEM	53
4.3.2 Preparo do PBS	53
4.3.3 Preparo do Azul de Tripán	54
4.3.4 Preparo do MTT	54
4.3.5 Manutenção das culturas de células	54
4.3.6 Modelo experimental para estimulação elétrica	55
4.3.7 Preparo das células para o tratamento com CE	56
4.3.8 Tratamento com CE	56
4.3.9 Viabilidade celular: ensaio por MTT	57
4.3.10 Crescimento celular após estímulo do fluxo eletro-iônico	58
4.3.11 Dosagem da atividade enzimática	58
4.3.12 Consumo de glicose e produção de lactato	59
4.3.13 Microscopia óptica	59
4.3.14 Microscopia eletrônica de transmissão	59
4.3.15 Análise estatística	60
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>60</b>
5.1 VIABILIDADE DE CÉLULAS HL-60 ELETRO-ESTIMULADAS	60
5.1.1 Viabilidade celular após 2 minutos de estímulo elétrico	60
5.1.2 Viabilidade celular após 4 minutos de estímulo elétrico	61
5.1.3 Viabilidade celular após 6 minutos de estímulo elétrico	62
5.1.4 Viabilidade celular após 8 minutos de estímulo elétrico	63

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1	64
5.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS: MICROSCOPIA ÓPTICA	65
5.4 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	67
5.5 VIABILIDADE CELULAR APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO PELO FLUXO ELETRO-IÔNICO	69
5.6 REVERSIBILIDADE DOS DANOS CAUSADOS PELO FLUXO ELETRO-IÔNICO	70
5.7 CURVA DOSE-RESPOSTA DE CÉLULAS HL-60 SUBMETIDAS AO FLUXO ELETRO-IÔNICO	71
5.8 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR	72
5.8.1 <b>Avaliação do crescimento celular após primeiro estímulo elétrico pelo fluxo eletro-iônico</b>	72
5.8.2 <b>Avaliação do crescimento celular após segundo estímulo elétrico pelo fluxo eletro-iônico</b>	73
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1	75
5.9.1 <b>Atividade enzimática após 1º estímulo elétrico pelo FEI</b>	75
5.9.2 <b>Atividade enzimática após 2º estímulo elétrico pelo FEI</b>	77
5.10 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE	78
5.10.1 <b>Consumo de glicose após 1º estímulo elétrico pelo FEI</b>	78
5.10.2 <b>Consumo de glicose após 2º estímulo elétrico pelo FEI</b>	79
5.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACTATO	80
5.11.1 <b>Produção de lactato após 1º estímulo elétrico pelo FEI</b>	80
5.11.2 <b>Produção de lactato após segundo estímulo elétrico pelo FEI</b>	80
5.12 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS: MICROSCOPIA ÓPTICA	81
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>83</b>

<b>7 CONCLUSÕES</b>	90
<b>REFERÊNCIAS</b>	91
<b>ANEXO- TABELAS</b>	101

## 1 INTRODUÇÃO

Os mais diversos tipos de câncer são ainda hoje um desafio para a ciência e para a medicina, devido ao fato de que para a maioria dos tumores ainda não foi encontrada a cura e, além disso, os tratamentos utilizados produzem efeitos colaterais muito prejudiciais ao paciente, principalmente aos mais debilitados. Entretanto, devido ao grande número de pesquisas *in vitro* e *in vivo*, espera-se que o tratamento do câncer sofra mudanças significativas dentro dos próximos anos.

Inicialmente os tratamentos com quimioterápicos contra o câncer tinham como alvo o DNA da célula normal e tumoral sem qualquer seletividade. As novas abordagens terapêuticas vêm modificando radicalmente o alvo de atenção, dando-se maior relevância às drogas que podem ser seletivas à célula tumoral, uma vez que essa seletividade reduz os efeitos colaterais e, conseqüentemente, aumenta a eficácia e a qualidade de vida do paciente (SANTINI *et al.*, 2007).

Quando se verifica a bibliografia relacionada ao tratamento das neoplasias, constata-se que a Medicina encontra-se presa a combinações clássicas que incluem cirurgias, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (AVILES *et al.*, 2007).

O uso terapêutico da corrente elétrica contínua (CE) para o tratamento de diversas enfermidades, alívios de sintomas, estimulações neuromusculares inclusive em casos de lesões do sistema nervoso central é prática comum há bastante tempo e seus benefícios são inquestionáveis (HUMPHREY *et al.*, 1959; SCHAUBLE *et al.*, 1977; TAYLOR, *et al.*, 1994 *apud* KULSH, 1997). Contudo, continua-se desconhecendo os vários mecanismos pelos quais a corrente elétrica utilizada com fins terapêuticos atua no corpo humano. Trabalhos publicados nos últimos anos utilizam os recursos da chamada eletroterapia tumoral (ETT), muitas vezes associados à quimioterapia, para o tratamento

dos mais diversos tipos de tumores (MIKLAVIČIČ *et al.*, 2006; SERŠA *et al.*, 2007). Resultados experimentais bastante promissores e eficazes têm sido demonstrados por grupos brasileiros que vêm trabalhando *in vitro* (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2001 e 2005) e *in vivo* (TELLÓ *et al.*; 2004, 2007) na busca pela consolidação e pelo entendimento dos mecanismos de ação relacionados à atividade antitumoral da ETT.

Nesse sentido, avançamos em relação a alguns aspectos importantes mostrando que as alterações celulares são dependentes do pólo e do tempo de exposição a CE. Evidenciamos a ocorrência de apoptose (morte celular programada) disparada pelo pólo positivo (ânodo) e de necrose pelo pólo negativo (cátodo) como importantes mecanismos de morte induzidos pela CE num modelo *in vitro* (VEIGA *et al.*, 2005). Esses resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa estão em acordo com os publicados por Von Euler e colaboradores (VON EULER *et al.*, 2001) quando estes aplicaram CE em animais.

A inibição da proliferação de células tumorais pode ser alcançada através de diversas vias e uma delas consiste no comprometimento de seu metabolismo, já que essas células encontram-se com a demanda energética aumentada devido à intensa atividade mitótica. O fluxo glicolítico, via primordial de obtenção dessa energia, é regulado por diversos parâmetros, dentre os quais, a reação irreversível mediada pela enzima fosfofrutocinase-1 (PFK-1), ponto-chave nesta regulação. Outra importante via envolve a produção de lactato, já que estudos recentes sugerem que células tumorais tendem a produzir lactato para se proteger do *stress* oxidativo gerado pelo metabolismo da glicose (FANTIN *et al.*, 2006).

Em função do exposto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a atividade da enzima PFK-1, o consumo de glicose e a produção de lactato em células cancerosas

tratadas com CE de baixa intensidade, com vistas à compreensão dos mecanismos de ação associados a esta promissora terapia antitumoral. Cabe ressaltar que este estudo foi realizado visando elucidar principalmente as alterações celulares decorrentes da estimulação pelo fluxo de elétrons, sendo, portanto, grande a sua relevância, pois os trabalhos publicados nesta área descrevem apenas alterações celulares e metabólicas geradas por espécies eletroquímicas produzidas pela estimulação elétrica, não havendo relatos científicos acerca das alterações decorrentes do contato com a chamada região isoeletrica, representada neste trabalho pelo fluxo eletro-iônico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para se referir a mais de 100 tipos de doenças nas quais células que sofreram alterações genéticas, chamadas de neoplásicas ou cancerígenas, se dividem sem controle, podendo invadir tecidos do organismo por meio da circulação sanguínea e do sistema linfático (<http://www.abcancer.org.br>, acesso em 10/04/2009).

A maioria dos cânceres é nomeada de acordo com o órgão atingido ou tipo de célula onde se inicia e os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células que compõem o nosso organismo. As principais categorias do câncer são carcinoma, sarcoma, linfoma e leucemia (SOBIN & GREENE, 2001).

Todos os cânceres se iniciam na célula, a menor unidade estrutural básica dos seres vivos. O organismo humano é composto por vários tipos de células, que crescem e se dividem de modo controlado e ordenado, garantindo o seu bom funcionamento. Uma vez que são responsáveis pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo, quando ficam velhas ou danificadas, as células morrem e são substituídas por novas. Mas, é possível que esse processo natural sofra erros (CLARKE *et al.*, 2006).

O material genético (DNA) de uma célula pode sofrer alterações ou ser danificado desenvolvendo mutações que afetam o crescimento normal das estruturas celulares e, conseqüentemente, a sua divisão. Com seus mecanismos de controle da divisão inoperantes, as células passam a se multiplicar independentemente das necessidades do organismo. Por meio de sucessivas divisões, as células acabam formando um agrupamento de estruturas celulares irregulares que recebe o nome de tumor. Diante dessa perda de controle intrínseca da multiplicação celular, só resta ao organismo tentar identificar e destruir essas estruturas

anormais por intermédio do sistema imunológico que, por vezes impotente, não consegue conter a evolução da doença (WALL & SHUETZ, 2002).

Somente tumores malignos podem ser designados como câncer. Um tumor benigno pode se tornar maligno, mas não necessariamente o tumor maligno já foi benigno. Uma das principais diferenças entre os dois tipos de tumor é em relação à velocidade de crescimento e a capacidade que tem ou não de invasão e de proliferação celular: os tumores malignos têm crescimento acelerado em comparação aos benignos. O tumor maligno sofre um processo de vascularização, chamado angiogênese, que promove acelerado crescimento e maior probabilidade de invadir outras partes do organismo (ROZNAK & SEIDMAN, 2002).

O último congresso mundial de câncer, ocorrido em agosto de 2008, apresentou estimativas recentes sobre o câncer (<http://internationalcancerfoundation.org>, acesso em 11/04/2009):

- Há mais de 11 milhões de novos casos e aproximadamente 8 milhões de mortes anualmente no mundo todo devido ao câncer;
- Até 2030 esses dados aumentarão para quase 16 milhões com previsão de aproximadamente 11,5 milhões de mortes por ano, se as atuais tendências continuarem;
- O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo todo;
- O câncer mata mais do que a malária, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e a tuberculose juntas.

Levantamento do Centro Internacional de Pesquisas contra o Câncer da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicou que a doença deverá superar as incidências cardiovasculares como primeira causa de mortalidade no mundo, em 2010. Segundo o relatório, os casos de câncer dobraram entre 1975 e 2000 e devem duplicar novamente entre 2000 e 2020. Em 2030, o câncer poderá matar 16 milhões de pessoas contra os 7,6 milhões

que provocou em 2007. No ano passado, também foram registrados 12 milhões de novos casos de câncer, entre os quais 5,6 milhões ocorreram em países em desenvolvimento. No total, 7,6 milhões de pessoas morreram no mundo, sendo 4,7 milhões nos países em desenvolvimento.

### 2.1.2 Leucemia

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos) de origem, na maioria das vezes, não conhecida. Ela tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, as quais substituem as células sanguíneas normais. A medula é o local de formação das células sanguíneas, ocupa a cavidade dos ossos (principalmente esterno e bacia) e é conhecida popularmente por tutano. Nela são encontradas as células mães ou precursoras que originam os elementos figurados do sangue: glóbulos brancos (leucócitos), glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e plaquetas (MELVIN, 1981).

Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo das células blásticas anormais na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia (WIERNIK, 2002).

As leucemias podem ser classificadas em: leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC) e leucemia linfóide aguda (LLA). A leucemia mielóide aguda caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e exagerado das células indiferenciadas, chamadas blastos, de característica mielóide. Na maioria dos casos desta doença não existe

causa evidente. No entanto, em alguns pacientes, consegue-se relacioná-la à exposição a benzeno, a irradiações ionizantes, como a que ocorreu em Hiroshima, e à exposição à quimioterapia. Sua incidência é de 1/150.000 na infância e adolescência. A LMA apresenta-se com uma variedade de tipos de células que podem ser observados no sangue e medula óssea. Esta observação possibilitou a subclassificação em oito subtipos: M0 e M1, mieloblásticas imaturas; M2, mieloblástica madura; M3, promielocítica; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M6, eritroleucemia; e M7, megacariocítica (HAMERSCHLAK, 2008).

A leucemia mielóide crônica caracteriza-se pela presença de uma anormalidade genética adquirida, a qual foi chamada de cromossomo Filadélfia, pois foi descoberta na Universidade da Pensilvânia. O cromossoma Filadélfia é uma anormalidade que envolve os cromossomos de números 9 e 22. Essa fusão de pedaços de cromossomos é reconhecida em nível molecular como bcr-abl. As causas que levam a essa alteração são geralmente desconhecidas. Uma pequena proporção de pacientes pode ter essa doença relacionada à irradiação. Isso ficou relativamente claro em estudos no Japão com sobreviventes da bomba atômica. Verificou-se, nessa população, um maior risco de leucemia, assim como de outros tipos de câncer. A maioria dos casos de LMC ocorre em adultos. A frequência deste tipo de leucemia é de 1 em 1 milhão de crianças até os 10 anos. Em adultos com uma frequência em torno de 1 em 100.000 indivíduos (O'BRIEN *et al.*, 2007).

A leucemia linfóide aguda resulta na produção descontrolada de blastos de características linfóides e no bloqueio da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. Na maioria das vezes, a causa da LLA não é evidente. Também nestes casos, acredita-se que haja alguma relação com radiação devido ao aumento de casos no Japão pós-guerra. A LLA desenvolve-se a partir dos linfócitos primitivos, que podem se encontrar em

diferentes estágios de desenvolvimento (PUI & EVANS, 1998 *apud* HAMERSCHLAK, 2008).

Como geralmente não se conhece a causa da leucemia, o tratamento tem o objetivo de destruir as células leucêmicas, para que a medula óssea volte a produzir células normais. O grande progresso para obter cura total da leucemia foi conseguido com a associação de medicamentos (poliquimioterapia), controle das complicações infecciosas e hemorrágicas e prevenção ou combate da doença no sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal). Para alguns casos, é indicado o transplante de medula óssea. O tratamento é feito em várias fases: a primeira tem a finalidade de atingir a remissão completa, ou seja, um estado de aparente normalidade que se obtém após a poliquimioterapia. Esse resultado é conseguido entre um e dois meses após o início do tratamento (fase de indução de remissão), quando os exames não mais evidenciam células leucêmicas. Isso ocorre quando os exames de sangue e da medula óssea (remissão morfológica) e o exame físico (remissão clínica) não demonstram mais anormalidades (HAMERSCHLAK *et al.*, 2003). Entretanto, as pesquisas comprovam que ainda restam no organismo muitas células leucêmicas (doença residual), o que obriga a continuação do tratamento para não haver recaída da doença. Nas etapas seguintes, o tratamento varia de acordo com o tipo de leucemia (linfóide ou mielóide), podendo durar mais de dois anos nas linfóides e menos de um ano nas mielóides. São três as fases envolvidas com a terapêutica: consolidação (tratamento intensivo com substâncias não empregadas anteriormente); reindução (repetição dos medicamentos usados na fase de indução da remissão) e manutenção (o tratamento é mais brando e contínuo por vários meses) (HAMERSCHLAK *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Células humanas leucêmicas: linhagem HL-60

HL-60 é uma linhagem promielocítica de sangue periférico e foi selecionada a partir de leucócitos do sangue periférico obtido por leucoforese de uma mulher caucasiana, de 36 anos, com leucemia mieloide aguda. As células HL-60 podem se diferenciar espontaneamente e esta diferenciação pode ser estimulada por butirato, hipoxantina, dimetilsulfóxido, actinomicina D e ácido retinóico (COLLINS *et al.*, 1978). Essas células apresentam atividade fagocítica, são responsivas à estimulação quimiotática, expressam o oncogene *myc* (GALLAGHER *et al.*, 1979) e são muito utilizadas em experimentos que envolvem a morte celular programada (VEIGA *et al.*, 2005). Estas características, associadas ao fato de serem células de fácil manutenção *in vitro* e de terem crescimento em suspensão, e não aderente, tornam esta linhagem um ótimo modelo biológico para o entendimento dos mecanismos associados à atividade antitumoral de correntes elétricas.

### 2.1.4 Tipos de tratamentos para o câncer

A cirurgia oncológica, a mais antiga das formas de tratamento do câncer, ainda ocupa uma posição de destaque no controle desta doença. Uma cirurgia oncológica definitiva visa à remoção mecânica de todas as células malignas presentes junto ao câncer primário. Para isso, é necessário que o cirurgião retire, não apenas o tumor, mas também uma quantidade de tecido ao seu redor, que se convencionou chamar de margem de segurança. Dada a capacidade invasora do câncer, a retirada de tecidos, aparentemente saudáveis junto ao tumor, diminui as chances de que porções microscópicas do mesmo sejam deixadas para trás. Os gânglios linfáticos que recebem a drenagem da região onde

se encontra o tumor devem também ser removidos, aumentando a eficácia deste método, ao mesmo tempo em que se complementa o diagnóstico sobre a extensão da doença. Com esta abordagem agressiva torna-se possível eliminar por completo o tumor, aumentando as chances de cura do paciente. É claro que abordagens tão agressivas podem não ser isentas de sequelas. Muitas vezes, a perda parcial ou mesmo completa da função de um órgão é o principal dano a ser pago pelo sucesso de uma cirurgia (GENTIL & LOPES, 1991).

A quimioterapia é a utilização de medicamentos específicos para o tratamento de tumores, com o objetivo de destruir células cancerosas. Administrados por via oral, via intravenosa, intramuscular ou intradérmica, os quimioterápicos distribuem-se para todas as partes do corpo. Enquanto a cirurgia e a radioterapia limitam-se a eliminar as células malignas de uma área restrita, a quimioterapia tem a capacidade de alcançá-las onde quer que estejam, dentro do organismo. Os quimioterápicos podem atuar em diversas etapas do metabolismo celular. Geralmente, interferem na síntese ou na transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA), ou diretamente na produção de proteínas, agredindo, principalmente, as células em divisão (AZEVEDO *et al.*, 2004). Por estar constantemente se multiplicando, a célula maligna se torna um alvo fácil para estas drogas. Na maioria das vezes, os quimioterápicos são usados de forma combinada, o que aumenta a sua eficácia. Os agentes quimioterápicos bloqueiam alguns processos metabólicos comuns ao tumor e aos tecidos saudáveis. São os tecidos do corpo com maiores índices de renovação, como a medula óssea, couro cabeludo, pele e mucosas, que acabam sendo mais afetados, de forma indesejada, pela medicação. Por isso, durante este tipo de tratamento, efeitos colaterais podem ocorrer, variando em frequência e intensidade, de pessoa para pessoa. Os sintomas mais comuns são: anemia, fadiga, suscetibilidade a infecções (leucopenia), lesões orais (mucosite), náuseas e vômitos, diarreia e alopecia (queda de cabelo). Alguns

desses efeitos são bastante transitórios, ocorrendo apenas por alguns dias após a aplicação do tratamento; outros podem durar um pouco mais ou, às vezes, durante todo o tratamento (HAMERSCHLAK *et al.*, 2006).

Pela sua capacidade de destruir células malignas, a radioterapia representa hoje uma importante arma no combate ao câncer. Os dois tipos fundamentais de radiação utilizados são: fóton (RX ou radiação gama) e o feixe de elétrons. Estas radiações exercem seu maior efeito no DNA de forma direta ou indireta. No efeito direto, a radiação atinge a molécula de DNA causando alteração química e ruptura da cadeia. No efeito indireto, há uma interação da radiação com outras substâncias (principalmente a água intracelular) havendo a produção de radicais livres que se combinam com o DNA para determinar ruptura da sua cadeia. O mecanismo indireto é responsável por mais de 90% do efeito da radiação (AZEVEDO *et al.*, 2004). A ação da radioterapia está restrita à área tratada, constituindo-se, como a cirurgia, um tratamento com caráter local. Seus efeitos tóxicos são também localmente limitados. Assim, não há risco de lesão aos órgãos fora do campo de irradiação.

Irritações ou leves queimaduras na pele, inflamações das mucosas, queda de cabelo nas áreas irradiadas e diminuições do número de leucócitos e hemácias, assim como as plaquetas podem ter suas produções comprometidas, determinando queda em suas contagens no sangue; são os efeitos colaterais mais frequentemente experimentados pelos pacientes sob tratamento, variando sua intensidade de acordo com as doses utilizadas e regiões tratadas.

A radioterapia pode ser empregada com o objetivo de eliminar totalmente o câncer, visando à cura do paciente, ou diminuir os sintomas da doença, evitando as possíveis complicações decorrentes da presença e do crescimento do tumor. Para alcançar estes objetivos, a radioterapia pode ser combinada à cirurgia e à quimioterapia, ou

mesmo empregada como recurso isolado. Uma das formas conhecidas de irradiação é a braquiterapia, que pode utilizar diferentes isótopos, tais como: céσιο 137, iodo 131, ouro 198, irídio 192, fósforo 32 e estrôncio 90.

A braquiterapia é uma técnica que utiliza fontes seladas, radioativas naturais ou artificiais, colocadas em contato íntimo com o tumor em cavidades naturais ou implantadas diretamente dentro dos tecidos tumorais. A dose é elevada dentro do tumor e os tecidos normais circunjacentes são relativamente poupados dos efeitos da radiação (FILHO *et al.*, 1991).

As décadas de 70 e 80 assistiram a um grande avanço no conhecimento médico sobre o sistema imunológico. Seus componentes, os mensageiros envolvidos e a forma de atuação de cada um deles puderam ser reconhecidos, permitindo uma clara visão do seu funcionamento. O câncer é um elemento estranho ao organismo sadio, até comparável a um parasita invasor. Desta forma, não causa surpresas que o sistema imunológico possa reconhecê-lo e destruí-lo e, que, em condições de mau funcionamento das defesas do organismo, como na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), as doenças malignas tornem-se frequentes. Durante as últimas décadas, grandes investimentos em pesquisa foram feitos na tentativa de desenvolver ferramentas que permitissem interferir no funcionamento do sistema imunológico com o objetivo de controlar o câncer. Apesar de não terem conseguido satisfazer a enorme expectativa criada, interferon (DOBBIN & GADELHA, 2002), interleucinas (SANTOS JÚNIOR, 1997) e anticorpos monoclonais (BLAU *et al.*, 2006) são hoje parte integrante do arsenal terapêutico para o combate ao câncer, sendo utilizados dentro de diversos protocolos de tratamento.

O transplante de medula óssea pode fazer parte do tratamento de várias doenças, tais como leucemias, linfomas, anemia aplástica severa, imunodeficiências congênitas, anemias hemolíticas hereditárias, tumores sólidos e outras doenças metabólicas

hereditárias. Não são todos os doentes, com qualquer uma das doenças mencionadas, que poderão se beneficiar do transplante (HAMERSCHLAK *et al.*, 2006).

## 2.2 CORRENTE ELÉTRICA

### 2.2.1 Aplicações de correntes elétricas contínuas

O uso de correntes elétricas propicia ações terapêuticas nos tecidos biológicos ou possibilita a manutenção de suas funções. A eletroterapia é um recurso terapêutico relevante, quando corretamente utilizado, para o tratamento de diversas afecções dos tecidos biológicos. Estudo realizado por Wheeler e colaboradores (2002) evidenciaram resultados positivos com o uso da eletroterapia para a recuperação do músculo esquelético e, conseqüentemente, da função cardiorrespiratória em pacientes portadores de lesões neurológicas importantes, como o trauma da medula espinhal. Lamb e colaboradores (2002) observaram a recuperação da musculatura esquelética de pacientes portadores de fraturas de quadril fixadas cirurgicamente com o uso de CE. A melhora da resposta muscular também foi observada em indivíduos sedentários saudáveis (GUIRRO *et al.*, 2000) ou em atletas (PICHON *et al.*, 1995), acarretando aumento da força e, conseqüentemente, do rendimento.

Outro campo de aplicação das correntes, diz respeito aos processos de cicatrização, em que a efetividade das microcorrentes está descrita, onde a estimulação anódica foi utilizada para promover a cicatrização de feridas de pele (TALEBI *et al.*, 2007).

Existem evidências de que a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) pode diminuir a dor, facilitar o reparo tecidual e ainda minimizar a severidade de lesões por estresse repetitivo (STRALKA *et al.*, 1998). Desde o início do século XX, vários experimentos utilizaram a corrente elétrica como estímulo para a consolidação de fraturas ósseas, baseando-os nas propriedades elétricas dos ossos. No entanto, foram os relatos de

Fukada & Yasuda (1957) que propiciaram o aumento na busca de explicações para o efeito da corrente elétrica no reparo ósseo. Estes autores relataram que a deformação óssea produz corrente elétrica direta, a qual estimula a formação óssea. Como consequência desses relatos, surgiram idéias que uma estimulação elétrica fraca, aplicada de forma exógena, poderia agir como estímulo para o osso. Assim, a estimulação elétrica surgiu como uma forma de reparar fraturas ósseas, sem a necessidade de cirurgia. Efeitos positivos também foram obtidos com técnica não invasiva, por meio de estímulos indutivos, os quais criam campos magnéticos ao redor da região de não-união óssea (SCOTT & KING, 1994). O estímulo elétrico também foi descrito para o tratamento de osteonecroses e osteoporose (NORDENSTRÖM, 1989; VODOVNIK *et al.*, 1992). Yonemori e colaboradores (1996) observaram aumento da atividade da fosfatase alcalina após estimulação elétrica, o que reflete em um maior número de osteoblastos e maior grau de osteogênese. Nesse estudo, foi concluído que a estimulação elétrica é eficaz para promoção da osteogênese quando na região estimulada existem células sensíveis a este tipo de estímulo.

Os resultados de Spadaro (1997) corroboram os achados de Zerath e colaboradores (1995) sobre o efeito da estimulação elétrica em músculos da pata de ratos incapazes de sustentar o próprio peso. Estes autores observaram que o estímulo elétrico exógeno sozinho, embora promova contração muscular, não é suficiente para prevenir a perda de massa óssea provocada pelo desuso. No entanto, embora as características ósseas não melhorem com o estímulo, a análise histológica indica aumento do número de osteoblastos e da formação óssea trabecular na região estimulada.

No tratamento elétrico de úlceras cutâneas alguns pesquisadores sugerem a estimulação catódica (pólo negativo) durante todo o tratamento (HOUGHTON *et al.*, 2003), já que a estimulação catódica pode exercer efeito bactericida (UNGER *et al.*, 1991).

Outros trabalhos indicam a eletroterapia transcutânea como opção interessante para o controle da dor do trabalho de parto, constituindo método comprovadamente seguro, de baixo custo e isento de efeitos colaterais (KAPLAN *et al.*, 1997). A técnica consiste basicamente em administrar impulsos ou estímulos elétricos de baixa voltagem através de eletrodos colocados sobre a pele. Embora possa ser aplicada a qualquer momento durante o trabalho de parto, verifica-se maior efetividade nas fases iniciais (GENTZ, 2001).

Até o início de 1990, a pesquisa em animais foi suficientemente avançada para permitir que estudos com estimulação elétrica fossem realizados em humanos. Este avanço sugeriu a possibilidade de utilização da estimulação elétrica para déficits neuromusculares, incluindo paralisia vocal bilateral e disfonia espasmódica, bem como estimulação do nervo vagal para o tratamento da epilepsia (LUNDY *et al.*, 1993; GILMAN & GILMAN, 2008).

### **2.2.2 Eletroterapia tumoral**

A eletroterapia tumoral (ETT) se apresenta como uma nova alternativa para tratar tumores sólidos malignos. Consiste num tratamento local, onde os produtos de eletrólise formados e a toxicidade possuem efeitos destrutivos nas células cancerosas. Uma importante vantagem deste tratamento é que a possibilidade de aplicação local, o que incorre em efeitos colaterais mínimos ou nenhum efeito colateral sistêmico. Clinicamente a ETT tem demonstrado ser uma terapia segura, efetiva, barata, além de representar uma boa opção a pacientes que não podem ser operados ou tratados com radioterapia e quimioterapia (NORDENSTRÖM, 1983; TELLÓ *et al.*, 2004).

O primeiro trabalho realizado sobre o uso da ETT em pacientes com câncer foi publicado por Nordenström em 1978 e desde 1987 este projeto vem sendo financiado pelo

governo Chinês visando o tratamento de tumores malignos na China. Desde então mais de 15 mil pacientes vêm sendo tratados em diversos países (XIN *et al.*, 1997).

Os estudos *in vitro* e *in vivo* (estudos pré-clínicos e clínicos) têm demonstrado que a CE exerce efeito antitumoral em diferentes tipos de neoplasias; porém a inexistência de um protocolo terapêutico padronizado tem sido um obstáculo para introduzir a ETT na oncologia clínica.

Diversos trabalhos evidenciam que a corrente elétrica retarda o crescimento de diferentes tipos de tumores em animais e em humanos. Estudos evidenciaram que os tumores são mais sensíveis à CE do que os tecidos sadios que circundam os tumores. Além disso, a literatura mostra que os efeitos da CE são dependentes do tipo de tumor e do esquema terapêutico, ou seja, da carga e do arranjo dos eletrodos que circundam o tumor.

Em 1997, Bergues e colaboradores realizaram em Cuba os primeiros estudos experimentais com CE em ratos que apresentavam tumores de Ehrlich e fibrosarcoma Sa-37. Os achados histopatológicos tumor de Erlich tratados por CE revelaram que no grupo tratado ocorre necrose, congestão vascular, infiltração peritumoral de neutrófilos, resposta inflamatória aguda com moderada infiltração peritumoral de monócitos (CIRIA *et al.*, 2001, 2004). Os resultados corroboram que a atividade antitumoral da ETT está relacionada aos efeitos químicos produzidos diretamente no tumor, os quais modificam o metabolismo e a homeostase celular.

Trabalhos realizados por Cabrales e colaboradores (2001) e Quevedo e colaboradores (2003) com fibrosarcoma SA-37 e tumor de Ehrlich evidenciaram que a estimulação elétrica diminui a velocidade de crescimento e reduz de maneira significativa o volume tumoral em comparação aos respectivos controles.

Outros estudos também apresentaram resultados importantes quanto ao tratamento de tumores com CE. Jarque e colaboradores (2007) trataram 4 pacientes em Cuba, com tumores

do tipo carcinoma, liposarcoma e metástase ganglionar. Utilizaram eletrodos de platina devido a sua alta condutividade e resistência a corrosão observando que os pacientes apresentaram resposta parcial ao tratamento.

Veiga e colaboradores (2000) avaliaram os efeitos do tratamento elétrico *in vitro* em células de mastocitoma de rato (linhagem tumoral P815). Neste estudo foram comprovados os efeitos de CE sobre a membrana celular, além de alterações em carboidratos da superfície celular. O uso de aparato experimental que permite a separação dos eventos eletroquímicos decorrentes da estimulação elétrica (Figura 1) permitiu evidenciar alterações relevantes induzidas por cada reação eletrolítica de maneira independente: a estimulação catódica induz lise celular e aumento do pH reacional; enquanto que a estimulação anódica induz aumento da permeabilidade da membrana a corantes, com diminuição do pH do meio. A CE também diminui a viabilidade e a proliferação destas células tumorais, com alterações morfológicas que incluem condensação da cromatina e inchaço mitocondrial (HOLANDINO *et al.*, 2001).

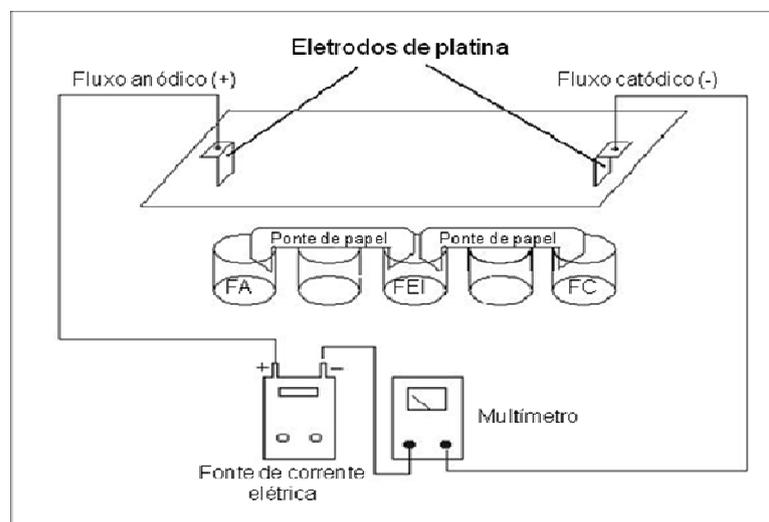


Figura 1: Esquema de cubetas com as situações experimentais separadas. FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico.

Holandino e colaboradores (2001) analisaram os efeitos da CE em células leucêmicas humanas (linhagem K562) e sua derivada resistente a vincristina (linhagem K562-lucena-1). Nessas condições experimentais, a análise da glicoproteína-P por RT-PCR e citometria de

fluxo, revelou que esta molécula não é um alvo para CE; desta forma, a diminuição da viabilidade de células K562-lucena-1 após tratamento com CE parece ser decorrente de alterações na membrana plasmática e organelas vitais, como mitocôndrias e núcleo.

Outro estudo realizado com aplicação de CE *in vitro* (VEIGA *et al.*, 2005) mostra que os compostos tóxicos produzidos durante a estimulação anódica induzem apoptose e necrose em células humanas leucêmicas (linhagem HL-60). A indução de apoptose nas células tratadas com o fluxo anódico é dependente da geração de produtos de eletrólise, como as cloraminas. Em constraste, o estímulo catódico induz lise celular e necrose, mas não apoptose. Estes resultados indicam a importância da polaridade na geração de compostos citotóxicos e colaboram com a elucidação dos mecanismos envolvidos com a atividade antitumoral de CE (VEIGA *et al.*, 2000, 2005; HOLANDINO *et al.*, 2000; 2001).

### 2.2.3 Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia (EQT) ou técnica de eletroporação (permeabilização reversível da membrana celular) para o tratamento do câncer combina a administração de drogas quimioterápicas impermeáveis ou pouco permeáveis com a aplicação de pulsos elétricos ou correntes elétricas contínuas, a fim de facilitar a entrada destes agentes nas células tumorais (Figura 2). Assim, a EQT potencializa substancialmente a eficácia da quimioterapia, sem afetar os tecidos adjacentes (HOFMANN *et al.*, 1994; SERŠA *et al.*, 1996).

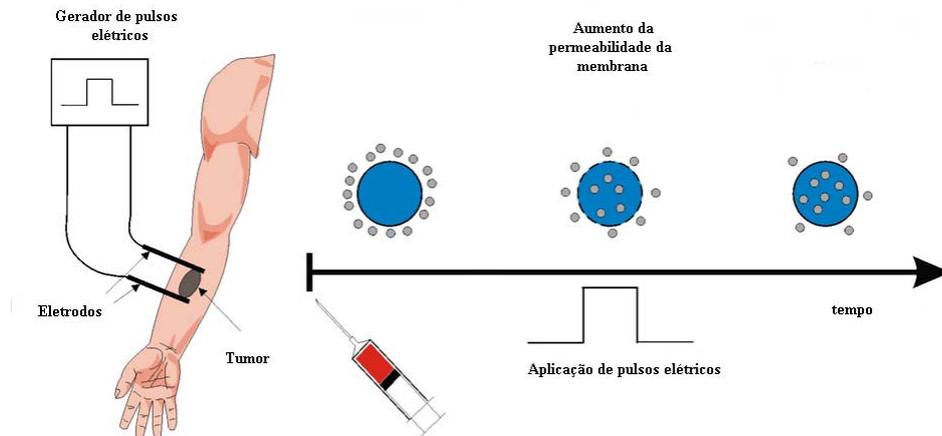


Figura 2: Esquema do princípio da eletroquimioterapia. Aplicação de um pulso elétrico adequado aumenta a permeabilidade da membrana, conseqüentemente, aumenta a penetração do quimioterápico (Adaptado de Serša *et al.*, 2008).

Com base em inúmeros estudos pré-clínicos utilizando bleomicina ou cisplatina, o primeiro estudo clínico sobre EQT foi realizado por Mir e colaboradores (1991). A EQT associada a estas drogas tem se mostrado eficaz em pacientes com metástases cutâneas de carcinoma de cabeça e pescoço.

A EQT pode ser utilizada em diversos tipos de metástases cutâneas, tais como: carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, melanoma, carcinoma basocelular, adenocarcinoma de mama e da glândula salivar, sarcoma de Kaposi e carcinoma de bexiga (GOTHELF *et al.*, 2003; SERŠA *et al.*, 2003). Segundo Mir *et al.* (2006) já foram tratados com EQT, 1009 nódulos de 247 pacientes. Em geral, os resultados destes estudos demonstram que a EQT é um tratamento eficaz, com respostas objetivas obtidas em 48-100% dos nódulos tratados. As melhores respostas são obtidas em pequenos nódulos tumorais porque toda a massa tumoral pode sofrer eletroporação. Diferente do resultado obtido em nódulos maiores e mais espessos, onde é mais difícil se fazer uma eletroporação adequada. Em alguns casos o tratamento deve ter repetidas sessões consecutivas. A EQT é ainda uma nova abordagem para o tratamento de nódulos tumorais acessíveis por fibroscopia, endoscopia ou cirurgia. Em

alguns casos, a EQT pode ser utilizada para reduzir a massa tumoral tornando-a acessível para cirurgia.

A efetividade antitumoral da EQT vem sendo consideravelmente avaliada em diversos modelos tumorais, tanto em animais, quanto em humanos. A utilização de bleomicina e cisplatina oferecem uma abordagem promissora para o tratamento de lesões tumorais cutâneas e subcutâneas. Serša e colaboradores (1997) observaram que o fibrosarcoma de ratos tratados com EQT associada a cisplatina tiveram um efeito antitumoral maior que o tratamento realizado somente com cisplatina. Além disso, estudos anteriores (MIR *et al.*, 1992; MIR *et al.*, 1995) mostraram que a resposta imune após a cura com EQT e cisplatina está envolvida com atividade de linfócitos T, enquanto exames histológicos indicam o envolvimento de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após a EQT com bleomicina.

Situações de metástases cutâneas e subcutâneas de melanomas são de difícil tratamento com as terapias convencionais (como cirurgia e radioterapia). Porém, a EQT pode ser utilizada com sucesso como registrado por Snoj e colaboradores (2006), onde o paciente apresentou cura total após 5 sessões de EQT associada a cisplatina.

Entretanto, o tratamento não é indicado em pacientes que apresentam reação alérgica a bleomicina ou cisplatina. Ainda assim, apresenta diversas vantagens como: capacidade de melhorar a qualidade de vida do paciente; cura de lesões dolorosas; controle de hemorragias e no caso de lesões isoladas representa potencial cura para o paciente (MIR *et al.*, 2006).

Os pulsos elétricos podem ser gerados por tipos diferentes de eletrodos que foram desenvolvidos em colaboração com Cliniporator®. Os eletrodos tipo I são como placas, e se destinam ao tratamento de nódulos superficiais e pequenos (Figura 3-A). Os eletrodos de agulha são adequados ao tratamento dos nódulos mais espessos e profundos (Figura 3-B). Existem dois tipos de eletrodos com agulha: um com duas matrizes de agulhas paralelas com 4 mm entre elas (eletrodos do tipo II), para nódulos pequenos; ou eletrodos em série no

formato hexagonal (eletrodos do tipo III) para nódulos maiores que 1 cm de diâmetro. Esta variedade de eletrodos foi desenvolvida de forma a abranger os diferentes tipos de nódulos cutâneos encontrados que podem ser tratados com EQT ([www.cliniporator.com](http://www.cliniporator.com), acesso em 09/05/2009).

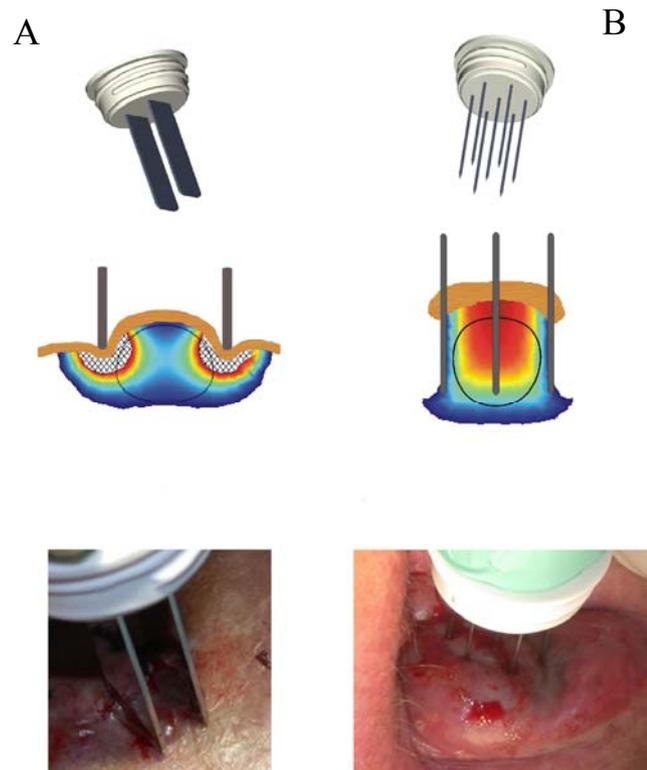


Figura 3: Tipos de eletrodos (A-eletrodo em placas, B-eletrodo em agulhas), distribuição da corrente elétrica e aplicação de pulsos elétricos em tumores. Adaptado de Serša *et al.*, 2008.

#### 2.2.4 Mecanismos de ação da eletroterapia tumoral

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar os mecanismos envolvidos com a atividade antitumoral de correntes elétricas (CE). Muitos fatores causam a destruição das células tumorais pela eletroterapia. Como sugerido por Nordenström e colaboradores (1995) esses fatores incluem: desidratação do tecido tumoral, alterações de pH, formação de produtos de eletrólise, imunomodulação e coagulação. A temperatura dos tecidos tumorais

expostos a CE não se altera durante a aplicação da CE, sendo este um fator que não atua na destruição do tumor (DAVID *et al.*, 1985 *apud* TANG *et al.*, 2005).

A ação antitumoral do tratamento elétrico combina a ativação do transporte iônico, a reação entre os eletrodos e a liberação de substâncias tóxicas, como espécies reativas de oxigênio (NORDENSTRÖM 1994; CABRALES *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2000; WARTENBERG *et al.*, 2007).

Os mecanismos para um grande número de tratamentos de tumores, incluindo a eletroterapia, estão associados com o controle do ciclo celular pelo bloqueio da fase G1. Tang e colaboradores (2005) estabeleceram um tratamento eletroterápico num modelo *in vitro* para carcinoma cervical humano. Neste estudo se demonstrou que a aplicação da CE foi capaz de destruir células de câncer cervical (linhagem celular HeLa), estando a eficácia do tratamento relacionada com o grau de ionização e com as alterações de pH decorrentes do estímulo elétrico. Estes autores também evidenciaram que o tratamento elétrico é capaz de modular o ciclo celular, mantendo uma maior porcentagem de células na fase G1 (síntese de proteínas e RNA, sem síntese de DNA) diminuindo o número de células na fase de síntese (fase S).

Além disso, ocorre um significativo aumento dos cátions  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  no fluxo catódico, bem como formação do ânion  $Cl^-$  no fluxo anódico (TANG *et al.*, 2005). Após o tratamento elétrico, um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  pode ativar endonucleases e clivagens no DNA, enquanto o efluxo de  $K^+$  pode disparar o sistema de caspases, ambos envolvidos com apoptose celular. Estudos também sugerem que o aumento de  $Na^+$  nos fluidos teciduais podem aumentar a inibição do tumor (YU *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2000).

Yen *et al.* (1999) mostraram que a mudança aguda no pH é a maior causa de degeneração irreversível de vários tipos de enzimas que leva à morte da célula. A acidez gerada pelo fluxo anódico e a alcalinidade produzida pelo fluxo catódico, acrescidos do transporte eletro-osmótico e do distúrbio da circulação, são fatores importantes envolvidos

com a regressão do tumor e a desintegração das células tumorais, em decorrência do estímulo elétrico (MATSUSHIMA *et al.*, 1994; NORDENSTRÖM, 1994). A hiperacidificação pode ativar mecanismos citolíticos, como o aumento da atividade dos lisossomos, que resultam na destruição das células tumorais (YEN, LI & ZHOU, 1999). O baixo pH também é conhecida causa de quebra de glicose e inibição da síntese de proteínas. Portanto, mudanças no equilíbrio ácido-base do tumor encerram em si um importante valor terapêutico.

Von Euler e colaboradores (2002) mostraram *in vitro* (células de tumores de ratos), que a mudança de pH de 7,4 para 4,5 – 5,5, induzida pelo fluxo anódico estava associada a dois tipos de morte celular: a necrose e a apoptose, com ativação da caspase-3 e quebra da molécula de DNA. Enquanto no fluxo catódico onde o pH chega a 9 – 10, ocorre somente necrose. Estes dados foram corroborados por Veiga e colaboradores (2005) em células humanas leucêmicas (HL-60).

Outros efeitos, além da alteração de pH, são responsáveis pela morte celular, como o estímulo à reações imunológicas. Estudos clínicos realizados por Cabrales e colaboradores (2001) confirmaram a infiltração de macrófagos e linfócitos no tecido estimulado pela eletroterapia. Este estudo sugere uma ativação do sistema imune do paciente decorrente da liberação de antígenos gerados pela eletroterapia.

Os produtos de eletrólise podem combinar-se com outras substâncias químicas presentes no tecido e formar, assim, outros produtos citotóxicos. Portanto, os danos causados por produtos de eletrólise diretos ou indiretos estão localizados entorno dos eletrodos e não são detectados à medida que se aumenta a distância dos eletrodos (MIKLAVČIČ *et al.*, 1993; CVIRN *et al.*, 1994; NILSSON *et al.*, 1999; NILSSON & FONTER, 2001; VON EULER *et al.*, 1999, 2001.)

Estudos realizados por Tang e colaboradores (2002) mostraram que genes associados a apoptose (incluindo bcl-2, p53, c-myc e c-raf) foram inibidos em células estimuladas pelo

fluxo catódico (FC) e anódico (FA) gerados pela eletroterapia, sugerindo a ação desta terapia na regulação da expressão ou atividade de moléculas envolvidas com a morte celular programada.

Wartenberg e colaboradores (2007) investigaram os efeitos da eletroterapia em células cancerosas da mucosa oral. Demonstraram que a eletroterapia aumenta a expressão de subunidades de NADPH oxidase e a geração de espécies reativas de oxigênio induzindo a apoptose celular. Outros estudos evidenciaram a ação pró apoptótica da NADPH oxidase (REINEHR *et al.*, 2006; VAN LAETHEM *et al.*, 2006). Esta enzima exerce efeitos anti apoptóticos, por exemplo, em células de adenocarcinoma esofágico, induzindo uma diminuição da proliferação celular e um aumento dos níveis de apoptose (FU *et al.*, 2006).

A distinção entre os efeitos anti e pró apoptóticos da NADPH oxidase depende da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas pela enzima. Baixos níveis de EROS estão associados com o processo de proliferação celular, enquanto altos níveis de EROS estão associados com apoptose celular (SAUR *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por Cabrales e colaboradores (2001) foram tratados com multieletródos tumores sólidos de Erlich sendo em seguida, investigados os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Os resultados deste estudo mostraram que a CE influencia negativamente o crescimento do tumor de Erlich. O volume do tumor diminui e ocorre um aumento no percentual de necrose. A presença de neutrófilos na periferia dos tumores tratados e a hiperplasia linfóide do baço dos animais estimulados também sugerem um estímulo do sistema imune, com a indução de uma resposta inflamatória. Esta ativação do sistema imune deve ser a responsável por eliminar as células que sobreviveram à ação citotóxica da CE.

Miklavčič e colaboradores (2003) testaram a hipótese de que a atividade antitumoral de CE pode ser resultado de um distúrbio no fluxo sanguíneo dos tumores. Essa hipótese foi

testada medindo as mudanças na perfusão sanguínea e na oxigenação em dois tipos de fibrosarcoma (LPB e Sa-1). Os resultados indicam claramente que a aplicação da CE induz uma severa diminuição do fluxo sanguíneo (perfusão) em tumores sólidos subcutâneos. O efeito observado foi resultado dos danos ou da oclusão dos vasos sanguíneos, devido à inserção dos eletrodos no tecido sadio em torno do tumor.

## 2.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO

### 2.3.1 Glicólise

A glicólise (do grego glykys, que significa “doce”, e lysis, que significa “quebra”) é um processo comum à maioria dos organismos e em seres humanos ocorre em praticamente todos os tecidos. Nesta via metabólica, um conjunto de dez reações catalisadas por enzimas culmina na formação de duas moléculas de piruvato para cada molécula de glicose. Todas as reações ocorrem no citoplasma e são anaeróbias. Nas células que não possuem mitocôndrias, como, os eritrócitos, e em células que contêm mitocôndrias, porém sob condições limitadas de oxigênio (por exemplo, músculo esquelético durante o exercício pesado) o produto final é o lactato (BHAGAVAN, 2002).

Durante as reações sequenciais da glicólise, parte da energia livre liberada da glicose é conservada na forma de ATP e NADH.

Células com demanda aumentada de energia, em processos como mitose, síntese de proteínas e contração muscular, devem obter energia de maneira rápida e eficiente. A glicólise é a principal via de obtenção de energia para maioria das células devido a sua capacidade de fornecer ATP rapidamente e não dependente do metabolismo oxidativo, assumindo grande importância para a sobrevivência celular (STANLEY & CONNETT, 1991).

O fluxo de glicose através da via glicolítica é regulado para manter constante a concentração de ATP, bem como fluxos adequados de suprimentos dos intermediários glicolíticos que possuem destinos biossintéticos. Para esse fim, os necessários ajustes na taxa glicolítica são conseguidos pela regulação de três enzimas dessa via: a hexocinase, a fosfofrutocinase-1 (PFK-1) e a piruvato cinase. Essas duas últimas enzimas são reguladas alostericamente pela flutuação na concentração de certos metabólitos-chave que refletem o equilíbrio celular entre a produção e o consumo de ATP (NELSON & COX, 2002).

As células tumorais captam mais glicose do que as normais e as convertem em lactato para reoxidar o NADH. A velocidade aumentada da glicólise pode resultar também do menor número de mitocôndrias existentes nas células tumorais; menos ATP sintetizado por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, significa que uma maior quantidade dele precisará ser sintetizada pela glicólise (NELSON & COX, 2002).

A figura 4 mostra o esquema da via glicolítica em células normais e em células tumorais. Nas células tumorais, há um aumento de todas as enzimas e transportadores de glicose quando comparado as células normais. Nas células tumorais a enzima hexocinase é super-expressa. Um maior fluxo para síntese de nucleotídeos também é documentado para diversas células tumorais. Também ocorre super expressão da enzima PFK-1 (MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

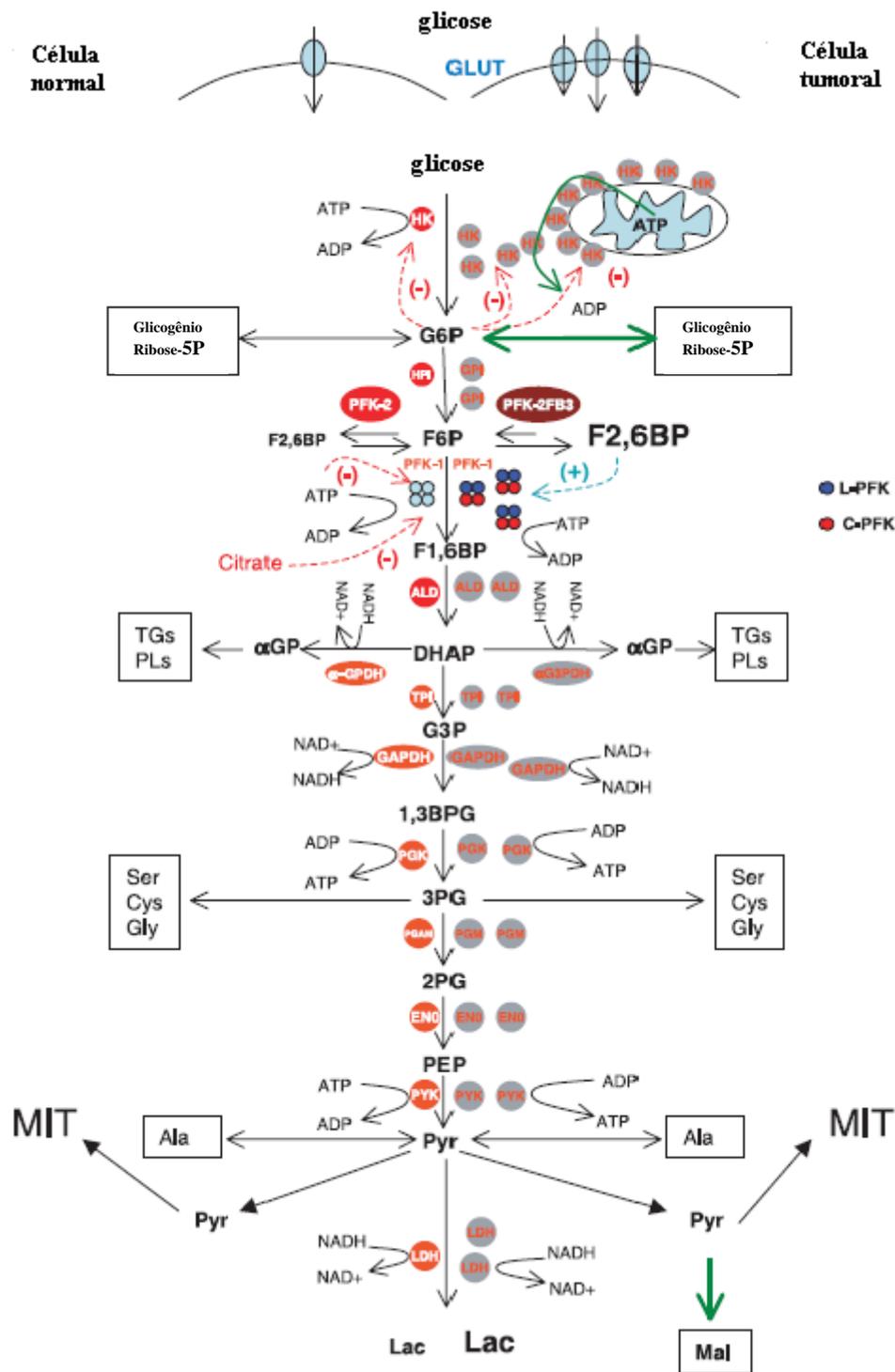


Figura 4: Via glicolítica em células normais (à esquerda), via glicolítica em células tumorais (à direita).HK: hexocinase, PFK-1: fosfofrutocinase, αGPDH: α-glicerol fosfato desidrogenase, Lac: lactato, Pyr: piruvato, MIT: mitocôndria, Ala: alanina, Mal: malato, G6P: glicose-6-fosfato, F2,6BP: frutose-2,6-bi-fosfato, LDH: lactato desidrogenase, ALD: aldolase. Adaptado de Moreno-Sánchez *et al.*, 2007.

### 2.3.2 Fosfofrutocinase-1 e o controle da glicólise

Em vias metabólicas, as enzimas que catalisam reações essencialmente irreversíveis são locais potenciais de controle. Na glicólise, as reações catalisadas pela hexocinase, fosfofrutocinase e pela piruvato cinase são irreversíveis; portanto, possuem papéis reguladores além de catalíticos. Suas atividades são reguladas por ligações reversíveis de efetores alostéricos ou por modificação covalente. Também, as quantidades das enzimas-chave são alteradas por controle da transcrição de acordo com as necessidades metabólicas.

A PFK-1 é uma enzima reguladora do fluxo glicolítico e, entre as conhecidas, uma das mais complexas. É caracterizada por uma estrutura oligomérica complexa e múltiplos modos de regulação como, por exemplo, variedade de ligantes, incluindo seus substratos, produtos de reação e vários outros metabólitos celulares, como AMP, frutose 2,6-bisfosfato, glicose 1,6-bisfosfato, citrato e outros. O ATP um dos substratos da PFK-1, tem duplo efeito sobre a enzima, ativando-o em concentração até 1 mM e inibindo-a em concentrações mais altas, enquanto frutose 2,6-bifosfato reverte o efeito inibitório do ATP (UYEDA, 1979 *apud* LEITE *et al.*, 2007). Esse efeito alostérico é produzido pela ligação de ATP a um centro altamente específico, que é diferente do centro catalítico. A ação inibitória do ATP também é revertida por AMP e, portanto, a atividade da enzima aumenta quando diminui a proporção ATP/AMP. Ou seja, a glicólise é estimulada quando a carga energética celular está diminuída. Outro exemplo de modulação ocorre quando o pH diminui. A inibição da PFK-1 por H<sup>+</sup> impede a excessiva formação de lactato e uma queda abrupta no pH sanguíneo (STRYER, 1996).

A isoforma da PFK-1 presente no tecido muscular apresenta vários estados oligoméricos: a forma tetramérica ativa se dissocia em dímeros e monômeros inativos mediante diluição ou ação de moduladores alostéricos (UYEDA, 1979 *apud* LEITE *et al.*,

2007). Além disso, vários fatores alteram o equilíbrio entre estas formas, por exemplo, pH, força iônica e temperatura. Em meio ácido, assim como forças iônicas fortes e altas temperaturas favorecem a formação de dímeros. Meio alcalino, baixas forças iônicas e baixas temperaturas favorecem a formação de maiores complexos enzimáticos (LUTHER *et al.*, 1986 *apud* ZANCAN *et al.*, 2007).

Reguladores alostéricos da enzima também podem regular seu equilíbrio oligomérico. Tem sido descrito que o citrato estabiliza os dímeros da PFK-1, e que o ADP estabiliza a configuração tetramérica da enzima. A inibição da PFK-1 tem sido correlacionada com a diminuição do fluxo glicolítico e com alterações na concentração de intermediários glicolíticos (EL-BACHA *et al.*, 2003; MEIRA *et al.*, 2005).

A glicólise também fornece esqueletos carbonados para biossínteses, e por isso a PFK-1 deve ser também regulada por um sinal que indique se os blocos de construção estão abundantes ou escassos. De fato, a PFK-1 é inibida por citrato, um intermediário inicial do ciclo do ácido cítrico. Um nível alto de citrato significa que os precursores de biossínteses estão em abundância, e por isso não deve ser degradada mais glicose para esse fim. A frutose 2,6-bifosfato ativa a PFK-1 no fígado, aumentando a sua afinidade por frutose 6-fosfato e diminuindo o efeito inibidor do ATP. Em essência, a frutose 2,6-bifosfato é um ativador alostérico que muda o equilíbrio conformacional dessa enzima tetramérica do estado T para o R (STRYER, 1996).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antitumoral de correntes elétricas contínuas e seus mecanismos de ação

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir curvas de dose resposta de células HL-60 submetidas ao fluxo anódico (FA), fluxo catódico (FC) e fluxo eletro-iônico (FEI);
- Avaliar alterações na viabilidade de células HL-60 eletroestimuladas, através do método de exclusão por azul de tripan e MTT;
- Avaliar a reversibilidade dos danos induzidos pelo FA, FC e FEI;
- Construir curva dose-resposta para o FEI, utilizando diferentes tempos e intensidades de corrente;
- Avaliar o crescimento celular após estímulo elétrico pelo FEI;
- Investigar as alterações na morfologia de células HL-60 eletroestimuladas, utilizando microscopia óptica de luz;
- Investigar alterações ultraestruturais de células HL-60 eletroestimuladas utilizando e eletrônica de transmissão;
- Verificar alterações na atividade da enzima fosfofrutocinase-1 de células HL-60 submetidas ao FA, FC e FEI;
- Obter dosagem do consumo de glicose e da produção de lactato de células HL-60 submetidas à eletroestimulação.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura

Ácido acético;

Acetato de uranila;

Acetona;

Adenosina tri-fosfato (ATP);

Aldolase;

Alfa-glicerofosfato desidrogenase;

Antibióticos (Estreptomicina/Penicilina) – GIBCO;

Azul de tripan – VETEC;

Bouin;

Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) – GIBCO;

Citrato de chumbo

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ );

Dimetilsulfóxido (DMSO) – SIGMA-ALDRICH®;

Epon;

Fosfofrutocinase-1 purificada (PFK-1);

Frutose-6-fosfato;

Giemsa;

Glucos 500 (Dóles reagentes e equipamentos para laboratório, LTDA, Brasil);

Glutamina – GIBCO;

Glutaraldeído;

Hidróxido de sódio (NaOH) – GIBCO;

HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietyl piperazina] N- 2 etano sulfônico – SIGMA®;

Lactato desidrogenase;

Meio Dulbeco' s Modificado (DMEM) – GIBCO;

MTT: [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] – SIGMA®;

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH);

Permout;

Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO;

Sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>);

Tampão cacodilato;

Tampão Salina Fosfato (PBS);

Tetróxido de ósmio;

Triosefosfato isomerase;

Tris-HCl (pH 7,4);

Xilol.

## 4.2 EQUIPAMENTOS

Balança semi-analítica – GEHAKA – BG200;

Capela de fluxo laminar – VECO – ULFS 12;

Centrífuga de placas – CIENTEC – CT 6000 R;

Centrífuga clínica – CENTRIBIO – 80 - 2B;

Espectrofotômetro – SHIMADZU UV 2401 PC;

Estufa de cultura – FANEM – 002CB;

Estufa de secagem e esterilização – FANEM – 315 SE;

Fonte de Corrente Elétrica Contínua – INSTRUTERM – FA-3050;

Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços (Elisa) – THERMOPLATE;

Microscópio Eletrônico de Transmissão – MORGANI/FEI;

Microscópio óptico – OLYMPUS – B061;

Microscópio óptico AXOPLAN II / ZEIS;

Multímetro digital – ICEL – MD-6500.

## 4.3 MÉTODOS

### 4.3.1 Preparo do meio DMEM

Para o preparo de 900 ml de meio de cultura DMEM foram pesados 3,0 g de HEPES, 0,2 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,3 g de glutamina e dissolvidos em 900 ml de água purificada. O pH do meio, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. A solução final foi filtrada em membrana celular de 0,22  $\mu\text{m}$ , em capela de fluxo laminar; as soluções foram distribuídas em recipientes de vidro fechados e um frasco contendo o meio recém preparado foi mantido em estufa a 37 °C, por no mínimo 48 h, para teste de esterilidade.

### 4.3.2 Preparo do PBS

O tampão salina fosfato foi preparado a partir da dissolução de: 0,2 g de fosfato de potássio monobásico, 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio e 1,44 g de fosfato de sódio bibásico desidratado dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1000 ml de solução. O pH da solução foi ajustado, quando necessário, para 7,4

com NaOH 1 N. A solução foi distribuída em recipientes de vidros fechados e autoclavados durante 20 min a 120 °C. Após o resfriamento os frascos foram mantidos em geladeira.

#### **4.3.3 Preparo do Azul de Tripán**

Foi preparada inicialmente uma solução estoque de 0,4 % do corante da seguinte maneira: 400 mg do corante azul de tripan foram adicionados a 90 ml de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; em seguida, o volume da solução foi ajustado para 100 ml com água purificada. A solução foi aquecida até solubilização completa e o pH ajustado para 7,2 com auxílio da solução de NaOH 1 N. Essa solução estoque foi diluída à concentração de 0,2 %, com água purificada e mantida em geladeira.

#### **4.3.4 Preparo do MTT**

A solução de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio foi obtida pela diluição de 50 mg de MTT em 10 ml de PBS (5 mg/ml). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e em geladeira.

#### **4.3.5 Manutenção das culturas de células**

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular promielocítica de sangue periférico (HL-60), a qual apresenta crescimento em suspensão, e não aderente. Para manutenção do estoque, as culturas foram congeladas em nitrogênio líquido com 95 % de SFB e 0,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Durante os experimentos as células foram mantidas em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, com três passagens ou repiques semanais, usando como fonte nutricional o

meio DMEM acrescido de glutamina, bicarbonato de sódio, tampão HEPES, estreptomicina e penicilina, suplementado com soro fetal bovino a 10 %.

#### 4.3.6 Modelo experimental para estimulação elétrica

O modelo experimental de eletroestimulação é constituído por uma placa de 24 poços com volume interno de  $3 \text{ cm}^3$ , interligados por pontes de papel de filtro que permitem a passagem do fluxo de elétrons (FEI). A esta placa é adaptada uma tampa removível contendo eletrodos de platina de  $1 \text{ cm}^2$ , que ficam embebidos nos poços conforme observado na Figura 5. Esse sistema experimental possibilita a avaliação dos eventos associados à polaridade da corrente aplicada: o poço conectado ao pólo positivo é chamado de fluxo anódico (FA); o poço conectado ao pólo negativo é chamado de fluxo catódico (FC) e o poço que tem contato apenas com o fluxo de elétrons gerado pela corrente é chamado de fluxo eletro-iônico (FEI). Uma fonte de corrente elétrica externa gera um fluxo de corrente o qual produz uma diferença de potencial (ddp) a qual é monitorada por um multímetro digital (VEIGA *et al.*, 2005).



Figura 5: Sistema experimental para estímulo elétrico. À esquerda: Fonte geradora de CE; no centro: multímetro digital; à direita: garrafa para cultivo de células e placa acrílica com tampa removível a qual foram adaptados eletrodos de platina e cabos condutores.

#### 4.3.7 Preparo das células para o tratamento com CE

Para os experimentos de estimulação elétrica, as células foram transferidas para um tubo falcon e lavadas uma vez com 1 ml de PBS para remoção do meio de cultura. Em seguida, foram centrifugadas por 1 min, a 1000 rpm, em centrífuga clínica; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão em 2 ml de meio DMEM para contagem em câmara de Neubauer. Para a contagem foram utilizados 25 µl da suspensão de células e 25 µl de uma solução aquosa de azul de Tripán 0,4% (p/v). Este corante possui alta massa molecular e somente permeia as células com membrana plasmática danificada. No microscópio óptico as células íntegras se apresentam translúcidas, enquanto que as células com rupturas na membrana celular se apresentam coradas. A câmara de Neubauer foi utilizada para quantificação do número de células, de acordo com a equação 1:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{(\text{Total das células presente nos 4 quadrantes})}{4} \times 2 \times 10^4 \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

4 – Média aritmética do total de células contadas nos quatro quadrantes maiores da câmara de Neubauer;

2 – Fator de diluição;

10<sup>4</sup> – Fator de conversão da câmara de Neubauer.

Após quantificação, as células HL-60, na concentração de 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, foram distribuídas em placa de 24 poços contendo 2,5 ml de PBS por poço.

#### 4.3.8 Tratamento com CE

As células foram estimuladas com 2 mA, utilizando o modelo experimental demonstrado na seção 4.3.10. Os tempos escolhidos para a construção da curva dose-resposta foram: 2, 4, 6, 8, 10 minutos, com intervalo de 3 minutos a cada 2 minutos de

eletroestimulação (HOLANDINO *et al.*, 2000). Após a estimulação elétrica o meio reacional foi retirado e as células foram ressuspensas em meio nutricional e distribuídas em placas de 96 poços para ensaio de viabilidade, de acordo com a seção 4.3.13. Os estudos de quantificação do número de células foram realizados como descrito na seção 4.3.14.

#### 4.3.9 Viabilidade celular: ensaio por MTT

O método MTT mede a atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a citotoxicidade e a atividade celular (MOSMANN, 1983). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Este produto de coloração púrpura é acumulado dentro da célula e após solubilização no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser quantificado em espectrofotômetro do tipo ELISA ( $\lambda = 540$  nm, background = 670 nm). Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente na absorbância, o que permite quantificar a viabilidade celular após o tratamento. (MOSMANN, 1983).

Em nossas condições experimentais 180  $\mu$ l da suspensão celular foram incubadas com 20  $\mu$ l de MTT (5,0 mg/ml em PBS), por 3 horas e 24 horas a 37 °C, na ausência de luz. Em seguida, as células, distribuídas em quintuplicata, foram centrifugadas e ressuspensas em 200  $\mu$ l de DMSO. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento.

#### 4.3.10 Crescimento celular após estímulo do fluxo eletro-iônico

A quantificação do número de células para observação do crescimento celular foi realizada pelo método de exclusão do azul de tripan que avalia a integridade da membrana celular e permite a quantificação do número de células. Nesta análise, as células eletroestimuladas, assim como as que não receberam o estímulo elétrico (grupo controle), foram lavadas por centrifugação, para retirada dos produtos de eletrólise e meio eletrolítico (tampão PBS) e ressuspensas em 2 ml de meio DMEM, suplementado com 10 % (v/v) de SFB. Em seguida, as células foram plaqueadas novamente em placa de 24 poços e incubadas a 37 °C, por 24, 48, 72 e 96 horas. Ao final desta incubação, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada situação experimental e diluídas com o mesmo volume do corante azul de tripan. O número de células foi então quantificado em câmara de Neubauer, através de microscopia óptica (HOLANDINO *et al.*, 2000).

#### 4.3.11 Dosagem da atividade enzimática

Após estímulo elétrico foram retiradas alíquotas contendo  $1,0 \times 10^6$  células do FEI, bem como de uma situação controle (suspensão celular não-tratada), para dosar a atividade da enzima fosfofrutocinase-1 através de análise espectrofotométrica. A técnica consiste basicamente num meio reacional contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 1 mM frutose 6-P, 0,1 mM ATP, 5 mM NADH, 1,5 U aldolase, 2,5 U triosefosfato isomerase, 4 U alfa-glicerofosfato desidrogenase e 2 mg de PFK-1 purificada num volume final de 1 mL. Em seguida foi obtida a oxidação do NADH medida pela diminuição da absorbância em 340 nm. Essas dosagens foram realizadas após estímulo elétrico e incubação por até 96 h, com dose de 2 mA por 10 minutos (MEIRA *et al.*, 2005).

#### 4.3.12 Consumo de glicose e produção de lactato

O consumo de glicose foi medido por um Kit colorimétrico enzimático (Glucox, Doles reagentes e equipamentos para laboratório, LTDA, Brasil), sendo calculado pela diferença da quantidade de glicose nas alíquotas retiradas no tempo 0 hora e depois da incubação por 24 horas, em células eletroestimuladas. A produção de lactato foi determinada utilizando a formação de NADH e piruvato, a partir do lactato na presença de excesso de  $\text{NAD}^+$ . A reação é catalisada pela lactato desidrogenase, sendo a concentração de lactato calculada a partir do coeficiente de extinção do NADH a 340 nm (MEIRA *et al.*, 2005).

#### 4.3.13 Microscopia óptica

As células tratadas foram fixadas com bouin, posteriormente lavadas com álcool 70%, coradas com aproximadamente 1 mL de Giemsa (1:10 em água destilada), por 2 horas. Decorrido este tempo, foi feita a remoção do corante e a desidratação, através da seguinte sequência: 0,5 mL de ácido acético glacial em 10 mL de água destilada; água destilada; acetona absoluta; acetona 70% e xilol 30%; acetona 50% e xilol 50%; acetona 30% e xilol 70% e xilol puro. Feito isso, o sistema lâmina-lamínula foi montado com auxílio de permount e os estudos morfológicos foram feitos em microscópio óptico (VEIGA *et al.*, 2005).

#### 4.3.14 Microscopia eletrônica de transmissão

Alterações ultra-estruturais, após estímulo elétrico, foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. As células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de glutaraldeído 2,5%. Após 2 horas de fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), contendo 0,2 M de sacarose e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 45

minutos. Finalmente, o material foi desidratado com etanol e acetona e emblocado em resina Epon. O corte ultrafino foi contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observado em microscópio eletrônico de transmissão (Holandino *et al.*, 2001).

#### 4.3.15 **Análise estatística**

As análises estatísticas foram obtidas pelo programa SigmaPlot 10.0 integrado com o SigmaStat 3.1. Foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste Post Hoc de Tukey. foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 **RESULTADOS**

### 5.1 VIABILIDADE DE CÉLULAS HL-60 ELETRO-ESTIMULADAS

As células foram estimuladas por uma corrente elétrica de 2 mA, com intervalos de 2, 4, 6 e 8 minutos. A viabilidade foi obtida através do método do MTT (4.3.13). Após o tratamento, as células foram incubadas por 24 horas, a 37 °C e em seguida submetidas novamente ao ensaio de viabilidade pelo MTT

#### 5.1.1 **Viabilidade celular após 2 minutos de estímulo elétrico**

Imediatamente após estímulo elétrico de 2 min/ 2 mA, onde as células foram submetidas ao fluxo catódico (FC), fluxo eletro-iônico (FEI), fluxo anódico (FA), não foram observadas modificações estatisticamente significativas na viabilidade das células HL-60 ( $p = 0,765$ ). Após incubação por 24 h, a viabilidade foi mantida sem alterações significativas (Figura 6).

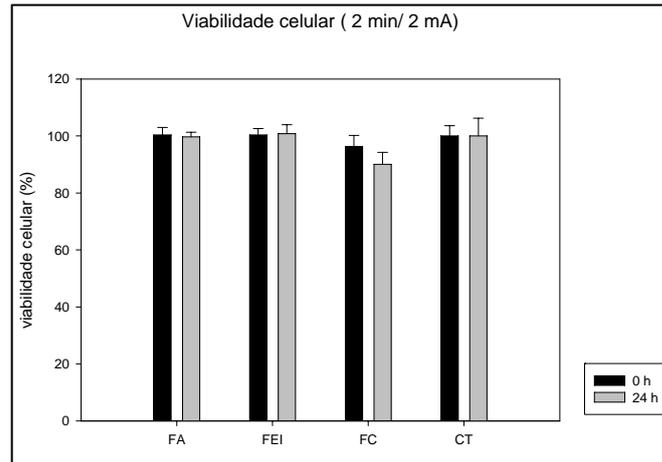


Figura 6: Gráfico da viabilidade de células HL-60 após 2 min/2 mA de estímulo elétrico. FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico, CT: controle. Barras pretas: tempo 0 h, imediatamente após o estímulo elétrico. Barras cinza: tempo 24 h, incubação por 24 h após estímulo elétrico (n= 3, p > 0,05).

### 5.1.2 Viabilidade celular após 4 minutos de estímulo elétrico

Imediatamente após o estímulo elétrico por 4 min/ 2 mA, houve uma diminuição significativa na viabilidade das células tratadas com as três situações experimentais, FA, FEI e FC, quando comparado ao grupo controle (CT). Após 24 horas, as células submetidas ao estímulo do FA, FEI e FC recuperaram os danos causados pela CE, não apresentando diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular (Figura 7).

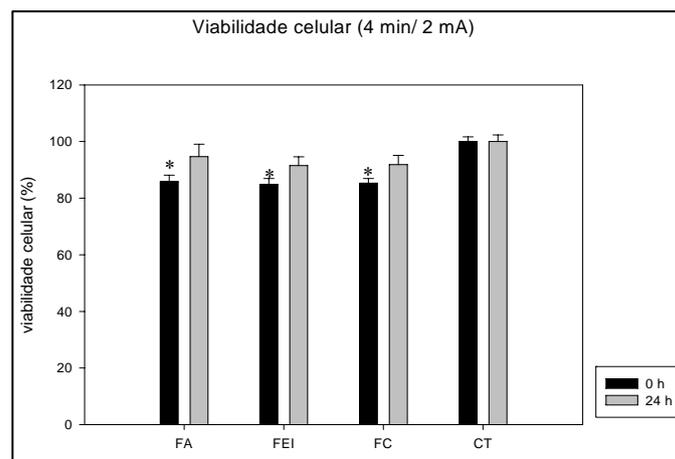


Figura 7: Gráfico da viabilidade de células HL-60 após 4 min / 2 mA de estímulo elétrico. FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico, CT: controle. Barras pretas: tempo 0 h, imediatamente após o estímulo elétrico. Barras cinza: tempo 24 h, incubação por 24 h após estímulo elétrico (n= 6, p\* < 0,05).

### 5.1.3 Viabilidade celular após 6 minutos de estímulo elétrico

Após estímulo de 6 minutos, foram observadas modificações significativas em relação ao controle em todas as situações experimentais. Houve uma diminuição de aproximadamente 20 % na viabilidade das células tratadas com o FEI e diminuição de 40 % no FC, sendo que o FA foi a situação experimental capaz de diminuir em cerca de 70 % a viabilidade destas células.

Após 24 horas de incubação, as células tratadas com o FA não foram capazes de reverter os danos e recuperar sua viabilidade, enquanto as células tratadas com o FC recuperaram parcialmente as suas taxas de viabilidade, apresentando ainda uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. As células tratadas com o FEI recuperaram totalmente a sua viabilidade, não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle (Figura 8).

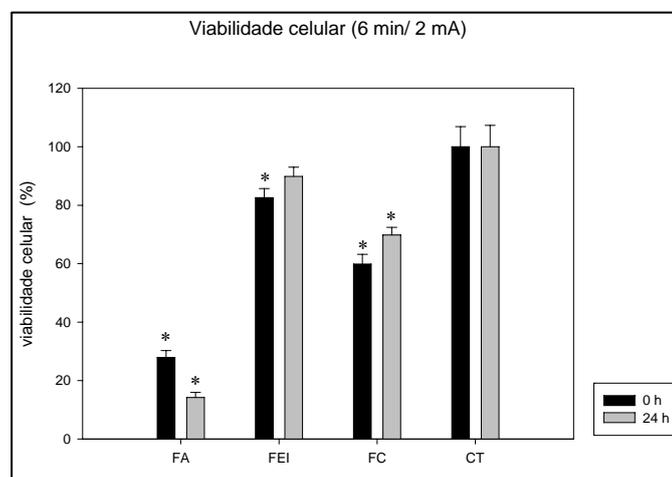


Figura 8: Gráfico da viabilidade de células HL-60 após 6 min /2 mA de estímulo elétrico. FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico, CT: controle. Barras pretas: tempo 0 h, imediatamente após o estímulo elétrico. Barras cinza: tempo 24 h, incubação por 24 h após estímulo elétrico (n= 4, p\* < 0,05 em relação ao controle).

#### 5.1.4 Viabilidade celular após 8 minutos de estímulo elétrico

Imediatamente após estímulo elétrico de 8 min / 2 mA, houve uma diminuição significativa na viabilidade celular em todas as situações experimentais. A corrente elétrica gerada pelo FA foi capaz de diminuir a viabilidade destas células em aproximadamente 80 %. Enquanto que o FEI diminuiu a viabilidade em aproximadamente 40 % e o FC em 50 %. Após incubação por 24 h, as células submetidas ao FA e FC não foram capazes de reverter os danos causados pela CE. As células tratadas com o FEI foram capazes de reverter esses danos (Figura 9). Podemos observar que o tempo de 8 minutos é o tempo de estímulo considerado mais danoso as células HL-60 submetidas ao FC e FA, não sendo possível realizar estudos relacionados com alterações metabólicas, que possivelmente precedem a diminuição da viabilidade das células tratadas com CE.

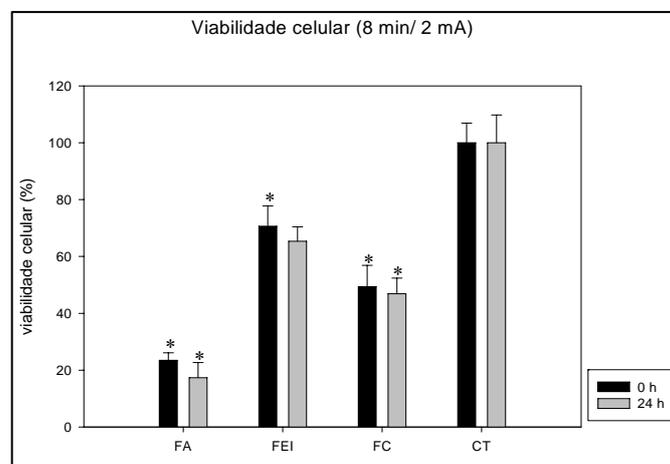


Figura 9: Gráfico da viabilidade de células HL-60 após 8 min / 2 mA de estímulo elétrico. FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico, CT: controle. Barras pretas: tempo 0 h, imediatamente após o estímulo elétrico. Barras cinza: tempo 24 h, incubação por 24 h após estímulo elétrico (n= 4, p\* < 0,05 em relação ao controle).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1

A fosfofrutocinase-1 (PFK-1) é uma enzima chave na regulação do metabolismo glicolítico. Neste ensaio pode-se verificar se a queda na viabilidade das células tratadas com corrente elétrica (CE), estava relacionada com a diminuição da atividade da enzima PFK-1. Inicialmente foi escolhido o tempo de 4 minutos de estímulo, pois foi o tempo onde as células tratadas começaram a apresentar uma queda significativa na viabilidade (Figura 14). Na figura 10, pode-se observar a atividade da enzima fosfofrutocinase-1 das células HL-60 nas diferentes situações experimentais (FA, FEI, FC e CT). A intensidade de CE aplicada foi de 2 mA por um tempo de 4 minutos de estimulação. A atividade da PFK-1 foi quantificada imediatamente após o estímulo (barras cinza). Foram realizados 5 experimentos independentes e os resultados foram analisados pelo teste ANOVA.

A atividade da enzima PFK-1 nas células HL-60 tratadas por 4 minutos (barras cinza), apresentou-se diminuída em todas as situações experimentais, imediatamente após estímulo elétrico. Os valores foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) no FA, FEI e FC quando comparados ao grupo controle (CT).

Após 24 horas de tratamento a atividade da enzima foi recuperada sendo possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre as situações tratadas com FA e FC em relação ao controle. Entretanto, o estímulo com o fluxo de elétrons (FEI) induziu um aumento estatisticamente significativo na atividade da PFK-1 (Figura 10).

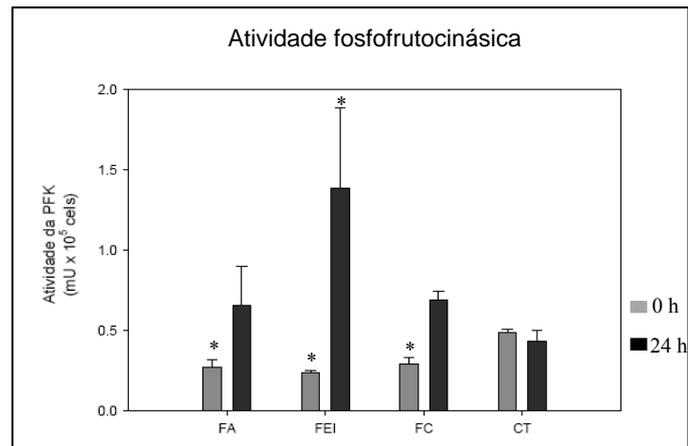


Figura 10: Gráfico da atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 eletro-estimuladas. Barras cinza: atividade da PFK-1 após eletroestimulação (2 mA / 4 min); barras pretas: atividade da PFK-1 após eletroestimulação (2 mA/ 4 min) e incubação por 24 horas (37 °C). FA: fluxo anódico, FEI: fluxo eletro-iônico, FC: fluxo catódico, CT: controle (n= 5, p\* < 0,05 em relação ao controle).

### 5.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS: MICROSCOPIA ÓPTICA

As alterações morfológicas induzidas pelo estímulo elétrico (2 mA/ 4 min) foram analisados por coloração de giemsa como descrito no item 4.3.17. Após o estímulo de 4 minutos, foram detectadas alterações morfológicas em todas as situações experimentais quando comparadas ao grupo controle (Figura 11 A-D). Dentre as principais alterações destacam-se o aparecimento de vacúolos e bolhas na superfície celular (blebs) nas células tratadas com o FEI (Figura 11 C/ setas). Em contra partida, o FC induziu intensa lise celular com diminuição do número de células (Figura 11 D).

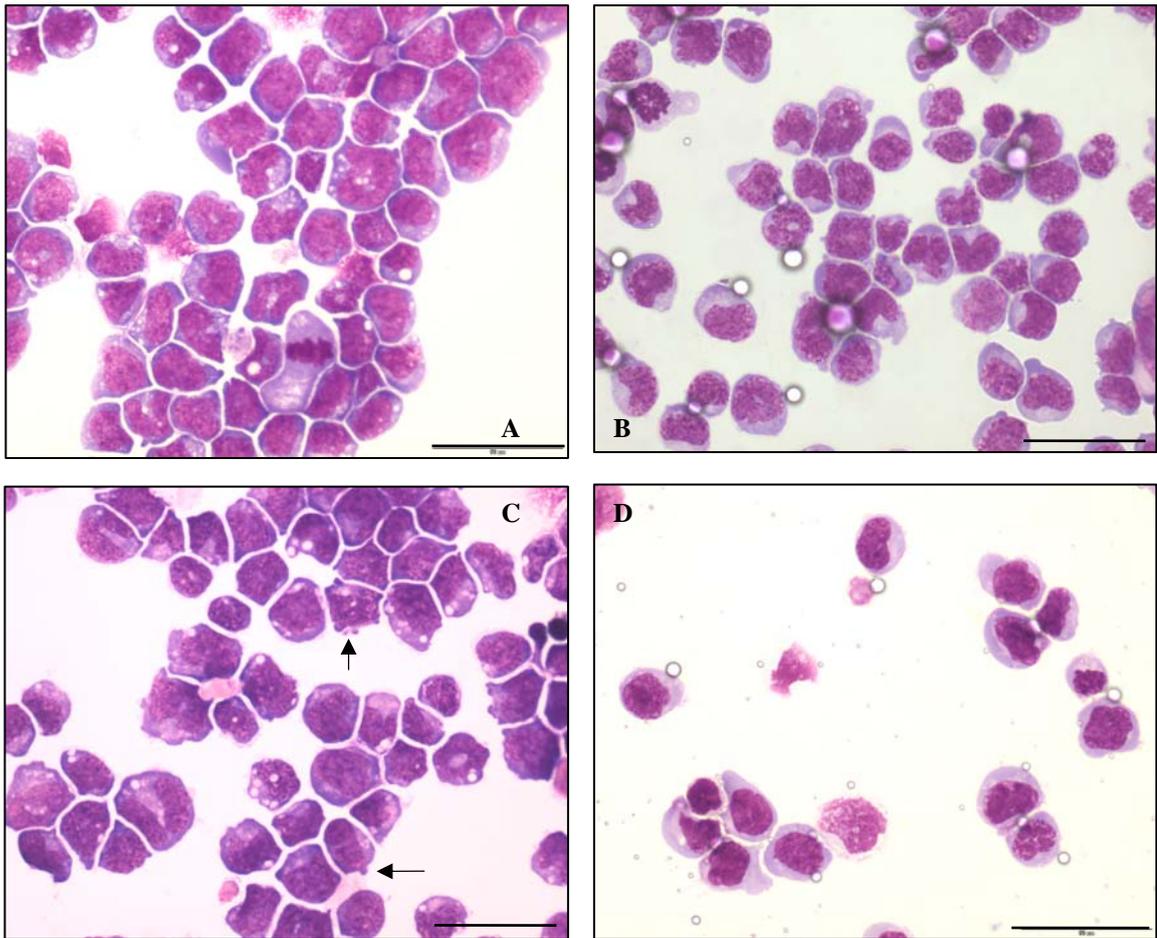


Figura 11: (A-D) Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa. A: controle, B: fluxo anódico (2 mA/ 4 min), C: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 4 min), D: fluxo catódico (2 mA/ 4 min). Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 50  $\mu\text{m}$ .

As alterações na morfologia de células HL-60 estimuladas por um CE de 2 mA por 4 minutos, também foram avaliadas após 24 horas do estímulo elétrico (Figura 12 B-D) e comparadas ao grupo controle (Figura 12 A). Foram observadas alterações, como: formação de bolhas de superfície (blebs) nas células submetidas ao fluxo anódico e ao fluxo catódico (Figura 12 B e D/ setas). As células submetidas ao fluxo eletro-iônico (FEI) apresentaram aumento do número de vacúolos (Figura 12 C).

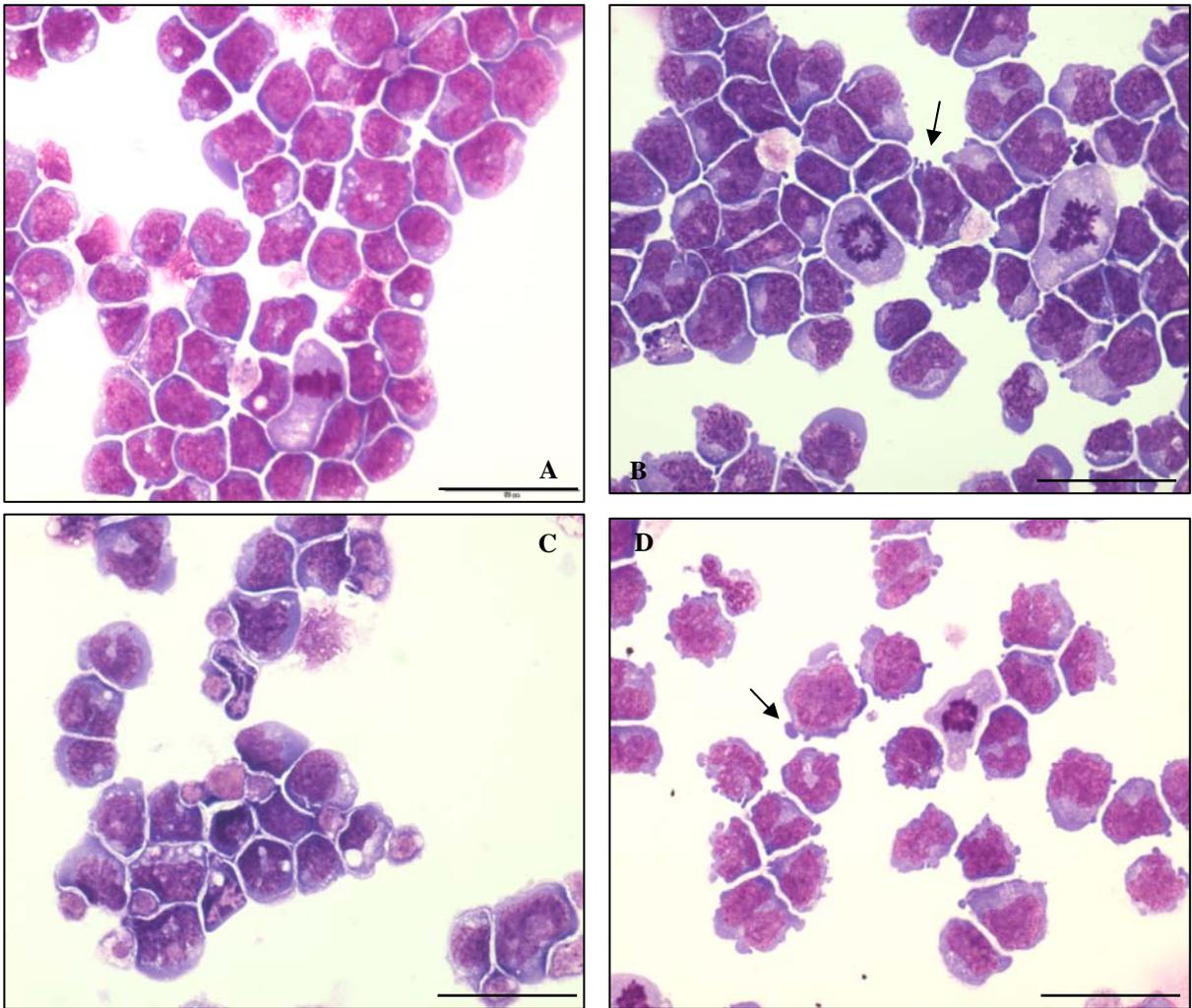


Figura 12: (A-D) Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa 24 após estímulo elétrico. A: controle, B: fluxo anódico (2 mA/ 4 min), C: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 4 min), D: fluxo catódico (2 mA/ 4 min). Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 50  $\mu$ m.

#### 5.4 ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As alterações ultra-estruturais causadas pela CE foram avaliadas através de microscopia eletrônica de transmissão (4.13.18). Após 24 horas do estímulo elétrico, pode-se observar o aparecimento de bolhas de superfície (blebs) nas células submetidas ao FEI (Figura 13 D/ setas). No fluxo catódico (FC) podem-se observar alterações celulares importantes, como edema das mitocôndrias, perda das cristas mitocondriais (indicado pelas setas),

rarefação de matriz citoplasmática com intensa lise celular e rupturas de membrana (Figura 13 C). Além de dilatação das cristas mitocondriais induzidas pelo fluxo anódico (Figura 13 B). As alterações mitocondriais indicam que a estimulação elétrica induz alterações metabólicas, com comprometimento da respiração celular, sendo as mesmas dependentes de produtos de eletrólise.

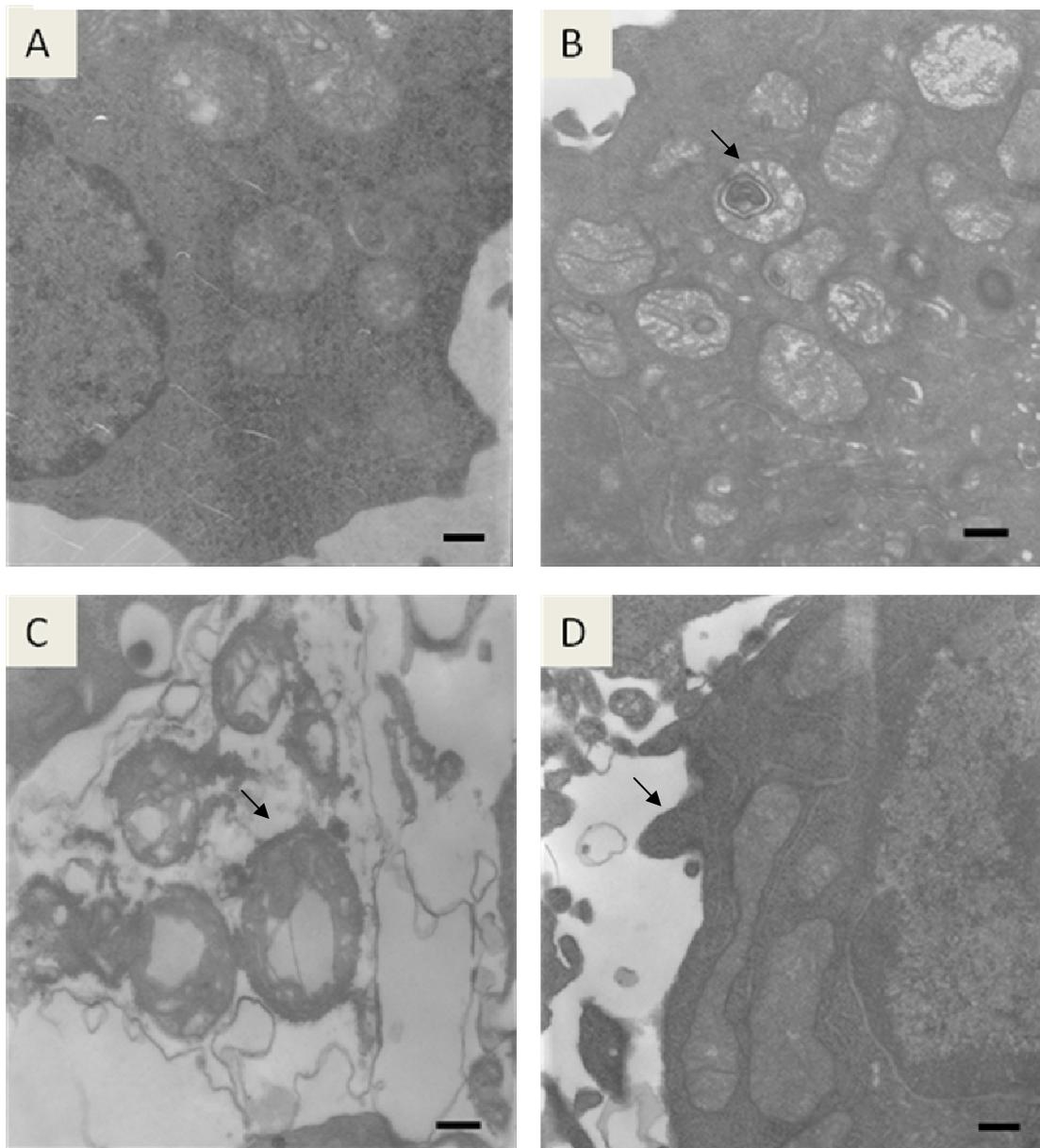


Figura 13: Microscopia eletrônica de transmissão de células HL-60. A: controle, B: fluxo anódico (2 mA/ 4 min), C: fluxo catódico (2 mA/ 4 min), D: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 4 min). Todas as imagens foram registradas em escala de 300 nm.

## 5.5 VIABILIDADE CELULAR APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO PELO FLUXO ELETRO-IÔNICO

A viabilidade de células HL-60 foi obtida através do ensaio por MTT, nos tempos de 2 a 10 min, imediatamente após o estímulo elétrico (5.1.1). A significância estatística dos resultados foi avaliada através do teste ANOVA e foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Na figura 14 estão os valores médios, em percentual em relação ao controle. Podemos observar que o tempo de 2 minutos não foi suficiente para alterar a viabilidade destas células. Após o tratamento com o fluxo eletro-iônico as células apresentam viabilidade celular significativamente diminuída em relação ao grupo controle nos tempos de 4 e 6 minutos ( $p < 0,05$ ). Com o aumento dos tempos de estimulação (8 e 10 minutos) observa-se uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade em torno de 30% (Figura 14).

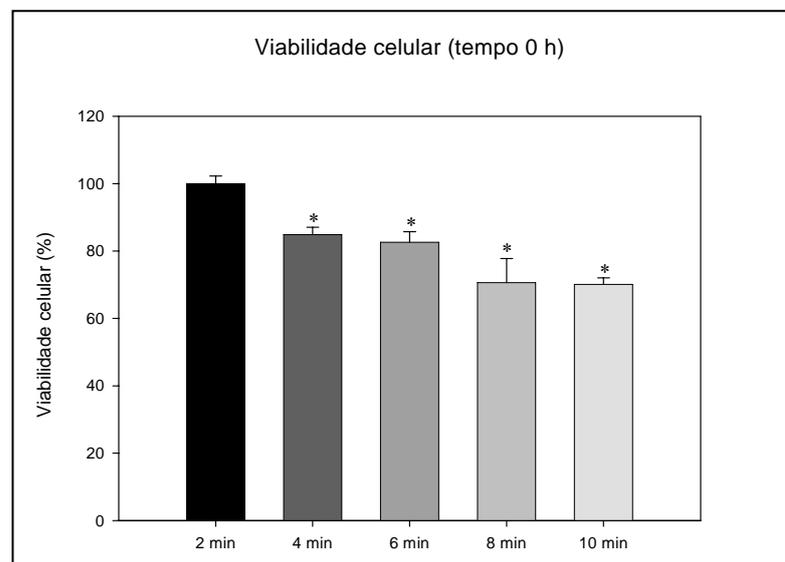


Figura 14: Percentual da viabilidade de células HL-60 em relação ao controle após estímulo elétrico (FEI) em relação ao controle. As células foram estimuladas com 2 mA de FEI em diferentes intervalos de tempo ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$ ).

## 5.6 REVERSIBILIDADE DOS DANOS CAUSADOS PELO FLUXO ELETRO-IÔNICO

Para avaliar a reversibilidade dos danos causados pelo FEI, as células HL-60 foram eletro-estimuladas por 10 minutos com uma corrente elétrica de 2 mA. Em seguida foram incubadas por 24 horas em meio nutricional para avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT, como descrito no item 4.3.13 (Figura 15). A significância estatística dos resultados foi avaliada através do teste ANOVA sendo foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Nos tempos de 2 a 6 minutos, a viabilidade destas células permanece inalterada quando comparada a viabilidade do grupo controle. No tempo de 8 minutos, as células apresentam a viabilidade diminuída, porém de maneira não significativa em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Entretanto, após 10 minutos de estimulação com o FEI a viabilidade celular foi diminuída de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que os danos causados pelo FEI (Figura 14) não puderam ser totalmente revertidos. Sendo assim, 24 h após o tratamento permanecem com a viabilidade diminuída em 40 % ( $p < 0,05$ ).

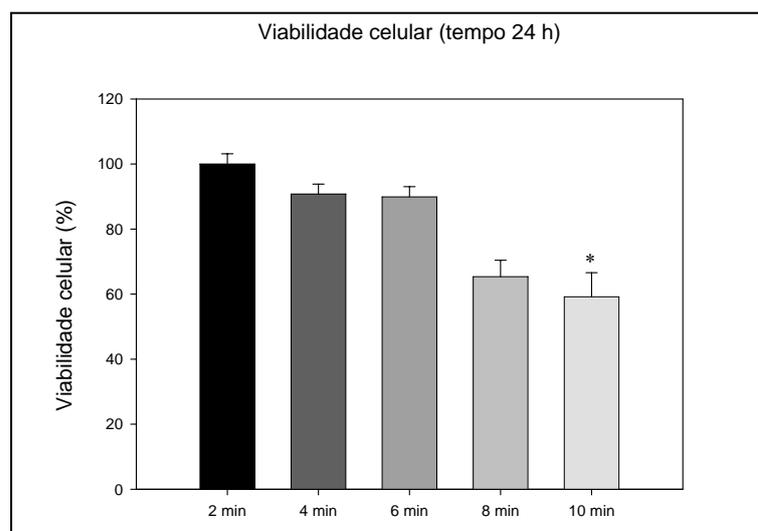


Figura 15: Percentual da viabilidade de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) em relação ao controle. As células foram estimuladas com 2 mA de FEI em diferentes intervalos de tempo sendo em seguida incubadas por 24 horas ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$ ).

## 5.7 RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE CÉLULAS HL-60 SUBMETIDAS AO FLUXO ELETRO-IÔNICO

Após o experimento de reversibilidade dos danos nos perguntamos se esse efeito seria dependente da intensidade de CE (FEI) aplicada. Para responder essa questão, construímos relação dose-resposta utilizando o tempo de 10 minutos de estimulação com outras intensidades de CE (0,5, 1,0 e 2,0 mA) imediatamente após o estímulo e após 24 horas de incubação, a viabilidade foi quantificada por MTT como descrito no item 5.1.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 16. Verificamos que a dose de 0,5 mA aplicada por 10 minutos foi capaz de diminuir em aproximadamente 20 % a viabilidade das células HL-60 tratadas pelo FEI. Entretanto, as células tratadas com 1,0 e 2,0 mA, apresentaram uma queda de aproximadamente 30 % na viabilidade ( $p < 0,05$ ). Após incubação por 24 horas, foi realizado um novo ensaio pelo MTT. Com esses dados pode-se observar que após 24 horas de incubação, as células estimuladas com 0,5 e 1,0 mA retomam sua viabilidade com valores de aproximadamente 90%, sendo capazes de reparar os danos causados pelo FEI ( $p > 0,05$ ). Enquanto no estímulo de 2 mA, as células permanecem com a viabilidade diminuída (40%) não sendo capazes de reverter os danos causados pelo FEI ( $p < 0,05$ ). Para a relação dose-resposta, que é dada pela razão entre intensidade de CE e tempo, tem-se as seguintes doses associadas às intensidades de CE utilizadas: 0,3 C, 0,6 C e 1,2 C.

Sendo assim, a dose de 2 mA e o tempo de 10 minutos foram os parâmetros de escolha para realização dos ensaios seguintes, nos quais outros aspectos metabólicos foram investigados.

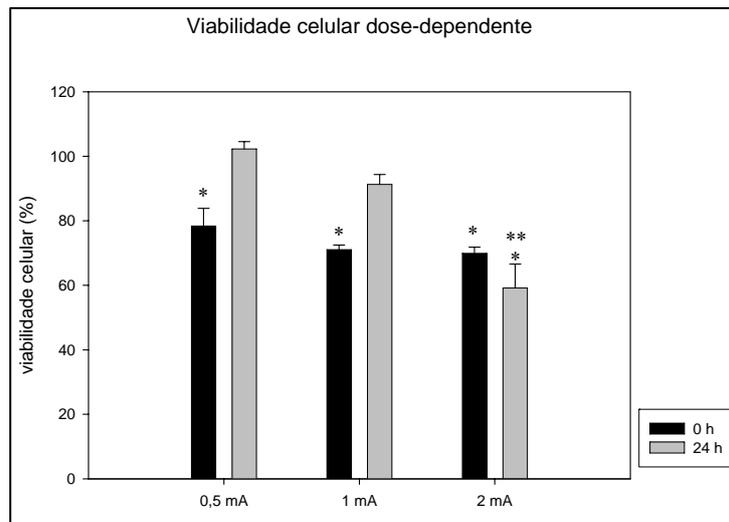


Figura 16: Percentual da viabilidade de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) em relação ao controle. As células foram estimuladas com 10 minutos de FEI em diferentes intensidades de CE sendo em seguida incubadas por 24 horas ( $n = 4$ ,  $p^* < 0,05$  em relação ao controle,  $p^{**} < 0,05$  em relação ao CT do tempo 0h). Assim para as CE de 0,5; 1,0 e 2,0 mA tem-se as doses de 0,3; 0,6 e 1,2 C, respectivamente.

## 5.8 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

Neste ensaio acompanhamos o crescimento celular após estímulo do FEI por 10 minutos e 2 mA. A curva de crescimento celular foi obtida através do método do azul de tripan como descrito no item 4.14 onde as células não permeáveis ao azul de tripan foram consideradas células viáveis, e as células permeáveis foram consideradas células não viáveis. Os valores foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes e estão relacionados ao número total de células. A análise dos dados foi feita pelo teste ANOVA.

### 5.8.1 Avaliação do crescimento celular após primeiro estímulo elétrico pelo fluxo eletro-iônico

Pode-se observar na figura 17, que imediatamente após o estímulo pelo FEI, não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao número de células do

controle. Entretanto, após 24 horas de incubação o número de células tratadas foi significativamente menor do que aquele quantificado para o grupo controle. Este padrão se mantém até 72 horas do estímulo, tempo no qual as células não conseguem retomar as taxas normais de crescimento. A partir de 96 horas o número de células tratadas se aproxima do grupo controle. Desta forma, quando aplicamos um único estímulo verificamos um retardo significativo no crescimento celular que se mantém até 72 horas após o tratamento. Verificamos ainda que o número de células permeáveis ao tripan (símbolos abertos) se mantém constante durante toda a incubação, indicando que o FEI não induz morte celular programada.

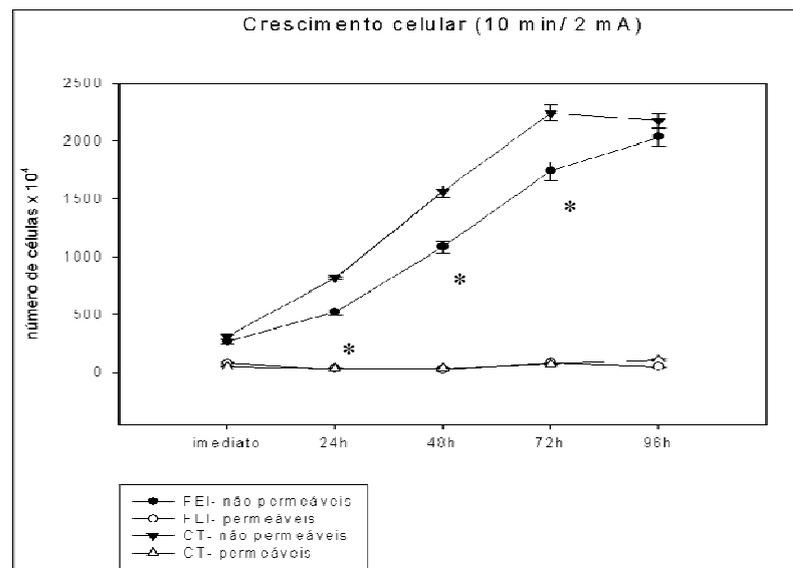


Figura 17: Crescimento de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) de 10 min/ 2mA e incubação por diferentes horas. Triângulos fechados: CT de células HL-60 não permeáveis, triângulos abertos: CT de células HL-60 permeáveis, círculos fechados: células HL-60 estimuladas pelo FEI e não permeáveis, círculos abertos: células HL-60 estimuladas pelo FEI e permeáveis ao azul de tripan ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$  em relação ao controle).

### 5.8.2 Avaliação do crescimento celular após segundo estímulo elétrico pelo fluxo eletro-iônico

O resultado obtido na avaliação do crescimento celular após um único estímulo nos motivou a investigar a resposta destas células submetidas a um novo estímulo pelo FEI. Para

isto, realizamos novamente a quantificação do número de células por azul de tripan após um segundo estímulo elétrico. Com este experimento poderíamos complementar a justificativa de estudos clínicos nos quais se aplicam a estimulação elétrica repetidas vezes, visando aumentar a eficácia da eletroterapia tumoral.

Como descrito no item anterior (5.8.1) as células foram submetidas a uma corrente de 2 mA por 10 minutos e em seguida incubadas por 24 horas. Após 24 horas de incubação, estas células foram quantificadas (item 4.14), novamente estimuladas com 2 mA por 10 minutos e incubadas novamente, tendo seu crescimento acompanhado por até 96 horas.

Podemos observar novamente que 24 horas após o primeiro estímulo as células tratadas com o FEI estão com as taxas de crescimento diminuídas em relação às células não tratadas (grupo CT). Assim, 24 horas após o segundo tratamento ou 48 horas após o primeiro tratamento, a velocidade de crescimento celular se mantém reduzida. Essa taxa de crescimento, então, só é recuperada após 72 horas, indicando que a recuperação dos danos causados pelo FEI apenas ocorre após 24 horas de estimulação.

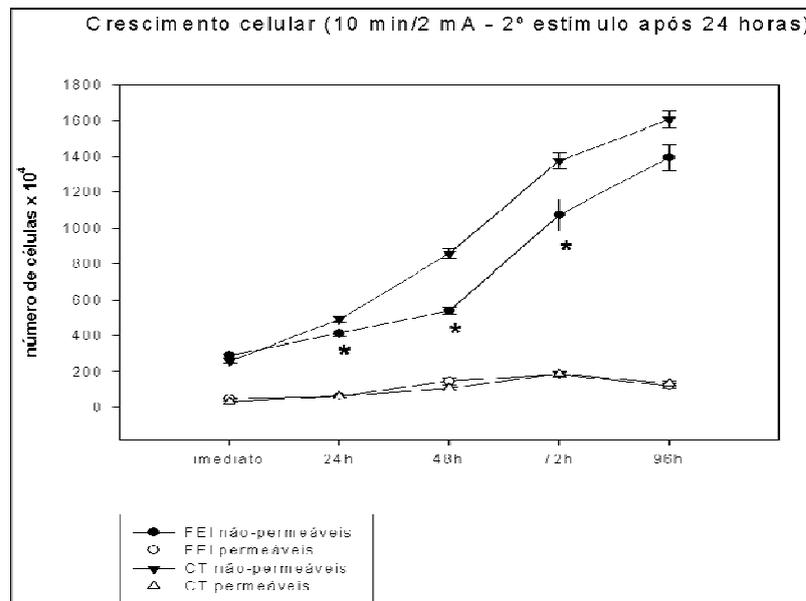


Figura 18: Crescimento de células HL-60 após estímulo elétrico (FEI) de 10 min/ 2 mA, incubação por 24 horas seguida de um segundo tratamento e incubação por diferentes horas. Triângulos fechados: CT de células HL-60 não permeáveis, triângulos abertos: CT de células HL-60 permeáveis, círculos fechados: células HL-60 estimuladas pelo FEI e não permeáveis, círculos abertos: células HL-60 estimuladas pelo FEI e permeáveis ao azul de tripan (n = 3, p\* < 0,05 em relação ao controle).

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1

### 5.9.1 Atividade enzimática após 1º estímulo elétrico pelo FEI

A inibição do crescimento de células tumorais pode ser controlada por diversos mecanismos. Um dos principais mecanismos é a regulação do metabolismo glicolítico, neste caso mais precisamente da regulação de uma enzima chave, a fosfofrutocinase-1. Sendo assim, esta dissertação teve como um dos seus objetivos avaliar alterações no metabolismo glicolítico da linhagem HL-60 induzidas pela estimulação elétrica. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes e a atividade da enzima PFK-1 foi obtida por análise espectrofotométrica como descrito no item 4.3.15. Neste ensaio apresentamos a atividade da enzima fosfofrutocinase-1 de células HL-60 tratadas com corrente elétrica de 2 mA por 10 minutos, seguido de incubação por 24 e 48 horas.

Podemos observar que imediatamente após o primeiro estímulo (Figura 19) a atividade enzimática não é alterada de maneira estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), quando comparada ao controle.

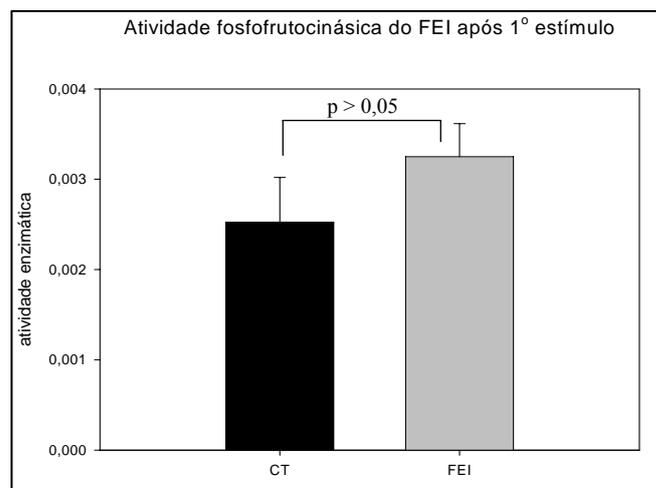


Figura 19: Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10 min ( $n= 3$ ,  $p > 0,05$  em relação ao controle, valores médios de absorbância,  $\lambda = 340$  nm).

Após o tratamento com o FEI, as células foram incubadas por 24 horas para análise da atividade enzimática. Podemos observar na figura 20, que a atividade da enzima fosfofrutocinase-1, apresenta uma tendência a diminuir, porém novamente de maneira estatisticamente não significativa ( $p > 0,05$ ).

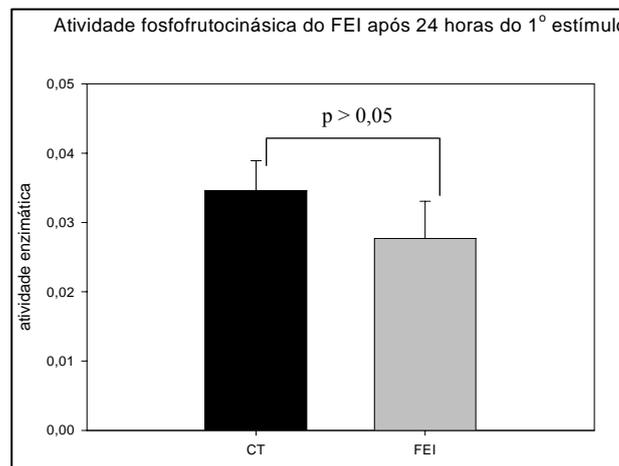


Figura 20: Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10min seguido de incubação por 24 horas ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  em relação ao controle, valores médios de absorbância,  $\lambda = 340$  nm).

O mesmo perfil de atividade enzimática foi detectado após 48 horas do primeiro estímulo (Figura 21). Esse conjunto de resultados indicou que um único estímulo elétrico pelo FEI não foi capaz de alterar significativamente a atividade desta enzima, mesmo após 48 horas do estímulo elétrico.

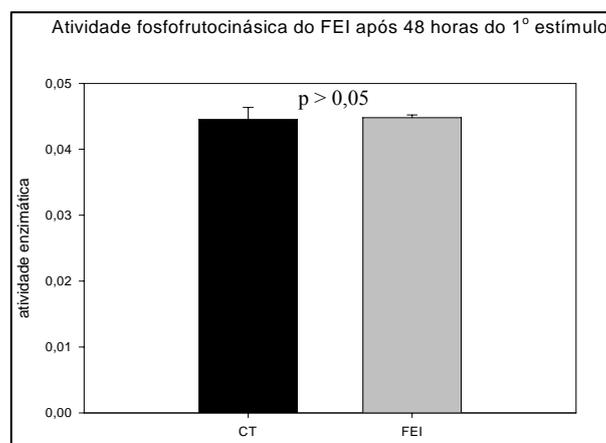


Figura 21: Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 estimuladas pelo FEI por 2 mA / 10min seguido de incubação por 48 horas ( $n = 3$ ,  $p^* > 0,05$  em relação ao controle, valores médios de absorbância,  $\lambda = 340$  nm).

### 5.9.2 Atividade enzimática após 2º estímulo elétrico pelo FEI

Como observado anteriormente, um único estímulo não foi capaz de reduzir significativamente a atividade da enzima PFK-1. Porém, ao avaliar esta atividade após um segundo estímulo elétrico, detectamos mudanças significativas na atividade desta enzima ( $p < 0,05$ , figura 22), com uma queda de quase 50 % da atividade enzimática.

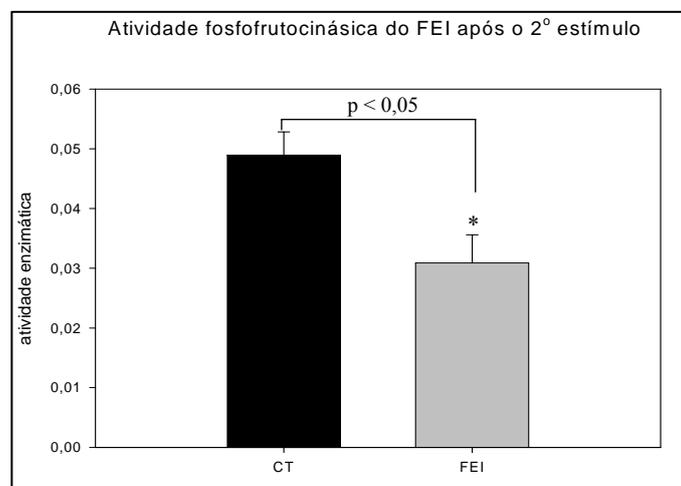


Figura 22: Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 quantificada após 24 horas do segundo estímulo pelo FEI (2 mA/ 10 min). O gráfico expressa a média de três experimentos independentes ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$  em relação ao controle, valores médios de absorbância,  $\lambda = 340$  nm).

Em seguida, a atividade desta enzima foi quantificada após 24 horas de incubação, ou seja, 48 horas após o primeiro estímulo. Observa-se que decorridas 48 horas, a atividade da PFK-1 retorna a níveis comparáveis ao do grupo controle (Figura 23). A enzima recupera sua atividade normal mesmo quando as células são submetidas a um segundo estímulo pelo FEI.

Desta forma, a queda na atividade da enzima PFK-1 possui um caráter transitório e não permanente, indicando uma recuperação do metabolismo celular quando são decorridas 48 horas do primeiro e segundo estímulos elétricos.

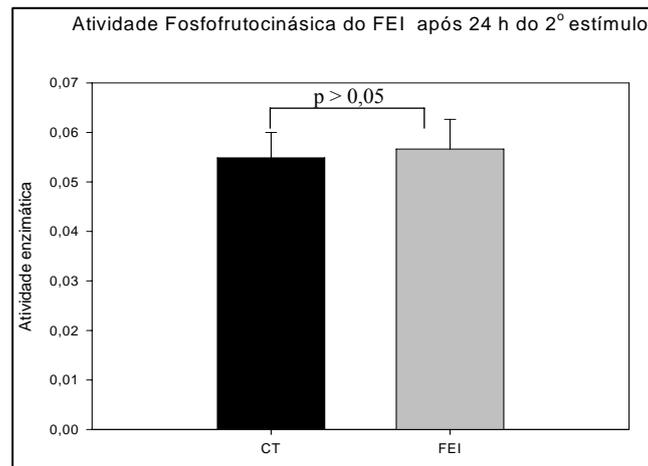


Figura 23: Atividade da enzima PFK-1 em células HL-60 quantificada após 24 horas do segundo estímulo pelo FEI (2 mA / 10 min). O gráfico expressa a média de três experimentos independentes ( $n = 3$ ,  $p^* > 0,05$  em relação ao controle, valores médios de absorbância,  $\lambda = 340$  nm).

## 5.10 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE

### 5.10.1 Consumo de glicose após 1º estímulo elétrico pelo FEI

Neste ensaio avaliamos o consumo de glicose após estímulo elétrico de 10 minutos com 2 mA de CE, como descrito no item 4.3.16. Foram realizados três experimentos independentes e a análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA.

Observa-se na figura 24, que após estímulo elétrico, as células tratadas com o FEI apresentaram consumo de glicose significativamente aumentado em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) com um aumento de cerca de 20 % do consumo relativo de glicose, os valores foram estatisticamente significativos.

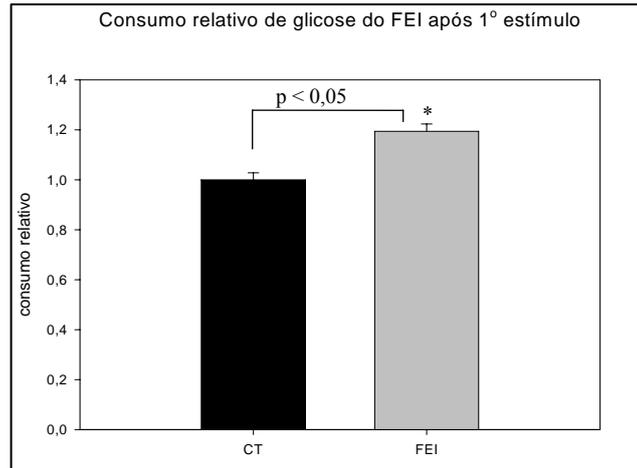


Figura 24: Consumo relativo de glicose de células HL-60 quantificado imediatamente após estímulo do FEI (2 mA/ 10 min). O gráfico representa a média de três experimentos independentes ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$  em relação ao controle).

### 5.10.2 Consumo de glicose após 2º estímulo elétrico pelo FEI

Neste ensaio foi avaliado o consumo de glicose das células HL-60 após o segundo estímulo elétrico pelo FEI. Pode-se observar que após o segundo estímulo, as células estimuladas apresentam uma diminuição estatisticamente significativa do consumo de glicose, quando comparado ao consumo de glicose do grupo controle (Figura 25).

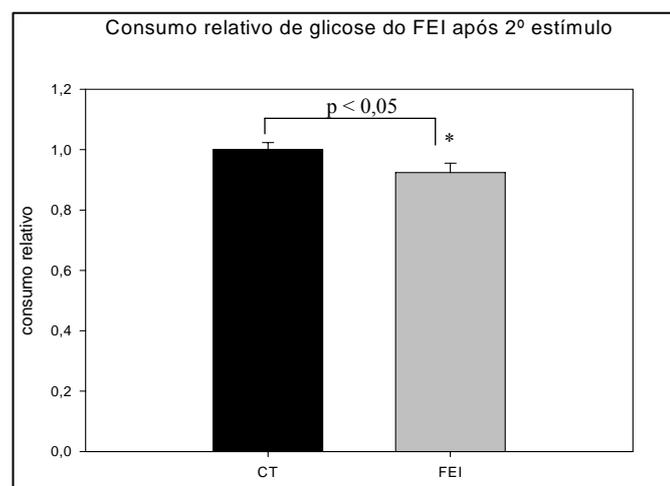


Figura 25: Consumo relativo de glicose de células HL-60 quantificado após segundo estímulo pelo FEI (2 mA/ 10 min). O gráfico representa a média de três experimentos independentes ( $n = 3$ ,  $p^* < 0,05$  em relação ao controle).

## 5.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACTATO

### 5.11.1 Produção de lactato após 1º estímulo elétrico pelo FEI

Paralelos aos ensaios realizados para avaliação do consumo de glicose foram realizados testes para avaliação da produção de lactato das células eletroestimuladas, como descrito anteriormente no item 4.3.16. Foram realizados três experimentos e a análise dos dados foi feita pelo teste ANOVA.

Pode-se observar que após um estímulo elétrico (Figura 26), as células tratadas não apresentam diferenças estatisticamente significativas na produção de lactato ( $p > 0,05$ ) quando comparado a produção relativa de lactato do grupo controle.

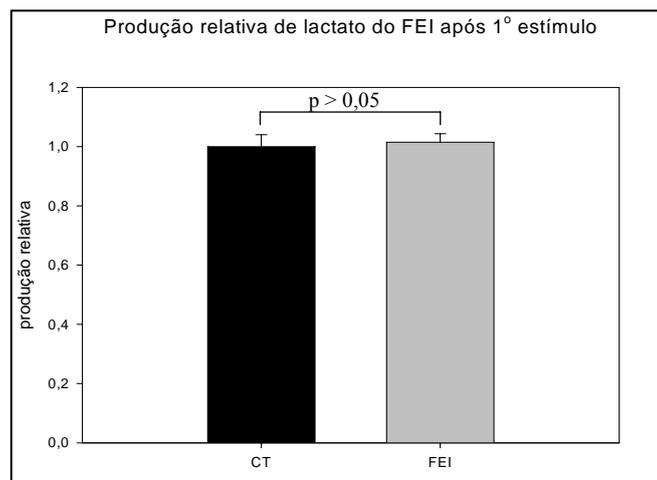


Figura 26: Produção de lactato de células HL-60 após 1º estímulo pelo FEI com 2 mA por 10 minutos ( $n = 3$ ,  $p > 0,05$  em relação ao controle).

### 5.11.2 Produção de lactato após segundo estímulo elétrico pelo FEI

A produção relativa de lactato das células HL-60 também foi obtida após o segundo estímulo pelo FEI (Figura 27). Como descrito no item anterior, também não foram observadas

modificações estatisticamente significativas na produção de lactato das células tratadas pelo FEI, mesmo quando submetidas a um segundo estímulo elétrico.

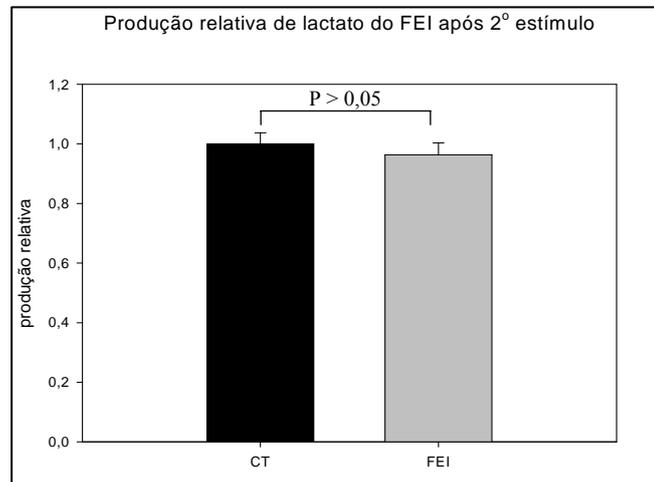


Figura 27: Produção relativa de lactato de células HL-60 após 2º estímulo do FEI com 2 mA por 10 minutos (n = 3, p > 0,05 em relação ao controle).

## 5.12 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS: MICROSCOPIA ÓPTICA

Para verificar se o FEI foi capaz de causar mudanças morfológicas nas células HL-60, realizamos a microscopia óptica através da coloração por giemsa (4.3.17).

Na figura 28, as células foram estimuladas pelo FEI com 2 mA por 10 minutos. Com esta dose não foram detectadas alterações morfológicas causadas pela CE imediatamente após o estímulo.

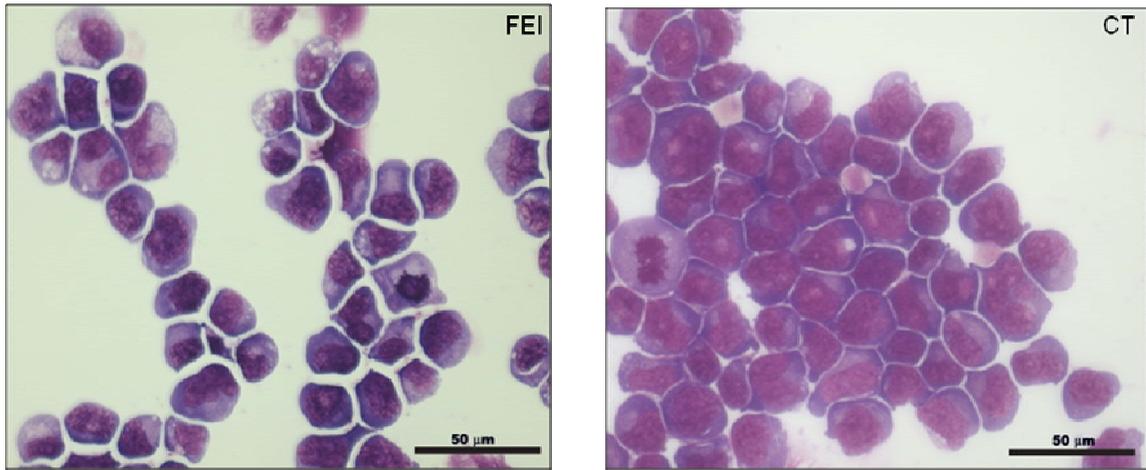


Figura 28: Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa. FEI: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 10 min); CT: controle. Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 50 μm.

Na figura 29, observa-se a microscopia óptica das células HL-60, 24 horas após o primeiro estímulo pelo FEI, na qual não foram detectadas alterações morfológicas significativas.

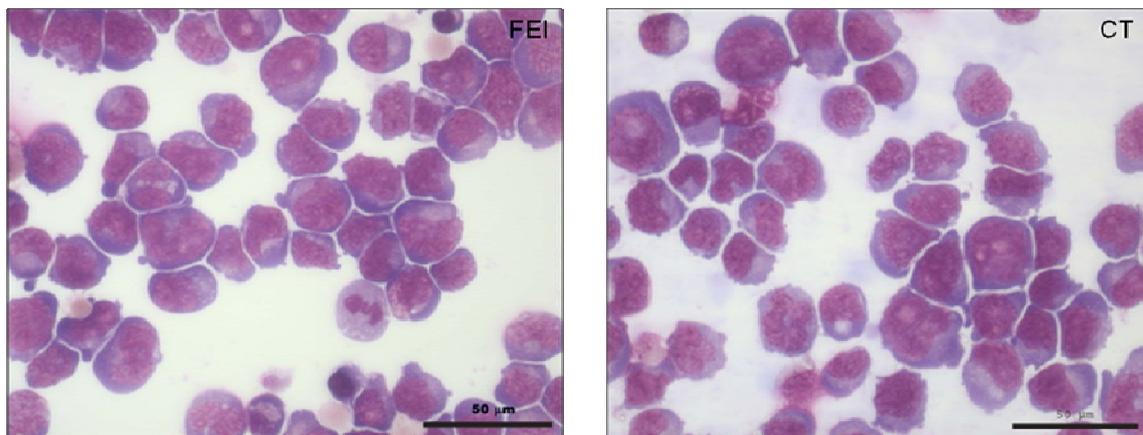


Figura 29: Microscopia óptica de células HL-60 coradas por giemsa e incubação por 24 h. FEI: fluxo eletro-iônico (2 mA/ 10 min); CT: controle. Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 50 μm.

## 6 DISCUSSÃO

O tratamento eletroquímico de tumores também denominado de eletroterapia tumoral (ETT) consiste na passagem de uma corrente elétrica contínua através de dois ou mais eletrodos inseridos localmente no tecido, com o objetivo de destruir as células tumorais. Esta terapia antitumoral teve sua origem nos estudos clínicos realizados por Nordenström (NORDENSTRÖM, 1989) e desde então tem sido amplamente aplicada em pacientes com tumores sólidos, principalmente na China (YULING, 1995). Outros pesquisadores como Miklavčič e colaboradores, em uma série de trabalhos iniciados em 1990, vêm estudando os efeitos da corrente elétrica aplicada isoladamente ou em associação a quimioterápicos em animais e em humanos. No Brasil, os mecanismos de ação envolvidos com a atividade antitumoral da ETT vêm sendo elucidados por estudos *in vitro* (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2001, 2005) e *in vivo* (TELLÓ *et al.*, 2004, 2007).

Os efeitos antitumorais da ETT são atribuídos a diferentes mecanismos, dependendo da configuração dos eletrodos e dos parâmetros da corrente aplicada. Não existem trabalhos na literatura que evidenciem os efeitos do campo elétrico na ausência dos produtos de eletrólise. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos celulares induzidos pelo FEI em células humanas leucêmicas (HL-60). Para tanto, inicialmente os efeitos do fluxo anódico e catódico foram também avaliados sobre a viabilidade das células HL-60, utilizando o método do MTT. Este ensaio colorimétrico permite avaliar a atividade mitocondrial das células viáveis de maneira quantitativa, uma vez que a enzima succinato desidrogenase catalisa a transformação do sal tetrazolium, de cor amarela, em cristais de formazan, de cor púrpura (MOSMANN, 1983). A quantidade de cristais formados é proporcional ao número de células viáveis e, conseqüentemente, fornece parâmetros da respiração celular. A queda na viabilidade das células HL-60 estimuladas com 2 mA ocorre a partir do tempo de 4 minutos de estímulo em todas as situações experimentais realizadas neste

estudo, as quais chamamos de fluxo anódico (FA), fluxo eletro-iônico (FEI) e fluxo catódico (FC). Esta diminuição das taxas de respiração celular não pode se recuperada após 24 horas do estímulo elétrico, especialmente após estímulo anódico e catódico, onde as alterações são detectadas a partir do tempo de 6 minutos. Da mesma forma o FEI foi capaz de inibir as taxas de respiração celular; entretanto, tal inibição foi detectada de maneira mais tardia, sendo necessários 10 minutos de estimulação para que se observasse o mesmo efeito. Essa diminuição da viabilidade das células HL-60 pode ser explicada pela formação de produtos de eletrólise e alterações de pH, eventos decorrentes dos estímulos anódico e catódico, entretanto não justificam os efeitos induzidos pelo FEI. Esses dados corroboram o estudo realizado por Veiga e colaboradores (2005), onde também foi utilizada a linhagem celular HL-60. Neste estudo os autores evidenciaram que os produtos de eletrólise estão envolvidos com a morte por necrose, induzida pelo FA e FC; entretanto, comprovam que o FA é também capaz de disparar a morte celular programada, devido à geração de cloraminas, sabidamente indutoras de apoptose (VEIGA *et al.*, 2005; WAGNER *et al.*, 2002; ERGLERT & SCHACTER, 2002). Tang e colaboradores (2005) demonstraram que além desses compostos tóxicos, após tratamento elétrico ocorrem outros eventos, como: aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , com ativação de endonucleases e clivagem do DNA; efluxo de  $\text{K}^+$ , com estímulo a caspases e consequente indução de apoptose. Outros autores sugerem que a mudança aguda no pH é a maior causa da degeneração irreversível de vários tipos de enzimas, levando à morte das células (YEN & ZHOU, 1999; CABRALES *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2000; TURJANSKI *et al.*, 2008). Tanto esses estudos, quanto os resultados apresentados nesse trabalho, demonstram a importância da polaridade na geração de compostos citotóxicos capazes de diminuir a viabilidade destas células.

A microscopia óptica mostrou que a CE foi capaz de induzir alterações morfológicas como aparecimento de bolhas de superfície celular (blebs), lise e diminuição do número de

células. Tais alterações morfológicas foram confirmadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permitiu evidenciar também alterações mitocondriais, como perda das cristas mitocondriais, lise celular e rupturas da membrana plasmática, induzidas principalmente pelo FC. Como observado em estudos anteriores, a estimulação elétrica é capaz de causar alterações ultraestruturais semelhantes em mastocitomas de camundongos (HOLANDINO *et al.*, 2000), em células humanas leucêmicas (VEIGA *et al.*, 2005) e em células humanas leucêmicas resistentes a múltiplas drogas (HOLANDINO *et al.*, 2001).

Assim, a citotoxicidade da estimulação elétrica é normalmente atribuída a produtos de eletrólise. Esses compostos gerados, explicam a toxicidade direta no tecido tumoral, entretanto não justificam o retardo na velocidade de crescimento das células que são submetidas apenas ao fluxo de elétrons. Além disso, as células submetidas ao FA e FC, apresentam-se com a viabilidade celular muito diminuída, o que dificulta o estudo de possíveis alterações metabólicas causadas pela CE. Então a partir destes resultados iniciais, optou-se por estudar somente o FEI para melhor entendimento dos mecanismos de ação relacionados à eletroterapia tumoral.

Como mostrado anteriormente, a viabilidade das células submetidas ao FEI apresenta-se diminuída a partir de 4 minutos de estimulação; porém esses danos são revertidos até o tempo de 8 minutos. A partir de 10 minutos de estímulo elétrico, estas células não são capazes de reverter tais danos, talvez por um comprometimento da respiração celular.

De uma maneira peculiar, as células cancerosas produzem energia preferencialmente pela glicólise anaeróbia em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial. As principais funções da mitocôndria são produção de energia (ATP); geração de espécies reativas de oxigênio e a regulação da morte celular programada (ROSSIGNOL *et al.*, 2004). A fosforilação oxidativa fornece energia para o citoplasma e a glicólise anaeróbia para o núcleo. O núcleo parece ser o compartimento mais susceptível à deficiência de ATP, não somente nas

células normais como também nas células malignas. A perda de ATP no núcleo de células malignas possui consequências drásticas que impedem funções celulares cruciais, como, a transcrição e a replicação do DNA. Se isto acontecer, isto é, se a fosforilação oxidativa predominar sobre a glicólise, com a diminuição do ATP nuclear, as consequências são benéficas, porque a diminuição da energia para o núcleo induz significativa diminuição da proliferação tumoral e da apoptose. Outro aspecto a considerar é a relação entre o potencial transmembrana e a proliferação celular. Trabalhos mostraram que a queda do potencial transmembrana a níveis inferiores a -15 mV desencadeiam a síntese de DNA e a multiplicação celular (mitose). Normalmente, o potencial transmembrana das células gira em torno de -50 a 90 mV, sendo tais valores mantidos pela fosforilação oxidativa (ALBERTS *et al.*, 2008; HARGUINDEY *et al.*, 2005).

A diminuição da produção de ATP via fosforilação oxidativa, impede o funcionamento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e despolariza a membrana celular. Se a despolarização atingir os valores próximos à -15 mV a síntese de DNA nuclear, dependente da glicólise anaeróbia, e a consequente mitose, são disparados. Desta forma, se o estímulo pelo fluxo eletro-iônico for capaz de impedir a despolarização das membranas celulares da linhagem HL-60, uma queda na viabilidade e nas taxas de crescimento serão consequentemente verificadas. De fato, os resultados obtidos por MTT corroboram esta hipótese e apontam ainda para a existência de uma relação dose-dependente, uma vez que a viabilidade das células HL-60 foi diminuída à medida que o tempo de estimulação (0 a 10 minutos) e a intensidade de CE (0,5 a 2,0 mA) foram variados.

O ensaio realizado pela contagem do número de células, utilizando o corante azul de tripan, mostrou que o estímulo pelo FEI retardou de maneira significativa a taxa de crescimento celular por até 96 horas após o estímulo. Além disso, a linhagem HL-60 se mostrou mais susceptível ao tratamento pelo FEI, quando submetida a um esquema repetitivo

de estimulação, indicando que quanto maior o número de estímulos, maior é a capacidade da CE de inibir o crescimento do tumor.

Quando uma célula está pronta para se dividir a enzima ribonucleotídeo redutase converte os blocos de RNA em DNA, sendo crucial para o crescimento celular. Sendo assim, a atividade desta enzima está estreitamente ligada à transformação e à progressão neoplásica. Alguns agentes quimioterápicos, como a hidróxi-uréia bloqueiam esta enzima; porém, o uso destas drogas é ainda limitado, uma vez que a inibição da atividade enzimática é apenas parcial e os efeitos colaterais são muitos. Um ponto de regulação desta enzima é o radical tirosil, que é essencial para sua atividade. Em hipótese proposta por Kulsh (1997), os radicais livres, produzidos pela CE, e outras espécies reativas seriam capazes de inibir a ribonucleotídeo redutase, inibindo, conseqüentemente, o crescimento de células neoplásicas de maneira mais eficaz sobre o tecido tumoral, porque neste a concentração desta enzima é mais elevada quando comparada às células normais (KULSH, 1997).

No presente estudo foram evidenciados os efeitos do FEI sobre o metabolismo glicolítico de células humanas leucêmicas com uma tendência de aumento na atividade da enzima PFK-1 nas primeiras 24 horas de pós-tratamento. Entretanto, ao aplicar um novo estímulo, foi verificada uma queda significativa desta atividade ( $p < 0,05$ ). Tal redução foi revertida após 48 horas de tratamento, quando as células HL-60 foram incubadas em meio nutricional, indicando o caráter transitório desta inibição. O aumento da atividade da enzima PFK-1 nas primeiras 24 horas de estímulo com o FEI induziu um consumo de glicose cerca de 20 % maior, o qual foi normalizado quando as células foram novamente incubadas em meio nutricional. Em contra-partida, não foram detectadas alterações significativas na produção de lactato pelas células HL-60, mesmo após segundo estímulo elétrico.

Células cancerosas mantêm uma alta taxa glicolítica mesmo em condições de oferta adequada de oxigênio conhecido como efeito Warburg. No entanto, a maioria dos tumores é

submetida a condições de hipóxia devido à vascularização anormal que fornece oxigênio e nutrientes. Assim, a glicólise é essencial para a sobrevivência e propagação do tumor. Um passo fundamental no controle da taxa glicolítica é a conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato pela enzima PFK-1 (BARTRONS & CARO, 2007). Inibidores glicolíticos que bloqueiam o abastecimento de energia para as células cancerígenas representam uma nova classe de fármacos antineoplásicos. Foi demonstrado que drogas antineoplásicas clássicas, tais como vimblastina, vincristina e paclitaxel, também modulam a atividade das enzimas glicolíticas, contribuindo para os seus efeitos sobre a viabilidade de células tumorais. Outras drogas, como o antifúngico clotrimazol e o ácido acetilsalicílico, são capazes de diminuir a viabilidade de células tumorais através da inibição de enzimas glicolíticas, sendo desta forma potenciais candidatos a antineoplásicos (SPITZ *et al.*, 2008; MEIRA *et al.*, 2005).

Os dados apresentados neste trabalho mostram de maneira inédita que a via glicolítica, regulada principalmente pela enzima PFK-1, é um possível alvo de correntes elétricas, indicando que os mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral de CE parecem ser dependentes de parâmetros bioquímicos fundamentais para a proliferação dos tumores malignos. Novas medidas da atividade da PFK-1 precisam ser feitas para que se chegue a uma dose de CE ideal capaz de inibir de maneira mais eficaz e, preferencialmente definitiva, o metabolismo glicolítico das células neoplásicas.

Esta pode ser uma nova estratégia terapêutica interessante para o controle da proliferação de células tumorais a qual deve possuir níveis de toxidez muito baixos a tecidos normais, uma vez que não envolve a formação de produtos oxidantes e tóxicos comprovadamente produzidos pelos pólos positivo (FA) e negativo (FC).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitiram concluir que:

- Células humanas leucêmicas (HL-60) são susceptíveis a estímulos elétricos;
- Os danos induzidos na viabilidade celular são dependentes da polaridade, do tempo de exposição aos produtos de eletrólise e ao fluxo eletro-iônico;
- Os danos induzidos pela corrente elétrica não são revertidos a partir do tempo de 6 minutos (FA e FC) e no tempo de 10 minutos (FEI);
- A corrente elétrica causa alterações morfológicas e ultra-estruturais em células HL-60 depende da polaridade aplicada;
- O fluxo eletro-iônico gerado por uma corrente elétrica é capaz de diminuir as taxas de crescimento das células HL-60;
- O fluxo eletro-iônico é capaz de alterar a atividade da enzima fosfofrutocinase de células HL-60;
- O fluxo eletro-iônico é capaz de alterar o consumo de glicose sem modificar a produção de lactato das células HL-60.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO CÂNCER. Definição de câncer. Disponível em: <[http://www.abcancer.org.br/portal/index.php?module=conteudo\\_fixo&id=585](http://www.abcancer.org.br/portal/index.php?module=conteudo_fixo&id=585)>. Acesso em abril 2009.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. 15<sup>a</sup> ed. Garland Science, 2008. 1268 p.
- AVILES, A. *et al.* *Antitumor effect of zoledronic acid in previously untreated patients with multiple myeloma*. *Med Oncol*, v. 24, p. 227-30, 2007.
- AZEVEDO, D. R.. *Psicooncologia e interdisciplinaridade: uma experiência na educação a distância*. 1<sup>a</sup> ed., EDIPUC RS, 2004, 379 p.
- BARTONS, R.; CARO, J. *Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect*. *J Bioenerg Biomembr*, v. 39, p.223–229, 2007.
- BHAGAVAN, N. V. *Carbohydrate metabolism I: glycolysis and TCA cycle*. *Medical biochemistry*, v. 4, p. 225-246, 2002.
- BLAU, L. *et al.* *Prodrug activation by enzyme, a promising strategy for chemotherapy*. *Quim. Nova*, v. 29, p. 1307-1317, 2006.
- CABRALES, L. B., CIRIA, H. C., BRUZON, R. P. *Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current*. *Bioelectromagnetics*, v. 22, p. 316-322, 2001.
- CIRIA, H. C. *et al.* *Efectos de la corriente eléctrica directa en el crecimiento del tumor de ehrlich*. *Rev Cubana Oncol*, v. 17, p. 167-70, 2001.
- CIRIA, H. C. *et al.* *Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Erlich and Fibrosarcoma Sa-37 tumors*. *BMC Cancer*, v. 4, p. 1-10, 2004.
- CLARKE, M. F. *et al.* *Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells*. *Cancer Res*, v. 66, p. 9339-9344, 2006.
- COLLINS, S. J. *et al.* *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds*. *Medical Sciences*, v. 75, p.2458-2462, 1978.

CVIRN, P. *et al.* *Tumor pH changes due to electrotherapy-experimental results and mathematical model.* Electrotech, v. 61, p. 37-42, 1994.

DAVID, S. L., ABSOLOM, D. R., SMITH, C. R. *Effect of low level direct current on in vivo tumor growth in hamsters.* Cancer Res, v. 45, p. 5625-5631, 1985.

DOBBIN, J. A.; GADELHA, M. I. P. *Imatinib Mesylate in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia.* Revista Brasileira de Cancerologia, V. 48 (3), p. 429-438, 2002.

EL-BACHA, T.; DE FREITAS, M. S.; SOLA PENNA, M. *Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer.* Mol. Genet. Metab., v. 79, 294–299, 2003.

ENGLERT, R. P.; SCHACTER E. *Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species.* Journal of Biological Chemistry, v. 277, p. 20518-20526, 2002.

FANTIN, V. R.; St-PIERRE, J.; LEDER, P. *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance.* Cancer cell, v. 9, p. 425-434, 2006.

FILHO, A. B.; FERREIRA, P. R. *Princípios de Tratamento Radioterápico.* Oncologia Clínica – princípios e prática. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 97-105, 1991.

FU, X. *et al.* *cAMP response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells.* J Biol Chem, v. 281, 20368–20382, 2006.

FUKADA, E. ; YASUDA, I. *On the piezoelectric effect of bone.* J Physiop Soc Japan, v. 12, p. 1158-62, 1957.

GALLAGHER, R. *et al.* *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.* Blood, v. 54, p. 713-733, 1979.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. *Why do cancers have high aerobic glycolysis?.* Nature Reviews, 4, 891-899, 2004.

GENTIL, F. C.; LOPES, A. *Princípios de Cirurgia Oncológica*. Oncologia Clínica – princípios e prática. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 84-96, 1991.

GENTZ, B. A. *Alternative therapies for the management of pain in labor and delivery*. Clin Obstet Gynecol, v. 44, p. 704-32, 2001.

GILMAN E GILMAN. *Electrotherapy and the Human Voice: A Literature Review of the Historical Origins and Contemporary Applications*. Journal of Voice, v. 22, No. 2, 2008.

GOPALKRISHNAN, P., SLUKA, K. A. *Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats*. Arch Phys Med Rehabil, v. 81, p. 984-990, 2000.

GOTHELF, A. *et al. Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation*. Cancer Treatment Reviews, v. 29, p. 371–87, 2003.

GUIRRO, R. *et al. Comparação dos efeitos de dois protocolos de estimulação elétrica neuromuscular sobre a força muscular isométrica do quadríceps*. Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo, v. 7, n. 1-2, p. 10-15, 2000.

HAMERSCHLAK, N. *et al. Leucemias*. Medicina do adolescente. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 274–9, 2003.

HAMERSCHLAK, N. *et al. Retrospective study of stem cell transplantation for acute myeloid leukemia (AML):the Brazilian experience*. Rev. bras. hematol. hemoter.v.28, p.11-18, 2006.

HAMERSCHLAK, N. *Oncohematologic diseases and rheumatic disorders*. Einstein, v. 6, p. 589-597, 2008.

HARGUINDEY, S. *et al. The role of pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin—one single nature*. Reviews on cancer, v. 1756, p. 1-24, 2005.

HOLANDINO, C. *et al. Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in Escherichia coli*. Indian J. Biochemistry Biophysics, v. 35, p. 284-290, 1998.

\_\_\_\_\_ *et al. Damage induction by direct electric current in tumoural target cells.* Indian J. Experimental Biology, v. 38, p. 554-607, 2000.

\_\_\_\_\_ *et al. Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell.* Bioelectromagnetics, v. 22, p. 470-478, 2001.

HOUGHTON, P. E. *et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance.* Phys Ther, v. 83, p. 17-28, 2003.

IJIRI K. *et al. Indomethacin inhibition of ossification induced by direct current stimulation.* J Orthop Res, v. 13, p. 123-31, 1995.

JARM, T. *et al. Perturbation of blood flow as a mechanism of anti-tumor action of direct current electrotherapy.* Physiological Measurement, v. 24, p. 75-90, 2003.

JARQUE, M. V. *et al. Primeras experiencias clínicas en Cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales.* Medisan, v. 11, p. 1-13, 2007.

KAPLAN, B. *et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) as a pain-relief device in obstetrics and gynecology.* Clin Exp Obstet Gynecol, v. 24, p. 123-6, 1997.

KULSH, J. *Targeting a key enzyme in cell growth: a novel therapy for cancer.* Medical Hypotheses, v. 49, p. 297-300, 1997.

LAMB, S. E. *et al. Neuromuscular stimulation of the quadriceps muscle after hip fracture: a randomized controlled trial.* Arch Phys Med Rehabil, v. 83, p. 1087-92, 2002.

LEITE, T. C. *et al. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.* Biochem. J., v. 408, p. 123-130, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica.* 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 977 p.

LIN, X. Z., JEN, C. M., CHOU, C. K. *Saturated saline enhances the effect of electrochemical therapy.* Dig Dis Sci, v. 45, 509-514, 2000.

LUNDY, D. S. *et al.* *Effects of vagal nerve stimulation on laryngeal function.* J Voice, v. 7, p. 359–364, 1993.

MATSUSHIMA, Y. *et al.* *Clinical and experimental studies of anti-tumoural effects of electrochemical therapy (ECT) alone or in combination with chemotherapy.* Eur J Surg Suppl, v. 574, p. 59-67, 1994.

MEIRA, D. D. *et al.* *Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes.* Mol Genet Metab, v. 84, p. 354–362, 2005.

MELVIN, S. L. *Immunological Definition of Leukemic Cell Surface Phenotypes.* Cancer Research, v. 41, p. 4790-4793, 1981.

MIKLAVČIČ, D. *et al.* *Tumor treatment by direct current- tumor temperature and pH, electrode material and configuration.* Bioelectrochemistry e Bioenergetics, v. 30, p. 209-20, 1993.

MIKLAVČIČ, D. *et al.* *Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy.* E J C Supplements, v. 4, p. 45-51, 2006.

MIR, L. M., *et al.* *Electrochemotherapy, a novel antitumour treatment: first clinical Trial.* Cr Acad Sci Paris, v. 313, p. 613-618, 1991.

\_\_\_\_\_. *Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy.* British Journal of Cancer, v. 77, p. 2336–42, 1998.

\_\_\_\_\_. *Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporation.* Bioelectrochemistry, v. 53, p. 1-10, 2001.

\_\_\_\_\_. *Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator by means of invasive or non-invasive electrodes.* EJC Supplements, v. 4, p. 14-25, 2006.

MORENO-SÁNCHEZ, R. *et al.* *Energy metabolism in tumor cells.* FEBS Journal, v. 274, p. 1393–1418, 2007.

MOSMANN, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

NILSSON, E. *et al.* *Electrochemical treatment of tumors: a simplified mathematical model.* J Electroanal Chem, v. 460, p. 88-99, 1999.

NILSSON, E.; FONTES, E. *Mathematical modeling of physicochemical reactions and transport processes occurring around platinum cathode during the electrochemical treatment of tumors.* Bioelectrochemistry, v. 53, p. 213-224, 2001.

NORDENSTRÖM, B. E. *Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer.* Eur J Surg Suppl, v. 574, p. 93-109, 1994.

\_\_\_\_\_. *Biologically closed electrical circuits: clinical, experimental and theoretical evidence for an additional circulatory system.* Stockholm: Nordic Medical Publications, 1983.

\_\_\_\_\_. *Electrochemical treatment of cancer. Variable response to anodic and cathodic fields.* Am J Clin Oncol, v. 12, p. 530-6, 1989.

NORDESNTRÖM, B. E. , YULING, X. , BANGNING, X. *Electrochemical Treatment for Cancers.* People's Health Publishing House, p. 1-15, 1995.

O'BRIEN, S. *et al.* Chronic myelogenous leukemia. **J Natl Compr Canc Netw**, v.5, p. 474-96, 2007.

ORANGE, F. A. *et al.* *Uso da estimulação transcutânea para alívio da dor durante o trabalho de parto em uma maternidade-escola: ensaio clínico controlado.* RBGO, v. 25, p. 45-52, 2003.

PICHON, F. *et al.* *Electrical stimulation and swimming performance.* Med Sci Sports Exerc, v. 27, n. 12, p. 1671-76, 1995.

POZNAK, C. V.; SEIDMAN, A. D., *Breast Cancer.* Encyclopedia of Cancer, Second Edition, v. 1, p. 287-299, 2002.

PUI, C. H., EVANS, W. E.. *Acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med., v. 339, p. 605-15, 1998.

QUEVEDO, C. S. *et al.* *Alteraciones inducidas en El fibrosarcoma Sa-37 por La acción citotóxica de La corriente eléctrica directa.* Rev Cubana Med, v. 42, p. 1-6, 2003.

- REINEHR, R. *et al.* *Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity induced hepatocyte apoptosis.* J Biol Chem, v. 281, p. 23150–23166, 2006.
- ROSSIGNOL, R. *et al.* *Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells.* Cancer Research, v. 64, p. 985–993, 2004.
- SAUER, H. *et al.* *Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation.* Cell Physiol Biochem, v.11, p.173–186, 2001.
- SANTOS JÚNIOR, J. C. M. *Adjuvant treatment in rectal cancer: III: Immunotherapy.* Rev Bras colo-proctol, v. 17, p. 204-208, 1997.
- SANTINI, D. *et al.* *Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients.* Clin Cancer Res, v. 13, 4482-6, 2007.
- SCOTT, G., KING, J. B. *A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones.* J Bone Joint Surg, v. 76<sup>a</sup>, p. 820-6, 1994.
- SERŠA, G. *et al.* *Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 39, p. 61-66, 1996.
- SERŠA, G. *et al.* *Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 43, p. 279-283, 1997.
- SERŠA, G. *et al.* *Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients.* European Journal of Cancer, v. 34, p. 1213–8, 1998.
- SERŠA, G. *et al.* *Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients.* Cancer Therapy, v. 1, p. 133–42, 2003.
- SERŠA, G. *et al.* *Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients.* Câncer Therapies, v. 1, p. 133-42, 2003.

SERŠA, G. *et al.* *Electrochemotherapy in treatment of tumours*. EJSO, v. 34, p. 232-240, 2008.

SNOJ, M. *et al.* *Long lasting complete response in melanoma treated by electrochemotherapy*. EJC Supplements, v. 4, 26-28, 2006.

SOBIN, L. H.; GREENE, F. L. *TNM classification*. Cancer, v. 92, p. 452, 2001.

SPADARO, J. A. *Mechanical and electrical interations in bone remodeling*. Bioelectromagnetics, v. 18, p. 193-202, 1997.

SPITZ, G. A. *et al.* *Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity*. Biochemical pharmacology, v. 77, p. 46-53, 2009.

STRALKAS, W., JACKSON, J. A., LEWIS, A. R. *Treatment of hand and wrist pain: A randomized clinical trial of high voltage pulsed, direct current built into a wrist splint*. AAOHN Journal, v. 45, n. 5, p. 233-36, 1998.

STRYER, L. *Bioquímica*. 4<sup>a</sup> ed. Stanford University: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.

TALEBI, G. *et al.* *Effects of micro-amperage direct current stimulation on injury potential and its relation to wound surface area in guinea pig*. Conference of the IEEE EMBS, Cité Internationale, Lyon, France, p. 3516-19, 2007.

TANG, B., LI, L., CHEN, X. *Electrochemical treatment for late stage cervical cancers: clinical study*. J Guangxi Med Univ, v. 19, p. 1-5, 2002.

TANG, B. *et al.* *Characterization of the mechanisms of electrochemotherapy in an in vitro model for human cervical cancer*. International Journal of Oncology, v. 26, p. 703-711, 2005.

TELLÓ, M. *et al.* *Electrochemical therapy to treat cancer (in vivo treatment)*. Conference of the IEEE EMBS, Cité Internationale, Lyon, France, p. 3524-27, 2007.

\_\_\_\_\_ *et al.* *Uso da corrente elétrica no tratamento do câncer*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2004. 229 p.

TURJANSKI, P. *et al.* *pH Front Tracking in the Electrochemical Treatment (EChT) of Tumors: Experiments and Simulations*. Electrochimica Acta, p. 1-28, 2008.

UNGER, P., EDDY, J., RAIMASTRY, A. S. *A controlled study of the effect of high voltage pulsed current (HVPC) on wound healing*. Phys Ther, v. 71, p. 119, 1991.

UIIC. International union against cancer. What is cancer. Disponível em: <[http://www.uicc.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=13&Itemid=113](http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113)> Acesso em abril 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. Sistema de Informação e Bibliotecas. *Manual para elaboração e normalização de trabalhos de conclusão de curso*. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <[http://www.sibi.ufrj.br/manual\\_teses.pdf](http://www.sibi.ufrj.br/manual_teses.pdf)>. Acesso em: maio 2009.

VAN LAETHEM, A. *et al. Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes*. Free Radic Biol Med, v. 41, p.1361–1371, 2006.

VAN POZNAK, C., SEIDMAN, A. D.. *Breast Cancer*. Encyclopedia of cancer. 2º ed., v.1, p. 287-299, 2002.

VEIGA, V. F. *et al. Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms*. Cell Biochem Biophys, v. 42, p. 61-74, 2005.

VEIGA, V. F. *et al. Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an in vitro analysis*. Bioelectromagnetics, v. 21, p. 567-607, 2000.

VODOVNIK, L., MIKLAVČIČ, D., SERŠA, G. *Modified cell proliferation due to electrical currents*. Med Biol Eng Comput, v. 30, p. 21-8, 1992.

VON EULER, H. *et al. Development of a dose-planning method for electrochemical treatment of tumors: a study of mammary tissue in healthy female CD rats*. Electro-magnetobiol, v. 18, p. 93-104, 1999.

VON EULER, H.; NILSSON, E.; OLSSON, J. M. *Electrochemical treatment (EChT) effects in rat mammary and liver tissue. In vivo optimizing of a dose-planning model for EChT of tumors*. Bioelectrochemistry, v. 54, p. 117-124, 2001.

VON EULER, H., SODERSTEDT, A., THORNE, A. *Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumor cell line: an in vitro model for investigation of the tumor destructive properties of electrochemical treatment of tumours.* Bioelectrochemistry, v. 58, p. 163-170, 2002.

XIN, Y. *et al.*, *Electrochemical treatment of lung cancer.* Bioelectromagnetics, v. 18, p. 8-13, 1997.

XIN, Y. *et al.* *Effectiveness of electrochemical therapy in the treatment of lung cancers of middle and late stage.* Chin Med J, v. 110, p. 379-83, 2004.

WAGNER, B. A. *et al.* *Hydrogen peroxide-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells is mediated by the oxidants hypochlorous acid and chloramines.* Arch. Biochem. Biophys., v. 401, p. 223-234, 2002.

WALL, A. M., SHUETZ, J. D. *Genetic basis for quantitative and qualitative changes in drug targets.* Encyclopedia of cancer. 2° ed., v.2, p. 273-278, 2002.

WARTENBERG, M. *et al.* *Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species.* Bioelectromagnetics, p. 2-8, 2007.

WIERNIK, P. H. *Acute myelocytic leukemia.* Encyclopedia of cancer. 2° ed., v.1, p. 19-24, 2002.

WHEELER, G. D. *et al.* *Functional electric stimulation-assisted rowing: increasing cardiovascular fitness through functional electric stimulation rowing training in persons with spinal cord injury.* Arch Phys Med Rehabil, v.83, p. 1093-99, 2002.

(<http://www.abcancer.org.br>, acesso em 10/04/2009).

YEN, Y. , LI J. R., ZHOU, B. S. *Electrochemical treatment of human KB cells in vitro.* Bioelectromagnetics, v. 20, p. 34-41, 1999.

YONEMORI, K. *et al.* *Early effects of electrical stimulation on osteogenesis.* Bone, v. 19, p. 173-80, 1996.

YU, S. P. *et al.* *NMDA receptor-mediated  $K^+$  efflux and neuronal apoptosis.* Science, v. 284, p. 336-339, 1999.

YULING, X., BANGNING, X. *Electrochemical Treatment for Cancers*. People's Health Publishing House, p.1-15, 1995.

ZANCAN, P. *et al.* *Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 467, p. 275–282, 2007.

ZERATH, E. *et al.* *Electrical stimulation of leg muscles increases tibial trabecular bone formation in unloaded rats*. **J Appl Physiol**, v. 79, p. 1889-94, 1995.

## **ANEXO - TABELAS**

**Tabela 1 - Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação**

<b>Tempo 2 minutos</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>
<b>FA</b>	100,3658 ± 2,6037	99,6790 ± 1,6329
<b>FEI</b>	100,3387 ± 2,2567	100,8026 ± 3,1172
<b>FC</b>	96,3555 ± 3,8049	90,04802 ± 4,2287
<b>CT</b>	100,0000 ± 3,6160	100,0000 ± 6,2702

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 2 - Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação**

<b>Tempo 4 minutos</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>
<b>FA</b>	85,8218 ± 2,2847	94,6586 ± 4,4153
<b>FEI</b>	84,7801 ± 2,1630	91,5002 ± 3,0894
<b>FC</b>	85,3009 ± 1,6551	91,8718 ± 3,2042
<b>CT</b>	100,0000 ± 1,6400	100,0000 ± 2,2945

N=6; ±: desvio padrão

**Tabela 3 - Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação**

<b>Tempo 6 minutos</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>
<b>FA</b>	27,9076 ± 2,3498	14,1954 ± 1,7361
<b>FEI</b>	82,6049 ± 3,1084	106,6215 ± 3,7320
<b>FC</b>	59,8782 ± 3,3275	69,8095 ± 2,6058
<b>CT</b>	100,0000 ± 6,8733	100,0000 ± 7,3267

N= 4; ±: desvio padrão

**Tabela 4 - Percentuais médios da viabilidade de células HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação**

<b>Tempo 8 minutos</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>
<b>FA</b>	23,4403 ± 2,6654	17,3534 ± 5,3110
<b>FEI</b>	70,6510 ± 7,1299	65,3439 ± 5,0661
<b>FC</b>	49,3787 ± 7,4664	46,8592 ± 5,5317
<b>CT</b>	100,0000 ± 6,9231	100,0000 ± 9,7621

N=4; ±: desvio padrão

**Tabela 5 – Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 0 h de eletroestimulação no fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Tempo (min)	Fluxo eletro-iônico (%)	Controle (%)
	0 h	0 h
2'	100,3387 ± 2,2567	100,0000 ± 3,6160
4'	84,7801 ± 2,1630	100,0000 ± 1,6400
6'	82,6049 ± 3,1084	100,0000 ± 6,8733
8'	70,6510 ± 7,1299	100,0000 ± 6,9231
10'	70,0910 ± 1,9620	100,0000 ± 5,7796

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 6 – Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 24 h de eletroestimulação no fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Tempo (min)	Fluxo eletro-iônico (%)	Controle (%)
	24 h	24 h
2'	100,8026 ± 3,1172	100,0000 ± 6,2702
4'	91,5002 ± 3,0894	100,0000 ± 2,2945
6'	106,6215 ± 3,7320	100,0000 ± 7,3267
8'	65,3439 ± 5,0661	100,0000 ± 9,7621
10'	59,1790 ± 7,4220	100,0000 ± 12,8668

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 7 – Percentuais médios de viabilidade de HL-60 após 0 h e 24 h de eletroestimulação por 10 minutos no fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Corrente (mA)	Fluxo eletro-iônico (%)		Controle (%)	
	0 h	24 h	0 h	24 h
<b>0,5</b>	78,3688 ± 5,5142	102,2576 ± 2,3108	100,0000 ± 4,0780	100,0000 ± 3,3466
<b>1,0</b>	71,0366 ± 1,4360	91,2769 ± 3,0973	100,0000 ± 3,1707	100,0000 ± 4,1846
<b>2,0</b>	69,9300 ± 1,8767	59,1760 ± 7,4158	100,0000 ± 5,7796	100,0000 ± 12,8668

N=4; ±: desvio padrão

**Tabela 8 – Valores médios do número de células ( $\times 10^4$ ) quantificado por azul de tripan após primeiro estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Tempo (horas)	Fluxo eletro-iônico		Controle	
	Não-permeáveis	Permeáveis	Não-permeáveis	Permeáveis
<b>0</b>	267,5000 ± 21,3850	78,0000 ± 6,1752	310,3333 ± 9,5836	50,1667 ± 2,8684
<b>24</b>	519,1667 ± 24,4410	30,0000 ± 4,6547	815,8333 ± 11,3590	35,0000 ± 3,1623
<b>48</b>	1081,6667 ± 51,2131	28,3333 ± 4,7726	1565,0000 ± 50,0999	30,8333 ± 7,4629
<b>72</b>	1738,3333 ± 83,3533	79,1667 ± 9,9513	2243,3333 ± 67,2020	70,0000 ± 8,9443
<b>96</b>	2034,1667 ± 78,0109	45,8333 ± 7454	2175,8333 ± 65,7700	106,6667 ± 7,6012

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 9 – Valores médios do número de células ( $\times 10^4$ ) quantificado por azul de tripan após segundo estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Tempo (horas)	Fluxo eletro-iônico		Controle	
	Não-permeáveis	Permeáveis	Não-permeáveis	Permeáveis
0	290,5556 $\pm$ 11,5375	48,1111 $\pm$ 3,9737	261,6667 $\pm$ 16,3877	30,6667 $\pm$ 4,1500
24	411,6667 $\pm$ 13,8193	62,2222 $\pm$ 4,8671	492,2222 $\pm$ 14,8631	60,0000 $\pm$ 4,7871
48	538,8889 $\pm$ 18,9440	145,5556 $\pm$ 19,2831	861,1111 $\pm$ 27,0259	107,2222 $\pm$ 7,6880
72	1074,4444 $\pm$ 87,9885	182,7778 $\pm$ 14,1939	1377,2222 $\pm$ 43,3823	186,1111 $\pm$ 13,9885
96	1395,0000 $\pm$ 73,2812	120,5556 $\pm$ 15,4435	1607,2222 $\pm$ 50,8546	133,3333 $\pm$ 12,7203

N=3;  $\pm$ : desvio padrão

**Tabela 10 – Valores médios da atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 após primeiro estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

Tempo (horas)	Fluxo eletro-iônico	Controle
	0	2,5250e-3 $\pm$ 4,9392e-4
24	0,0277 $\pm$ 5,3536e-3	0,0346 $\pm$ 4,3220e-3
48	0,0448 $\pm$ 4,0208e-4	0,0445 $\pm$ 1,8327e-3

N=3;  $\pm$ : desvio padrão

**Tabela 11 – Valores médios da atividade fosfofrutocinásica de células HL-60 após segundo estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Fluxo eletro-iônico</b>	<b>Controle</b>
<b>0</b>	0,0309 ± 4,6893e-3	0,0489 ± 3,8924e-3
<b>24</b>	0,0566 ± 5,9959e-3	0,0549 ± 5,1485e-3

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 12 – Valores relativos de consumo de glicose de células HL-60 após estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

<b>estímulos</b>	<b>Fluxo eletro-iônico</b>	<b>Controle</b>
<b>1°</b>	1,1938 ± 0,0300	1,0000 ± 0,0279
<b>2°</b>	0,9241 ± 0,0308	1,0000 ± 0,0234

N=3; ±: desvio padrão

**Tabela 13 – Valores relativos da produção de lactato de células HL-60 após estímulo de 10 min/ 2 mA, fluxo eletro-iônico e sem estímulo (controle).**

<b>estímulos</b>	<b>Fluxo eletro-iônico</b>	<b>Controle</b>
<b>1°</b>	1,0150 ± 0,0285	1,0000 ± 0,0398
<b>2°</b>	0,9631 ± 0,0403	1,0000 ± 0,0371

N=3; ±: desvio padrão