



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

MARINA DAS NEVES GOMES

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CORRENTES ELÉTRICAS CONTÍNUAS:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO

RIO DE JANEIRO

ABRIL

2010

MARINA DAS NEVES GOMES

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CORRENTES ELÉTRICAS CONTÍNUAS:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO**

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

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Carla Holandino Quaresma

Prof. Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão

RIO DE JANEIRO

2010

Gomes, Marina das Neves

Atividade antitumoral de correntes elétricas contínuas: avaliação do potencial mutagênico e genotóxico. Rio de Janeiro / Marina das Neves Gomes.– Rio de Janeiro: Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, 2010.

xv, 97 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Carla Holandino Quaresma e Álvaro Augusto da Costa Leitão

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, CCS, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010.

Referências bibliográficas: f. 90 - 97

1. Estimulação Elétrica. 2. Dano ao DNA. 3. Mutagênese. 4. Neoplasia – terapia. 5. Farmácia - Tese. I. Quaresma, Carla Holandino. II. Leitão, Álvaro Augusto da Costa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

MARINA DAS NEVES GOMES**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CORRENTES ELÉTRICAS CONTÍNUAS:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO**

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

Aprovada em:**Orientadores:**

Prof.^a Dr.^a Carla Holandino Quaresma
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Faculdade de Farmácia

Prof. Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Marcia Alves Marques Capella
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Prof. Dr. Marcos Telló
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Escola Politécnica

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Faculdade de Farmácia

Prof.^a Dr.^a Patrícia Zancan
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia

Prof.^a Dr.^a Magdalena Nascimento Rennó
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

Dedico este trabalho aos meus pais, Heitor Flávio e Marília, dos quais eu tenho muito orgulho, por terem me apoiado em todos os momentos de minha vida, me dando segurança e amor. Graças aos ensinamentos que me passaram, hoje tenho este trabalho realizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Carla Holandino por ter me aceito em seu laboratório e ter-me apresentado a um projeto pelo qual me encantei. Por ter dividido comigo viagens, metas e bons momentos entre família e amigos, sendo mais do que uma orientadora, uma amiga.

Agradeço ao Professor Alvaro Leitão por todo o conhecimento que me passou, por ter colaborado em demasia para o sucesso do trabalho, por sua orientação e amizade.

Aos meus pais, Heitor Flavio e Marília, que sempre me apoiaram em todos os caminhos que escolhi, responsáveis pelos mais sábios conselhos que escutei, aos quais eu devo tudo que sou.

Aos meus maravilhosos irmãos, Luiza e João Paulo, e à minha querida cunhada Priscilla pela amizade e amor demonstrados. Eu os amo demais.

Aos velhos e novos amigos por acompanharem com carinho mais uma jornada.

Aos amigos que fiz no laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Venicio pelo auxílio na microscopia e pelo apoio dado durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos que contribuíram com informações técnicas e momentos de descontração no laboratório de Radiobiologia Molecular, em especial a Janine Cardoso, uma pessoa de muita competência, paciência e constante disposição para ajudar.

A banca de acompanhamento, Prof. Alexandre Pyrrho e Prof^a. Patrícia Zancan pelas contribuições no decorrer deste trabalho.

RESUMO

GOMES, Marina das Neves. Atividade antitumoral de correntes elétricas contínuas: avaliação do potencial mutagênico e genotóxico. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

O câncer é um grande desafio para a ciência, visto que a cura de muitos tipos de tumores ainda não foi descoberta. Além disso, os tratamentos atuais apresentam muitos efeitos colaterais e não apresentam seletividade ou especificidade para as células tumorais. Isto motiva a busca por novas terapias antitumorais, como a eletroterapia tumoral (ETT), a qual utiliza uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade (CE) para a destruição de tumores. Na ETT uma fonte de CE é utilizada e eletrodos são inseridos no tumor, causando uma série de danos que parecem ser decorrentes principalmente dos produtos de eletrólise gerados. Muitos resultados promissores com ETT têm sido publicados na literatura a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, não existem estudos que avaliem o potencial mutagênico ou genotóxico da estimulação elétrica. No presente trabalho este potencial foi avaliado através de ensaios convencionais de mutagenicidade e genotoxicidade. Para tanto, células procarióticas e eucarióticas foram submetidas a um sistema experimental que permite avaliar os efeitos celulares da estimulação anódica, catódica e do fluxo eletro-iônico gerados por 2mA de CE. A sobrevivência celular após a estimulação elétrica das seguintes cepas de *E. coli* K12 foi avaliada: cepa selvagem (AB1157), cepa deficiente no reparo por excisão (AB1886/*uvrA6*) e cepa deficiente no reparo recombinacional (AB2463/*recA13*). Os resultados experimentais indicaram que todas as cepas bacterianas apresentaram respostas semelhantes ao estímulo elétrico

indicando que tais estímulos não induziram lesões reparáveis pelos sistemas *uvrA* ou *recA*. A sensibilidade de células eucarióticas (*Saccharomyces cerevisiae*, FF18733) ao estímulo elétrico também foi avaliada e os resultados indicaram que tal estímulo não induz alterações no material genético destas leveduras. Para avaliar a capacidade mutagênica da CE, o teste de resistência a rifampicina, com a cepa AB1157 foi realizado. A ausência de mutação no gene bacteriano que confere resistência a rifampicina (*rpoB*) indicou a preservação do DNA bacteriano. Os testes genotóxicos realizados com bacteriófagos λ eletroestimulados e utilizados para infectar as bactérias selvagens e mutantes (AB1157, AB1886 e AB2463) indicaram ausência de alterações no DNA viral ou geração de lesões diferentes das que podem ser reparadas por excisão e/ou recombinação. Da mesma forma, mas utilizando o protocolo onde a cepa WP2s(λ) foi eletroestimulada, novamente foi possível verificar a ausência de danos genotóxicos induzidos por CE. Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que o estímulo elétrico com 2 mA de corrente contínua não é capaz de induzir lesões mutagênicas e/ou genotóxicas nos modelos celulares estudados.

ABSTRACT

GOMES, Marina das Neves. Antitumor activity of direct electric current: an evaluation of mutagenic and genotoxic potentials. Rio de Janeiro. Master's Thesis in Pharmaceutical Sciences. Pharmacy Faculty, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

Cancer is a major challenge to science, since the cure of many types of tumors has not yet been found. Moreover, the current treatments present many side effects and no selectivity or specificity for tumor cells. This lack of suitable treatments calls for new antitumor therapies, such as Electrotherapy (ETT) which employs a low direct electric current (DC) for tumor destruction. In the ETT a DC source is used and electrodes are inserted into the tumor, causing damage which appears to result from the generation of electrolysis products. Many promising results using ETT have been published in the literature from *in vivo* and *in vitro* studies. However, no studies to date have evaluated the mutagenic and genotoxic potentials of electric stimulation. The present work aims to assess these potentials through traditional mutagenesis and genotoxicity protocols. For this purpose, prokaryotic and eukaryotic cells were submitted to an experimental approach that allows the evaluation of the cellular effects of anodic, cathodic and electro-ionic stimuli generated by 2mA of DC. Cell survival of three different strains of *E. coli* K12 was evaluated after DC stimulation: wild type strain (AB1157), strain deficient in excision repair (AB1886/*uvrA6*) and strain deficient in recombinational repair (AB2463/*ecA13*). The experimental results show that all bacterial strains had similar response to DC, suggesting that this stimulation did not induce reparable damage by *uvrA* or *recA* systems. The sensibility of eukaryotic cells (*Saccharomyces cerevisiae*, FF 18733) to DC was also evaluated, showing that no alterations occurred in the genetic material of these yeasts. The

mutagenic potential of DC was investigated in AB1157 cells through rifampin resistance test. This assay indicated that DC stimulation did not induce any damage to the bacterial gene which confers resistance to rifampin (gene *rpoB*). The genotoxic tests carried out with DC-treated bacteriophages used to infect wild (AB1157) and mutant bacteria (AB1886, AB2463) showed no alteration in viral DNA or generation of lesions that cannot be repaired by excision and/or recombination. Similarly, the use of another protocol in which strain WP2s(λ) was stimulated confirms the absence of DC genotoxicity. The results obtained from the present work allow us to conclude that 2 mA of DC is not able to induce mutagenic and/or genotoxic lesions in the cellular models studied.

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1** - Equação de decomposição da água em oxigênio e íons H^+ 26
- Equação 2** - Equação de oxidação do cloreto.....26
- Equação 3** - Equação de decomposição da água em hidrogênio e íons hidroxila....26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas neste trabalho.....	35
Quadro 2 – Antibióticos utilizados neste trabalho.....	35
Quadro 3 – Média dos valores de pH obtidos após eletroestimulação da cepa AB1157.....	51
Quadro 4 – Média dos valores de pH obtidos após eletroestimulação da cepa <i>S. cerevisiae</i>	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo de tumor benigno e maligno.....	04
Figura 2 - Representação esquemática da cerclagem monopolar.....	09
Figura 3 - Esquema da colocação de eletrodos no tumor, formação de produtos de eletrólise e eletrosmose.....	12
Figura 4 - Esquema da eletroporação em células.....	18
Figura 5 – Fluxograma de possibilidades de reparo do DNA quando submetido a tratamentos com agentes físicos ou químicos	22
Figura 6 – Nucleotídeos que compõem o DNA.	23
Figura 7 - Formação de dímeros de pirimidina.....	26
Figura 8 - Reparo por excisão de nucleotídeos de dímero de pirimidina.....	27
Figura 9 - Ativação do sistema de reparo SOS.....	29
Figura 10 - Sistema experimental para estímulo elétrico.....	38
Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1157 de <i>E. coli</i> após estímulo nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.....	40
Figura 12 – Esquema de aplicação de corrente elétrica contínua de 2 mA.....	41
Figura 13 – Foto demonstrativa das Unidades Formadoras de Plaques.....	43
Figura 14 - Esquema representativo da metodologia de ensaio reparo das lesões causadas pela corrente elétrica contínua em bacteriófagos λ	44
Figura 15 - Esquema representativo do ensaio de indução lisogênica.....	46
Figura 16 – Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1157 após estímulo de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos.....	49
Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB2463 após estímulo de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos.....	49
Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1886 após estímulo de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos.....	50
Figura 19 - Resposta da cepa AB1157 para o ensaio de mutagênese para resistência a rifampicina.....	52

Figura 20 - Número de plaques induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB1157.....	53
Figura 21 - Número de plaques induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB2463.....	54
Figura 22 - Número de plaques induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB1886.....	54
Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade da cepa WP2s(λ) após estímulo elétrico de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos.....	56
Figura 24 – (a) Número de centros infecciosos induzidos com estimulação elétrica de 2mA. (b) O controle positivo, feito com radiação ultravioleta C.....	57
Figura 25 - Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias <i>E. coli</i> AB1157.....	58
Figura 26 - Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias <i>E. coli</i> AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo anódico.....	58
Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias <i>E. coli</i> AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo eletroênico.....	60
Figura 28 - Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias <i>E. coli</i> AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo catódico.....	61
Figura 29 - Ensaio de citotoxicidade da cepa FF18733 de <i>S. cerevisiae</i> após estímulo elétrico de 2 mA em tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.....	52
Figura 30 - Representação esquemática da ligação do antibiótico rifampicina.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG	8-oxoguanina
CE	corrente elétrica contínua
ddp	diferença de potencial
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
e ⁻	elétrons
EChT	eletroquimioterapia
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ESOPE	European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy
ETT	eletroterapia tumoral
FA	fluxo anódico
FC	fluxo catódico
FEI	fluxo eletro-iônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LB	Lysogeny-broth
n	número de amostras
N	número de células viáveis
N ₀	número inicial de células
PBS	tampão salina fosfato
pH	potencial hidrogênico
PTA	ácido fosfotúngstico
qsp	quantidade suficiente para
UV-C	ultravioleta C
WHO	World Health Organization
YPG	Yeast Peptona Glucose

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	porcentagem
°C	graus Celsius
cél/mL	células por mililitro
cm ²	centímetros quadrados
cm ³	centímetros cúbicos
h	hora (s)
g	grama (s)
g/L	grama por litro
J/m ²	Joule (s) por metro quadrado
mA	miliampere (s)
mg	miligrama (s)
mg/mL	miligrama (s) por mililitro
min	minuto (s)
mL	mililitro (s)
mM	milimolar
nm	nanômetro (s)
µg/mL	micrograma (s) por mL
µL	microlitro (s)

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da eletricidade ocorreu em etapas, começando com a produção de cargas estáticas sobre bulbos de vidro no início do século XVIII, passando pelos diferentes meios de produção de corrente elétrica – como a pilha voltaica – até os meios cada vez mais sofisticados de variar e reverter tais correntes.

Uma forma de uso da eletricidade, datada de 2.750 a. C., era o alívio da dor, por meio da aplicação de peixes elétricos, com o intuito de causar dormência. Já em meados do século XVIII, com estudos de Benjamin Franklin, foram criadas máquinas eletrostáticas, usadas na medicina no lugar de organismos vivos. No final do século XVIII Galvani realizando estudos em coxas de rã, descobriu que músculos e células nervosas eram capazes de produzir eletricidade originária de reações químicas. Esta eletricidade ficou conhecida como galvânica. Na mesma época, Alessandro Volta construiu a primeira bateria elétrica, conhecida como pilha voltaica. No início do século XIX a contribuição veio de Faraday com a compreensão da eletrólise. Desde então, correntes elétricas contínuas (CE) vêm sendo amplamente utilizadas terapeuticamente (JOHN & REED, 2001).

A literatura evidencia que, os efeitos da interação de correntes elétricas com o material biológico são inúmeros, tais como: i) efeito bactericida e fungicida, atribuído a eventos eletroquímicos (RANALLI *et al.*, 2002; VALLE *et al.*, 2007; BIRBIR *et al.*, 2008, 2009; TIEHM *et al.*, 2009); ii) efeito antiinflamatório e de regeneração de tecido ulcerado (HUCKFELDT *et al.*, 2007; TALEBI *et al.*, 2007); iii) controle da atividade de fibroblastos no processo de cicatrização (JENNINGS *et al.*, 2008), tendo aplicações na ortopedia, por acelerar a cicatrização de fraturas ósseas (CIOMBOR & AARON, 2005); iv) atividade antitumoral que originou a eletroterapia tumoral (ETT).

Na ETT os eletrodos são colocados de forma invasiva, na região a ser tratada, com geração de produtos de eletrólise e espécies oxidantes que

resultam na destruição das células (NORDENSTRÖM, 1983, 1984; TELLÓ *et al.*, 2004).

Associações a CE podem ser feitas, como a introdução de quimioterápicos com o objetivo de melhorar a resposta dos tumores tratados (TELLÓ *et al.*, 2007; SPUGNINI *et al.*, 2009).

Entretanto, o mecanismo de ação envolvido com esta atividade antitumoral ainda não é totalmente compreendido e apesar dos promissores resultados clínicos da CE e da ETT não existe, até o presente momento, nenhum estudo que comprove ou descarte o potencial mutagênico e/ou genotóxico desta terapia. Nesse sentido, e com vista a ampliar os resultados existentes sobre os efeitos induzidos por CE em organismos vivos, neste trabalho o potencial mutagênico e genotóxico da CE foi avaliado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O corpo é composto de muitos tipos de células. Estas células crescem e se dividem de forma controlada, para produzir mais células que são necessárias para manter o corpo saudável. Quando as células se tornam velhas ou danificadas, elas morrem e são substituídas por novas células. Porém, às vezes, este processo não ocorre de forma normal. O material genético (DNA) de uma célula pode ser danificado ou alterado, produzindo mutações que afetam o crescimento e sua divisão. Quando isso acontece, as células não morrem, no momento que deveriam, e formam novas células, quando o organismo não precisa delas. Estas novas células podem formar uma massa de tecido chamada de tumor (NCI, 2009).

Estas células tumorais passam a se comportar de forma anormal: multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o; levam ao desenvolvimento de microvasos, a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas (angiogênese). Alguns tipos adquirem a capacidade de se desprender do tumor e de migrar, por vasos sanguíneos ou linfáticos, formando as metástases. Neste caso, são chamadas células cancerosas, as quais geralmente são menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais e, conforme substituem as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (INCA, 2009).

Estas células alteradas podem formar o câncer e diferenciam-se de células tumorais benignas, pois, estas formam uma massa localizada de células que se multiplica vagarosamente e se assemelha ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de morte (INCA, 2009), (Figura 1).

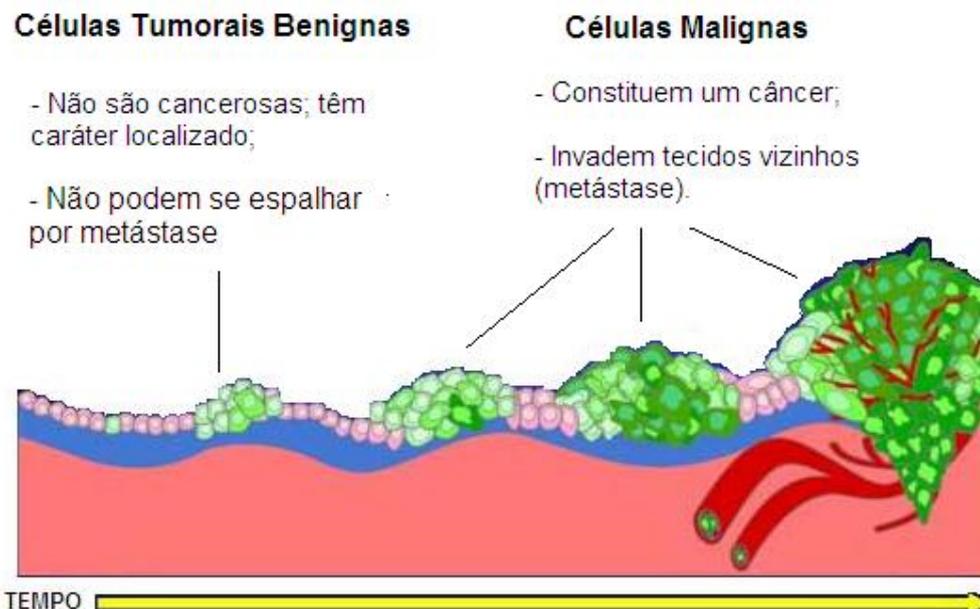


Figura 1 – Esquema ilustrativo de tumor benigno e maligno. Adaptado de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/Slide9>.

O câncer é o resultado da interação entre fator genético, envelhecimento e agentes externos. Dentre os agentes externos estão: os agentes físicos (radiação ultravioleta e ionizante), os agentes químicos (amianto, componentes do fumo do tabaco, aflatoxinas) e os agentes biológicos (infecções virais, bacterianas e parasitárias). O vírus da hepatite B está relacionado ao câncer de fígado, o papiloma vírus humano (HPV) está relacionado ao câncer cervical e as bactérias *Helicobacter pylori* ao câncer gástrico. Parasitas, como *Schistosoma haematobium* podem gerar câncer de bexiga (WHO, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou dados estatísticos acerca da incidência de câncer no mundo e como resultado obteve que esta é uma das principais causas de morte, tendo sido responsável por 7,4 milhões (cerca de 13 % de todas as mortes) em 2004. Segundo a OMS, estas mortes continuarão crescendo, sendo estimado um número de 12 milhões de óbitos para o ano de 2030. Já o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresentou como estimativa, para o Brasil a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, no ano de 2010.

Os cânceres mais incidentes serão o câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e do colo do útero, no sexo feminino (INCA, 2009).

Os diferentes tipos de câncer irão corresponder aos vários tipos de células do corpo, sendo os principais os seguintes (NCI, 2009):

- Carcinoma - se inicia na pele ou nos tecidos que cobrem órgãos internos;
- Sarcoma - câncer que começa no osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou tecido conjuntivo;
- Leucemia - câncer que começa no tecido de formação do sangue, como a medula óssea;
- Câncer do sistema nervoso central – origem nos tecidos do cérebro e da medula espinhal.

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, sendo que em alguns casos é necessário combinar mais de uma modalidade. A radioterapia é um tratamento no qual se utilizam radiações x e γ para destruir ou impedir que as células tumorais aumentem. A quimioterapia utiliza medicamentos quimioterápicos antineoplásicos e o transplante de medula óssea é utilizado para algumas doenças que afetam as células sanguíneas, consistindo na substituição de uma medula óssea doente por células normais desta, com o objetivo de reconstituir uma nova medula (INCA, 2009).

Outros tratamentos que podem ser usados no combate ao câncer são: os inibidores de angiogênese, onde se elimina o fornecimento de sangue aos tumores; as terapias biológicas, que atuam no sistema imunológico; a terapia genética; a hipertermia (tratamento de tumores com o calor); os lasers, onde se faz uso de luz de alta intensidade; a terapia fotodinâmica, onde a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não-tóxico (fotosensibilizador) e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a morte tumoral (NCI, 2009).

Além desses, tem-se tratamentos complementares e alternativos que são um grupo diversificado de produtos e práticas médicas e de saúde que,

geralmente, não são considerados parte da medicina convencional, sendo o tratamento complementar usado junto com a medicina convencional e o alternativo utilizado no lugar da medicina convencional. O uso de terapias complementares e alternativas é particularmente elevado entre os pacientes com doenças graves como câncer. Um estudo do ano de 2000, do *National Center for Complementary and Alternative Medicine* demonstrou que 69 % de 453 pacientes com câncer tinham utilizado, pelo menos, uma destas duas terapias (RICHARDSON *et al.*, 2000). Entre as terapias complementares podemos citar a acupuntura e a eletroacupuntura, o uso de suplementos nutricionais, probióticos, além de terapias bioeletromagnéticas que envolvem o uso convencional de campos eletromagnéticos (NCCAM, 2010).

2.2 ELETROTERRAPIA TUMORAL

A eletroterapia tumoral consiste na passagem de corrente elétrica contínua de baixa intensidade por dois ou mais eletrodos inseridos no local, diretamente ou próximo do tecido tumoral, com o objetivo de destruí-lo.

2.2.1 Histórico da Eletroterapia Tumoral

Os estudos da eletroterapia tumoral tiveram início com um médico sueco, radiologista, Björn E. W. Nordenström. Na década de 70, Nordenström iniciou o tratamento de câncer de pulmão aplicando corrente entre dois eletrodos de platina inseridos no tumor. Em 1983, Nordenström publicou um livro com resultados do tratamento de 26 tumores pulmonares em 20 pacientes, que por alguma razão não estavam mais aptos a receberem tratamentos cirúrgicos ou radioterapia e quimioterapia. Como resultado, obteve uma regressão em 12 dos tumores, sem sinal de reaparecimento dos mesmos após um período de 2 a 5 anos (NORDENSTRÖM, 1983).

Nordenström, em 1987 levou sua experiência para a China, onde, apoiado pelo governo chinês iniciou um projeto de aplicação desta terapia. Em dois anos este projeto acumulou bons dados clínicos e experimentais e em

1989 a eletroterapia tumoral foi aprovada pelo Ministério de Saúde Pública da China como forma de tratamento a ser usada em qualquer parte do país (XIN, 1994, 1998).

A eletroterapia tumoral (ETT) é divulgada no mundo através de conferências, encontros, congressos e por grupos de pesquisas de diversos países. O primeiro encontro foi realizado em 1993 em Estocolmo, Suécia, e foi denominado *The First Conference of the International Association for Biologically Closed Electric Circuits in Medicine and Biology* (IABC). Um segundo simpósio internacional foi realizado em 1998 em Bejing na China, onde se relatou que neste país 1260 hospitais estabeleceram o uso da ETT (XIN, 1998). Em 2008 ocorreu o décimo congresso internacional sobre a ETT, nos Estados Unidos, Flórida (IABC, 2010).

2.2.2 Aplicação da Eletroterapia Tumoral

2.2.2.1 Eletrodos

O eletrodo usado na eletroterapia tumoral deve ser inerte, não pode ser degradado durante a aplicação da corrente. Desta forma, devem ser escolhidos eletrodos de um material com a menor tendência a oxidação, como, por exemplo, o ouro, a platina e o cobre.

Um estudo feito por Kim e colaboradores comparou eletrodos de platina revestidos de titânio, tungstênio, bronze e aço inoxidável, cada um, em dois aspectos: a) a resistência à corrosão e b) a eficácia clínica. Para isso, tratou camundongos BALB/c transplantados com uma linhagem celular de câncer broncoalveolar (linhagem H358). Este estudo mostrou que todos os quatro tipos de eletrodos foram capazes de destruir as células cancerosas, porém o eletrodo de platina com titânio foi o que apresentou a maior resistência à corrosão (KIM *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Localização dos eletrodos

A localização ideal dos eletrodos para a eficácia da ETT ainda é de pouco conhecimento e precisa de muitos estudos. Na clínica, algumas dúvidas existem sobre a disposição dos eletrodos (quantidade; localização dos ânodos e cátodos; direção dos eletrodos - perpendicular ao tumor ou paralelo; distância entre eletrodos, etc). Nordenström, em suas primeiras experiências tratando câncer de pulmão com eletroterapia, colocou o ânodo centralmente no tumor e o cátodo distante, aproximadamente, duas vezes o diâmetro do tumor, longe do ânodo. Nordenström, estudando mais aplicações da ETT, verificou um excesso de cargas negativas na superfície da maioria dos tecidos tumorais e, por isso, concluiu que apenas o ânodo deveria ser inserido no tumor, de modo a evitar a disseminação de micrometástases durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1983, 1984). Contudo, em um trabalho posterior, Nordenström obteve resultados positivos quando inseriu o cátodo no tumor (NORDENSTRÖM, 1989).

Em 1994, Xin e colaboradores começaram a inserir os ânodos no centro e o mesmo número de cátodos na periferia do tumor (XIN *et al.*, 1994). Turler e colaboradores verificaram que não havia diferença significativa quando se aplicava o ânodo no centro do tumor e quatro cátodos na periferia e vice-versa, utilizando-se a mesma carga para os dois casos (TURLER *et al.*, 2000).

Ren e colaboradores testaram a resposta de um tratamento de câncer de mama, com diâmetro de aproximadamente 2,5 cm, em ratos, utilizando a eletroterapia tumoral, visando verificar se a distância entre os eletrodos era significativa. Como respostas obtiveram que o espaçamento entre os eletrodos não é um fator importante dentro de um determinado intervalo. Utilizando 5, 10 e 15 milímetros de espaçamento, verificaram que a indução de necrose não apresentou diferença significativa entre espaçamentos de 5 e 10 mm; porém, esta taxa de tecido necrosado foi menor no grupo com espaçamento de 15 mm, concluindo que nestas condições, o espaçamento máximo deve estar entre 5 e 10 mm (REN *et al.*, 2001).

Visando minimizar este problema de padronização do uso de eletrodos Telló e colaboradores desenvolveram um esquema de disposição dos eletrodos chamado de cerclagem monopolar (Figura 2). Na cerclagem, o eletrodo positivo (ou negativo), formado por um fio de aço, rodeia todo o volume do tumor e é conectado a uma fonte de corrente contínua, enquanto o outro eletrodo (negativo ou positivo) é conectado a uma placa metálica do lado externo à região do tumor (TELLÓ *et al.*, 2007).

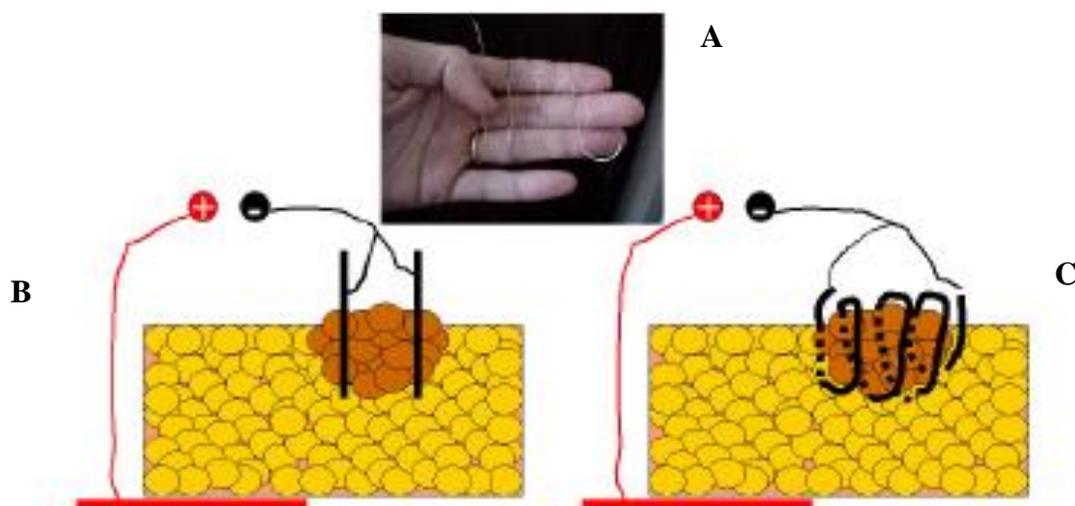


Figura 2 - Representação esquemática da cerclagem monopolar. A: fio de aço que irá circundar o tumor; B: representação de uma disposição normal dos eletrodos; C: cerclagem do tumor, com estimulação pelo pólo negativo. Retirado de Telló *et al.*, 2007.

2.2.2.3 Dose

A dose na eletroterapia tumoral é dada pela intensidade de corrente (âmpere) vezes o tempo de aplicação (segundos), sendo a unidade de medida o Coulomb (C).

Em 1994, Griffin e colaboradores ao usarem a eletroterapia em ratos perceberam uma correlação direta entre a carga aplicada e a regressão do volume tumoral. Estes autores relataram um efeito tóxico relacionado à dose, onde uma carga anódica superior a 10,6 C ou uma carga catódica superior a 21,6 C resultava em 100 % de mortalidade dentro de 24 - 72 h, sendo esta

mortalidade relacionada com o desequilíbrio eletrolítico sérico provavelmente resultante da degradação metabólica do tumor (GRIFFIN *et al.*, 1994).

Em células humanas tumorais também se observa uma redução do crescimento celular proporcional a intensidade e ao tempo de estimulação elétrica (YEN *et al.*, 1999).

Em trabalho publicado no ano de 2000 a efetividade da ETT e a influência da dose aplicada, foram analisadas usando-se ratos com metástase de câncer de cólon no fígado. Aplicando cinco eletrodos de platina, com duas diferentes combinações, o ânodo no centro e quatro cátodos na periferia e vice-versa. Com dose de 60 e de 80 C. Em ambos os casos não houve diferença em relação à localização dos eletrodos. Porém, quase o dobro dos animais teve uma resposta completa quando se aumentou a dose de 60 para 80 C (TURLER *et al.*, 2000).

Outros trabalhos de comparação de dose foram realizados, como o de Ren e colaboradores. Neste foram utilizadas doses de 40 a 100 C para tratar câncer de mama em ratos. No ensaio de sobrevivência, obtiveram como resposta valores menores que 40% ao se usar corrente de 40 C e 60 C. A sobrevivência dos animais tratados aumentou para 70% quando a dose de CE foi aumentada para 80 até 100 C, não havendo recorrência do tumor. O estudo patológico apresentou um efeito significativo na indução de necrose no tumor, com o aumento da dose. Isto leva a conclusão de que a sobrevivência e o percentual de necrose dependem da dose, sendo o ideal, doses acima de 80 C (REN *et al.*, 2001).

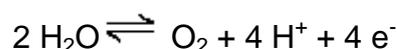
Cabrales e colaboradores, através de modelos matemáticos, reafirmam que a eficácia do tratamento com corrente elétrica depende da dose, do tempo e da susceptibilidade do tumor a ETT (CABRALES *et al.*, 2008).

2.2.2.4 Mecanismo

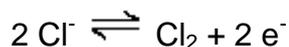
Produtos de eletrólise, variações de pH e eletrosmose

O mecanismo de ação da eletroterapia tumoral ainda não é completamente conhecido, o que impede a sua utilização mais ampla na oncologia clínica. Nordenström chegou a estudar os eventuais mecanismos de destruição da eletroterapia, tendo como respostas alterações no valor do pH, transporte eletrosmótico de água e efeitos no transporte iônico transmembranar (NORDENSTRÖM, 1983, 1984, 1989).

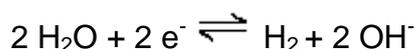
No tratamento eletroquímico as principais reações no ânodo envolvem a formação de oxigênio, a acidificação devido aos íons de hidrogênio liberados, e a formação de cloro (equação 1 e 2). No cátodo, o hidrogênio é formado e íons hidroxila são liberados (equação 3), levando assim, a alcalinização do pH. Esta variação de pH e os produtos de eletrólise formados são responsáveis pela destruição das células após aplicação da corrente elétrica de baixa intensidade.



Equação 1 – Equação de decomposição da água em oxigênio e íons H+. Reação anódica.



Equação 2 – Equação de oxidação do cloreto. Reação que ocorre no ânodo.



Equação 3 - Equação de decomposição da água em hidrogênio e íons hidroxila. Reação que ocorre no cátodo.

Em um estudo, Von Euler e colaboradores verificaram a importância do valor do pH, mimetizando os valores que ocorrem com o uso da corrente elétrica na linhagem celular R3230AC. Como resultado estes valores de pH e o tempo de exposição forneceram efeitos citotóxicos. As células em pH entre 3,5 – 5,0 tiveram sua morfologia alterada, ficaram menores, arredondadas e com a cromatina condensada; já as células em contato com faixas de pH entre 9,0 e 10,0 se apresentaram inchadas e com expansão nuclear. A partir do pH 11,0

ocorre citólise intensa. Além disso, foi observado neste mesmo trabalho que no pH acidificado ocorre um aumento na atividade de caspases-3, o que leva a apoptose, fato que não ocorre no pH alcalino. Tanto o aumento quanto a diminuição do pH inibem a taxa de proliferação celular, porém, a elevação do pH gera apenas a necrose, enquanto, que com a acidificação ocorre também a apoptose (von EULER *et al.*, 2002).

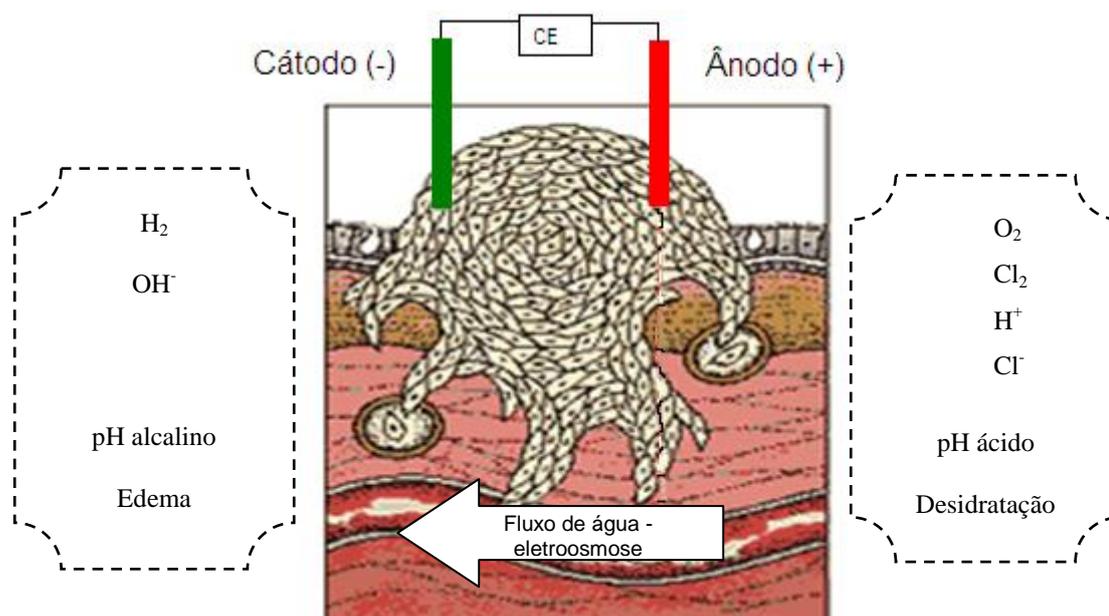


Figura 3 - Esquema da colocação de eletrodos no tumor, formação de produtos de eletrólise e eletrosmose. Adaptado de Weinberg, 1996.

Porém, Veiga e colaboradores verificaram que o efeito citotóxico da ETT não pode ser atribuído exclusivamente à variação de pH (VEIGA *et al.*, 2000). Neste trabalho, os autores mimetizaram os valores de pH induzidos pela CE, acidificando e alcalinizando o meio eletrolítico com HCl e NaOH, respectivamente. No cátodo, com valores mais altos de pH foi verificado um aumento do número de células não viáveis, porém, com a aplicação da CE e consequente variação de pH, a perda de viabilidade foi maior. Para o ânodo a resposta é ainda mais visível e a variação do pH por si só não conseguiu induzir as mesmas taxas de morte nas células tumorais da linhagem P815 (VEIGA *et al.*, 2000).

Vijh em 2004 corroborou para as afirmações acima, verificando que, a estimulação catódica e anódica, induzem uma destruição celular por necrose. Vijh também afirma que o movimento eletrosmótico da água, que vai do ânodo para o cátodo, causando desidratação na área anódica e edema na catódica, contribuem para a necrose (VIJH, 2004).

Durante a eletrólise espécies produzidas no ânodo e no cátodo são transportadas para o tecido circundante por difusão, devido à diferença de concentração. Ocorre migração de espécies carregadas às quais podem reagir com constituintes dos tecidos, formando produtos potencialmente tóxicos. O cloro, por exemplo, reage com a água para formar ácido hipocloroso, este pode reagir com aminoácidos dando origem as cloraminas (VEIGA *et al.*, 2000, 2005). A cloramina é capaz de inibir o ciclo celular, de maneira tempo-dose dependente, induzindo a morte celular, com degradação do DNA típica de apoptose (NAITO *et al.*, 1997).

Veiga e colaboradores descreveram os efeitos inibitórios de compostos clorados, gerados pela corrente elétrica, na proliferação de células leucêmicas humanas (linhagem HL60). O estímulo anódico foi capaz de induzir apoptose e necrose celular em células leucêmicas humanas HL60, enquanto que o estímulo catódico originou lise celular e necrose, mas não a apoptose (VEIGA *et al.*, 2005).

A presença de cloreto é essencial para a atividade letal da corrente elétrica, pois, quando células bacterianas são eletroestimuladas em meio sem cloreto, não se observa a perda de viabilidade (VEIGA *et al.*, 2000). Além disso, o(s) composto(s) responsável(is) pela morte celular tem efeito residual, já que, adicionando meio tratado em bactérias não tratadas, ainda ocorre, em menor porcentagem, morte celular (PAREILLEUX & SICARD, 1970).

Temperatura

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; TELLÓ *et al.*, 2004).

Alterações morfológicas e bioquímicas

Outro possível mecanismo de ação da ETT envolve as alterações celulares morfológicas que incluem: alteração de carboidratos presentes na superfície celular; aparecimento de *blebs*; rupturas na membrana plasmática; alterações nas mitocôndrias; inchaço celular; rarefação da matriz extracelular; formação de debris e condensação da cromatina (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000). Estes danos celulares foram detectados em diferentes linhagens celulares, inclusive em uma linhagem leucêmica resistente a múltiplas drogas (K562 – Lucena 1). Neste último tipo celular, Holandino e colaboradores avaliaram a atividade e a expressão da glicoproteína P e verificaram que a estimulação elétrica não modifica esta glicoproteína de membrana (HOLANDINO *et al.*, 2001).

Danos vasculares

A aplicação de CE também promove danos vasculares na região tumoral, diminuindo a perfusão sanguínea e a oxigenação e, conseqüentemente, a nutrição do tumor (JARM *et al.*, 2003).

2.2.2.5 Aplicação em animais e em humanos

Vários têm sido os trabalhos publicados mostrando os resultados positivos da ETT para o tratamento de tumores, tanto humanos quanto animais (TAYLOR *et al.*, 1994; WEMYSS-HOLDEN *et al.*, 2000; FOSH *et al.*, 2003; von EULER *et al.*, 2003; MORRISON *et al.*, 2004; TELLÓ *et al.*, 2007). Como dito anteriormente, a eletroterapia ganhou espaço na China, onde muitos pacientes foram tratados por este método (XIN *et al.*, 1998).

Em 2001, em um artigo de von Euler e colaboradores, foram comparados os efeitos de cargas diferentes de CE (5 a 10 C) em tecidos normais de ratos (von EULER *et al.*, 2001). Os resultados obtidos com os tecidos mamários e hepáticos indicaram que a estimulação elétrica induziu um padrão semelhante de alterações, independente do tipo de tecido e da intensidade aplicada. Estes resultados indicam que o padrão destrutivo

causado pelo tratamento parece ser o mesmo observado em tumores tratados com CE (von EULER *et al.*, 2001).

Animais de médio porte também são utilizados em trabalhos com ETT, como observado no trabalho de von Euler e colaboradores. Nesse estudo foram aplicadas doses de 5, 10 ou 90 C em tumores de cães e ratos. Os autores relatam uma destruição tecidual do tumor dose-dependente (von EULER *et al.*, 2003).

O alvo principal da eletroterapia são os tumores sólidos externos, porque estes permitem a inserção direta dos eletrodos garantindo uma aplicação localizada. Porém, Wemyss-Holden e colaboradores verificaram a possibilidade de usar a eletroterapia em tecidos internos ao corpo, usando como modelo, ratos e tendo auxílio de um equipamento de ultrasonografia para guiar a colocação do eletrodo no tumor no fígado dos animais. Neste trabalho, os autores demonstraram a segurança deste método e relataram apenas uma oclusão vascular, a qual não causou morbidade ou mortalidade nos animais (WEMYSS-HOLDEN *et al.*, 2000).

Em Cuba, pacientes foram tratados com eletroterapia tumoral. Quatro pacientes foram tratados, sendo três do sexo feminino, duas com carcinoma ductal invasor e uma com lipossarcoma, além de um paciente do sexo masculino com metástase ganglionar. Todos eram pacientes em estado avançado da progressão do câncer, impossibilitados de serem operados, nem tão pouco poderiam receber quimioterapia ou radioterapia. O tratamento foi realizado com eletrodos de platina, com carga entre 80 e 100 C. O número de eletrodos foi calculado caso a caso, sendo a distância entre eles de 2 cm.

Como resultado, os quatro pacientes toleraram bem as sessões de tratamento. Após a eletroterapia, no local de aplicação apareceram células com aspecto amorfo e granular, típico padrão de necrose, além da presença de líquido purulento. Em uma das pacientes com carcinoma ductal obteve-se 80 % de redução do volume do tumor após sete meses da aplicação e para a outra paciente, pelo mesmo tempo, a redução foi de 90 %. O paciente com metástase ganglionar no sétimo mês após a ETT teve um decréscimo de 90 % do volume do tumor, porém outra metástase apareceu e o paciente não resistiu

e faleceu. A quarta paciente com lipossarcoma faleceu 6 meses após a aplicação por complicações da doença (JARQUE *et al.*, 2007).

2.2.2.6 Efeitos colaterais

Nordenström, em seu livro publicado em 1983, relata que a terapia com corrente elétrica não induziu mortes e, que, como efeitos colaterais observou em seus pacientes, apenas febre passageira e dor local, durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1983).

Em experimentos realizados com ratos, foi observado que nenhum animal morreu em consequência da eletrólise e, além disso, todos os animais ganharam peso no pós-operatório. Entretanto, as enzimas hepáticas se apresentaram elevadas após o tratamento, com retorno aos níveis normais, após uma semana. Dois dias após a eletrólise, a área de aplicação dos eletrodos apresentou uma necrose coagulativa que, em seis meses, levou a uma pequena cicatriz fibrosa (WEMYSS-HOLDEN *et al.*, 2000).

Jarque e colaboradores ao tratar os pacientes com ETT obtiveram como efeitos colaterais, eritema e edema na área tratada; secreção fétida em um dos pacientes tratados; moderada dor de cabeça ao tratar o tumor no pescoço e dor moderada na parede posterior do tórax, ao tratar a região escapular (JARQUE *et al.*, 2007).

2.2.2.7 Limitações

A ausência de conhecimentos acerca de seus mecanismos de ação impede sua ampla utilização na clínica médica.

2.2.2.8 Vantagens

Clinicamente a ETT tem demonstrado ser uma terapia segura, efetiva, de baixo custo quando comparada a tratamentos usuais, com possibilidade de uso em pacientes que não respondem a tratamentos convencionais e facilidade no manuseio do equipamento (TELLÓ *et al.*, 2004).

2.2.2.9 Eletroquimioterapia

A eletroterapia também pode ser associada a fármacos quimioterápicos antineoplásicos, técnica que recebe o nome de eletroquimioterapia (EQT). Porém, neste procedimento a corrente utilizada é em forma de pulsos que aumentam a permeabilidade do tumor à droga. Os antineoplásicos cisplatina e bleomicina, fármacos hidrofílicos, são os mais utilizados na EQT, por via intravenosa ou intratumoral (PARISE *et al.*, 2008). O principal mecanismo da eletroquimioterapia é a eletroporação das células tumorais (Figura 4). O pulso elétrico intenso, aplicado localmente, torna a membrana celular mais permeável a moléculas, que de outra forma, não entrariam com facilidade na célula por não terem mecanismos de transporte apropriado. Este processo aumenta a eficácia da droga; além disso, o fármaco pode ser concentrado na região tumoral, visando minimizar os efeitos colaterais sistêmicos (SERSA *et al.*, 2009).

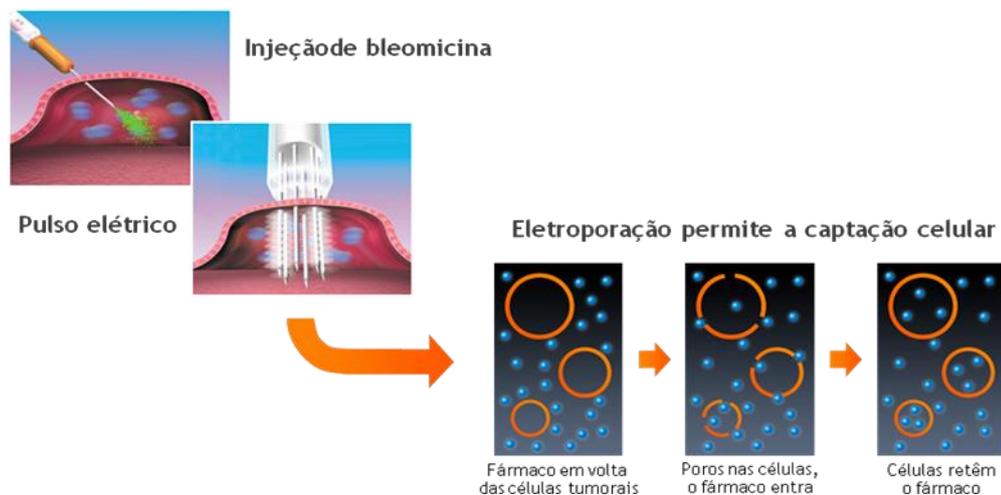


Figura 4 - Esquema da eletroporação em células. Aplicação da eletroporação por pulsos elétricos, induzindo a abertura dos poros da membrana celular, aumentando a absorção de bleomicina. Adaptado de <http://www.inovio.com/technology/howelectroporationworks.htm>.

Um estudo multi-institucional foi realizado por quatro centros de pesquisa para o câncer, reunidos no projeto ESOPE (*European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy*) e os resultados confirmaram que a eletroquimioterapia é eficaz no tratamento de nódulos tumorais cutâneos e subcutâneos em taxa de 85 % de resposta, independente da histologia do tumor, das drogas utilizadas (bleomicina, cisplatina) ou da via de administração empregada. A eletroquimioterapia está sendo usada em cerca de 40 centros de câncer na Europa e nos Estados Unidos (MARTY *et al.*, 2006).

Sersa e seu grupo verificaram, a partir de um apanhado de estudos clínicos e pré-clínicos com ETT, que a resposta ao tratamento para vários tumores, predominando melanoma, foi de 75% com resposta completa e 10% com resposta parcial, quando os tumores foram tratados. Além disso, concluiu que a eletroquimioterapia é um novo método para o tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos, tendo como vantagens: a eficácia em tumores com diferentes histologias; a facilidade de aplicação e mínimos efeitos colaterais (SERSA *et al.*, 2008).

A EQT em cães e gatos tem sido aplicada também em trabalhos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a coordenação do Prof. Marcos Telló. Nestes estudos se obteve como principais respostas: inflamação

e necrose local; abundante quantidade de macrófagos no local estimulado; aumento do volume dos nódulos devido ao edema, com subsequente aparecimento de focos de necrose. A destruição das células neoplásicas foi confirmada por exames citopatológicos, onde cerca de 70 % dos animais tiveram resposta completa ao tratamento (TELLÓ *et al.*, 2007).

Na sequência, dos estudos com animais, iniciou-se um ensaio clínico de Fase I, no Hospital Sírio Libanês, Brasil. Os quatro pacientes incluídos possuíam recidiva de tumores malignos após tratamento padrão, ou seja, após uso de cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. O fármaco utilizado junto com a EQT foi a bleomicina. Como resultados, três pacientes apresentaram resposta parcial e um paciente resposta completa (TELLÓ *et al.*, 2007).

O processo e o equipamento para aplicação de corrente elétrica contínua monopolar de baixa intensidade associada ou não à quimioterapia para o tratamento de tumores já possui patente registrada (número PI0601668-5).

Como efeito colateral da eletroquimioterapia, pode-se citar uma contração muscular involuntária no instante do pulso elétrico, geralmente indolor, porém desconfortável (GOTHELF *et al.*, 2003).

2.3 A PRESERVAÇÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA

O papel biológico desempenhado pelas moléculas de DNA exige que elas possuam duas propriedades fundamentais: a auto-replicação e a preservação da informação genética. Para que o conteúdo informacional do DNA seja preservado e corretamente transmitido, de geração em geração, é essencial que haja fidelidade na replicação semiconservativa e que existam mecanismos capazes de reparar modificações estruturais produzidas no material genético por agentes físicos ou químicos (LEITÃO *et al.*, 2005). Com estes reparos, mutações ou alterações na estrutura do material genético da célula são evitadas.

Mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético, que pode ser espontânea ou induzida. As mutações podem ser gênicas quando alteram a estrutura do DNA, ou seja, alteram uma ou mais bases, afetando a leitura durante a replicação ou durante a transcrição, ou cromossômicas, quando alteram a estrutura ou o número de cromossomos, (LEITÃO *et al.*, 2005).

Um composto é dito mutagênico quando é capaz de aumentar a taxa de mutação em um organismo, além da espontânea; além disso, muitos compostos potencialmente mutagênicos podem ser carcinogênicos, ou seja, podem induzir o câncer. Nas últimas décadas, inúmeros argumentos experimentais foram obtidos indicando o papel desempenhado por lesões produzidas no DNA por agentes causais de mutações, no desenvolvimento de diversos tipos de câncer, no aparecimento de más-formações congênitas e de outros processos patológicos (LEITÃO *et al.*, 2005). A determinação do efeito carcinogênico potencial de produtos e tratamentos em animais é lenta e dispendiosa; assim, como a maioria dos agentes causadores de tumores é mutagênica, o efeito carcinogênico potencial de produtos pode ser convenientemente avaliado pela sua capacidade em causar mutações (WATSON *et al.*, 2006).

A genotoxicidade descreve uma ação deletéria sobre o material genético de uma célula que afeta a sua integridade. Um composto é dito genotóxico quando é capaz de causar modificações no genoma de um ser vivo (LEITÃO *et al.*, 2005).

2.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO

Devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, este agente tem potencial para danificar o DNA em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou microbiana). Porém, organismos diferentes possuem metabolismos e mecanismos de reparação e detoxificação que variam, tornando também, diferentes suas respostas aos agentes genotóxicos e mutagênicos. As estratégias de avaliação levam a extrapolação de dados

entre diferentes organismos, o que torna difícil a avaliação de risco.

Assim, vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de detectar o potencial genotóxico e mutagênico de agentes físicos, químicos e biológicos. Pode-se realizar estes testes em bactérias, leveduras, em fagos, plasmídeos, em cultura de linfócitos de sangue periférico humano, em células de medula óssea de camundongos e em células humanas (MACGREGOR, CASCIANO & MULLER, 2000).

As bactérias são fundamentais para a realização dos testes *in vitro*. Apesar de existir controvérsia sobre os valores exatos previsíveis para as alterações que podem ocorrer na estrutura genética, os dados obtidos, deixam claro que existe uma correlação entre a genotoxicidade/mutagenicidade em procariotos e eucariotos. Ames e McCann (1981), em uma discussão sobre esses dados, estimaram que esta correlação seja de aproximadamente 83%, quando usado o teste de Ames. Os mesmos autores relatam a vantagem de se utilizar testes *in vitro* que podem ser facilmente adaptados e melhorados, à medida que se aprende mais sobre o metabolismo e os danos ao DNA (AMES & MCCANN, 1981).

Estes testes levam a confirmação ou não do potencial mutagênico e/ou genotóxico de um agente físico ou químico, pela verificação de erros que este agente pode acarretar no material genético da célula. Em contato com o material celular, estes agentes podem levar a modificações no DNA, que podem ser processadas de diferentes formas (Figura 5):

- Reparação correta, com garantia de preservação da informação;
- Reparação incompleta ou ausente, com perda da atividade biológica do DNA;
- Reparação errada, que gera uma mutação.

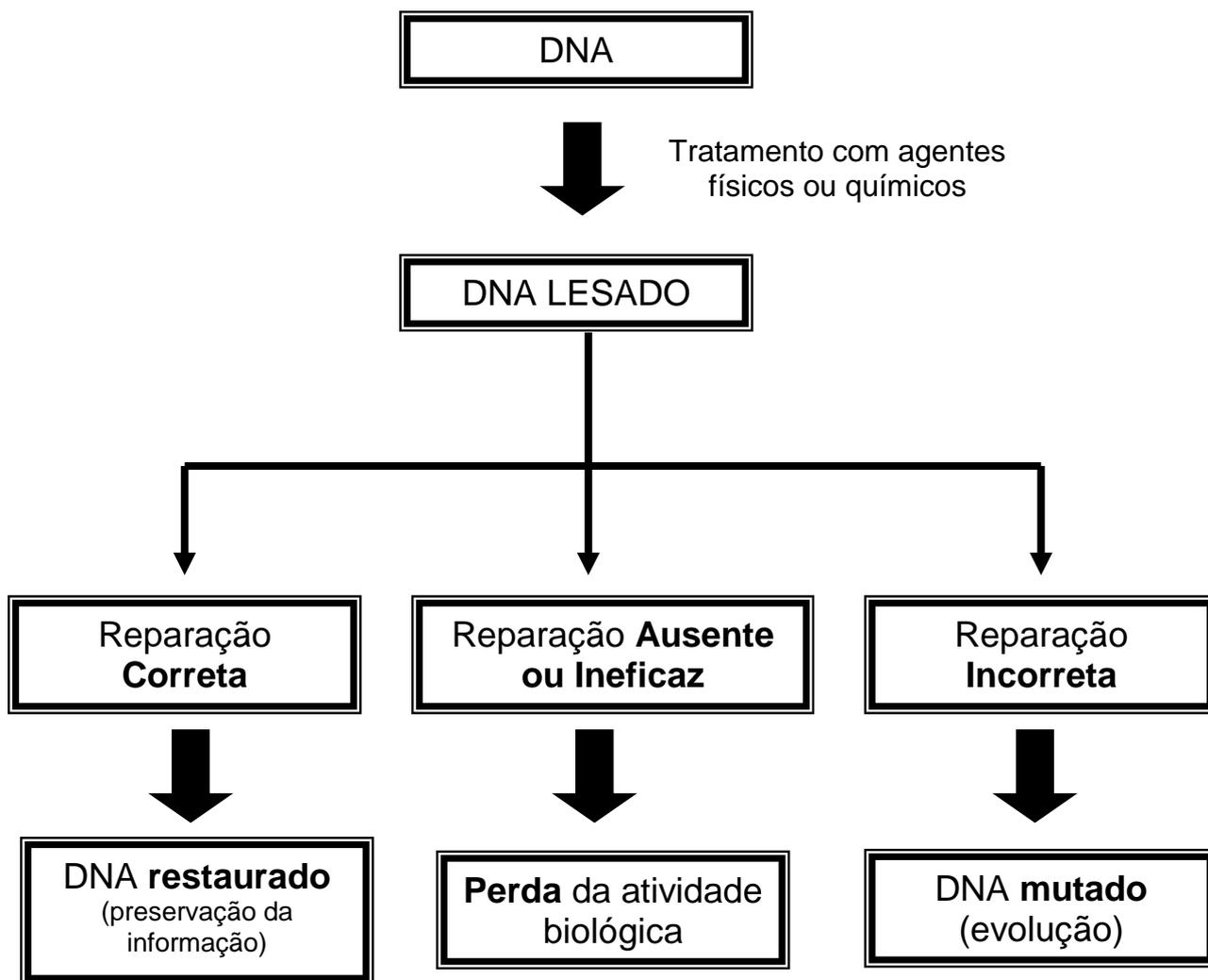


Figura 5 – Fluxograma de possibilidades de reparo do DNA quando submetido a tratamentos com agentes físicos ou químicos. Adaptado de Leitão *et al.*, 2005.

Erros na replicação podem ocorrer espontaneamente, mas, ao final, são bastante raros dada a existência de mecanismos capazes de impedi-los ou corrigi-los. Além das diferenças de afinidade das bases nitrogenadas [formação preferencial de pares entre adenina e timina (A: T) ou entre citosina e guanina (C: G)], vistas na Figura 6, a atuação seletiva da DNA polimerase (Pol) e sua capacidade exonucleolítica que elimina nucleotídeos incorretamente inseridos, evita grande parte dos erros de emparelhamento.

Em *Escherichia coli*, a DNA polimerase III (Pol III), responsável pela replicação semiconservativa; é uma enzima constituída de 10 proteínas cuja atividade de exonuclease se encontra na subunidade épsilon (ϵ), codificada

pelo gene *dnaQ* (*mutD*). Em células humanas, o complexo de replicação é composto pelas DNA polimerases alfa ($Pol\alpha$), delta ($Pol\delta$) e épsilon ($Pol\epsilon$), sendo que a atividade de exonuclease encontra-se nas duas últimas (ALBERTS *et al.*, 1997).

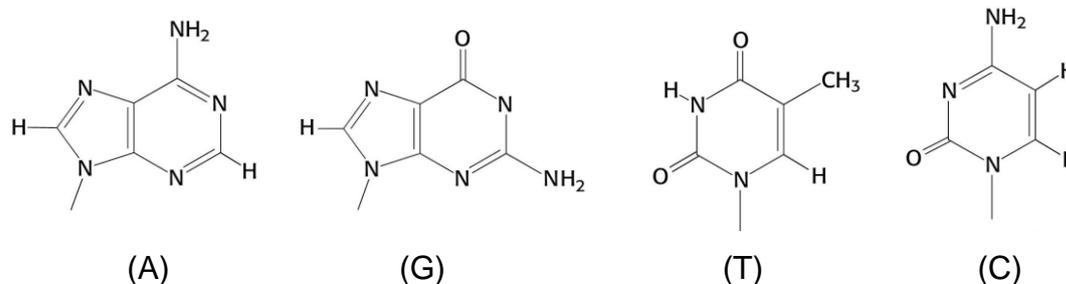


Figura 6 – Nucleotídeos que compõem o DNA. Bases purínicas: (A) adenina, (G) guanina; bases pirimidínicas: (T) timina e (C) citosina.

2.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS MECANISMOS DE REPARO DO DNA

Em uma célula normal existem diversos mecanismos de reparo do DNA com a função de eliminar os mais diferentes tipos de lesões que ocorrem espontaneamente ou como consequência da exposição da célula a agentes físicos ou químicos. A célula deve vasculhar o genoma para detectar erros de síntese e lesões no DNA e depois tentar corrigi-los, de tal forma, que sempre que possível, a sequência do DNA original deve ser restaurada.

Estes erros de pareamentos são detectados e corrigidos através de um sistema de reparo. Na replicação celular este sistema deve primeiro verificar o genoma atrás de pareamentos errados e depois corrigi-los de forma precisa. Na bactéria *Escherichia coli* os mal pareamentos são detectados por um dímero da proteína de reparo, chamado MutS, que vasculha o DNA reconhecendo os pareamentos incorretos a partir de distorções que estes provocam. Este complexo de MutS com o DNA recruta a MutL, uma segunda proteína que compõe o sistema de reparo. A MutL, por sua vez, ativa a MutH, uma enzima que promove quebra em uma das fitas, próximo ao sitio de mal

pareamento. O efeito geral é a remoção do pareamento errado e a substituição pelo nucleotídeo que forma corretamente o par de bases. As células eucarióticas apresentam proteínas homólogas a MutS (chamadas MSH) e MutL (MLH e PMS) para corrigir estes erros (WATSON *et al.*, 2006).

As mutações incluem alterações mais simples, como alteração na sequência do DNA ou mais drásticas, como inserções, deleções ou rearranjos na estrutura do cromossomo. As mais simples são a substituição de uma base por outra, podendo ser uma purina por outra ou uma pirimidina por outra, podendo também haver troca de uma purina por uma pirimidina e vice-versa. O DNA também é vulnerável a danos por alquilação, oxidação e radiação, por análogos de base (compostos que substituem as bases normais) e agentes intercalantes (compostos que se inserem entre as bases) (ALBERTS *et al.*, 1997).

Para se proteger destas alterações, as células desenvolveram mecanismos elaborados para identificar e corrigir as lesões, antes que estas provoquem o bloqueio da replicação ou uma mutação. Sem tais mecanismos as células não sobreviveriam por muito tempo.

Os mecanismos de reparo podem ocorrer de forma direta, onde, uma enzima de reparo reverte a lesão por excisão e o nucleotídeo danificado não é corrigido e sim removido do DNA, podendo ocorrer a remoção apenas do nucleotídeo ou de um pequeno segmento de DNA de fita simples que contém a lesão.

O reparo de forma direta pode ocorrer de uma forma mais sofisticada, pelo reparo recombinacional, que ocorre quando ambas as fitas estão danificadas e uma fita não pode servir de molde para outra sendo a informação da sequência extraída de uma segunda cópia do cromossomo (ALBERTS *et al.*, 1997).

Também podem ocorrer lesões que não são corrigidas e impedem a progressão da DNA polimerase. O mecanismo que desvia a maquinaria de replicação desses sítios de lesão é conhecido como síntese translesão (ALBERTS *et al.*, 1997).

Os mecanismos de reparo do DNA são, em geral, dependentes dos

produtos de diversos genes e se caracterizam por possuírem várias etapas, possibilitando vias alternativas, muitas vezes coexistentes e competitivas. A seguir seguem as considerações gerais dos principais tipos de reparo.

2.5.1 Reparos pela simples reversão da lesão

Estas reversões simples podem ser do tipo fotorreativação, que reverte dímeros de pirimidina (fusão fotoquímica de duas timinas em posições adjacentes na mesma cadeia polinucleotídicas), resultantes da irradiação ultravioleta. A enzima DNA-fotoliase captura a energia luminosa e a utiliza para quebrar as ligações covalentes que ligam as pirimidinas adjacentes (Figura 7). Outro exemplo de reversão direta é a remoção do grupo metil da base O⁶-metilguanina (o oxigênio do átomo de carbono 6 da guanina é sítio vulnerável para ação de agentes alquilantes, formando a O⁶-metilguanina que realiza pareamento errôneo com a timina), através de uma metil-transferase.

Mais um exemplo de simples reversão da lesão é o sistema conhecido por sistema GO, presente em *Escherichia coli*, o qual previne a mutagênese causada por 8-oxoG. A 8-oxoguanina (8-oxoG) é uma das lesões oxidativas que ocorrem por ataque de espécies reativas de oxigênio, levando a oxidação do carbono 8 do anel imidazol da guanina, e assim, esta pode parear tanto com adenina, quanto com citosina, tendo, portanto potencial mutagênico. Três proteínas estão envolvidas na prevenção dos efeitos mutagênicos de tal lesão, a proteína MutT, a MutM e a proteína codificada pelo gene *mutY* (WATSON *et al.*, 2006).

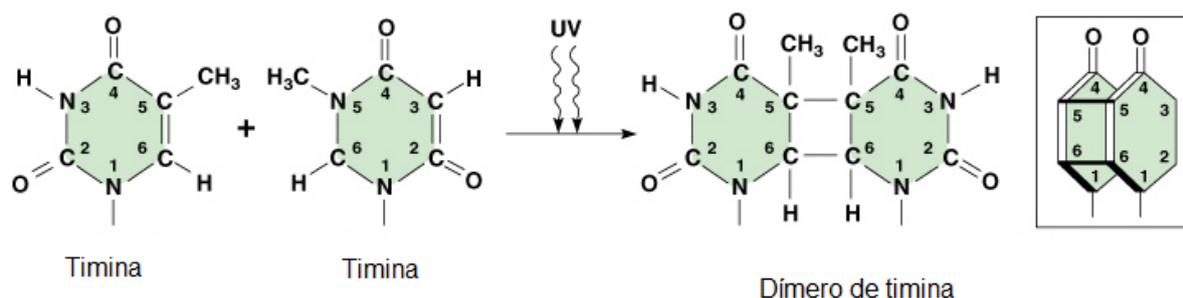


Figura 7. Formação de dímeros de pirimidina. Esquema mostrando duas bases timinas sofrendo irradiação com luz ultravioleta e posterior formação do dímero de pirimidina. Adaptado de Russell, 2005.

2.5.2 Mecanismo de reparo por excisão de base

As bases danificadas do DNA podem ser removidas pelo mecanismo de excisão de base, onde a enzima glicosilase reconhece e remove a base danificada através de hidrólise da ligação glicosídica. Em seguida, a fita é restaurada pela DNA polimerase e DNA ligase ou pela excisão de nucleotídeos, onde as enzimas não reconhecem a lesão, mas sim, distorções na dupla hélice. Este reconhecimento desencadeia uma série de eventos que levam a remoção do pequeno segmento de fita simples que depois é preenchida pela DNA polimerase (ALBERTS *et al.*, 1997).

2.5.3 Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos

O reparo por excisão de nucleotídeos em *Escherichia coli* é realizado basicamente por quatro proteínas: UvrA, UvrB, UvrC e UvrD. O complexo UvrA-UvrB verifica o DNA, sendo a UvrA responsável pela detecção de distorções na hélice. Encontrando a distorção, a UvrA sai do complexo e a UvrB separa o DNA, criando uma bolha de fita simples ao redor da lesão. A seguir, UvrB recruta UvrC e esta promove cortes produzindo um DNA de fita simples, com cerca de 13 nucleotídeos, que se torna acessível pela ação da UvrD. Finalmente, a DNA polimerase e a DNA ligase preenchem a lacuna resultante (Figura 8).

O princípio de reparo por excisão de nucleotídeos em células superiores é muito parecido com o da *Escherichia coli*, mas, a maquinaria para detecção, excisão e reparo da lesão é mais complicada, envolvendo 25 ou mais polipeptídeos.

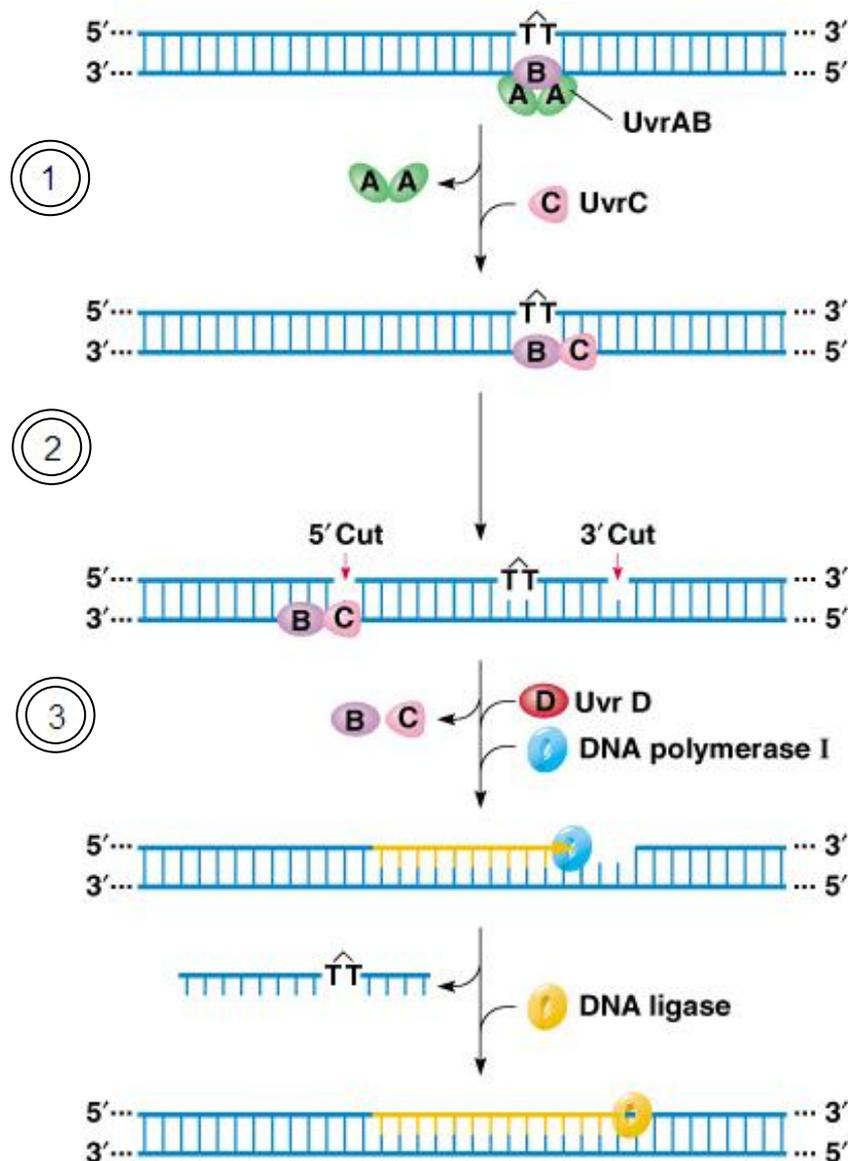


Figura 8. Reparo por excisão de nucleotídeos de dímero de pirimidina. (1) Complexo UvrA-UvrB verifica o DNA, UvrB separa o DNA, (2) UvrC promove cortes produzindo um DNA de fita simples que se torna acessível pela ação da UvrD, (3) DNA polimerase e DNA ligase preenchem a lacuna resultante. Adaptado de Russell, 2005.

2.5.4 Mecanismo de reparo recombinacional

O mecanismo de reparo de recombinação lida com quebras de fita dupla (DSB – *Double Strand Break*) do DNA. Este mecanismo de correção é dividido em dois tipos: a) Recombinação Homóloga (HR) e b) Recombinação não-Homóloga (NHEJ -*Non-Homologous End-Joining* ou ligação de extremidades não coesivas), processo utilizado com maior frequência em mamíferos. Nessa via de reparo, as extremidades do cromossomo que sofreu quebra dupla são justapostas e religadas, com a possível perda de um ou dois nucleotídeos no local da ligação. Em outros organismos, quebras duplas são normalmente reparadas por meio de recombinação homóloga, utilizando a informação contida no cromossomo homólogo não danificado. O NHEJ é uma forma rápida de reparo, porém tem maior tendência a erro, ao contrário da recombinação homóloga (LEITÃO *et al.*, 2005).

2.5.5 Reparo por translesão

Outro mecanismo conhecido é o de síntese de translesão, que é catalisado por uma classe de DNA polimerases que sintetizam o DNA diretamente sobre o sítio de dano. A síntese translesão em *Escherichia coli* é realizada por um complexo das proteínas UmuC (família de DNA polimerases) e UmuD. Estas polimerases, embora dependam de um molde, podem incorporar nucleotídeos independentemente do pareamento de bases. Esta síntese é altamente sujeita a erros, sendo considerada um sistema de último recurso. Em *Escherichia coli* a polimerase translesão não está presente em circunstâncias normais. Assim, os genes que codificam a polimerase translesão são expressos como parte de um sistema conhecido como resposta SOS, onde o repressor LexA controla a expressão de genes que codificam UmuC e UmuD (LEITÃO *et al.*, 2005).

2.5.6 Sistema SOS

O sistema SOS também é um mecanismo de reparo constituído por mais de 20 genes, distribuídos por todo o cromossomo de *Escherichia coli*. A expressão destes ocorre em resposta ao surgimento de danos no DNA, ativando vários mecanismos de reparo e de tolerância a lesões.

A expressão dos genes SOS é bloqueada em condições fisiológicas pela ação do repressor *lexA*. Uma vez que o sinal indutor (regiões de DNA em fita simples gerada pela tentativa de replicação de moldes danificados ou pela interrupção da replicação normal) está presente na célula, este interage com a proteína *RecA*, fazendo com que a mesma passe a um estado ativado (*RecA**). Neste estado, tal proteína possui atividade co-proteolítica, capaz de induzir a autoclivagem do repressor *LexA*. Desta maneira, os genes reprimidos por *LexA* passam a ser transcritos. Dentre estes estão os próprios genes *recA* e *lexA*. Quando o sinal indutor cessa, a proteína *LexA* não é mais clivada, e se liga a seus sítios de DNA, reprimindo novamente a expressão dos genes SOS (Figura 9).

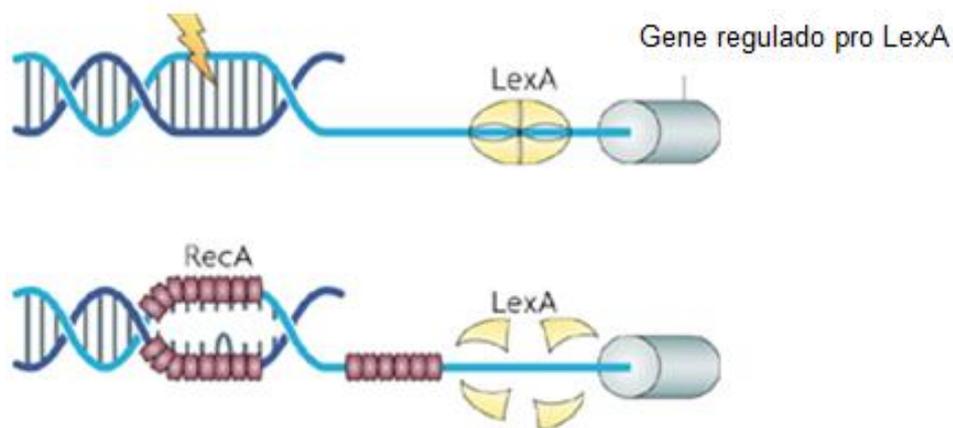


Figura 9. Ativação do sistema de reparo SOS. Uma exposição a algum agente que danifique o DNA pode levar à indução do sistema SOS. A proteína *RecA* é ativada na presença de nucleotídeos livres, estimulando a autoclivagem do repressor *LexA*. Com a clivagem do repressor são produzidas enzimas de reparo, inibidores da divisão celular (para evitar a transmissão do DNA para as células filhas), entre outros. Depois, de completo o reparo do DNA *LexA* é restaurado voltando a atuar como repressor. Adaptado de Justice, *et al.*, 2008.

A proteína RecA é uma enzima multifuncional que desempenha diversas funções celulares, principalmente quando ocorrem lesões. A rápida elevação da expressão do gene *recA*, em resposta a danos no DNA, pode ser utilizada como um teste para verificar se o composto é ou não genotóxico (FLEGROVÁ *et al.*, 2008).

Neste trabalho escolhemos o mutante *uvrA*, pela sua sensibilidade a lesões que provocam distorções na molécula de DNA e o mutante *recA* pela sua sensibilidade a pequenas lesões de, praticamente, qualquer natureza. A diferença de sensibilidade destas mutantes, comparada à cepa selvagem, pode ser um indicativo de um efeito genotóxico da CE.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial mutagênico e genotóxico da corrente elétrica contínua de baixa intensidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a citotoxicidade da CE em cepas selvagens e deficientes em mecanismos de reparo;
- ✓ Avaliar o potencial mutagênico da CE pelo ensaio de resistência a rifampicina em cepa selvagem de *Escherichia coli*;
- ✓ Verificar a citotoxicidade em eucariotos através da aplicação de CE em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico a partir do reparo das lesões, causadas pela CE, em bacteriófagos λ e pelo ensaio de indução lisogênica;
- ✓ Estudar a morfologia de *Escherichia coli* estimulada com CE por microscopia eletrônica de transmissão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico	- Corning PC-351 Hot Plate Stirrer
Balança analítica	- Denver Instrument Company – AA-160
Espectrofotômetro	- Bausch & Lomb Spectronic 70
Fonte de corrente elétrica contínua	- Instruterm – FA-3050
Homogeneizador Vortex	- Clay Adams Cyclo-Mixer
Microscópio eletrônico de transmissão	- Morgani 26z8 da FEI 80 kV
Multímetro digital	- Icel – MD-6500
Potenciômetro	- Mettler Toledo MPC227
Radiômetro UV (Fotocélula)	- VLX-3W, Vilber Lourmat
Ultracentrífuga refrigerada	- DuPont Sorvall Rc-5B Refrigerated

4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS

4.2.1 Preparo do Meio Lysogeny-Broth (LB) Líquido

NaCl	- 10,0 g	(Merck)
Bacto triptona	- 10,0 g	(Difco Laboratories)
Extrato de levedura	- 5,0 g	(Difco Laboratories)
Água destilada qsp.	- 1000 mL	

Autoclavar por 30 min a 120 °C e armazenar em frasco de vidro estéril à temperatura ambiente.

4.2.2 Preparo do Meio Lysogeny-Broth (LB) Sólido

Foi acrescentado ao meio LB líquido, ágar na concentração de 1,5 % (Difco Laboratories). Em alguns casos foi acrescentado ágar na concentração de 0,75 %. O meio foi autoclavado por 30 min a 120 °C e armazenado em frasco de vidro estéril à temperatura ambiente.

4.2.3 Preparo do Top-ágar

NaCl	- 8,0 g	(Merck)
Ágar Difco	- 7,0 g	(Difco Laboratories)
Água destilada qsp	- 1000 mL	

Autoclavar por 30 min a 120 °C e armazenar em frasco estéril de vidro à temperatura ambiente.

4.2.4 Preparo do Tampão M9

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	- 6,0 g	(QEEL-Química)
KH ₂ PO ₄	- 3,0 g	(Reagen-Quimibrás)
NaCl	- 0,5 g	(Reagen-Quimibrás)
NH ₄ Cl	- 1,0 g	(Reagen-Quimibrás)
Água destilada qsp	- 1000 mL	

Autoclavar por 30 min a 120 °C. Após autoclavagem do tampão M9, adicionar 100 µL de MgSO₄ 7.H₂O (Merck) 1mM e 100 µL CaCl₂ (Merck) 0,1mM a cada 100 mL de tampão. Armazenar em frascos estéreis de vidro à temperatura ambiente.

4.2.5 Preparo do Tampão PBS (Tampão salina fosfato)

Na ₂ HPO ₄	- 1,4 g	(QEEL-Química)
KH ₂ PO ₄	- 0,2 g	(Reagen-Quimibrás)
NaCl	- 8,0 g	(Reagen-Quimibrás)
KCl	- 0,2 g	(Reagen-Quimibrás)
Água destilada qsp	- 1000 mL	

O pH da solução deve ser ajustado, quando necessário, para 7,4 com NaOH 0,1 N. Distribuir a solução em recipientes de vidro fechados e autoclavar durante 30 min, a 120 °C. Após o resfriamento os frascos devem ser mantidos a 4 °C.

4.2.6 Solução de Sulfato de Magnésio 10⁻² M

MgSO ₄ . 7H ₂ O	- 2,4 g	(Merck)
Água destilada qsp	- 1000 mL	

Após completa dissolução, distribuir em frascos de vidros e autoclavá-los por 30 min, a 120 °C. Após autoclavagem os frascos devem ser mantidos à temperatura ambiente.

4.2.7 Preparo do Meio YPG (Yeast Peptone Glucose Media líquido)

Glicose	- 20,0 g	(Merck)
Bacto peptona	- 10,0 g	(Difco Laboratories)
Extrato de levedura	- 10,0 g	(Difco Laboratories)
Água destilada qsp	- 1000 mL	

Preparar e autoclavar a solução de glicose 20 %, separadamente, em um volume final de 100 mL. Após autoclavagem por 30 min, a 120 °C, acrescentar a glicose ao meio e armazenar em frascos de vidro estéreis à temperatura ambiente.

4.2.8 Preparo do Meio YPG sólido

Acrescentar ao meio YPG líquido, ágar, na concentração de 2,0 % (Difco Laboratories). Autoclavar por 30 min, a 120 °C e armazenar em frasco de vidro estéril à temperatura ambiente.

4.3 BACTÉRIAS, LEVEDURAS, BACTERÍOFAGOS

4.3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas, nos experimentos, cepas bacterianas derivadas de *Escherichia coli* K12 e *Escherichia coli* B. No quadro 1 encontram-se relacionadas todas as cepas.

Quadro 1 - Cepas de *E. coli* utilizadas neste trabalho

Designação	Caráter genético relevante	Apresenta
AB1157	Selvagem	
AB1886	<i>uvrA6</i>	Deficiência no reparo por excisão
AB2463	<i>recA13</i>	Deficiência no reparo recombinacional
RJF013	<i>ampR</i>	Gene que confere resistência à ampicilina
WP2s(λ)	<i>uvrA</i>	Deficiência no reparo por excisão; fago λ

Os antibióticos foram acrescentados aos meios de cultivo, das cepas bacterianas resistentes (Quadro 2).

Quadro 2 - Antibióticos utilizados neste trabalho. Fornecedor Sigma-Aldrich.

Antibiótico	Cepa	Concentração final
Estreptomicina	AB1157, AB1886, AB2463	100 μ g / mL
Ampicilina	RJF013	20 μ g/mL

4.3.2 Bacteriófagos

A obtenção dos bacteriófagos, agentes virais que infectam bactérias, foi realizada a partir de seu crescimento na linhagem bacteriana indicadora, AB1157 (selvagem), conforme descrito no item 4.9.1.

4.3.3 Cepa de levedura

Foi utilizada, nos experimentos, a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (tipo selvagem).

4.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

4.4.1 Cepas bacterianas

As cepas utilizadas neste estudo foram mantidas em estoques tipo *slantes*, que consistem de meio LB suplementado com timina 50 µg/mL e solidificado com ágar 0,75 %, à temperatura ambiente. Para utilização frequente das cepas, as culturas foram transferidas dos *slantes* com auxílio da alça de platina, para Erlenmeyers contendo meio LB líquido com o antibiótico apropriado, mantidas a 37 °C, sob agitação por 24 horas e então transferida, para criovials com glicerol 85 % (Merck), na proporção de 1:1. As cepas bacterianas foram mantidas nestas condições em estoque, sob refrigeração de -70 °C.

4.4.2 Cepa de levedura

A cepa utilizada neste estudo foi mantida em estoque tipo *slantes*, que consiste de meio YPG solidificado com ágar 0,75 %, à temperatura ambiente. Para uso freqüente a cepa foi crescida a 30 °C sob agitação, até a fase estacionária e então transferida para *criovails* contendo glicerol 85 % (Merck) e assim sob refrigeração, à temperatura de -70 °C.

4.4.3. Bacteriófagos λ

Os bacteriófagos produzidos e titulados foram mantidos em *criovails* numa faixa de temperatura entre 2 a 8 °C, em solução de sulfato de magnésio 10^{-2} M.

4.5 OBTENÇÃO DAS CULTURAS PARA EXPERIMENTOS

4.5.1 Cepas bacterianas

Para obter as culturas de bactérias utilizadas nos experimentos foram transferidas alíquotas, com auxílio de pipeta de microvolume, dos estoques a -70 °C, para Erlenmeyers contendo 10 mL de LB líquido, com antibiótico. Estas culturas foram incubadas, a 37 °C, com agitação (160 rpm) durante a noite, para que alcançassem a fase estacionária de crescimento (aproximadamente 10^9 cél/mL). Os antibióticos foram acrescentados, quando necessário, nas concentrações descritas no quadro 2. Inóculos, na proporção 1:40, foram feitos em meio líquido a partir dessas culturas em fase estacionária e cultivados até a fase exponencial de crescimento ($1-2 \times 10^8$ cél/mL), por aproximadamente duas horas, a 37 °C, com agitação. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e ressuspensa em PBS.

4.5.2 Cepa de levedura

Para os experimentos com levedura foi feita uma cultura a partir do estoque, em 10 mL de meio YPG, com incubação a 30 °C e agitação, por 24 horas. Após este período (a obtenção da fase exponencial de crescimento) a suspensão de leveduras foi centrifugada a 8.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e ressuspensa em PBS.

4.6 SISTEMA EXPERIMENTAL

O sistema experimental de eletroestimulação é constituído por uma placa de 24 poços, com volume interno de 3 cm³ cada poço, sendo cada poço preenchido com 2 mL da suspensão a ser estudada. Três poços são interligados por pontes de papel de filtro que permitem a passagem do fluxo de elétrons. A esta placa é adaptada uma tampa removível contendo eletrodos de platina-ródio cuja extensão de 6 mm por 10 mm fica imersa na solução a ser tratada, conforme observado na Figura 10. 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). Esta placa foi adaptada a uma fonte de corrente elétrica contínua (CE) que gera uma diferença de potencial (ddp), cuja intensidade é monitorada por um multímetro digital (VEIGA *et al.*, 2005).

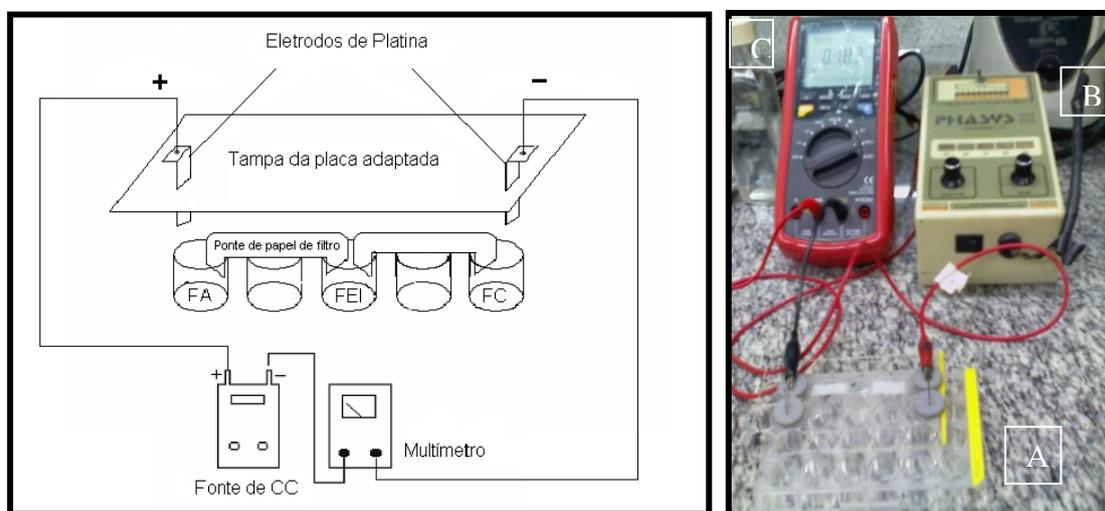


Figura 10 - Sistema experimental para estímulo elétrico. À esquerda desenho esquemático da placa de 24 poços interconectada com ponte de papel de filtro, que são umedecidos com tampão eletrolítico (PBS). Os eletrodos de platina, com polaridade positiva e negativa estão instalados na tampa da placa e inseridos no conteúdo dos poços, fechando o circuito. Este modelo experimental permite avaliar três situações experimentais, FA, FEI e FC. À direita, o sistema experimental com a placa adaptada aos eletrodos (A), conectada à fonte de corrente elétrica contínua (B), com monitoramento do multímetro (C).

A corrente elétrica contínua utilizada em todos os ensaios foi de 2 mA. Esta intensidade de CE vem sendo utilizada em vários trabalhos científicos realizados com CE (HOLANDINO *et al.*, 1998, 2000, 2001, VEIGA *et al.*, 2000, 2005, CAMPOS, 2008, BRITO, 2009).

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR BACTERIANA APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO

Para determinarmos a sensibilidade das cepas à corrente elétrica, as suspensões bacterianas de *E. coli* AB1157, AB2463 e AB1886, em tampão PBS, na concentração de $1,0 \times 10^8$ cél/mL, foram estimuladas, com 2 mA de corrente elétrica contínua. Primeiramente, os valores de estimulação escolhidos foram baseados em trabalhos produzidos pelo grupo de pesquisa de Holandino e colaboradores (HOLANDINO *et al.*, 1998, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 200, 2005). Os tempos usados foram de 5, 10 e 15 minutos. Entretanto, como 10 minutos de estimulação gerava cerca de 90 % de morte celular (Figura 11), foram escolhidos tempos menores de estimulação, em uma faixa de 3, 6 e 9 minutos, com intervalo de cerca de 5 minutos entre as estimulações, para a devida homogeneização da suspensão bacteriana e retirada de amostra, conforme Figura 11.

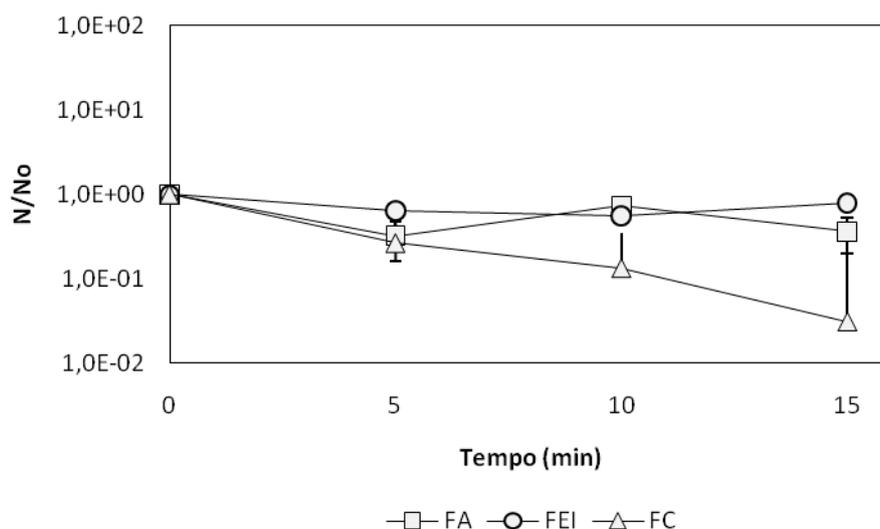


Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1157 de *E. coli* após estímulo com 2 mA nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. (□) Fluxo Anódico - FA, (○) Fluxo Eletro-Iônico - FEI e (△) Fluxo Catódico - FC. Resultados expressos como média \pm DP de cinco experimentos independentes ($n = 10$).

A cada intervalo de dose, alíquotas de 20 μ L eram retiradas de cada situação experimental (FA, FEI e FC), nas quais eram feitas diluições seriadas, em tampão M9, plaqueadas em meio LB sólido, com espalhamento por pérola de vidro e incubadas por 24 horas, a 37 °C. Ao final, as células estimuladas eram incubadas em meio LB sólido por 24 horas a 37° C e, em seguida, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) era quantificado.

Acompanhou-se o pH da suspensão eletrolítica de duas formas. Uma, em paralelo aos experimentos, utilizando-se fita indicadora de pH (Merck) e outro com uso do potenciômetro. Neste último, as células foram eletroestimuladas, conforme o sistema experimental descrito, e em cada tempo o eletrodo do potenciômetro foi inserido nos poços com a suspensão bacteriana.

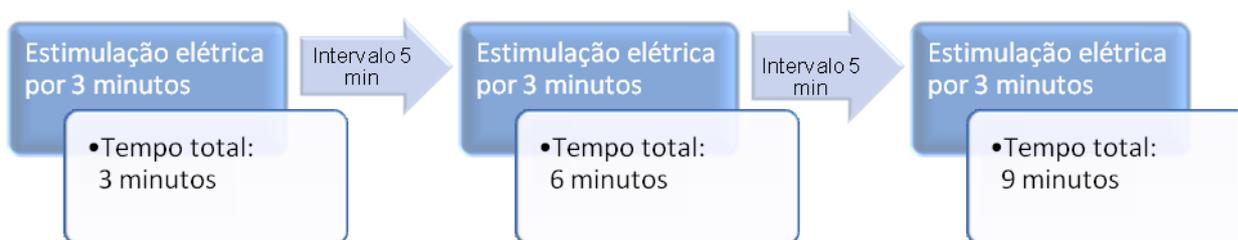


Figura 12 - Esquema de aplicação de corrente elétrica contínua de 2 mA. No primeiro bloco representação da estimulação de corrente elétrica por três minutos consecutivos, seguida por interrupção, homogeneização da suspensão, para um novo ciclo de estimulação. O procedimento é repetido para cada situação experimental específica (FA, FEI e FC). O mesmo procedimento, com exceção da estimulação elétrica foi realizado para a situação controle.

4.8 MUTAGÊNESE PARA RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA RIF^S → RIF^R

Após estimulação elétrica, alíquotas de 100 µL da cepa AB1157 foram retiradas de cada situação experimental e incubadas em tubo inclinado, contendo LB líquido, com crescimento pernoite, a 37 °C sob agitação, até densidade celular de 10⁹ cél/mL. Após crescimento foi feita uma diluição em tampão M9 e um plaqueamento em meio LB sólido, para quantificação da viabilidade celular. Simultaneamente, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio LB contendo rifampicina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h e, em seguida, o número de colônias viáveis e o número de colônias mutantes foi quantificado e comparado ao grupo controle.

Para este experimento foram realizados dois grupos controle, AB1157 sem estimulação elétrica e AB1157 irradiada com luz ultravioleta C (UV-C), no comprimento de onda de 254 nm (40 J/m²).

4.9 REATIVAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PELA CÉLULA HOSPEDEIRA - COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS SELVAGEM E DEFICIENTES EM MECANISMO DE REPARO

4.9.1 Obtenção do bacteriófago λ em meio sólido

Para o crescimento do bacteriófago é necessário a escolha de uma linhagem bacteriana indicadora. Em nossos experimentos utilizamos a cepa selvagem AB1157. A 0,3 mL desta suspensão bacteriana crescida na concentração de 10^9 cél/mL, foram adicionados 0,1 mL de uma solução de bacteriófagos λ . Para a adsorção, a suspensão de fagos foi incubada com a bactéria por 20 min em banho-maria, a 37 °C. Passado o tempo para adsorção, 5 mL de top-ágar foram adicionados e esta mistura (fago + bactérias) e vertida em placa de Petri contendo meio LB. Após crescimento *overnight* foi observada a lise nas bactérias indicadoras (Unidades Formadoras de Plaques).

O top-ágar com colônias de bactérias e fagos incorporados foi raspado, com auxílio da alça de Drigalsky, solubilizado em PBS e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, com adição de clorofórmio. Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi titulado.

4.9.2 Titulação do bacteriófago λ

A solução de fago obtida foi diluída em diferentes concentrações finais. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram adicionadas a 0,3 mL de cada bactéria indicadora, (AB1157, AB1886 e AB2463). Com adição de 3 mL de top-ágar, estas suspensões bacterianas foram vertidas em placas de Petri contendo meio LB. Após crescimento *overnight* a temperatura de 37 °C, o número de fagos (Unidades Formadoras de Plaques) foi quantificado.

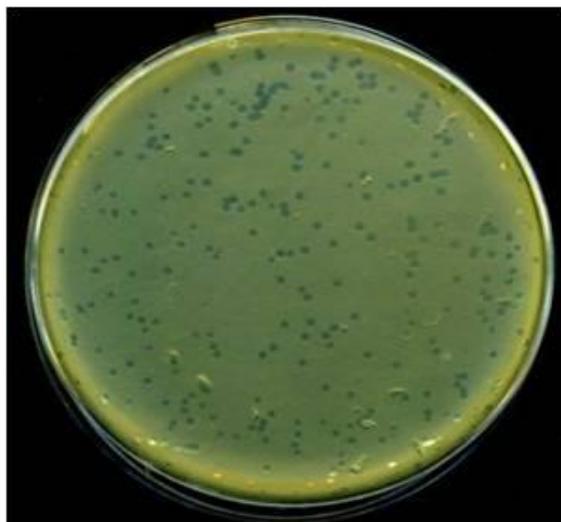


Figura 13 – Foto demonstrativa das Unidades Formadoras de Plaques. Em placa de Petri foi solidificado meio LB e vertido, sobre este, bactérias AB1157 infectadas com o bacteriófago λ diluído e top-ágar. A placa foi mantida a 37 °C por 24 horas e após este tempo contou-se a quantidade de Unidades Formadoras de Plaques (número de fagos na preparação após diluição) vista na foto como pontos transparentes.

4.9.3 Reativação de bacteriófagos pela célula hospedeira

A suspensão contendo 10^7 fagos/mL foi estimulada com 2 mA de CE por 3, 6 e 9 min, no sistema experimental descrito anteriormente (item 4.6). A cada intervalo de dose, alíquotas da suspensão estimulada e não estimulada foram diluídas em Mg_2SO_4 0,1 M. Após diluição, 0,1 mL de fago foram retirados e adicionados a 0,3 mL de cada bactéria indicadora (AB1157, AB2463 e AB1886) na concentração de 10^9 cél/mL. A adsorção foi feita por 20 min, a 37 °C, seguida por plaqueamento em meio LB contendo top-ágar.

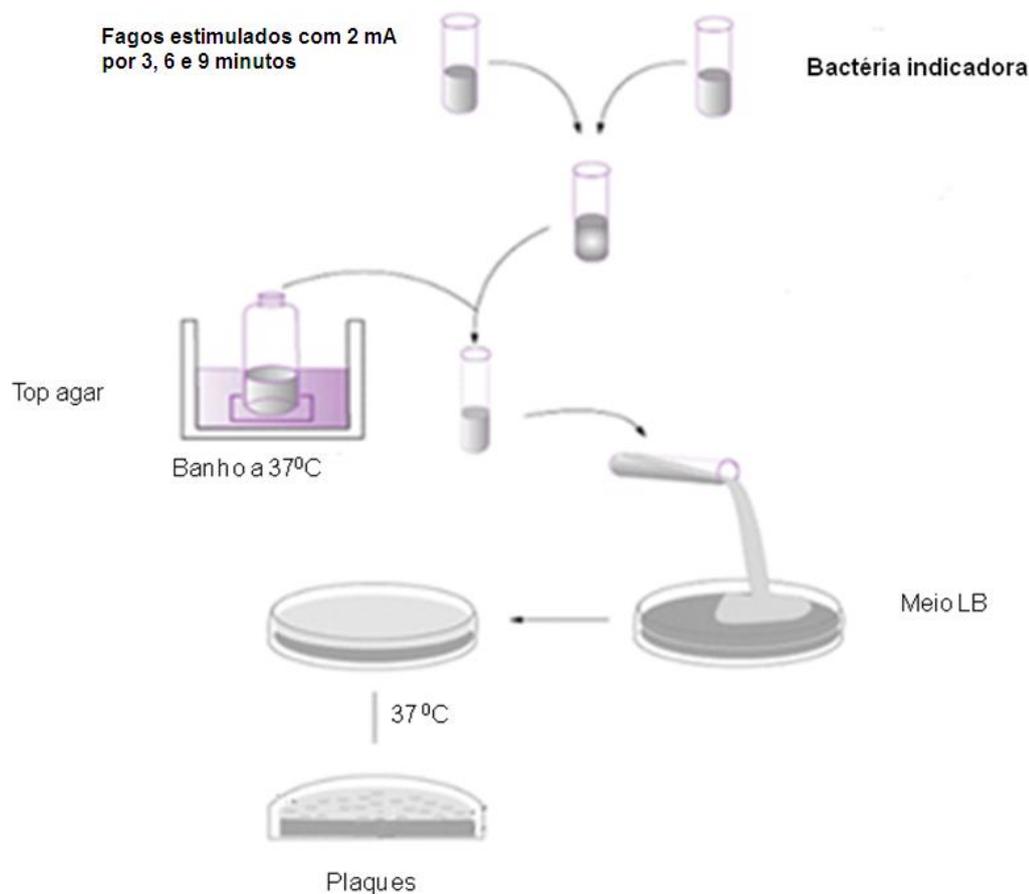


Figura 14 – Esquema representativo da metodologia de ensaio de reparo das lesões causadas pela CE em bacteriófagos λ , comparando cepas selvagem (AB1157) e deficientes em mecanismos de reparo (AB2463 e AB1886). Fagos não estimulados foram usados como controle.

No controle, fagos λ foram submetidos ao mesmo protocolo, excluindo a estimulação elétrica. Como controle positivo, de formação de plaques, os fagos foram irradiados com luz ultravioleta C (UV-C), no comprimento de onda de 254 nm. A dose utilizada variou de acordo com a cepa hospedeira: para as cepas AB1157 e AB2463 a dose utilizada foi de 50 J/m^2 e para AB1886 a dose foi de 10 J/m^2 . Uma dose cinco vezes menor para fagos da cepa AB1886 foi necessária por se tratar de uma cepa deficiente no mecanismo de reparo *uvrA*, característica que a torna muito susceptível aos danos causados pela radiação UV-C.

4.10 INDUÇÃO LISOGÊNICA

Para este ensaio foram utilizadas as cepas WP2s(λ) na fase logarítmica (10^8 cél/mL) e RJF013 como cepa indicadora, na fase estacionária (10^9 cél/mL), esta em maior quantidade para formar um camada indicadora no meio LB sólido. A cepa WP2s(λ) que já contém inserido em seu DNA o bacteriófago λ , foi eletroestimulada com 2 mA por 3, 6 e 9 min. Após tratamento, a suspensão foi diluída e foram realizados dois plaqueamentos. Um plaqueamento foi feito, em meio LB sólido, para verificar a citotoxicidade celular, de 0,1 mL da cepa WP2s(λ) tratada e diluída com 3 mL de top-ágar. No outro plaqueamento, 0,1 mL da cepa WP2s(λ) tratada, foram diluídas com 0,3 mL da cepa RJF013 (cepa indicadora), acrescentados 3 mL de top-ágar e vertidos em placa de meio LB contendo 20 μ g/mL de ampicilina (MOREAU *et al.*, 1976), (Figura 15). O controle positivo foi feito com UV-C em comprimento de onda de 254 nm (2 J/m^2).

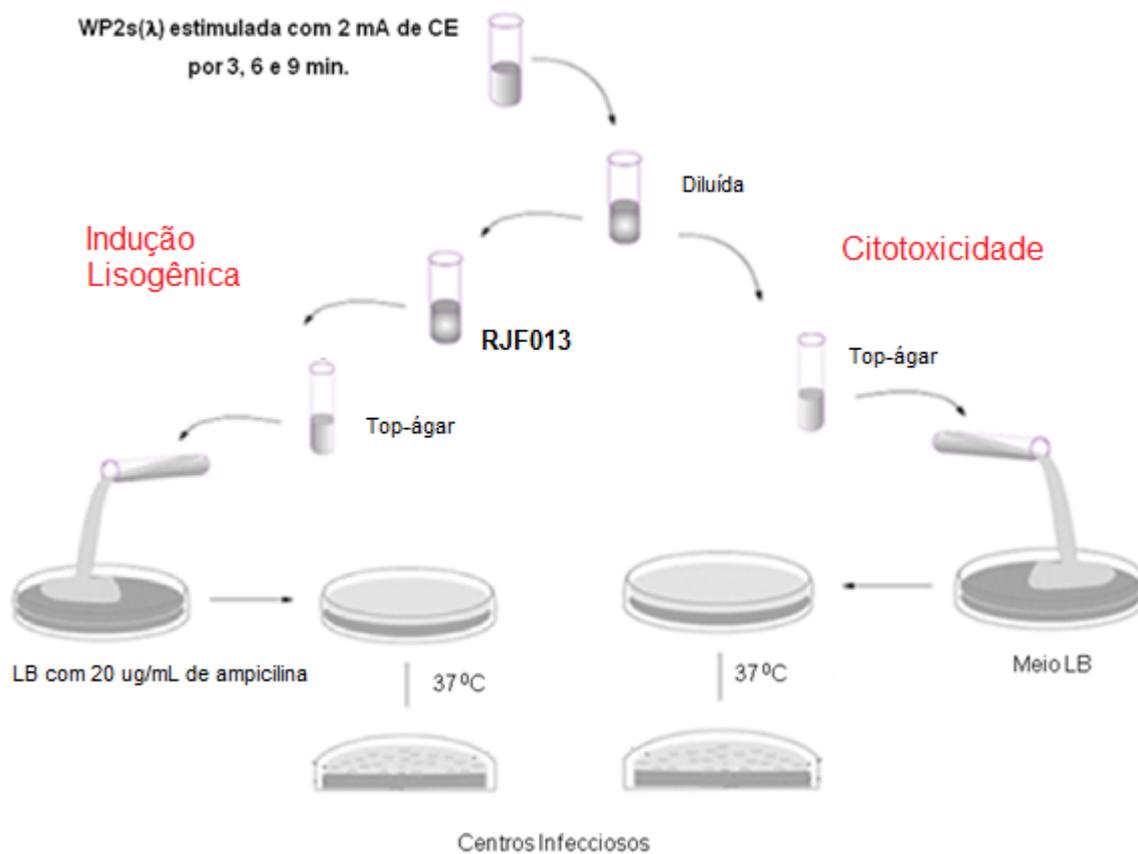


Figura 15 – Esquema representativo do ensaio de indução lisogênica. Representação da bactéria tratada sendo adicionada a uma cepa indicadora e plaqueamento em meio LB contendo ampicilina, antibiótico ao qual a cepa WP2s(λ) não é resistente. Após incubação *overnight* a 37 °C as Unidades Formadoras de Plaques são contadas e comparados aos respectivos controles (fagos não estimulados e fagos irradiados com UV-C). A representação gráfica também demonstra o ensaio de citotoxicidade no plaqueamento em meio LB.

4.11 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E PERMEABILIDADE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A cepa AB1157 foi estimulada por 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, com intervalo de 5 minutos entre cada tempo. Após o tratamento, uma alíquota de 10 µL foi colocada em grade de 400 *mesh*. Em seguida a fixação do material foi feita a partir da adição de 10 µL de ácido fosfotúngstico (PTA) a 2 %, por 60 segundos, à temperatura ambiente. O material foi seco com papel de filtro e mantido em dessecador até a observação em microscópio eletrônico de transmissão (Morgani 268 FEI, 80 kV).

4.12 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR DE *S. CEREVISIAE*

Para determinação da sensibilidade de organismos eucariotos à corrente elétrica, uma suspensão de leveduras de *S. cerevisiae* em PBS, na concentração de $1,0 \times 10^7$ cél/mL, foi estimulada com 2 mA de corrente elétrica contínua por 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, de acordo com o protocolo descrito (item 4.6).

A cada intervalo de dose, alíquotas de 20 μ L, de cada situação experimental, foram retiradas, diluídas em tampão PBS, plaqueadas em meio YPG sólido, com espalhamento por pérola de vidro e incubadas por 96 horas, a 28 °C. Em paralelo, acompanhou-se o pH da suspensão celular utilizando-se fita indicadora de pH (Merck) e posteriormente com uso de potenciômetro. Ao final da incubação o número de colônias foi quantificado.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Tukey-Kramer, usando o programa de estatística InStat versão 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Estas análises compararam os resultados obtidos nos tratamentos em diferentes situações experimentais com o controle, tendo sido adotado um nível de significância de 5%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO

Neste ensaio foram construídas curvas curso-temporal das cepas bacterianas AB1157, AB1886 e AB2463, com o propósito de verificar a sensibilidade destas ao Fluxo Anódico (FA), Fluxo Eletro-lônico (FEI) e Fluxo Catódico (FC) gerados por 2 mA de corrente elétrica em diferentes tempos. Além da citotoxicidade foi verificado o potencial da CE em induzir lesões no DNA e a capacidade destas cepas bacterianas em reparar tais lesões utilizando os mecanismos de reparo *uvrA* ou *recA*.

Os tempos de estímulo foram de 3, 6 e 9 minutos, com intervalo entre cada tempo para a devida homogeneização da suspensão celular. Paralelamente, os valores de pH foram avaliados, em cada tempo específico de estimulação.

As curvas de citotoxicidade foram construídas a partir da razão calculada como o número de células viáveis, após tratamento (N) e o número inicial de células antes do tratamento (N_0), cuja razão é expressa como N/N_0 . No eixo das ordenadas, em escala logarítmica essa razão é expressa em função do tempo de estimulação elétrica, eixo das abscissas. As curvas de citotoxicidade das cepas AB1157, AB2463 e AB1886 (Figuras 16, 17 e 18), indicam que em até 9 minutos, com 2 mA de corrente elétrica não ocorre morte celular significativa em nenhuma situação experimental. Além disso, verificamos que a corrente elétrica não produz lesões no DNA reparáveis pelo sistema de excisão ou recombinação genética, já que as curvas de citotoxicidade das cepas mutantes AB1886 e AB2463 não apresentam diferença de resposta em relação à curva obtida com a cepa selvagem, AB1157.

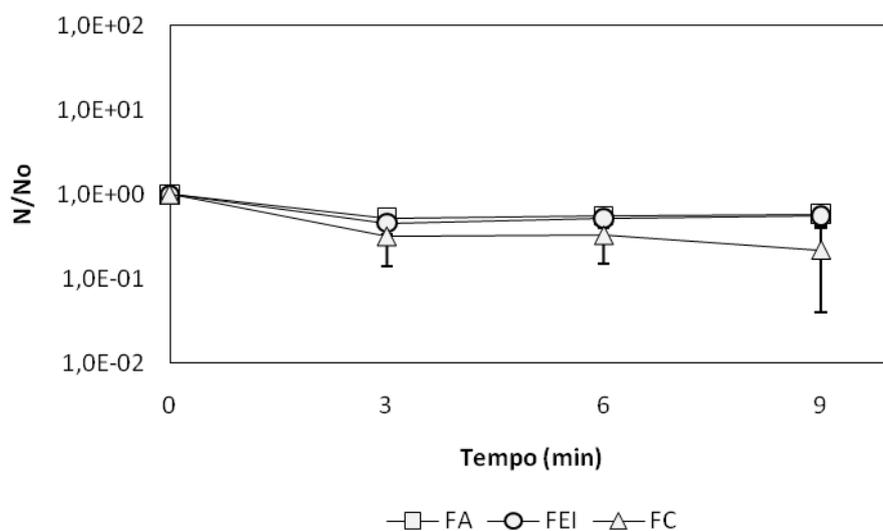


Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1157 de *E. coli* após estímulo com 2 mA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico - FA, (○) Fluxo Eletro-lônico - FEI e (△) Fluxo Catódico - FC. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de cinco experimentos independentes ($n = 10$).

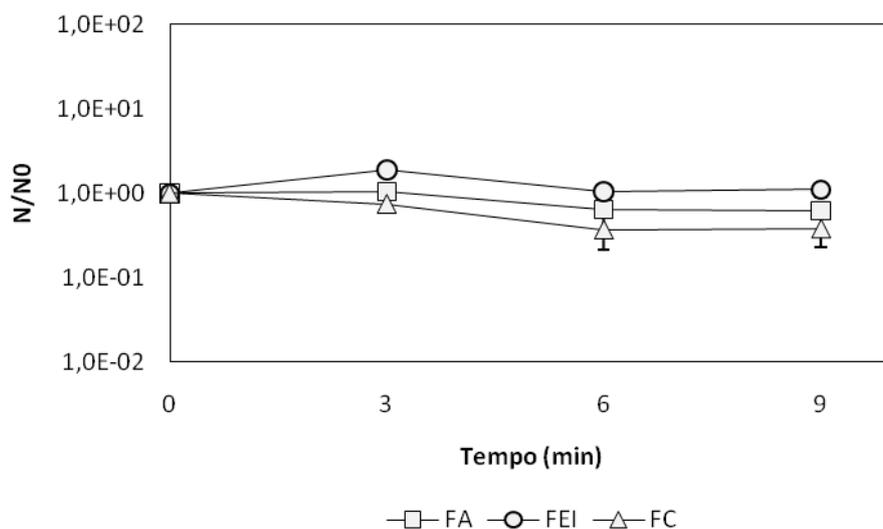


Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB2463 de *E. coli* após estímulo com 2 mA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico - FA, (○) Fluxo Eletro-lônico - FEI e (△) Fluxo Catódico - FC. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de três experimentos independentes ($n = 6$).

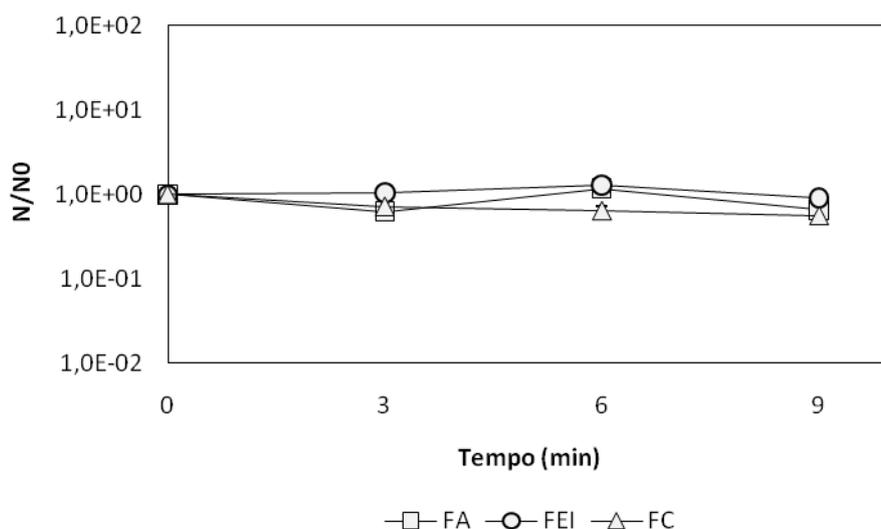


Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade da cepa AB1886 de *E. coli* após estímulo com 2 mA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico - FA, (O) Fluxo Eletro-lônico - FEI e (△) Fluxo Catódico - FC. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de três experimentos independentes ($n = 6$).

Durante o tratamento, foram medidos os valores de pH, nos diferentes tempos de aplicação de corrente (Quadro 3).

Observa-se que no controle ($t = 0$) o pH apresentou valor neutro. Após a aplicação de corrente por 3 minutos pode-se perceber um acréscimo no valor de pH no fluxo catódico, explicado pela já esperada decomposição da água em hidrogênio e íons hidroxila, o mesmo ocorrendo para o tempo de 6 e 9 minutos. Por outro lado, uma acidificação no FA devido à decomposição da água em oxigênio e íons H^+ foi detectada. O FEI não apresentou variação ao longo do tratamento. Este perfil de pH foi obtido para as três cepas estudadas (AB1157, AB1886 e AB2463). O quadro 3 apresenta a média obtida da variação do pH, durante a estimulação elétrica da cepa AB1157, pelo uso de fita indicadora de pH, paralelamente e os valores obtidos em outro experimento com auxílio do potenciômetro.

Quadro 3 – Média dos valores de pH obtidos após eletroestimulação da cepa AB1157, utilizando-se a fita indicadora (Fita) e o potenciômetro (Poten.). Resultados expressos como média de seis experimentos com fita indicadora e três com potenciômetro.

Tempo	FA		FEI		FC	
	Fita	Poten.	Fita	Poten.	Fita	Poten.
0	7,0	7,27	7,0	7,28	7,0	7,30
3	6,8	6,78	7,0	7,22	7,5	7,51
6	6,3	6,60	7,0	7,20	8,0	9,84
9	6,2	6,20	7,0	7,19	9,0	10,2

5.2 ENSAIO DE MUTAGÊNESE PARA RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA

Rif^S → Rif^R

Usando os tempos 3, 6 e 9 minutos e aplicação de 2 mA de corrente contínua, foi testada a mutagênese para resistência a rifampicina em bactérias tratadas com CE e crescidas em meio LB acrescido do antibiótico. Após crescimento, as Unidades Formadoras de Colônias das placas de viabilidade e de mutagênese foram quantificadas. A Figura 19 relaciona a viabilidade com a mutagênese, onde os resultados são dados em incremento. Um incremento 2 vezes maior é considerado mutagênico.

Na figura 19, pode-se observar que em todos os tempos não houve aumento de mais de duas vezes, além do valor do controle, ou seja, o espontâneo. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos, indicando que a estimulação com 2 mA de CE não apresenta potencial mutagênico. O controle positivo feito com irradiação de UV-C, apresentou um incremento de aproximadamente 42 vezes mais, indicando que o método é eficiente para avaliação do potencial mutagênico.

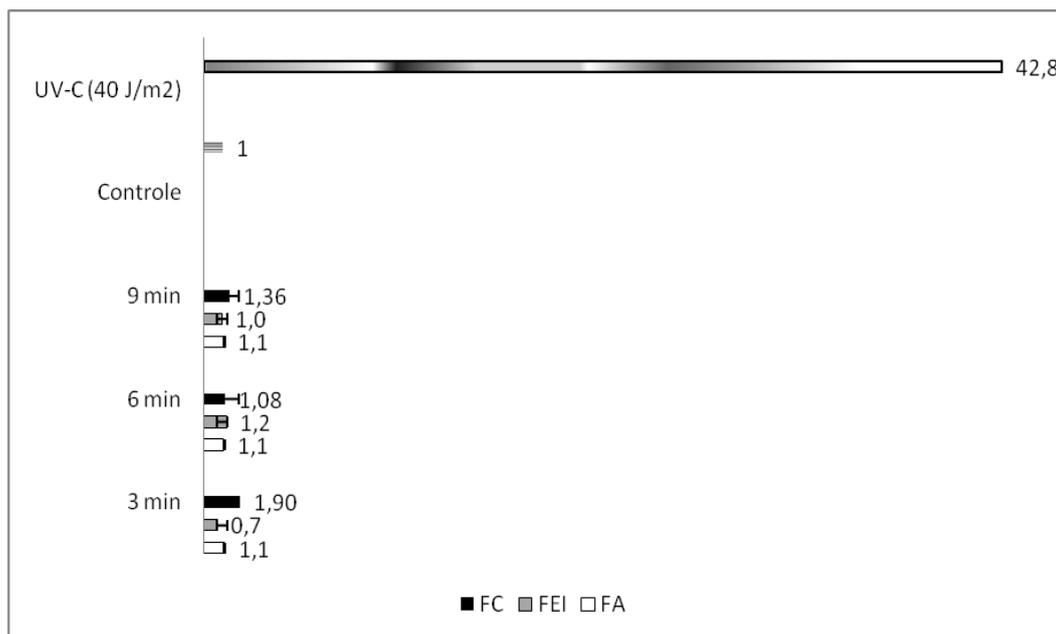


Figura 19 - Resposta da cepa AB1157 de *E. coli* para o ensaio de mutagênese para resistência a rifampicina, com tratamento de corrente elétrica contínua de 2 mA por 3, 6 e 9 minutos. Como controle positivo foi feita a irradiação com luz ultravioleta C (UV-C), com comprimento de onda de 254 nm e dose de 40 J/m², a qual produziu um incremento de cerca de 42 vezes na taxa de mutagênese. A estimulação elétrica não foi capaz de aumentar em mais de duas vezes o valor obtido no controle (espontâneo) indicando que nestas condições a CE não é mutagênica. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes ($n = 4$).

5.3 REATIVAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PELA CÉLULA HOSPEDEIRA - COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS SELVAGEM E DEFICIENTES EM MECANISMO DE REPARO

O bacteriófago λ foi obtido por crescimento em meio sólido na cepa indicadora *E. coli* AB1157 com posterior titulação, de onde se obteve aproximadamente 10^9 fagos/mL. Os fagos foram tratados com CE e crescidos em diferentes bactérias indicadoras: AB1157 (selvagem), AB2463 (*recA*) e AB1886 (*uvrA*). Com isso obtivemos as curvas de citotoxicidade do bacteriófago λ , nas diferentes cepas, após passagem da CE (Figuras 20, 21 e 22).

Este bacteriófago não possui em seu genoma as informações necessárias para a codificação das enzimas que promovem o reparo de danos. Porém, o sistema de enzimas presente nas células que os fagos infectam é capaz de reparar tais lesões. Assim, a cepa selvagem conseguiria reparar danos causados pela CE no fago, porém as cepas mutantes podem reparar ou não estas lesões. Quando o reparo da lesão envolve o mecanismo dependente dos genes *uvrA* ou *recA*, o mesmo fica deficiente.

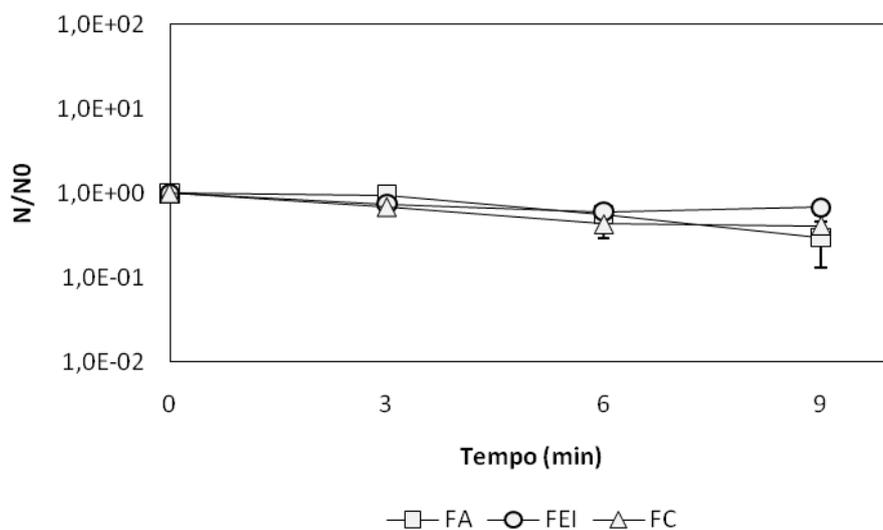


Figura 20 – Número de placas induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB1157 de *E. coli*, após tratamento com CE de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico (FA), (○) Fluxo Eletro-lônico (FEI) e (△) Fluxo Catódico (FC). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de sete experimentos independentes ($n = 14$).

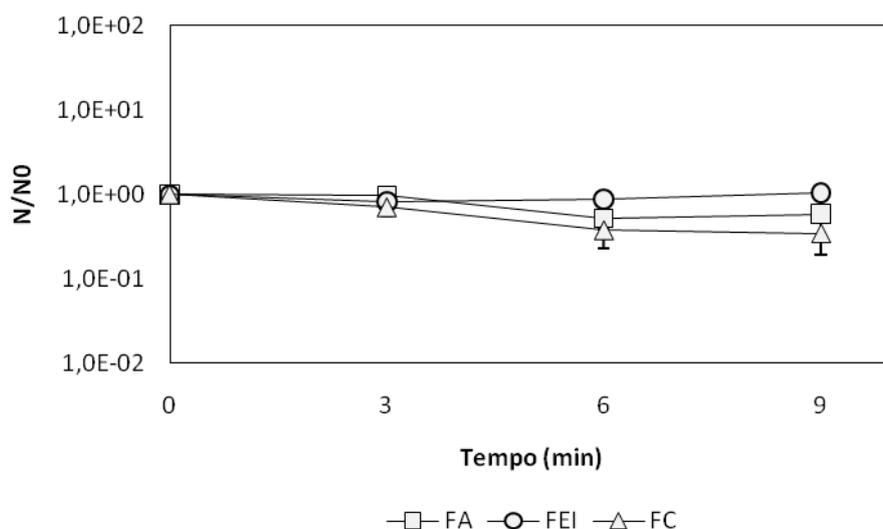


Figura 21 - Número de plaques induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB2463 de *E. coli*, após tratamento com CE de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico (FA), (○) Fluxo Eletro-lônico (FEI) e (△) Fluxo Catódico (FC). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média + DP de dois experimentos independentes ($n = 4$).

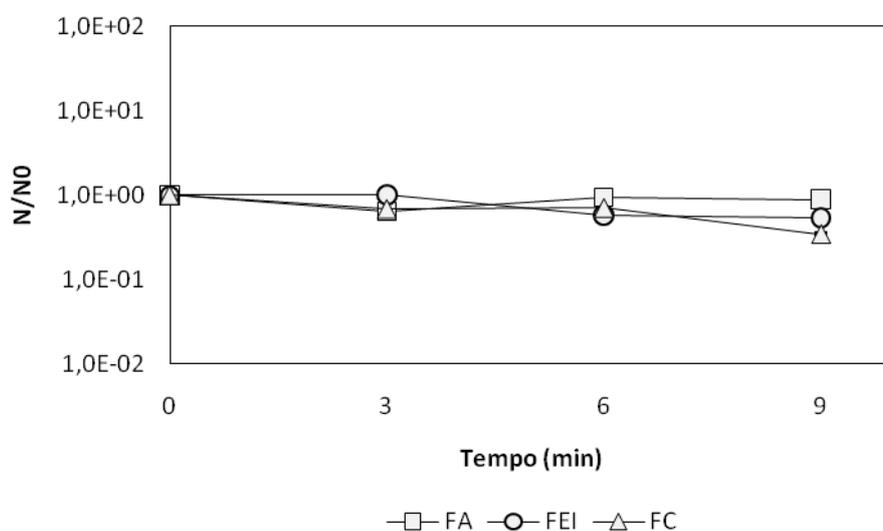


Figura 22 - Número de plaques induzidos pela CE no bacteriófago λ , tendo como célula hospedeira a cepa AB1886 de *E. coli*, após tratamento com CE de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos. (□) Fluxo Anódico (FA), (○) Fluxo Eletro-lônico (FEI) e (△) Fluxo Catódico (FC). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes ($n = 4$).

Os gráficos apresentados para este ensaio (Figuras 21, 22 e 23) têm no eixo y a razão entre o número de células infectadas após tratamento (N) e o número de células infectadas obtidas no tempo zero (N_0), em escala logarítmica. Na abscissa está expresso o tempo em minutos de estimulação elétrica. Nos três gráficos não há uma redução estatisticamente significativa no número de centros infecciosos, portanto, não há diferença na restauração pela cepa bacteriana selvagem ou mutante. Com estes experimentos concluímos que a CE não induz lesões reparáveis pelos sistemas estudados.

O controle positivo foi feito com luz ultravioleta C (UV-C) no comprimento de onda de 254 nm. Para as cepas AB1157 e AB2463 os fagos foram irradiados com uma dose de 50 J/m^2 , resultando um valor médio de 0,26 e 0,06 respectivamente. Para os fagos cuja cepa hospedeira foi AB1886 a dose de UV-C aplicada foi de 10 J/m^2 , com valor de N/N_0 igual a 0,54.

5.4 INDUÇÃO LISOGÊNICA

Neste ensaio a cepa WP2s(λ), já contendo o bacteriófago foi tratada com CE, conforme o sistema experimental descrito anteriormente. Neste experimento se obteve a curva de citotoxicidade desta cepa, apresentada na Figura 23 e a resposta do plaqueamento da cepa WP2s(λ) tratada com CE e foi adicionada a cepa indicadora, RJF013 (Figura 24).

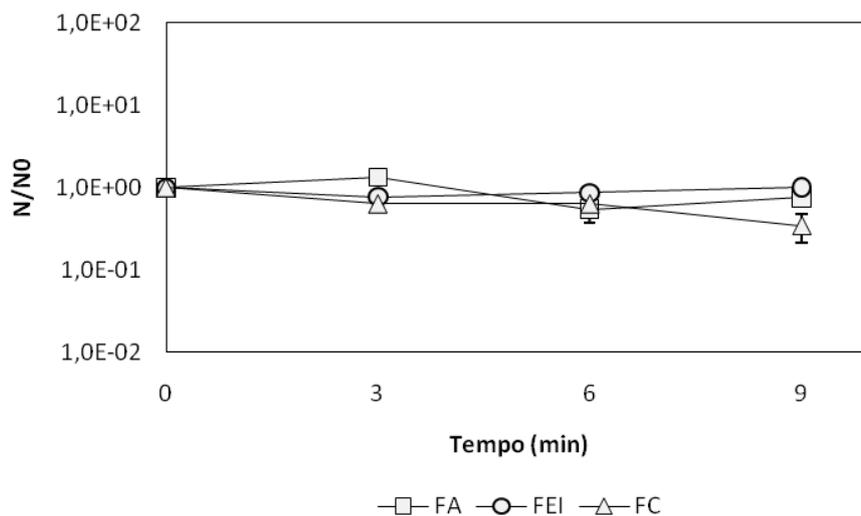


Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade da cepa WP2s(λ) após estímulo com 2 mA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. (\square) Fluxo Anódico - FA, (O) Fluxo Eletro-Iônico - FEI e (\triangle) Fluxo Catódico - FC. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média + DP de três experimentos independentes ($n = 6$).

A Figura 24 representa o gráfico de Unidades Formadoras de Plaques (UFP) pelo tempo. Os centros infecciosos são a infecção da bactéria pelo vírus. A conseqüente morte da bactéria leva a formação da plaque, quantificadas como Unidades Formadoras de Plaques. Neste caso as plaques foram originadas das bactérias lisogênicas nas quais o fago lambda foi induzido, isto é passou para o ciclo lítico. Pela análise, para o três fluxos estudados, não há aumento do número de centros infecciosos. Portanto, a CE não foi capaz de induzir mudanças genotóxicas nestas condições. O controle positivo, feito com irradiação de 2 J/m^2 , (*in set*) indicou um aumento do numero de CI de $1,0 \times 10^4$ para $3,58 \times 10^7$, demonstrando que o método foi eficiente para avaliar a genotoxicidade.

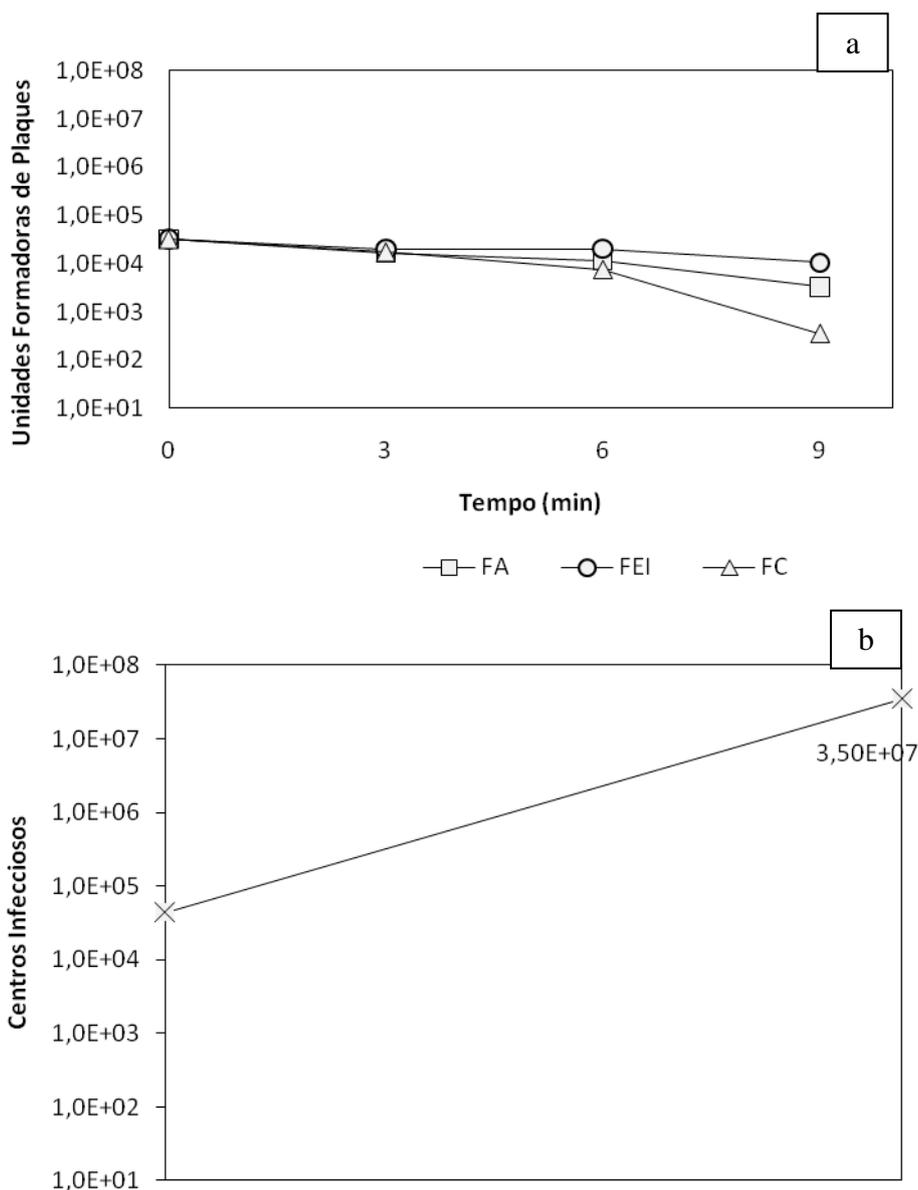


Figura 24 – (a) Número de centros infecciosos induzidos pela estimulação elétrica com 2 mA. O gráfico apresenta o número de centros infecciosos observados após estimulação da bactéria WP2s(λ) e posterior plaqueamento com a bactéria indicadora, RJF013. Para os tempos de tratamento com o (□) Fluxo Anódico (FA), (○) Fluxo Eletro-Iônico (FEI) e (△) Fluxo Catódico (FC), não se observou aumento do número de centros infecciosos, demonstrando que a CE não é genotóxica nestas condições. (b) O controle positivo, feito com radiação ultravioleta C, apresentou $3,58 \times 10^7$ centros infecciosos. Resultados expressos como média \pm DP de três experimentos independentes ($n = 6$).

5.5 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E PERMEABILIDADE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise por microscopia eletrônica de transmissão não indicou alterações na morfologia e nem em estruturas de adesão das bactérias AB1157 após estimulação elétrica com 2 mA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos. Porém, no fluxo anódico e catódico, nos tempos estudados, as bactérias apresentaram o contrastante PTA em seu interior, com aumento da quantidade de PTA no interior da célula conforme o tempo de passagem de corrente.

A Figura 25, 26, 27 e 28 apresentam a MET das bactérias nas situações estudadas.

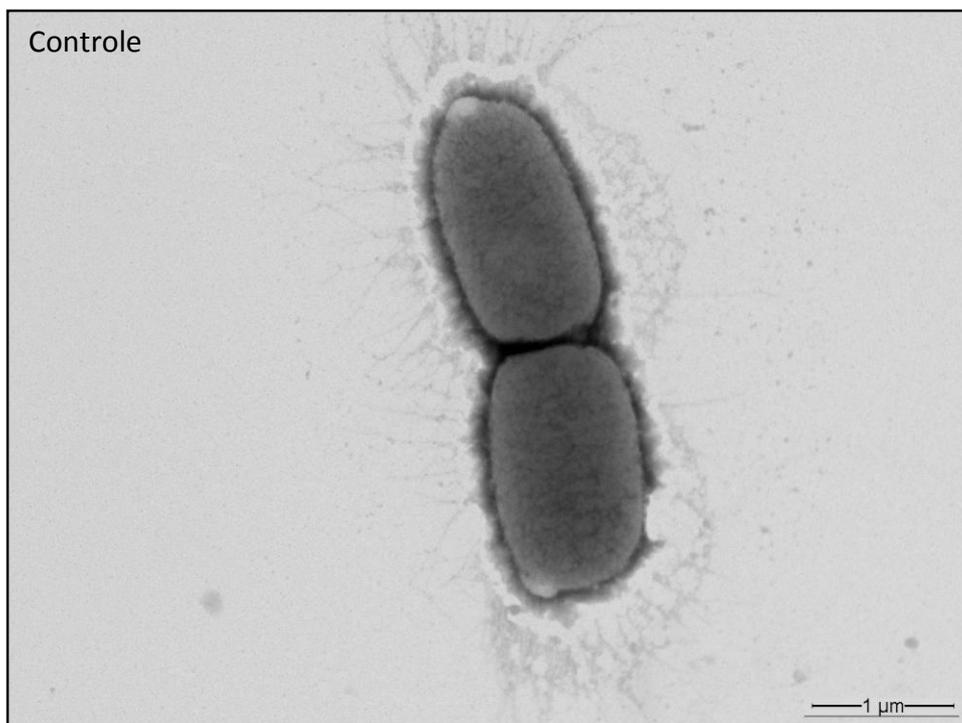


Figura 25 – Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias *E. coli* AB1157. A bactéria apresenta estrutura de bastonetes Gram-negativos de 1 a 1,5 µm de largura e 2 a 6 µm de comprimento. Fímbrias (estruturas de adesão) são numerosas.

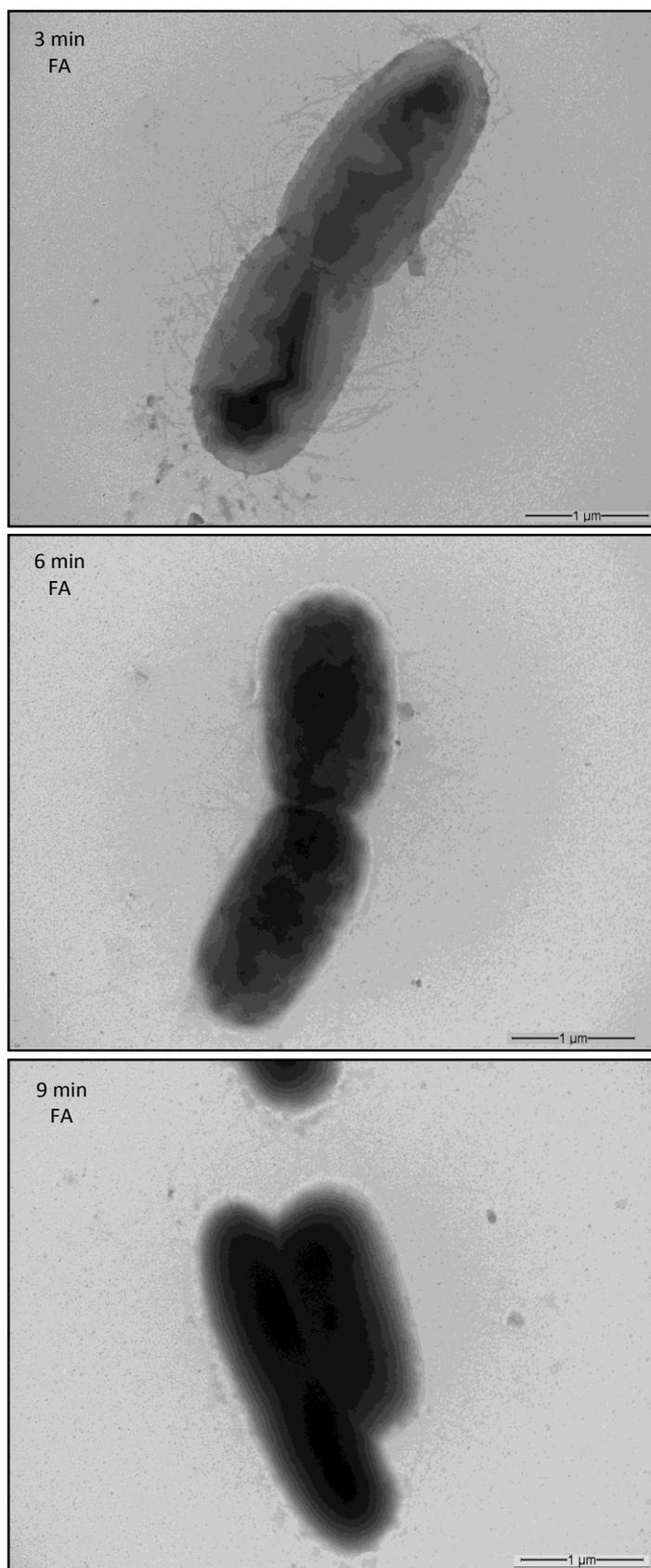


Figura 26 – Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias *E. coli* AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo anódico.

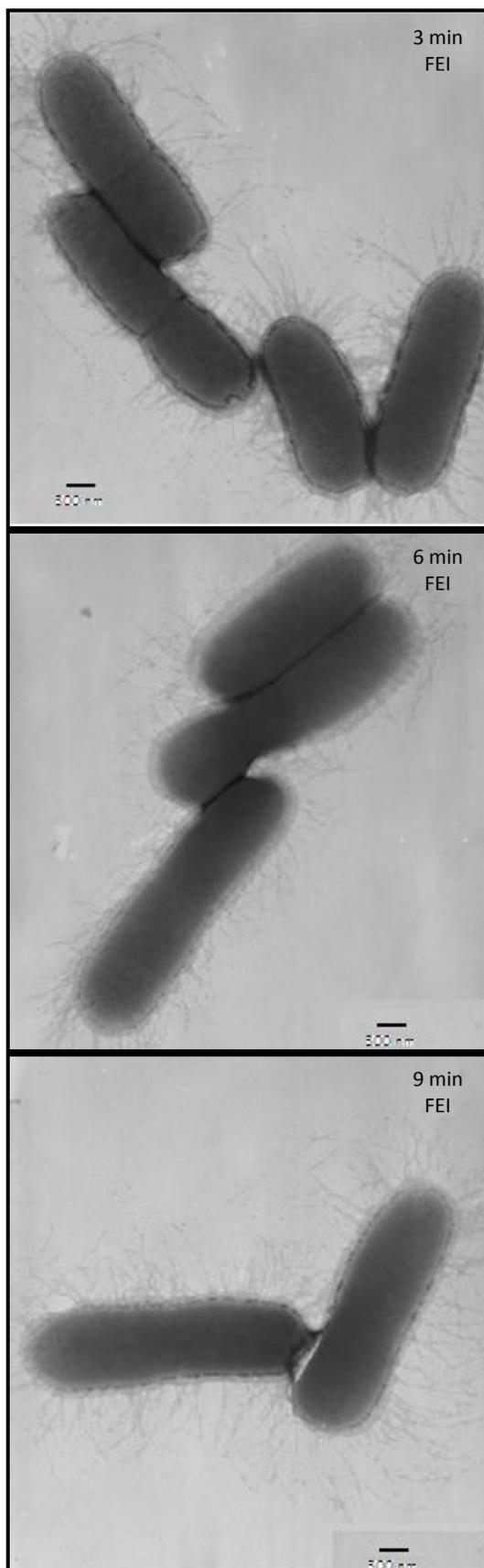


Figura 27 – Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias *E. coli* AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo eletroiónico.

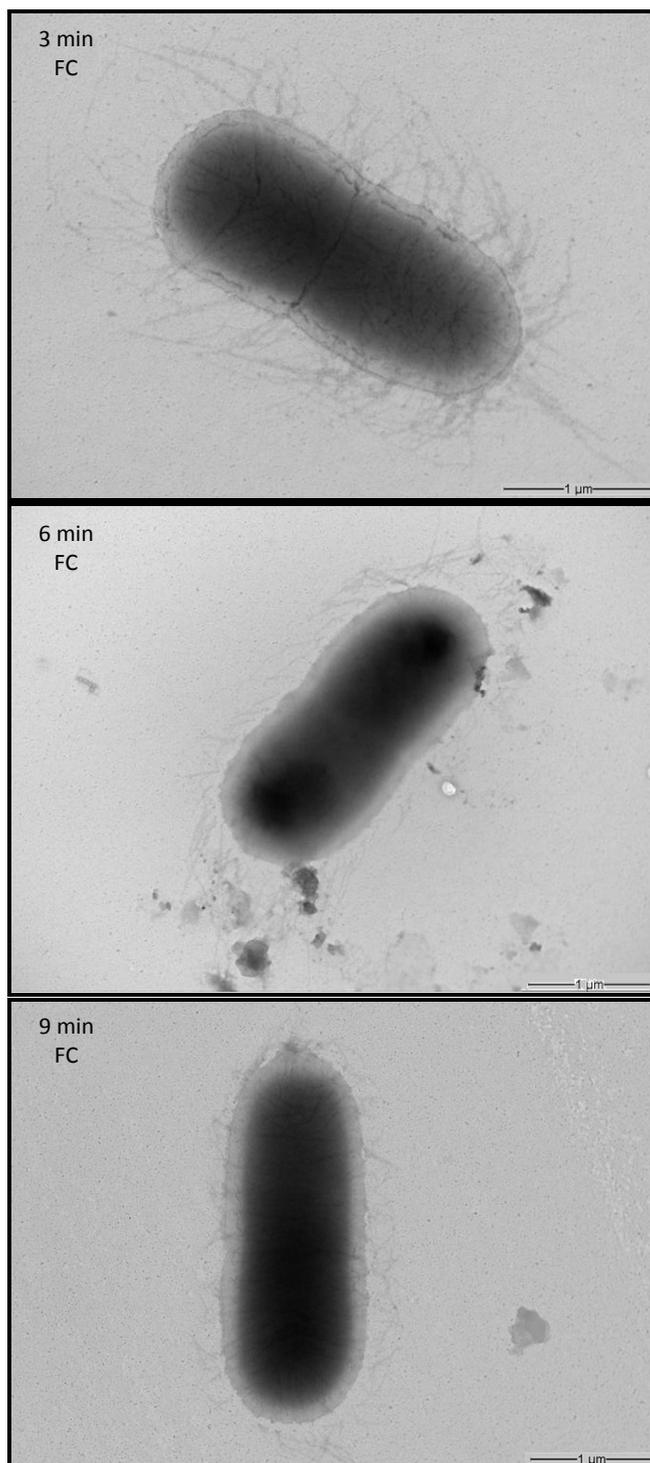


Figura 28 – Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias *E. coli* AB1157 estimuladas com 2 mA por 3, 6 e 9 minutos, no fluxo catódico.

5.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR DE *S. CEREVISIAE*

Neste ensaio foi construída uma curva curso-temporal da cepa de *S. cerevisiae* FF18733 estimulada com 2 mA de CE, para verificar a sensibilidade desta ao Fluxo Anódico (FA), Fluxo Eletro-lônico (FEI) e Fluxo Catódico (FC) (Figura 29). Os tempos escolhidos foram de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. Os valores de pH na suspensão foram acompanhados.

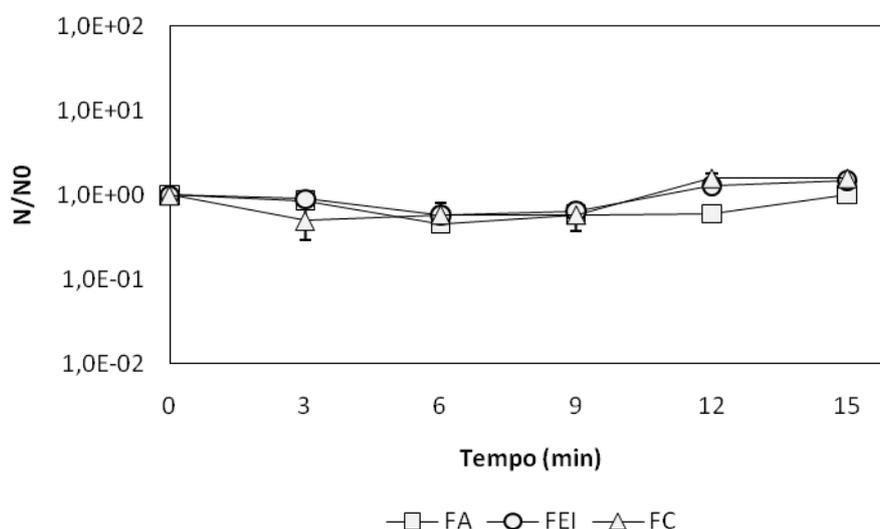


Figura 29 - Ensaio de citotoxicidade da cepa FF18733 de *S. cerevisiae* após estímulo com 2 mA nos tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. (□) Fluxo Anódico - FA, (○) Fluxo Eletro-lônico - FEI e (△) Fluxo Catódico - FC. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$). Resultados expressos como média \pm DP de quatro experimentos independentes ($n = 8$).

Os valores de pH obtidos também corresponderam ao apresentado pela literatura e estão resumidos no quadro 4. As leituras foram feitas em todos os tempos e fluxos, com fita indicadora de pH durante o experimento e com potenciômetro em experimento separado.

Quadro 4 – Média dos valores de pH obtidos após eletroestimulação da cepa *S. cerevisiae*, utilizando-se a fita indicadora (Fita) e o potenciômetro (Poten.). Resultados expressos como média de três medidas para ambos os métodos.

Tempo	FA		FEI		FC	
	Fita	Poten.	Fita	Poten.	Fita	Poten.
0	7,0	7,20	7,0	7,22	7,0	7,24
3	6,8	6,91	7,0	7,20	7,4	7,34
6	6,5	6,49	7,0	7,24	8,4	8,61
9	6,4	6,32	7,0	7,18	9,6	9,47
12	6,0	5,89	7,0	7,20	10,0	10,2
15	4,2	4,38	7,0	7,18	10,0	10,8

6. DISCUSSÃO

O tratamento eletroquímico de tumores pelo uso de uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade, denominada de eletroterapia tumoral (ETT), possui em sua metodologia o uso de eletrodos inseridos no local do tumor, objetivando destruir o tecido tumoral. Esta terapia antitumoral teve sua origem nos estudos clínicos realizados por Nordenström (NORDENSTRÖM, 1983, 1989) e, desde então, tem sido amplamente aplicada em pacientes com tumores sólidos, principalmente na China (XIN, 1994, 1998). No Brasil, os mecanismos de ação envolvidos com a atividade antitumoral da ETT vêm sendo elucidados por estudos *in vitro* (HOLANDINO *et al.*, 1998, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000, 2005, CAMPOS, 2008; BRITO, 2009; GOMES *et al.*, 2009) e *in vivo* (PARISE *et al.*, 2008, TELLÓ *et al.*, 2004, 2007).

Os efeitos antitumorais da ETT são atribuídos a diferentes mecanismos; porém, não existem trabalhos na literatura que evidenciem os efeitos mutagênicos ou genotóxicos da corrente elétrica contínua. Estes testes toxicológicos permitem a avaliação do potencial carcinogênico de substâncias ao qual o homem pode ser exposto, isto é, de novos medicamentos, pesticidas, aditivos alimentares, cosméticos e tratamentos. Esta investigação prévia leva a segurança durante o desenvolvimento e aplicação de inovações na área farmacêutica. Em certas situações, o risco identificado em estudos pré-clínicos pode ser de tal natureza que leve as agências reguladoras a emitir um parecer negativo e a não recomendação do tratamento (CARNEIRO *et al.*, 1997).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da CE no material genético, buscando verificar o potencial genotóxico e mutagênico deste tratamento.

A mutação é toda a alteração permanente do material genético de uma célula, que não resulta de recombinação ou da segregação normal dos cromossomos. Quando não é letal para a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações

seguintes (mutação germinativa). A taxa de mutação espontânea de uma determinada população refere-se a uma frequência basal, que pode alterar-se ao longo da história evolutiva, podendo sofrer um aumento induzido por agentes físicos, químicos e/ou biológicos. A taxa geral na qual as novas mutações surgem de forma espontânea em um determinado sítio do cromossomo varia de 10^{-6} a 10^{-11} , por ciclo de replicação do DNA (WATSON *et al.*, 2006). A genotoxicidade descreve uma ação deletéria diretamente no material genético, modificando o genoma de um ser vivo.

Para estudar o possível efeito mutagênico e genotóxico da corrente elétrica foi utilizado um sistema experimental anteriormente validado por Veiga e colaboradores, em 2005. A grande importância deste sistema é a possibilidade de diferenciar os efeitos de diferentes polaridades de corrente. Portanto, as diferentes reações decorrentes da estimulação anódica (FA) e catódica (FC) podem ser facilmente avaliadas. Além disso, este aparato experimental permite avaliar as alterações celulares decorrentes da interação do fluxo de elétrons com a suspensão celular (FEI). Esta situação se assemelha ao que ocorre na estimulação elétrica de humanos e em animais.

O valor de corrente escolhido foi baseado em trabalhos anteriores do mesmo grupo (HOLANDINO *et al.*, 1998, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000), no valor de 2 mA. Para a escolha dos tempos primeiramente foram testados os tempos de 5, 10 e 15 minutos, porém, uma morte celular de cerca de 90 % da população bacteriana ocorreu com aproximadamente 10 minutos de passagem de corrente elétrica no fluxo catódico. Esta morte teve como provável causa a alteração de pH do meio e a perda da permeabilidade celular, encontrada após passagem de corrente. Tempos menores de passagem de corrente elétrica (3, 6 e 9 minutos) foram escolhidos para o tratamento. Entre a aplicação de cada tempo, deu-se um intervalo, necessário para realizar a devida homogeneização da suspensão celular com os eletrólitos, para retirada das alíquotas e medição do pH. A aplicação de 2 mA por 3 minutos gera uma aplicação de 0,36 C.

O tampão escolhido para estudo de mutagenicidade e genotoxicidade da CE foi o PBS (tampão salina fosfato). Os motivos para a escolha deste tampão foram: (a) presença de cloreto, indispensável no tratamento eletroquímico; (b)

tonicidade semelhante aos meios fisiológicos; (c) validação prévia do uso deste tampão em diferentes linhagens celulares; (d) boa condutividade elétrica; (e) faixa de pH tamponado semelhante aos meios fisiológicos.

Veiga e colaboradores testaram a viabilidade celular de células de mastocitomas de camundongo (linhagem P815) tratados com corrente elétrica em diferentes tampões, entre estes: PBS, tampão M9, tampão fosfato e tampão HEPES. Com exceção do PBS, a variação no pH e a formação de produtos de eletrólise não foram suficientes para levar à variação na viabilidade das células atribuída a geração de espécies cloreto (ânodo) e hidroxila (cátodo) (VEIGA *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como primeiros experimentos os ensaios de citotoxicidade bacteriana em tampão eletrolítico PBS a uma corrente de 2 mA. Para tanto, foram utilizados três diferentes cepas de *E. coli* K12: cepa selvagem (AB1157); cepa deficiente no reparo por excisão (AB1886/*uvrA6*) e cepa deficiente no reparo recombinacional (AB2463/*recA13*). Uma resposta diferenciada entre as cepas mutantes e a selvagem, após passagem da CE, permite um estudo comparativo acerca dos possíveis alvos no DNA (FRIDBERG *et al.*, 2006). As cepas deficientes em mecanismos específicos de reparação não seriam capazes de reparar tais danos. Como resultado, foi obtida uma resposta semelhante para as três cepas, ou seja, após estímulo elétrico de 2 mA em tempos de 3, 6 e 9 minutos o comportamento das cepas não foi diferenciado, demonstrando que a CE não causa lesão reparável pelo sistema deficiente de *uvrA* ou *recA* (Figuras 16, 17 e 18).

As soluções oriundas de bactérias tratadas também tiveram seu pH monitorado durante a aplicação da corrente elétrica, para verificar se a resposta apresentada possuía coerência com a literatura. As medições foram realizadas com dois métodos, um paralelamente ao experimento com fita indicadora de pH e depois, com um método mais preciso para confirmar os valores obtidos. Pela necessidade de se manter as bactérias em ambiente estéril não seria possível medir com o potenciômetro durante os experimentos.

A resposta obtida foi um acréscimo no valor de pH no fluxo catódico, devido à decomposição da água em hidrogênio e íons hidroxila e uma

acidificação no fluxo anódico devido à decomposição da água em oxigênio e íons H^+ . O fluxo eletro-iônico não apresentou variação ao longo do tratamento quando medido com fita indicadora e apresentou um leve decréscimo de pH quando medido por potenciômetro. Este por ser mais sensível demonstra uma acidificação, porém com uma variação pouco significativa (0,09 entre o pH do controle e o pH do tempo de 9 minutos). Esta resposta está de acordo com a literatura (NILSSON *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2000).

Para estudar a capacidade mutagênica da CE utilizamos o teste de resistência a rifampicina, com a cepa AB1157. A rifampicina é bactericida para a cepa AB1157 e havendo potencial mutagênico associado a CE, esta poderia induzir alterações no sítio de ligação do antibiótico, tornando-a resistente a rifampicina (MILLER *et al.*, 1994). Esta resistência resulta de mutações ocorridas na subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e permite o crescimento da bactéria em meio de cultivo acrescido do antibiótico (CAMPBELL *et al.*, 2001).

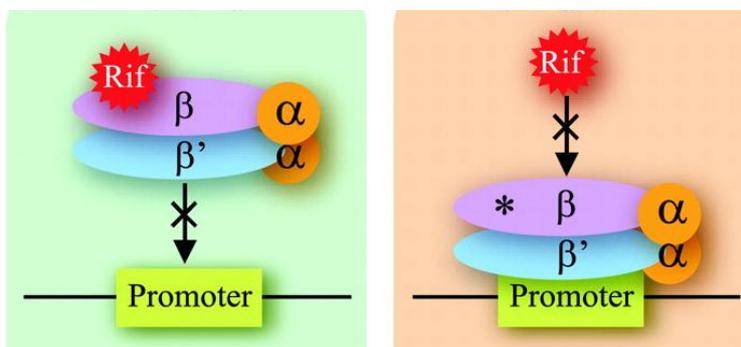


Figura 30 - Representação esquemática da ligação do antibiótico rifampicina. No quadro à esquerda a ligação da rifampicina a subunidade β da RNA polimerase impede a transcrição. À direita, após mutação, a região β é modificada e a rifampicina não consegue mais se ligar, o que a faz perder o efeito bactericida. Adaptado de <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406410101>.

Assim, após tratamento com CE, as bactérias foram mantidas a 37 °C, por 24 horas para crescimento das novas gerações. Após crescimento, a viabilidade em meio LB e o efeito mutagênico por plaqueamento em meio LB contendo rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram verificados. O controle positivo foi realizado com luz ultravioleta C (UV-C) no comprimento de onda de 254 nm (40

J/m²), um tratamento altamente mutagênico (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Na Figura 19 não se observa valor algum duas vezes maior que a taxa de mutação espontânea, ou seja, não houve perda do efeito bactericida da rifampicina, indicando que não houve mutação no gene *rpoB*. O controle com UV-C teve um resultado de cerca de 42 vezes superior ao valor espontâneo demonstrando que o teste foi funcional.

Os testes genotóxicos prosseguiram com a passagem de corrente elétrica direta em bacteriófagos λ com posterior incubação destes com bactérias selvagens e mutantes. Estes bacteriófagos, se danificados, não conseguem se autoreparar, pois, não possuem sistemas de reparo e precisam de um sistema enzimático presente no seu hospedeiro. As células bacterianas com todos os mecanismos de reparo (selvagem) são capazes de reparar o fago quando este é danificado; já as bactérias mutantes, são capazes de reparar apenas através dos mecanismos que lhes restam.

Após o tratamento com CE, o fago foi incubado junto à bactéria. A infecção pelo fago lambda começa quando o vírus adere a um receptor na parede da célula bacteriana e injeta seu DNA. O revestimento de proteína do fago permanece fora da célula enquanto o seu DNA entra rapidamente. Posteriormente, o fago se utiliza do maquinário bacteriano para sua reprodução, seguindo o ciclo lítico ou lisogênico. No ciclo lítico o vírus se reproduz e mata a célula hospedeira. Visualmente, no local de infecção deste vírus, temos a formação de uma plaque (unidade de bactéria infectada por vírus).

Com este pensamento aplicamos a CE em bacteriófagos e plaqueamos estes com bactéria selvagem (AB1157) e duas com deficiência em mecanismo de reparo, AB1886 (*uvrA6*) deficiente no reparo por excisão e AB2463 (*recA13*) deficiente no reparo recombinacional. Pelos resultados obtidos (Figura 20, 21 e 22) observamos que não houve diferença no número de plaques com os três tipos de bactérias, indicando que a CE não gera alterações no DNA viral ou que esta alteração não é passível de reparo (AB1886) por excisão e nem recombinação (AB2463).

O controle positivo foi realizado com UV-C. As proteínas Uvr do

mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos da *E. coli* são necessárias para corrigir lesões provocadas pela luz ultravioleta. Os mutantes dos genes *uvr* são sensíveis à luz UV e não são capazes de remover adutos timina-timina, timina-citosina. A cepa AB1886 é deficiente em *uvrA*, ou seja, ela não consegue reparar as lesões causadas pela luz ultravioleta; desta forma, ao aplicarmos a dose de UV-C nos fagos que seriam inseridos nesta cepa, precisamos usar uma dose 5 vezes menor do que a usada para as cepas que apresentam *uvrA*. Mutantes do tipo *uvrA*, *uvrB* ou *uvrC* não são capazes de remover dímeros de pirimidinas do seu DNA. Este sistema UvrABC também atua na reparação de lesões produzidas no DNA de fagos que infectam a célula bacteriana. Assim, a capacidade infecciosa de fagos como λ , se previamente lesados pela radiação UV, é bem maior em células que possuem reparação por excisão do que nos mutantes nela deficientes, fenômeno que constitui a reativação pela célula hospedeira (*host cell reactivation* - hcr). Este tipo de reparação não ocorre em mutantes *uvrA*, *B* ou *C* (LEITÃO *et al.*, 2005).

A indução lisogênica foi outro teste utilizado para verificar o efeito genotóxico da CE. Quando culturas de *E. coli* são expostas a determinados agentes físicos ou químicos ocorre à indução de funções celulares denominadas de funções SOS, controladas pelos genes *lexA* e *recA*.

Em condições normais a proteína LexA reprime uma série de operadores, entre eles, os de *recA* e o próprio *lexA*, permitindo somente a expressão de seus produtos em níveis basais. Quando o DNA é lesado ou sua replicação é inibida, há formação de sinais moleculares que ativam a função co-proteolítica da proteína RecA. Sob esta forma ela pode então induzir a autoclivagem da proteína LexA provocando sua indução. Com a clivagem do repressor *lexA* começa a transcrição de vários genes bacterianos e seus produtos tornam-se responsáveis direta ou indiretamente por fenômenos, tais como a amplificação da capacidade de reparo de lesões, indução de profagos em células lisogênicas, etc (LEITÃO *et al.*, 2005).

Os genes dos cromossomas bacterianos não são os únicos a sofrerem o controle do sistema SOS. Este sistema também está envolvido no controle dos genes encontrados em plasmídeos e vírus bacterianos. As funções SOS

também podem ser, portanto, visualizadas utilizando-se bacteriófagos, através da avaliação da indução de profagos em células lisogênicas, o que constitui o fenômeno da indução lisogênica. Existe uma semelhança estrutural entre o repressor *cl* do profago λ e o repressor *lexA*, que possibilita, a clivagem proteolítica do repressor do fago pela interação com a proteína RecA ativada. Após esta clivagem, o estado de lisogenia é rompido ocorrendo à indução do profago e a síntese do ciclo lítico (ALBERTS *et al.*, 1997).

A clivagem do repressor do profago pode ser desencadeada por diversos tratamentos físicos, como as radiações, ou agentes químicos, como compostos mutagênicos e ou carcinogênicos, os quais, por causarem lesões no DNA, possibilitam a ativação da proteína RecA. Sendo assim, a indução lisogênica é um teste bastante simples, utilizado na detecção de compostos genotóxicos, baseados na propriedade destes em induzir o profago através da clivagem do seu repressor (MOREAU *et al.*, 1976).

A cepa WP2s(λ) além de conter o fago λ , apresenta uma mutação no gene *uvrA* (FONSECA *et al.*, 1994), cujo produto está envolvido no reparo por excisão de nucleotídeos, o que torna esta estirpe bacteriana altamente sensível a agentes capazes de causar lesões de DNA. Foi necessária a presença da cepa indicadora para que os bacteriófagos liberados da cepa WP2s(λ) adsorvessem na cepa indicadora e apresentassem, visualmente, os centros infecciosos.

Neste processo, a cepa WP2s(λ) ao receber ação de um agente mutagênico, terá a enzima RecA do sistema de reparo SOS ativada e esta clivará o repressor LexA que não poderá mais inibir o mecanismo de reparo SOS, começando a produção de enzimas para fazer o reparo no DNA lesionado. Porém, o repressor LexA tem uma estrutura muito parecida com o repressor *cl* do bacteriófago; assim a enzima RecA ao clivar LexA também cliva o repressor *cl*. Esta proteína repressora, *cl*, impede a transcrição de genes essenciais para o ciclo lítico dos fagos. Sem a repressão, os fagos começam a sintetizar proteínas envolvidas com o ciclo lítico o que irá culminar em lise bacteriana da WP2s(λ) e liberação de novas partículas virais, que infectarão a cepa indicadora, RJF013, sendo visualizado como centros infecciosos numa

placa de cultura (LEITÃO *et al.*, 2005).

Em nossos experimentos de estimulação elétrica não foi obtido aumento no número de centros infecciosos demonstrando que o mecanismo de reparo da cepa tratada não foi ativado. Ocorre uma pequena queda no número de Unidades Formadoras de Plaques no ânodo, no tempo de 9 minutos. Esta queda pode estar ocorrendo por uma morte das bactérias, originária do tempo de aplicação de corrente, pode ser um erro experimental o que poderá ser elucidado com o aumento do número de ensaios ou pode estar ocorrendo uma diminuição na indução lisogênica, um resultado que deverá ser mais detalhadamente estudado. Este ensaio nos permite concluir que, nas condições experimentais utilizadas a CE não apresenta efeito genotóxico.

A fim de verificar a morfologia das bactérias AB1157 após o tratamento com CE, por 3, 6 e 9 min, amostras de cada tempo e fluxo foram analisadas a partir de contrastação negativa em microscópio eletrônico de transmissão. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 25, 26, 27 e 28. As células bacterianas no fluxo anódico e catódico tem sua permeabilidade alterada, e, à medida que se aumenta o tempo de eletroestimulação, mais esta alteração é visível, sugerindo que a permeabilidade é mais alterada com o tempo de eletroestimulação (Figura 26 e 28). No FEI não se observou alteração de permeabilidade (Figura 27). Em nenhum dos fluxos a morfologia foi alterada. No FA e no FC com o tempo de aplicação de corrente as fímbrias ficam menos visíveis devido a um artefato da técnica, não sendo possível focalizá-las na fotografia, porém elas estavam presentes.

Na continuação dos testes de citotoxicidade, utilizamos a levedura *S. cerevisiae*, um organismo eucarioto amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos quanto à presença de macromoléculas, organelas e proteínas. Por isto, esta levedura é uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese e reparo do DNA para modelos eucarióticos (COSTA & FERREIRA, 2001).

A levedura foi tratada pelo mesmo sistema experimental, com tempos entre 3 e 15 minutos e sua curva de crescimento foi construída. Este ensaio de cinética é útil e necessário para definir a citotoxicidade basal, permitindo a

observação da capacidade intrínseca de um composto em causar a morte celular, como consequência de danos às funções celulares (EINSENBRAND *et al.*, 2002). O ensaio com leveduras é um complemento aos ensaios com bactérias (POLI *et al.*, 1999; TERZIYSKA *et al.*, 2000). A cinética obtida com a passagem de corrente não teve diferença significativa entre os tempos e os fluxos, indicando uma provável preservação do material genético destas leveduras. O modelo eucariótico utilizado neste trabalho, *Saccharomyces cerevisiae*, não apresentou, após passagem da CE, inibição da proliferação celular (ver Figura 29), ou seja, a corrente não foi citotóxica para este eucarioto.

A resposta dos valores de pH para levedura foram os mesmos encontrados para bactérias *E. coli* AB1157 e que estão de acordo com a literatura.

7 CONCLUSÃO

- ☑ A estimulação elétrica com 2 mA de corrente contínua não apresentou citotoxicidade para as cepas de *E. coli* (mutante e selvagens) e de *S. cerevisiae*.
- ☑ A estimulação elétrica com 2 mA de corrente contínua alterou a permeabilidade da membrana celular ao PTA nos tempos de 3, 6 e 9 minutos no fluxo anódico e catódico.
- ☑ A estimulação elétrica com 2 mA de corrente contínua não induziu mutagenicidade em bactérias (*E. coli*, AB1157).
- ☑ A estimulação elétrica com 2 mA de corrente contínua não apresentou caráter genotóxico.

8. PERSPECTIVAS

Através deste estudo podemos afirmar que a estimulação elétrica com 2 mA de corrente contínua não apresenta caráter genotóxico ou mutagênico. Novos estudos serão realizados variando as condições experimentais a fim de corroborar o presente estudo.

Dentre as perspectivas mais imediatas citamos: verificar morfologia de organismos eucariotos (leveduras *S. cerevisiae*) por contrastação negativa com contrastante PTA e visualização por microscopia eletrônica de transmissão, aplicação de intensidade e tipos diferentes de estimulação elétrica; intervalos diferentes de estimulação elétrica; uso de outras soluções eletrolíticas; outros testes de genotoxicidade e mutagenicidade, como por exemplo, teste do cometa, feito em células de animais tratados com corrente elétrica contínua, a fim de visualizar possíveis danos em seu DNA, dentre outros testes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J.R., RAFF, M., ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 28, 1997.

AMES, B.; MCCANN, J. **Validation of the Salmonella test: a reply to Rinkus and Legator**. Cancer Research, v. 41 (10), p. 4192-203, 1981.

BIRBIR, Y.; DEGIRMENCI, D.; BIRBIR, M. **Direct electric current utilization in destruction of extremely halophilic bacteria in salt that is used in brine curing of hides**. Journal of Electrostatics, v. 66, p. 66388-66394, 2008.

BIRBIR, Y.; URGUR, G.; BIRBIR, M. **Inactivation of bacterial population in hide-soak liquors via direct electric current**. Journal of Electrostatics, v. 67 (4), p. 640-645, 2009.

BRITO, LUCIANA. **Atividade antitumoral de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade: possíveis mecanismos de ação**. Rio de Janeiro, f. 120. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

CABRALES, L.; AGUILERA, A.; JIMENEZ, R.; JARQUE, M.; CIRIA, H.; REYES, J.; MATEUS, M.; PALENCIA, F.; ÁVILA, M. **Mathematical modeling of tumor growth in mice following low-level direct electric current**. Mathematics and Computers in Simulation, v. 78, p. 112-120, 2008.

CAMPBELL, E. A., KORZHEVA, N., MUSTAEV, A., MURAKAMI, K., NAIR, S., GOLDFARB, A.; DARST, S.A. **Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase**. Cell, v. 104, p. 901–912, 2001.

CAMPOS, VÂNIA EMERICH BUCCO **Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer**. Rio de Janeiro, f. 126. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

CARNEIRO, M., PINTO, L.; PAUMGARTTEN, F. **Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista**. Caderno de Saúde Pública, v. 13 (1), 1997.

CIOMBOR, D.; AARON, R. **The role of electrical stimulation in bone repair**. Foot and Ankle Clinics, v. 10, p. 579-593, 2005.

COSTA, V.; FERREIRA, P.M. **Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases.** *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, p. 217-246, 2001.

DAVID, S.; ABSOLOM, D.; GAMS, J.; HERBERT, M. **Effect of low level direct current on in vivo tumor growth in hamsters.** *Cancer Research*, v. 45, p. 5625-5631, 1985.

EINSENBAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. **Methods of in vitro toxicology.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 40 (2-3), p. 193-236, 2002.

FLEGROVÁ, Z., BARTOS, T., CUPR, P.; SKAREK, M. **Sensitivity analysis of RecA genotoxicity test.** *Annals of Microbiology*, v. 58 (1), p. 1-5, 2008.

FONSECA, C. A., LEAL, J., COSTA, S. S.; LEITÃO, A. C. **Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms.** *Mutation Research*, v. 321 (3), p. 165-173, 1994

FOSH, B., FINCH, J., ANTHONY, A., LEA, M., WONG, S., BLACK, C.; MADDERN, G. **Use of electrolysis for the treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma.** *ANZ Journal of Surgery*, v. 73, p. 1068-1070, 2003.

FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SIEDE W., WOOD, R., SCHULTZ, R.; ELLENBERG, T. **DNA Repair and Mutagenesis.** American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2^o ed., 2006.

GOMES, M. N. **Mutagenicity and genotoxicity of direct electric current: an *in vitro* analysis.** In: III International Conference of Applied Electromagnetism, Santiago de Cuba, 2009.

GOTHELF, A.; MIR, L.; GEHL, J. **Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation.** *Cancer Treatment Reviews*, v. 29, p. 371-387, 2003.

GRIFFIN. D.; DODD, N.; MOORE, J.; PULLAN, B.; TAYLOR, T. **The effects of low-level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumour regression and systemic biochemical sequelae.** *British Journal of Cancer*, v. 69 (5), p. 875-878, 1994.

HOLANDINO, C.; CAPELLA, M.; ANGLUSTER, J.; SILVA-FILHO, F.; MENEZES, S.; ALVIANO, C. **Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in Escherichia coli**. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, v. 35, p. 284-290, 1998.

HOLANDINO, C.; VEIGA, V.; CAPELLA, M.; MENEZES, S.; ALVIANO, C. **Damage induction by direct electric current in tumoral target cells**. Indian Journal of Experimental Biology, v. 38, p. 554-558, 2000.

HOLANDINO, C.; VEIGA, V.; RODRIGUES, M.; MORALES, M.; CAPELLA, M.; ALVIANO, C. **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.

HUCKFELDT, R.; FLICK, A.; MIKKELSON, D.; LOWE, C.; FINLEY, P. **Wound closure after split-thickness skin grafting is accelerated with the use of continuous direct anodal microcurrent applied to silver nylon wound contact dressings**. Journal of Burn Care & Research, v. 28 (5), p. 703-707, 2007.

IABC, **International Association for Biologically Closed Electric Circuits**. Disponível em: <http://www.iabc.readywebsites.com/iabc_congress.html>, acesso em: 22 de fevereiro de 2010.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Brasil. **Câncer**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=469>, acesso em: 07 de dezembro de 2009.

JARM, T.; CEMAZAR, M.; STEINBERG, F.; STREFFER, C.; SERSA, G.; MIKLAVCIC, D. **Perturbation of blood flow as a mechanism of anti-tumour action of direct current electrotherapy**. Physiological Measurement, v. 24, p. 75-90, 2003.

JARQUE, M.; MATEUS, M.; JING-HONG, LI; CABRALES, L.; PALENCIA, F.; CIRIA, H.; BROOKS, S.; SALAS, M. **Primeras experiencias clínicas en Cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales**. Medisan, v.11 (1), p. 1-13, 2007.

JENNINGS, J.; CHEN, D.; FELDMAN, D. **Transcriptional response of dermal fibroblasts in direct current electric fields**. Bioelectromagnetics, v. 29, p. 394-405, 2008.

JOHN, L.; REED A. **Eletroterapia Explicada – Princípios e Prática**. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, cap. 1 e 2, 2001.

JUSTICE, S., HUNSTAD, D., CEGELSKI, L.; HULTGREN, S. **Morphological plasticity as a bacterial survival strategy**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 162-168, 2008.

KIM, H.B., AHN, S., JANG, H.J., SIM, S.B.; KIM, K.W. **Evaluation of corrosion behaviors and surface profiles of platinum-coated electrodes by electrochemistry and complementary microscopy: Biomedical implications for anticancer therapy**. *Micron*, v. 38, p. 38747-38753, 2007.

LEITÃO, A., LAGE, C., CABRAL-NETO, J., PÁDULA, M.; GOMES, R. **Radiobiologia e fotobiologia - respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos**. Rio de Janeiro - Brasil: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ - Apostila para Graduação e Pos-Graduação, 119 p., 2005.

MACGREGOR, J.; CASCIANO D.; MULLER, L. **Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks**. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.

MARTY, M.; SERSA, G.; GARBAY, J.; GEHL, J.; COLLINS, C.; SNOJ, M.; BILLARD, V.; GEERTSEN, P.; LARKIN, J.; MIKLAVCIC, D.; PAVLOVIC, I.; PAULIN-KOSIR, S.; CEMAZAR, M.; MORSLI, N.; SODEN, D.; RUDOLF, Z.; ROBERT, C.; O'SULLIVAN, G.; MIR, L. **Electrochemotherapy – an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study**. *European Journal of Cancer Supplements*, v. 4, p. 3–13, 2006.

MILLER, L.P.; CRAWFORD, J.T.; SHINNICK, T.M. **The rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 805-811, 1994.

MOREAU, P.; BAILONE, A.; DEVORET, R. **Prophage lambda induction of Escherichia coli K12 envA uvrB: a highly sensitive test for potential carcinogens**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73 (10), p. 3700-3704, 1976.

MORRISON, C. P., COURT, F. G., WEMYSS-HOLDEN, S. A., TEAGUE, B. D., BURRELL, A., TEXLER, M., METCALFE, M. S., DENNISON, A. R., MADDERN, G. J. **Periductal electrolytic ablation of the porcine pancreas**. *Surgical Endoscopy*, v. 18, p. 1435-1441, 2004.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; FUJII, T.; BOKU, Y.; YAGI, N.; DAO, S.; YOSHIDA, N.; KONDO, M.; MATSUI, H.; OHTANI-FUJITA, N.; SAKAI, T. **Monochloramine-induced cell growth inhibition and apoptosis in a rat gastric mucosal cell line**. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 25 (1), p. 5179-5185, 1997.

NCCAM, National Center for Complementary and Alternative Medicine, USA. **Health Info**. Disponível em: < <http://nccam.nih.gov/health/cancer/camcancer.htm>>. Acesso em: 11 de janeiro de 2010.

NCI, USA. U.S. National Institutes Of Health. National Cancer Institute. **Cancer Topics**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2009.

NILSSON, E., BERENDSON, J., THORNE, A., WERSALL, P., NASLUND, I.; LAGERSTEDT, A., NARFSTROM, K.; OLSSON, J. **Electrochemical treatment of tumours**. Chemical Engineering, v. 51, p. 1-11, 2000.

NORDENSTRÖM B. **Biologically closed electrical circuits: clinical, experimental and theoretical evidence for an additional circulatory system**. Nordic Medical Publications, Stockholm, 1983. 358 p.

NORDENSTRÖM, B. **Biologically closed electric circuits: activation of vascular interstitial closed electric circuits for treatment of inoperable cancers**. Journal Bioelectromagnetics, v. 3, p. 137–153, 1984.

NORDENSTRÖM, B. **Electrochemical treatment of cancer. Part I: Variable response to anodic and cathodic fields**, American Journal of Clinical Oncology, v. 12, p. 530–536, 1989.

PAREILLEUX, A.; SICARD N. **Lethal effects of electric current on Escherichia coli**. Applied Microbiology, v. 19, p. 421–424, 1970.

PARISE, O.; TELLÓ, M.; OLIVEIRA, L.; ZANELLA, R.; OLIVEIRA, R.; SILVA, C.; LEMES, A.; GIOSSO, M.; BARBUTO, J.; BUZAID, A. **Efeito anti-tumoral do campo elétrico potencializando quimioterápicos: estudos no modelo animal**. Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, v. 37(2), p. 76-81, 2008.

POLI, P., BUSCHINI, A., CANDI, A.; ROSSI, C. **Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochromo P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of Saccharomyces cerevisiae**. Mutagenesis, v. 14, p. 233-238, 1999.

RANALLI, G.; IORIZZO, M.; LUSTRATO, G.; ZANARDINI, E.; GRAZIA, L. **Effects of low electric treatment on yeast microflora**. Journal of Applied Microbiology, v. 93, p. 877-883, 2002.

REN, R.; VORA, N.; YANG, F.; LONGMATE, J.; WANG, W.; SUN, H.; LI, J.; WEISS, L.; STAUD, C.; MCDUGALL, J.; CHOU, C. **Variations of dose and electrode spacing for rat breast cancer electrochemical treatment.** Bioelectromagnetics, v. 22, p. 205-211, 2001.

RICHARDSON, M. A.; SANDERS, T.; PALMER, J. L.; GREISINGER, A.; S. SINGLETARY E. **Complementary/Alternative Medicine Use in a Comprehensive Cancer Center and the Implications for Oncology.** Journal of Clinical Oncology, v. 18 (13), p. 2505-2514, 2000.

RUSSEL, P. **Genetics: A Molecular Approach.** 2^o ed. Benjamin Cummings, 2005.

SERSA, G, CEMAZAR, M.; SNOJ, M. **Electrochemotherapy of tumours.** Current oncology, v.16 (2), p. 34-35, 2009.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z.; PUCIHAR, B.; SNOJ, M. **Electrochemotherapy in treatment of tumours.** European Journal of Surgical Oncology, v. 34 (2), p. 232-240, 2008.

SPUGNINI, E.; VINCENZI, B.; CITRO, G.; TONINI, G.; DOTSKINSKY, I.; MUDROV, N.; BALDI, A. **Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report.** The Veterinary Journal, v. 179 (1), p. 117-120, 2009.

TALEBI, G.; TORKAMAN, G.; FIROUZABADI, M.; MOFID, M.; SHARIAT, S. ; KAHRIL, S. **Effects of micro-amperage direct current stimulation on injury potential and its relation to wound surface area in guinea pig.** IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2007, p. 3516-3519, 2007.

TAYLOR, T.V., ENGLER,P., PULLAN, B. R.; HOLT, S. **Ablation of neoplasia by direct current.** British Journal of Cancer, v. 70, p. 342-345, 1994.

TELLÓ, M.; RAIZER, A.; BUZAID, A. C.; DOMENGE, C.; DIAS, G.; ALMAGUER, H. D.; OLIVEIRA, L.; FARBER, P. L.; OLIVEIRA, R.; SILVA, V. D. **O Uso da Corrente Elétrica no Tratamento do Câncer.** Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, cap. 1 e 4, 2004

TELLÓ, M.; PARISE, O.; BUZAID, A.; OLIVEIRA, R.; ZANELLA, R.; CARDONA, A. **Electrochemical therapy to treat cancer (in vivo treatment).** Conference IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2007, p. 3524-3527, 2007.

TERZIYSKA, A., WALTSCHEWA, L.; VENKOV, P. **A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution.** Environmental Pollution, v. 109, p. 43-52, 2000.

TIEHM, A.; LOHNER, S.; AUGENSTEIN, T. **Effects of direct electric current and electrode reactions on vinyl chloride degrading microorganisms.** *Electrochimica Acta*, v. 54, p. 3453-3459, 2009.

TURLER, A.; SCHAEFER, H.; SCHAEFER, N.; WAGNER, M.; MAINTZ, D.; QIAO, J.; HOELSCHER, A. **Experimental low-level direct current therapy in liver metastases: influence of polarity and current dose.** *Bioelectromagnetics*, v. 21, p. 395-401, 2000.

VALLE, A.; ZANARDINI, E.; ABBRUSCATO, P.; ARGENZIO, P.; LISTRATO, G.; RANALLI, G.; SORLINI, C. **Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 1376-1385, 2007.

VEIGA, V. F., HOLANDINO, C., RODRIGUES, M. L., CAPELLA, M. A., MENEZES, S.; ALVIANO, C. S. **Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells by direct electric Current: An in vitro analysis.** *Bioelectromagnetics*, v. 21, p. 597-607, 2000.

VEIGA, V.; NIMRICHTER, L.; TEIXEIRA, C.; MORALES, M.; ALVIANO, C.; RODRIGUES, M.; HOLANDINO, C. **Exposure of human leukemic cells to direct electric current.** *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 42, p. 61-74, 2005.

VIJH AK. **Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 29663–29665, 2004.

von EULER, H.; OLSSON, J.; HULTENBY, K.; THORNER, A.; LAGERSTEDT, A. **Animal models for treatment of unresectable liver tumours: a histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver.** *Bioelectrochemistry*, v. 59, p. 89–98, 2003.

von EULER, H.; SODERSTEDTB, A.; THORNEC, A.; OLSSONB, J.; YONGQINQB, G. **Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line. An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours.** *Bioelectrochemistry*, v. 58 (2), p. 163-170, 2002.

von EULER, H.; NILSSON, E.; OLSSON, J.; LAGERSTEDT, S. **Electrochemical treatment (EChT) effects in rat mammary and liver tissue. In vivo optimizing of a dose-planning model for EChT of tumours.** *Bioelectrochemistry*, v. 54 (2), p. 117-124, 2001.

WATSON, J.; BAKER, T.; BELL, S.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia Molecular do Gene.** 5 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. 728 p.

WEINBERG, A. **How cancer arises**. Scientific American, p. 62-70, 1996.

WEMYSS-HOLDEN, S.; ROBERTSON, G.; DENNISON, A.; HALL, P.; FOTHERGILL, J.; MADDERN, G. **Electrochemical Lesions in the Rat Liver Support Its Potential for Treatment of Liver Tumors**. Journal of Surgical Research, v. 93, p. 55-62, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2009.

XIN, Y. **The clinical advance in application of EChT within the past ten years**. Preprints from the 2nd International Symposium on Electrochemical Treatment of Cancer, Beijing, p. 81–92, 1998.

XIN, Y. **Organization and spread of electrochemical therapy (ECT) in China**. European Journal of Surgery Supplement, v. 574, p. 25–30, 1994.

YEN, Y.; LI, J.; ZHOU, B.; ROJAS, F.; YU, J ; CHOU, C. **Electrochemical treatment of human KB cells in vitro**. Bioelectromagnetics, v. 20, p. 34-41, 1999.