

CESAR AUGUSTO ANTUNES TEIXEIRA

**Aspectos Moleculares Associados à
Eletroterapia Tumoral: Um Estudo *in vitro* em
Células de Carcinoma Pulmonar e *in vivo* em
Camundongos com Melanoma**

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

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

Prof. Dr. Marcelo Marcos Morales

Rio de Janeiro

2010

CESAR AUGUSTO ANTUNES TEIXEIRA

Aspectos Moleculares Associados à Eletroterapia Tumoral: Um Estudo *in vitro* em Células de Carcinoma Pulmonar e *in vivo* em Camundongos com Melanoma

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

Aprovada em:

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

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

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Zancan
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Celuta Sales Alviano
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho
Faculdade de Farmácia – UFRJ

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

À minha Mulher, Lizanne, pelo amor e compreensão.

Aos meus pais, José Augusto e Aricélia, e meus avós, Almyr e Gitta

pela força e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao **Fluxo Energético Universal**, por me prover sempre de energia, concentração, lucidez e sensibilidade, muitas vezes sob a forma de amizade visível ou invisível, para o alcance de meus desejos e desígnios.

À prof. Dra. **Carla Holandino**, orientadora deste trabalho, que sempre acreditou em mim e neste trabalho, tratando-me como uma verdadeira mãe em todos os momentos. Em nome da confiança e da amizade que nem os hiatos da vida hão de enfraquecer, o meu imenso agradecimento.

Ao prof. Dr. **Marcelo Marcos Morales**, orientador deste trabalho, por aceitar este desafio e contribuir grandemente para realização deste trabalho, com provimento, conhecimento e palavras certas nos momentos certos.

Aos meus pais, **José Augusto** e **Aricélia**, pelo carinho, auxílio e amor incondicional de sempre. O primeiro, especialmente por nunca deixar esquecer-me de quem eu sou. A segunda, por sempre me lembrar da importância do Amor na mais rígida das tarefas. Obrigado pela confiança em mim depositada e pelo incentivo para alcançar este sonho. Vocês são e sempre serão a base da minha formação pessoal e profissional.

À minha mulher, amiga e amante **Lizanne**, por ter entendido minhas ausências, me completando de carinho e amor por 6 anos e por ter me dado forças para que eu nunca desistisse deste sonho. Por ser uma companheira no sentido mais completo que a palavra pode ter.

Aos meus irmãos, **José Paulo** e **Gustavo**, que se o sangue não nos unisse, ainda assim os escolheria.

Aos irmãos **Eliezer**, **Felipe** e **Thiago** por me ajudarem a ser uma pessoa muito melhor através da Arte e da amizade verdadeira.

Aos meus avós **Almyr** e **Gitta** pelo amor imensurável e orações sempre. Estão sempre presentes no meu coração.

A **Gleyce Moreno**, peça chave de nossa equipe, pela amizade, paciência, presteza e ajuda incansável.

Ao **Venício**, pela amizade e o expertise em microscopia, verdadeiro préstimo com a arte das imagens da natureza.

A **Débora Ornellas**, pelo indispensável aconselhamento e dedicado treinamento

em Biologia Molecular.

*A **Fernanda Aguiar**, pela amizade, senso de parceria e dedicação.*

*À toda equipe do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas: **Taíssa, Fortune, Camila, Rafaela, Luana e Rafael** por nossas sintonias produzirem um ambiente de trabalho leve e prazeroso.*

*À toda equipe do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular, em especial **Raquel Castiglione, Felipe Prota e Jackson Menezes**, pelo acolhimento e ajuda nas rotinas de Biologia Molecular.*

*Ao Prof. Dr. **André Luis Souza dos Santos**, por compor minha banca de avaliação, pelo aconselhamento e por ceder a estrutura do Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana para desenvolvimento de parte deste projeto.*

*À Prof. Dra **Patrícia Zancan**, por compor minha banca de acompanhamento e avaliação, contribuindo com importante aconselhamento.*

*Aos Profs. **Celuta Alviano, Alexandre Pyrrho e Eduardo Ricci** por gentilmente aceitarem o convite para compor a banca de avaliação.*

*À **Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**, por me aceitar como aluno e pelo atencioso trabalho.*

*À **CAPES**, pela bolsa de estudos.*

“Se vai tentar, vá até o fim.

Caso contrário, sequer comece.”

Charles Bukowski

RESUMO

TEIXEIRA, Cesar Augusto Antunes. **Aspectos Moleculares Associados à Eletroterapia Tumoral: Um Estudo *in vitro* em Células de Carcinoma Pulmonar e *in vivo* em Camundongos com Melanoma.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O câncer de pulmão é a oitava maior causa de morte no mundo, com baixo índice de sobrevida, sendo uma doença de difícil terapêutica. A eletroterapia tumoral consiste no tratamento de neoplasias com a passagem de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade (CE), através da inserção de eletrodos nas lesões. Esta técnica é difundida em alguns países como China e Cuba, mas seu reconhecimento como terapia antitumoral é travancado pelo pouco conhecimento de seus mecanismos de ação. Sabe-se que o fluxo anódico gera espécies oxidantes capazes de provocar apoptose celular, como as cloraminas, resultantes da reação de ácidos aminados e espécies reativas de cloro. A proposta deste estudo foi avaliar a susceptibilidade da linhagem pulmonar tumoral A549 à CE, bem como investigar a ocorrência de apoptose induzida pelo fluxo anódico, avaliando o papel de caspase-3, enzima chave de deflagração desse processo. Dois sistemas experimentais, com diferentes dimensões e superfícies de contato do eletrodo com o meio eletrolítico, foram utilizados para avaliar os efeitos da CE sobre a viabilidade celular. A análise deste parâmetro pelo método do MTT evidenciou quedas proporcionais à intensidade de corrente, ao tempo de tratamento e à superfície de contato dos eletrodos com o meio eletrolítico. A análise morfológica por coloração de Giemsa demonstrou marcantes alterações estruturais nas células tratadas, como: retração citoplasmática, condensação nuclear e projeções de membrana, características que podem ser associadas à apoptose. Na análise

do perfil eletroforético do DNA total das células tratadas observaram-se fragmentos de pesos moleculares bem definidos, múltiplos de 200 pares de bases, evidenciando a degradação enzimática do DNA típica da apoptose. A atividade enzimática de caspase-3 mostrou-se aumentada após o tratamento elétrico, o que caracteriza a participação de caspases no processo apoptótico induzido pela CE. Como parte do desenvolvimento do presente projeto, a nanotecnologia foi associada a corrente elétrica contínua e avaliada em um modelo de melanoma murino *in vivo*. Para atingir este objetivo, L-tirosina foi encapsulada em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona, visando aumentar a produção e liberação de cloraminas e, conseqüentemente, a potencialização do efeito antitumoral da CE. Neste estudo piloto foi observada uma grande necrose nos tumores tratados a partir da associação da L-tirosina encapsulada com CE, detectada tanto macroscopicamente quanto microscopicamente. Estes resultados trazem importantes contribuições visando otimizar a terapia do câncer, através da compreensão dos mecanismos antitumorais envolvidos com a eletroterapia, além de comprovar a eficácia da associação da L-tirosina encapsulada em nanopartículas com CE como uma promissora terapêutica antitumoral. Novos estudos serão desenvolvidos visando a melhor compreensão das vias apoptóticas envolvidas nestes mecanismos de ação, bem como o aperfeiçoamento e otimização do modelo *in vivo* de melanoma murino para estudo da associação de corrente elétrica e nanotecnologia.

Palavras-chave: Eletroterapia Tumoral, Corrente Elétrica, Câncer, Cloraminas Apoptose, Nanotecnologia.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Cesar Augusto Antunes. **Molecular Aspects Associated with Tumor Electrotherapy: A Study Using an *In Vitro* Lung Cancer Cell Model and *In Vivo* with Melanoma-Bearing Mice.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Lung cancer is the eighth highest death cause in the world, with low survival rates, being a hardly treatable disease. Tumor Electrotherapy consists of treatment of neoplasia with low intensity direct electric current (DC) through the insertion of electrodes in the lesions. The use of this technique is widespread in countries like China and Cuba, but its worldwide use is hindered by the lack of understanding of its action mechanisms. It is known that the anodic flow generates oxidizing species, such as chloramines, resulting from the reaction of amino acids with chlorine reactive species, inducing apoptosis. The aim of this study is to evaluate the susceptibility of lung tumor cell line A549 to DC, as well as to investigate the occurrence of anodic flow-induced apoptosis, assessing the role of caspase-3, a key enzyme in the trigger of this process. Cell viability was assessed by MTT method in two differently-sized experimental systems, and cell killing was proportional to DC intensity, time of treatment and electrode surface contact. Morphological analysis with Giemsa staining showed marked structural alterations in treated cells, such as cytoplasm loss, nuclear condensing and membrane projections, characteristics associated with apoptosis. DNA fragmentation assessed by gel electrophoresis showed a typical running profile, as a result of an enzymatic DNA fragmentation, a hallmark of apoptotic cell death. Caspase-3 activity was augmented after electrical treatment, which characterizes caspase-3 involvement in the DC-

induced apoptosis. As part of the development of this project, nanotechnology was associated with direct electric current and the resulting effects were evaluated in an *in vivo* murine melanoma model. In order to do this, L-tyrosine-loaded polycaprolactone nanoparticles were combined with DC to increase the production and delivery of chloramines and, consequently, potentiate the antitumoral effect of DC. This pilot study showed a significantly stronger necrosis production in tumors treated with the association of encapsulated L-tyrosine with DC, both macroscopically and microscopically. These results add important information for the comprehension of the antitumoral mechanisms of electrotherapy and also prove the efficacy of the association of L-tyrosine nanoparticles with DC as a promising antitumoral therapeutic.

Keywords: Tumor Electrotherapy, Direct Electric Current, Cancer, Chloramines, Apoptosis, Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação dos dedos da pata de camundongo em desenvolvimento.	27
Figura 2. Representação esquemática das duas principais vias deflagradoras da apoptose.	34
Figura 3. Representação esquemática da liberação de sistemas nanoparticulados.	44
Figura 4. Estrutura da poli- ϵ -caprolactona.	46
Figura 5. Representação esquemática do sistema experimental utilizado para tratamento elétrico das células A549.	54
Figura 6. Aparatos utilizados para tratamento elétrico das células A549.	55
Figura 7. Inoculação de camundongo com células B16F10.	62
Figura 8. Tratamento dos camundongos C56Bl/6Y portadores de melanoma induzido por inoculação de células B16F10.	65
Figura 9. Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo catódico.	67
Figura 10. Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo eletroiónico.	68
Figura 11. Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo anódico.	69
Figura 12. Viabilidade celular da linhagem A549 incubada com meio de cultura por 24 horas após o tratamento anódico.	70
Figura 13. Viabilidade celular da linhagem A549 incubada com meio de cultura por 24 horas após o tratamento com fluxo eletroiónico.	70
Figura 14. Expressão relativa de Caspase 3 após diversos tratamentos, seguidos de 3 horas de incubação com meio de cultura suplementado.	71
Figura 15. Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com 2 mA nos diferentes tempos de exposição, utilizando modelo de placa de 24 poços.	72
Figura 16. Fotomicrografias de células A549 coradas pelo método de Giemsa.	74
Figura 17. Atividade enzimática de Caspase 3 por fluorimetria em células A549.	75

Figura 18. Gel de eletroforese de DNA total de células após 18h de tratamento com FA e 18h de incubação com cisplatina 50 µM.	76
Figura 19. Fotomicrografias de cortes de melanoma murino corados por hematoxilina/eosina observados por microscopia óptica.	79
Figura 20. Fotomicrografias de cortes ultrafinos de melanoma murino observados por microscopia eletrônica de transmissão.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As principais enzimas da família das Caspases.	32
Tabela 2. As dez maiores causas de morte humana em 2004.	35
Tabela 3. Dimensões dos dois sistemas utilizados para tratamento das células com corrente elétrica.	55
Tabela 4: Tamanho dos tumores obtidos por inoculação de células B16F10 em dorso de camundongos.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating Factor
CAD	Caspase-activated DNase
CT	Controle de Células
CE	Corrente Elétrica
DMEM	Dulbecco Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETT	Eletroterapia Tumoral
FA	Fluxo Anódico
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FC	Fluxo Catódico
FEI	Fluxo Eletroiónico
HEPES	N-(2-hydroxyethyl-piperazine-N')-(2-ethanesulfonic acid)
KCl	Cloreto de Potássio

K_2HPO_4	Fosfato de potássio monobásico
MCP	Morte Celular Programada
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MO	Microscopia Óptica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nps	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVA	Álcool Polivinílico
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Percentual
nm	Nanômetro(s)
µm	Micrômetro (s)
cm	Centímetro(s)
mL	Mililitro(s)
µL	Microlitro(s)
g	Gramas(s)
mg	Miligramas(s)
mM	Milimolar (milimoles / litro)
M	Molar (moles / litro)
N	Normal
°C	Graus Celsius
h	Hora (s)
% v/v	Percentual volume (mL) / volume (mL)
mA	Miliampére

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 O CÂNCER E A ELETROTERRAPIA TUMORAL	24
2.1 Câncer	24
2.2 Morte Celular Programada	27
2.2.1 Apoptose	29
2.3 Câncer de Pulmão	35
2.4 Evidências in vivo e in vitro dos efeitos antitumorais da corrente elétrica	37
3 NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER	43
3.1 Nanotecnologia e sistemas de liberação de fármacos	43
3.2 Nanopartículas poliméricas	44
3.3 Propriedades da Policaprolactona (PCL)	46
4 OBJETIVOS	48
4.1 OBJETIVO GERAL	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Material	49
5.1.1 Equipamentos e Utensílios	49
5.1.2 Reagentes	50
5.2 Métodos	51
5.2.1 Cultura de Células	51
5.2.1.1 Preparo do meio de cultura DMEM	51
5.2.1.2 Preparo da solução de tripsina	52
5.2.1.3 Preparo do tampão salina fosfato	52

5.2.1.4 Preparo do azul de tripan	52
5.2.1.5 Cultivo das células da linhagem A549	53
5.2.2 Tratamento com corrente elétrica	53
5.2.3 Viabilidade celular	56
5.2.3.1 Preparo da solução de MTT	56
5.2.3.2 Determinação da viabilidade celular	56
5.2.4. Análises morfológicas	57
5.2.4.1 Preparo da solução de Bouin	57
5.2.4.2 Preparo da solução de Giemsa	57
5.2.4.3 Coloração pelo método de Giemsa	58
5.2.5 Atividade enzimática de Caspase-3	58
5.2.5.1 Preparo do tampão de lise para ensaio de atividade enzimática	58
5.2.5.2 Ensaio de atividade enzimática de caspase-3	59
5.2.6 Expressão gênica de caspase-3	59
5.2.7 Fragmentação do DNA	60
5.2.7.1 Preparo do tampão de lise	60
5.2.7.2 Extração do DNA e eletroforese em gel de agarose	60
5.2.8 Tratamento elétrico de melanoma murino in vivo associado à Nanotecnologia	61
5.2.8.1 Linhagem B16F10	61
5.2.8.2 Indução de melanoma em camundongos	62
5.2.8.3 Preparo das suspensões de ácidos aminados e Np	63
5.2.8.4 Inoculação das Np e tratamento dos animais	64
5.2.8.5 Microscopia óptica	65
5.2.8.6 Microscopia eletrônica de transmissão	66

6 RESULTADOS	67
6.1 Efeitos da CE sobre a linhagem A549 no sistema de placa de 96 poços	67
6.1.1 Citotoxicidade induzida por CE	67
6.1.2 Expressão gênica de caspase-3	71
6.2 Efeitos da CE sobre a linhagem A549 no sistema de placa de 96 poços	72
6.2.1 Citotoxicidade induzida por CE	72
6.2.2 Avaliação morfológica da linhagem A459 tratada com CE	73
6.2.3 Atividade enzimática de caspase-3	75
6.2.4 Análise da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose	76
6.3 Efeitos in vivo da CE em associação com L-tirosina encapsulada em Np de PCL em melanoma de camundongo	77
7 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
8 CONCLUSÕES	88
9 REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO:

Um dos grandes desafios do tratamento do câncer deriva do fato da doença ser causada por células do próprio organismo, que fugiram ao controle homeostático. Isso dificulta o desenvolvimento de terapias que sejam seletivamente tóxicas às células tumorais (ALBERTS *et al.*, 2008). Assim, alternativas terapêuticas seguras e eficazes devem ser intensivamente buscadas para preencher essas lacunas.

A eletroterapia tumoral (ETT) consiste na aplicação local de uma corrente elétrica de baixa intensidade em tumores sólidos, através da inserção de eletrodos metálicos na lesão (NORDENSTRÖM, 1983, 1985). Esse tratamento antitumoral surge como uma abordagem minimamente lesiva para o organismo, já que o dano pode ser restrito à área tumoral. A ETT pode, inclusive, ser aplicada como agente complementar de forma associada às terapias convencionais, potencialmente aumentando suas eficácias. De fato, a corrente elétrica associada ao tratamento com alguns quimioterápicos é uma técnica extensamente estudada e recebe o nome de eletroquimioterapia (MIR *et al.*, 1998; MARTY *et al.*, 2006; SERSA *et al.*, 2008).

Apesar de promissores resultados no tratamento de inúmeros tipos de câncer em diversos estudos (NORDENSTRÖM, 1983, 1985; XIN *et al.*, 1994, 1997)., o mecanismo de ação exato responsável pelas propriedades antitumorais da corrente elétrica ainda não é totalmente compreendido. Isso gera heterogeneidade nos protocolos clínicos de aplicação da terapia, como intensidades e tempos de corrente elétrica utilizados; quantidades, polaridades e posicionamento de eletrodos utilizados, etc. Esses fatores prejudicam a reprodutibilidade dos resultados da ETT. A compreensão das bases moleculares envolvidas com a atividade antitumoral de

correntes elétricas contínuas se faz necessária para a otimização e consolidação desta terapia (NILSSON *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* realizados previamente por nosso grupo de pesquisa foram capazes de avaliar o efeito isolado de cada componente do circuito elétrico, através do modelo desenvolvido por Veiga e colaboradores (VEIGA *et al.*, 2000, 2005; HOLANDINO *et al.*, 2001). Assim, tratando diferentes linhagens de células leucêmicas, foi observado que o tipo de morte celular é dependente da polaridade do eletrodo (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000, 2005). Dessa forma células próximas ao pólo negativo, ou o denominado fluxo catódico (FC), morrem por necrose, com extensa lise celular. Em contrapartida, as células próximas ao pólo positivo, o chamado fluxo anódico (FA), além de necrose, apresentam também características de morte celular por apoptose (VEIGA *et al.*, 2005), um tipo de morte celular programada, uma propriedade normalmente suprimida em células tumorais (FULDA, 2009). Este pode se caracterizar como um importante mecanismo de ação da corrente elétrica, que pode responder pelo efeito duradouro da ETT observado em estudos *in vivo*, o que faria do ânodo um componente vital para o sucesso da técnica. No entanto, pouco é conhecido acerca das vias de sinalização deflagradoras desta morte apoptótica, ou mesmo se este fenômeno se repete em outras linhagens celulares.

A geração de espécies reativas de oxigênio e cloro por decomposição eletrolítica dos fluidos nas imediações dos eletrodos parece ser um dos principais responsáveis pelo dano celular induzido pela CE (NORDENSTRÖM, 1994). O caráter destas espécies também varia de acordo com o pólo, de forma que a o FA produz espécies oxidantes que induzem variações, como a acidificação do meio, enquanto o FC gera espécies redutoras e alcalinização do meio eletrolítico. Este

estresse oxidativo gerado no FA pode ser um dos mecanismos envolvidos com a apoptose detectada neste pólo (MAYER *et al.*, 1994; DANIAL *et al.*, 2004; VEIGA *et al.*, 2005). Associado a isso, estudos anteriores avaliaram a citotoxicidade induzida apenas por variações do pH, sem a passagem de corrente elétrica, em células de tumor mamário murino e observaram indução de apoptose em pHs mais ácidos, por ativação de caspase 3 e fragmentação de DNA (VON EULER *et al.*, 2002).

A variação do pH e o tempo de contato com as espécies oxidantes geradas influenciam o tipo de dano induzido pela CE. No presente trabalho, foi realizado um estudo *in vitro* dos efeitos da corrente elétrica de baixa intensidade na linhagem celular de câncer de pulmão A549, ainda não estudada neste modelo. Para isso, o efeito do tratamento elétrico sobre a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT em dois sistemas de eletrodos com diferentes dimensões físicas. Num segundo momento, foram observadas as alterações morfológicas induzidas pelo FA por microscopia óptica, o perfil de fragmentação do DNA das células tratadas, bem como a atividade e a expressão gênica de caspase-3, enzima que desempenha papel central na maioria das vias apoptóticas. Esta abordagem permite caracterizar a ocorrência da morte celular por apoptose em células de câncer de pulmão, bem como o possível envolvimento das enzimas da família das caspases na deflagração deste processo (HUERTA *et al.*, 2007), o que é relevante, uma vez que esta morte celular programada também pode ocorrer sem a participação destas enzimas (BRÖKER *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas buscam desenvolver novos sistemas de liberação e tecnologias que visam direcionar fármacos ao seu sítio alvo, através do processo de vetorização. Entre os novos sistemas de liberação de fármacos encontram-se as nanopartículas (Nps) que são objeto de estudo da Nanociência e da Nanotecnologia (ALEXIS *et al.*, 2008). O conceito de nanotecnologia nas Ciências Farmacêuticas, direcionada à liberação de fármacos, está baseado na produção de nanopartículas capazes de encapsular fármacos a serem liberados exclusivamente no órgão alvo ou em aglomerados de células, como os que se formam em tumores (ALEXIS *et al.*, 2008). A liberação sítio-específica de fármacos é uma vantagem no tratamento do câncer porque reduz os efeitos colaterais. Estudos recentes realizados em camundongos com câncer mostraram que os sistemas de liberação nanoparticulados podem acumular-se na célula cancerosa exibindo notável eficácia, além de citotoxicidade específica (FAROKHZAD *et al.*, 2006).

Englert e Shacter descreveram em 2002 a propriedade pró-apoptótica de cloraminas, que são espécies químicas resultantes da reação entre espécies reativas de cloro e ácidos aminados, ambos presentes no meio eletrolítico nas imediações do FA *in vivo* (ENGLERT & SHACTER, 2002). Logo, é factível que o tratamento elétrico com o FA possa gerar cloraminas, que podem eventualmente participar do mecanismo de ação da CE como indutores de apoptose. De fato, Veiga e colaboradores comprovaram esta hipótese ao adicionar glutamina ao meio eletrolítico. O tratamento anódico na presença deste ácido aminado antecipou o aparecimento de células com morfologia apoptótica de 18 para 1 hora após o tratamento com 2 mA de CE (VEIGA *et al.*, 2005).

Desta forma, a adição de aminoácidos ao meio eletrolítico encapsulados em Nps poderia potencializar os efeitos citotóxicos da corrente elétrica, através da

produção de cloraminas e a modulação de sua liberação nas células. De fato, essa potencialização do dano foi observada por nosso grupo, quando células de melanoma murino da linhagem B16F10 foram tratadas *in vitro* com o FA em associação com o ácido aminado L-tirosina encapsulado em Np de poli- ϵ -caprolactona (CAMPOS, 2008; CAMPOS *et al.*, 2010).

Dando continuidade a esse trabalho, foi realizado um estudo piloto *in vivo* sobre o efeito da associação de CE e L-tirosina encapsulada em Np de poli- ϵ -caprolactona em um modelo de melanoma murino, onde camundongos Black C56BL/6Y foram inoculados com a linhagem B16F10, a mesma usada previamente no estudo *in vitro*.

2. O CÂNCER E A ELETROTERRAPIA TUMORAL:

2.1. Câncer

O câncer é responsável por cerca de 7,4 milhões de mortes por ano no mundo, o que corresponde a cerca de 13% do total de óbitos anuais no planeta, sendo a maior causa de morte humana nos últimos anos (OMS, 2009).

Em organismos multicelulares, as células em um tecido se comportam respeitando suas funções específicas, visando a manutenção das melhores condições para o organismo como um todo. Suas características e funções biológicas, tais como morfologia, metabolismo, diferenciação e proliferação são controladas por complexas vias bioquímicas de sinalização. Eventualmente, algumas células podem sofrer mutações em genes relacionados à resposta a esses controles, resultando em comportamentos aberrantes em relação ao tecido em que se encontram, como morfologia incompatível, metabolismo acelerado e proliferação indiscriminada. Além da perda de funcionalidade, essas células aberrantes podem acabar sobrepujando as células normais na disputa por espaço e nutrientes (ALBERTS *et al.*, 2009).

As células tumorais ou neoplásicas são células que, dentre outras características, acumulam mutações em diversos genes relacionados a funções de manutenção das características regulares da célula. Hanahan e Weinberg em 2000, em uma completa e bem estruturada revisão da literatura, delinearam seis características essenciais adquiridas por mutação, que definem uma célula como neoplásica. Essas características aberrantes se aplicam à grande maioria, se não à totalidade, dos tipos de câncer, variando apenas a ordem dos eventos e os mecanismos pelos quais elas podem se estabelecer:

- *Autosuficiência em sinais de crescimento*: células normais necessitam de

sinais mitogênicos para que passem de um estado de quiescência para um estado de proliferação ativa. Estes sinais são transmitidos à célula por receptores específicos em sua membrana que respondem a três tipos de moléculas: fatores de crescimento solúveis, componentes da matriz extracelular e moléculas de interação célula-célula. Mutações podem fazer com que as células tumorais passem a produzi-las para sua própria sinalização ou mesmo permaneçam com essas vias de sinalização ativadas independentemente da presença destas moléculas (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

- *Ausência de resposta a sinalização antiproliferativa externa:* da mesma forma que a proliferação celular é estimulada por sinais externos, o equilíbrio é estabelecido por sinais inibitórios de crescimento, para que um excesso de células não prejudique o funcionamento do tecido. Células tumorais se tornam irresponsivas a estes sinais repressores, através de mutações em proteínas repressoras do ciclo celular ou mesmo da expressão reduzida ou anômala dos receptores para esses sinais (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

- *Capacidade proliferativa ilimitada:* todas as células em um organismo possuem um número limitado de divisões celulares. Isso se deve à incapacidade do maquinário de replicação do DNA em duplicar as extremidades finais dos cromossomos, sendo que a cada divisão celular, uma parte do DNA é simplesmente perdida. Entretanto, existem regiões não-codificantes nas extremidades dos cromossomos chamadas telômeros, cujo tamanho diminui a cada geração de células, evitando a perda de regiões funcionais do DNA. O número de divisões celulares possíveis é então determinado pelo tamanho dos telômeros. Células neoplásicas têm um aumento da atividade e/ou expressão de telomerase, enzima que reconstrói estas estruturas, possibilitando um número virtualmente infinito de

divisões celulares, num processo chamado imortalização celular (HANAHAN & WEINBERG, 2000; SHAY & WRIGHT, 2005).

- *Capacidade de promover angiogênese*: uma vez estabelecido o tumor, seu desenvolvimento é limitado pelo aporte de nutrientes. Nem todas as células tumorais que vão sendo geradas têm acesso aos vasos sanguíneos e a difusão célula-célula dos nutrientes torna-se limitada. A capacidade de produzir fatores iniciadores de angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), torna o tumor capaz de deslocar para si o fluxo sanguíneo, garantindo seu aporte nutricional (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

- *Capacidade de invasão tecidual e metástase*: a capacidade de romper os limites do tecido em que se encontra, ganhar a corrente sanguínea e vasos linfáticos e se instalar em órgãos distantes da lesão primária é um forte componente de malignidade e letalidade do tumor. Células neoplásicas metastáticas têm alterações na expressão de proteases extracelulares, que degradarão componentes da matriz tecidual, e de proteínas de adesão específicas, responsáveis pela sua capacidade de instalação num tecido alvo diferente do original (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

- *Escape ou resistência à apoptose*: este tipo de morte celular programada consiste num mecanismo fisiológico que evita que células com padrões de diferenciação e proliferação aberrantes sobrevivam, o que pode comprometer a homeostase e a função do tecido em que se encontram (ALBERTS *et al.*, 2008). As alterações funcionais apresentadas pelas células neoplásicas seriam suficientes para o disparo da apoptose por diversas vias, mas este mecanismo está suprimido seja por silenciamento de genes pró-apoptóticos, seja por supra-regulação de genes anti-apoptóticos (FESIK, 2005; FULDA, 2009).

2.2. Morte Celular Programada

A funcionalidade de um tecido em um organismo multicelular depende de um padrão de comportamento sincronizado entre as células que o compõe. É um sensível estado de equilíbrio dinâmico, mediado por mecanismos bioquímicos de comunicação entre estas células. Neste contexto, até mesmo a morte é conveniente para o bom funcionamento do organismo.

O suicídio celular, denominado mais apropriadamente como morte celular programada (MCP), é um fenômeno fisiológico de ocorrência freqüente em inúmeros sistemas. Esta espécie de altruísmo biológico é de suma importância em processos como a manutenção da ordem tecidual ou mesmo para a funcionalização de um tecido em desenvolvimento. Um exemplo deste papel fisiológico é o desenvolvimento dos dedos da pata de animais *in utero*, onde células entram em apoptose para criar os espaços interdigitais, dando forma e função ao órgão (Figura 1).

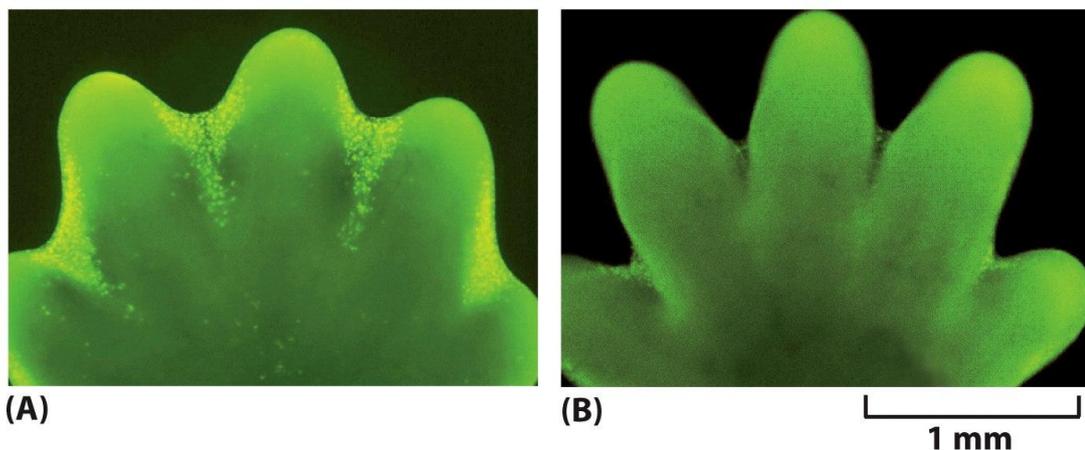


Figura 1 – Formação dos dedos da pata de camundongo em desenvolvimento. A – Pata do feto com marcação de células apoptóticas em verde brilhante. B – A mesma pata um dia depois, mostrando que a morte celular programada em regiões específicas deu origem aos espaços interdigitais (adaptado de Alberts *et al.*, 2008).

São 5 os principais tipos de MCP descritos até então: a cornificação, a autofagia, a necrose, a necroptose e a apoptose:

- *Cornificação*: é um tipo específico de morte celular que ocorre na formação da epiderme. Consiste numa etapa terminal de diferenciação dos queratinócitos, que produzem quantidades massivas de queratina e outras proteínas que, ao se depositarem nas camadas externas da pele, conferirão elasticidade e estabilidade estrutural necessárias a este tecido. Por fim, os queratinócitos morrem via cascatas de sinalização específicas, distintas dos outros mecanismos de MCP, e passam a ser denominados corneócitos (KROEMER *et al.*, 2009).

- *Autofagia*: é um processo intracelular de degradação de organelas da própria célula. Elas são sequestradas em vesículas chamadas autofagossomos, que, posteriormente, se fundem a lisossomos, formando os autolisossomos, onde o conteúdo será degradado. A autofagia não pode ser considerada um tipo de MCP *stricto sensu*, pois esta destruição de estruturas internas pode promover inclusive a sobrevivência celular, uma vez que as organelas consumidas podem gerar energia em situações de estresse metabólico (EISENBERG-LERNER *et al.*, 2009). A morte celular causada pela intensa degradação autofágica de estruturas internas, apesar de ser freqüente e erroneamente denominada “morte celular autofágica”, é mais apropriadamente chamada de morte *com* autofagia (KROEMER *et al.*, 2009).

- *Necrose e Necroptose*: é caracterizada por um aumento do volume celular acompanhado de inchaço de organelas, que culmina na ruptura da membrana plasmática e perda de conteúdo intracelular. É uma forma de morte celular desorganizada e a princípio acidental e não controlada, que costuma ser uma resposta a um estresse intenso e gera intensa resposta inflamatória. No entanto, nos últimos 5 anos vem sendo descrita na literatura a deflagração de necrose regulada

por vias de sinalização específicas, envolvendo especialmente a proteína quinase RIP1 (*kinases receptor interacting protein*), uma vez que a ocorrência de necrose foi inibida na presença de seu inibidor específico necrostatina-1 em alguns modelos experimentais (KROEMER *et al.*, 2009). Este tipo de “necrose programada” vem sendo denominada necroptose e alguns autores sugerem que ela pode representar um mecanismo de MCP alternativo para células tumorais resistentes à apoptose. De fato, a necroptose foi descrita em células tratadas com estímulos pró-apoptóticos na presença de inibidores de caspases (HITOMI *et al.*, 2008; KROEMER *et al.*, 2009).

2.2.1. Apoptose

O termo apoptose deriva do grego *apoptosis*, que se refere ao cair natural das pétalas de uma flor ou de folhas de árvores no outono. Foi primeiramente utilizado em 1972 por Kerr e colaboradores para designar a MCP, marcada por características morfológicas específicas. É importante ressaltar que apoptose e MCP não mais podem ser tratados como sinônimos, pois atualmente conhecem-se várias outras modalidades de MCP, conforme descrito acima (KROEMER *et al.*, 2009).

Uma dos aspectos da importância fisiológica da apoptose reside no fato que não há extravasamento de conteúdo intracelular no local, evitando a ocorrência de reação inflamatória no local, o que pode ser deletério para o tecido. Na apoptose, os restos celulares, denominados corpos apoptóticos, são fagocitados por macrófagos residentes no tecido, resultando numa morte “limpa” (CALLAHAN *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2004). A apoptose é o tipo de MCP mais largamente estudado e é identificado por características morfofuncionais típicas, a saber:

- *Perda do potencial transmembranar mitocondrial*: além do gradiente de prótons que participa da síntese de ATP na respiração celular, o espaço

intermembranar contém uma série de proteínas. A permeabilização da membrana externa da mitocôndria, além de dissipar este gradiente de prótons, libera no citoplasma o citocromo c, proteína que participa da cadeia respiratória mitocondrial mas, quando no citoplasma, desencadeia a ativação de cascata intrínseca de disparo da apoptose, a ser discutida mais à frente (BRUSTUGUN *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 2010).

- *Exposição de fosfatidilserina na face extracelular da membrana plasmática:* normalmente situado na face interna da membrana plasmática na maioria dos tipos celulares, este lipídio passa a ser exposto na face externa de células em apoptose. A presença de fosfatidilserina na face extracelular funciona como marcador para fagocitose por macrófagos (CALLAHAN *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2004).

- *Fragmentação organizada do DNA:* durante o processo de picnose e fragmentação nuclear, o DNA é fragmentado por endonucleases, enzimas que são ativadas pela cascata de deflagração da apoptose, como por exemplo, a DNase ativada por caspases (CAD). Essa clivagem enzimática ocorre entre os nucleossomos do DNA genômico, gerando fragmentos de tamanho definido, mais precisamente múltiplos de 180 a 200 pares de base, que é o tamanho aproximado do DNA enovelado em cada nucleossomo (COUNIS *et al.*, 2006; DI FILLIPO *et al.*, 2009).

- *Características morfológicas típicas:* importantes marcadores diagnósticos da célula em apoptose, essas alterações incluem condensação e perda de volume nuclear e citoplasmático, a chamada picnose; empacotamento de organelas em vesículas e aparecimento de projeções de membrana, os chamados “blebs”, culminando na fragmentação da própria célula, formando os chamados corpos apoptóticos (KERR *et al.*, 1972; HUERTA *et al.*, 2007; ALBERTS *et al.*, 2008).

As enzimas da família das caspases são os principais iniciadores e efetores intracelulares da apoptose. São cisteinil-aspartato proteases presentes no citoplasma que são sintetizadas sob a forma de zimogênio (onde levam o nome de procaspases) que, uma vez ativadas por proteólise, atuam irreversivelmente sobre uma série de proteínas intracelulares vitais, resultando nas alterações estruturais e funcionais características da apoptose (COHEN, 1997; ALBERTS, 2008; KROEMER *et al.*, 2009).

Até o momento foram caracterizados 14 membros desta família, com papéis distintos nas vias apoptóticas. É válido destacar, porém, que a atuação destas enzimas não se restringe exclusivamente à ativação da apoptose. Já foi descrita a participação de caspases em diversos processos não relacionados com morte celular, mesmo dos membros classicamente envolvidos na execução da apoptose (LAUNAY *et al.*, 2005; KROEMER *et al.*, 2009). Desta forma, a aumentada atividade de caspases não se configura como critério isolado de diagnóstico de apoptose (KROEMER *et al.*, 2009).

Tabela 1: As principais enzimas da família das Caspases, suas funções na apoptose e em outros processos fisiológicos (Adaptado de Launay *et al.*, 2005).

	Papel na Apoptose	Outras Funções
Caspase-2	Iniciadora ou executora da apoptose	Diferenciação de eritroblastos, osteoblastos e macrófagos; Reparo de DNA;
Caspase-3	Executora da apoptose	Desenvolvimento neuronal; Formação de plaquetas; Diferenciação de queratinócitos, eritroblastos, macrófagos, epitélio do cristalino, espermatozóides, músculo esquelético, osteoblastos e trofoblastos placentários; Controle negativo de ciclo celular em linfócitos B;
Caspase-6	Executora da apoptose	Diferenciação de células epiteliais do cristalino; Controle positivo de ciclo celular em linfócitos B;
Caspase-7	Executora da apoptose	Diferenciação de eritroblastos;
Caspase-8	Iniciadora da apoptose mediada por receptores de morte celular	Proliferação e ativação de linfócitos T; Controle positivo de ciclo celular em linfócitos B; Diferenciação de trofoblastos placentários, osteoblastos eritroblastos e monócitos; Internalização dos receptores de morte celular;
Caspase-9	Iniciadora da apoptose mediada pela via mitocondrial	Diferenciação dos mesmos tipos celulares onde a Caspase-3 desempenha este papel;
Caspase-10	Iniciadora da apoptose mediada por receptores de morte celular	Desconhecido.

As caspases que participam das vias apoptóticas podem ser divididas em dois grupos: as iniciadoras, que são ativadas diretamente frente aos sinais pró-apoptóticos, e as efetoras, que são subsequentemente ativadas pelas iniciadoras e agirão de forma mais extensa em múltiplos alvos celulares (COHEN *et al.*, 1997; LAUNAY *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias gerais, que ativam diferentes caspases iniciadoras. Os sinais deflagradores podem ter duas origens básicas: mecanismos sensores da própria célula, que ativam a chamada via intrínseca, ou a resposta à sinalização de células adjacentes, mediadas pela via extrínseca (COHEN *et al.*, 1997; LAUNAY *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005).

A via intrínseca é deflagrada por situações de carência nutricional ou de fatores de crescimento, stress oxidativo, ou alguns fármacos. Estas situações ativam mecanismos de permeabilização da membrana externa mitocondrial, liberando conteúdo transmembranar, como descrito acima. O citocromo C, uma vez presente no citossol, se associa à proteína Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*) e à procaspase-9, formando uma estrutura chamada apoptossomo. Nesta estrutura, onde várias moléculas de procaspase-9 encontram-se agregadas, ocorre uma auto-ativação proteolítica, gerando caspase-9 ativada. Esta enzima é a iniciadora da apoptose pela via intrínseca e ativará caspases efetoras (INOUE *et al.*, 2009).

A via extrínseca é mediada por receptores sinalizadores de morte celular, tais como a família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF). Estes receptores são proteínas transmembrana cujo domínio intracelular possui um sítio de ligação para proteínas adaptadoras, como a FADD, que contém os chamados *domínios de morte celular*. Estes domínios também estão presentes na estrutura da procaspase-8, de forma que mais de uma molécula da proenzima se liga a este complexo. A

proximidade entre elas, tal como ocorre com a caspase-9, leva então a uma auto-ativação proteolítica, liberando caspase-8 livre ativa no citossol. Esta enzima é uma das iniciadoras da apoptose pela via extrínseca e ativará caspases efetoras que executarão o processo (WANG *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2009).

A procaspase-3 pode ser clivada tanto pela caspase-8 quanto pela caspase-9, liberando caspase-3 ativa, que é a principal enzima efetora da apoptose da família das caspases. Assim, a caspase-3 representa um importante elo de convergência entre essas duas vias, de forma que todas as etapas subseqüentes de execução da apoptose são comuns a ambas. A caspase-3 age sobre uma pluralidade de proteínas envolvidas diretamente com ciclo celular, reparo do DNA e citoesqueleto, gerando uma resposta orquestrada em direção à apoptose (WANG *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008).

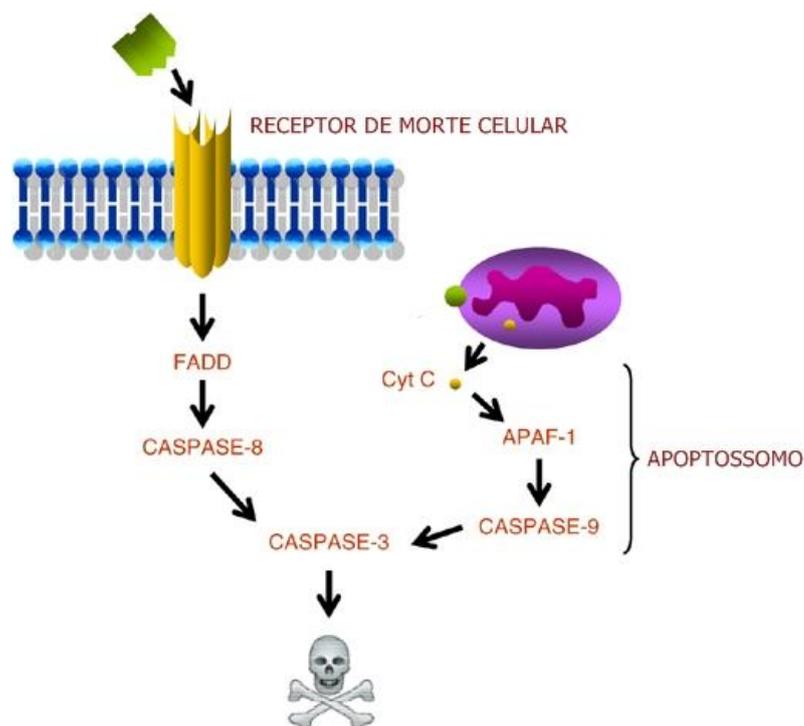


Figura 2: Representação esquemática das duas principais vias deflagradoras da apoptose, a intrínseca (mediada por ativação de caspase 9) e extrínseca (por ativação de caspase 8) (Adaptado de Fadeel *et al.*, 2008).

2.3. Câncer de Pulmão:

O câncer de pulmão e de vias aéreas é a forma que mais provoca óbitos, respondendo sozinho por 2,3% do total de mortes anuais (1,3 milhões de óbitos), o que o coloca como a oitava causa de morte mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Tabela 2: As dez maiores causas de morte humana em 2004. Adaptado de WHO, 2008.

Causas de Morte	Número de Óbitos (milhões)	% do total
Doença Coronariana Cardíaca	7,20	12,2
Doenças Cerebrovasculares	5,71	9,7
Infeções Respiratórias	4,18	7,1
Doença Pulmonar Obstrutiva	3,02	5,1
Doenças Diarréicas	2,16	3,7
HIV/SIDA	2,04	3,5
Tuberculose	1,46	2,5
Câncer de Pulmão e Vias Aéreas	1,32	2,3
Acidentes Automobilísticos	1,27	2,2
Nascimento Prematuro	1,18	2,0

A ocorrência do câncer de pulmão está intrinsecamente associada à exposição a agentes carcinogênicos, de forma que 90% dos casos estão associados ao fumo ativo ou passivo. Boa parte do percentual restante deriva da exposição ocupacional a carcinógenos, como o asbesto, metais pesados, alcatrão, dentre outros. Isso faz deste tipo de câncer uma doença essencialmente evitável pelo combate à prática do tabagismo ou da proteção ocupacional adequada (ALBERG *et al.*, 2007).

Este tipo de câncer apresenta índices de sobrevida e cura dos mais baixos quando comparados a tumores que acometem outros órgãos (JEMAL *et al.*, 2009), o que se deve, em parte, à ausência de ferramentas de diagnóstico precoce (HIRSCH *et al.*, 2002). Apesar de ser menos frequente que os cânceres de próstata e mama, o

câncer de pulmão apresenta uma letalidade muito superior a esses tipos de tumor, com sobrevivência de apenas 16% dos pacientes após 5 anos do diagnóstico, contra 95% e 90% de sobrevida dos tumores de próstata e mama, respectivamente (JEMAL *et al.*, 2009). Em contrapartida, cerca de 76% dos pacientes de câncer de pulmão são diagnosticados em estágios avançados da doença, contra 5% do câncer de próstata, por exemplo, o que denota uma forte relação entre a dificuldade de diagnóstico precoce e a mortalidade da doença (HIRSCH *et al.*, 2002; JEMAL *et al.*, 2009). Assim, muito frequentemente, os pacientes quando diagnosticados já se encontram em estágios avançados da doença, não podendo ser submetidos à cirurgia curativa, dado a extensão do comprometimento do aparelho respiratório, restando-lhes a radio ou a quimioterapia, cujos benefícios, por vezes, não compensam os riscos, colocando esses pacientes fora de possibilidades terapêuticas.

Os cânceres de pulmão são classificados em subtipos histológicos, sendo nomeados de acordo com suas características morfológicas à análise por microscopia ótica. Estes subtipos apresentam diferentes perfis de malignidade, resistência a quimioterápicos, potencial de metástase, dentre outras características patológicas. Os quatro tipos mais freqüentes são o adenocarcinoma, o tipo mais frequente, que responde por 32% dos diagnósticos, carcinoma escamoso (29% dos casos), tumor de pequenas células (18%) e tumor de grandes células (9%) (JAMESON *et al.*, 2008). O tumor de pequenas células em especial, apresenta um curso evolutivo peculiar, sendo rapidamente responsivo à quimioterapia, mas com uma alta freqüência de recidiva, associado a um perfil de resistência a múltiplos quimioterápicos, apresentando a pior sobrevida em 5 anos dentre os tipos histológicos (JAMESON *et al.*, 2008; PUGLISI *et al.*, 2010).

A linhagem celular A549 (ATCC nº CCL-185) foi a escolhida para o desenvolvimento deste projeto por tratar-se de uma linhagem epitelial de adenocarcinoma pulmonar, o tipo mais frequente de câncer de pulmão. Foi iniciada em 1972 por explante de pulmão de um homem caucasiano de 58 anos (GIARD *et al.*, 1973; LIEBER *et al.*, 1976). Como são células epiteliais, expressam queratina e crescem aderidas ao recipiente de cultura, formando monocamada. Apresentam tempo de duplicação de cerca de 22 horas (GIARD *et al.*, 1973; LIEBER *et al.*, 1976). É extensamente utilizada em diversos modelos *in vitro* de câncer de pulmão, como estudos de potencial metastático (WANG *et al.*, 2009) e de vias apoptóticas induzidas por agentes antitumorais diversos (KURINA *et al.*, 2004; KUO *et al.*, 2009; LING *et al.*, 2009). Entretanto, os efeitos da CE em A549 nunca foram avaliados até o desenvolvimento deste projeto, o que trouxe uma informação a mais acerca da susceptibilidade da linhagem ao tratamento elétrico.

2.4. Evidências *in vivo* e *in vitro* dos efeitos antitumorais da corrente elétrica:

A estimulação com correntes elétricas contínuas (CE) vem sendo utilizada terapeuticamente para a reabilitação de lesões na medula espinhal (GAN *et al.*, 2006); estimulações neuromusculares (STRASSER *et al.*, 2009) e cicatrização de lesões cutâneas (ZHAO, 2009). A associação de correntes elétricas a quimioterápicos constitui a chamada eletroquimioterapia a qual permite o aumento da penetração de fármacos nas células tumorais por alterações na permeabilidade da membrana plasmática induzida pelo estímulo elétrico (MIR *et al.*, 1998; RAMIREZ *et al.*, 1998).

O tratamento elétrico de tumores sólidos vem sendo objeto de estudo de vários projetos de pesquisa, envolvendo animais (SCHAUBLE *et al.*, 1977; CHOU *et al.*, 1997; TELLÓ *et al.*, 2004) e humanos (NORDENSRÖM, 1989; NORDENSRÖM, 1994; GRIFFIN *et al.*, 1994; BERGUES *et al.*, 1998). Esta prática leva o nome de Eletroterapia Tumoral (ETT) e vem demonstrando resultados bastante promissores que incluem: a regressão significativa de tumores; a melhoria de sobrevida e até mesmo a cura após estimulação elétrica das lesões. A aplicação localizada da CE restringe substancialmente seus efeitos citotóxicos à região tumoral, minimizando, ou até mesmo isentando de sofrimento, o tecido saudável, o que configura a ETT como uma terapia antitumoral altamente segura quando comparada à cirurgia, radioterapia e quimioterapia, atuais alternativas disponíveis no arsenal terapêutico contra o câncer. Além disso, a ausência de mutagenicidade e genotoxicidade (GOMES, 2010) acrescida da portabilidade e o baixo custo da estrutura e equipamentos necessários para a prática da ETT, tornam esta terapia bastante atraente do ponto de vista de saúde pública.

Inúmeros tipos de tumor vêm se mostrando responsivos à CE, como sarcomas (CHOU *et al.*, 1997), tumores mamários (GRIFFIN *et al.*, 1994), tumores pulmonares (SAMUELSON *et al.*, 1983; NORDENSTRÖM, 1983, 1984, 1985; XIN *et al.*, 1997) e outros. Alguns autores mostraram *in vivo* que o estímulo anódico é mais eficaz que o catódico (GRIFFIN *et al.*, 1994; TAYLOR *et al.*, 1994). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares de ação deste agente físico ainda permanecem pouco compreendidos, devido, em parte, à carência de estudos *in vitro*. Isso gera uma grande heterogeneidade nos protocolos utilizados nestes estudos *in vivo*, distanciando a ETT de sua consolidação definitiva como terapia anticâncer.

Nordenström (1983) discutiu exaustivamente possíveis mecanismos

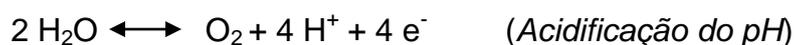
envolvidos na eletroterapia tumoral (ETT), como: alterações de pH; transporte eletrosmótico da água e os efeitos dos transportes iônicos transmembranares. Ele também apontou que a maioria dos tumores possui um excesso de cargas eletronegativas sobre a sua superfície e, por conseguinte, só o ânodo deveria ser inserido no tumor, uma vez que a presença do cátodo poderia gerar uma dispersão de células tumorais por repulsão eletrostática. Isso poderia produzir propagação de micrometástases durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1984). No entanto, o autor também obteve resultados positivos quando utilizou o cátodo no tratamento (NORDENSTRÖM, 1989).

Os estudos destes mecanismos contaram com um grande avanço graças ao modelo experimental *in vitro* desenvolvido por Veiga e colaboradores, que permite o estudo diferencial dos efeitos de cada componente do circuito elétrico sobre células de cultura (VEIGA, 1995; VEIGA *et al.*, 2000, 2005; HOLANDINO, 2000; HOLANDINO *et al.*, 2001). Este modelo permite avaliar as alterações celulares decorrentes do fluxo anódico (FA), catódico (FC) e eletroiónico (FEI) de maneira independente. Alguns dos resultados obtidos a partir do uso deste modelo experimental com a linhagem leucêmica HL60 foram publicados em 2005 (VEIGA *et al.*, 2005) e tiveram como aspecto importante a verificação de diferenças entre o tipo de morte celular decorrente dos tratamentos anódico e catódico. Assim, foi possível caracterizar o FC e o FA como causadores de necrose, mas, em especial, a ocorrência também de morte apoptótica em células tratadas com o FA, o que pode se configurar como um importante mecanismo molecular de atividade antitumoral da CE (VEIGA *et al.*, 2005). A identificação destes aspectos foi possível a partir de técnicas de microscopia óptica e eletrônica (VEIGA *et al.*, 2000; 2005; HOLANDINO *et al.*, 2001); eletroforese de DNA total e citometria de fluxo (VEIGA *et al.*, 2005). As

células que ficam em contato com a região isoelétrica (FEI) não apresentam alteração na viabilidade celular; entretanto, sofrem modificações bioquímicas importantes, como a modulação da atividade fosfofrutocinásica (BRITO, 2009). Além disso, ocorre uma diminuição significativa nas taxas de proliferação das células estimuladas em todas as três condições experimentais (HOLANDINO *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2005; CAMPOS, 2008). Entretanto, nestes trabalhos, os autores não conseguiram avançar nos mecanismos moleculares envolvidos com a estimulação elétrica, tais como as eventuais cascatas envolvidas na deflagração da apoptose.

A morte celular induzida pela CE parece estar fortemente associada à formação de produtos de eletrólise próximo aos eletrodos, gerando espécies oxidativas e queda de pH no FA e espécies redutoras acompanhadas de alcalinização no FC, respeitando as seguintes reações:

- Para o fluxo anódico:



- Para o fluxo catódico:



Wartenberg e colaboradores investigaram os efeitos do tratamento de câncer de mucosa oral com corrente elétrica, demonstrando que o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio foi aparentemente devido a ativação de NADPH oxidase pela CE (WARTENBERG *et al.*, 2008). Baixos níveis destas espécies oxidativas têm sido associados a processos de diferenciação e proliferação celular, enquanto a elevação destes níveis está associada à apoptose e à morte celular. Este estresse oxidativo induzido pelo FA pode ser um possível responsável pela deflagração de apoptose (MAYER *et al.*, 1994; DANIAL *et al.*, 2004).

Associado a isso, Von Euler e colaboradores avaliaram a citotoxicidade induzida apenas por variações do pH, sem a passagem de corrente elétrica, em células de tumor mamário murino e observaram indução de apoptose em pHs mais ácidos, por ativação de caspase 3 e fragmentação de DNA (VON EULER *et al.*, 2002). No entanto, ainda não existem estudos sobre os efeitos da CE propriamente dita na atividade de caspase 3 ou ainda, que vias apoptóticas estariam envolvidas com a morte celular programada induzida pelo tratamento anódico.

Englert e Shacter descreveram em 2002 a propriedade pró-apoptótica de cloraminas, que são espécies químicas resultantes da reação entre espécies reativas de cloro e ácidos aminados, ambos presentes no meio eletrolítico nas imediações do FA. Logo, é factível que o tratamento elétrico com o FA possa gerar cloraminas, que podem eventualmente participar do mecanismo de ação da CE como indutoras de apoptose.

Estudos feitos por outros autores avaliaram o potencial de alguns ácidos aminados para indução de apoptose (WAGNER *et al.*, 2002). Um destes estudos descreve inclusive uma série de ácidos aminados como sendo intermediadores e potencializadores do dano celular causado pelo hipoclorito (ROBASZKIEWICZ *et al.*,

2010), que é conhecidamente um dos produtos de eletrólise gerados pela CE no FA. Num outro estudo, foi evidenciado o papel da cloramina derivada da reação de taurina e peróxido de hidrogênio na oxidação de cofilina, uma proteína que participa da modulação estrutural da actina citoesquelética. Quando oxidada, esta proteína promove alterações estruturais na mitocôndria, causando extravasamento do conteúdo transmembranar, incluindo citocromo c, que levará à apoptose (KLAMT *et al.*, 2009).

A associação de CE com glutamina foi previamente testada nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM do ácido aminado, e observou-se a indução de apoptose, através da análise morfológica da linhagem HL60 (VEIGA *et al.*, 2005). Sugere-se então uma potencialização do dano causado pela CE com adição de ácidos aminados ao meio eletrolítico.

Com o objetivo de potencializar ainda mais os efeitos antitumorais da ETT, um recente trabalho de nosso grupo testou os efeitos da associação da CE com L-tirosina encapsulada num sistema nanoparticulado de liberação controlada. Foi verificado um significativo aumento da citotoxicidade da CE quando associada a Nps de policaprolactona contendo L-tirosina quando comparado à associação com L-tirosina livre e à CE isoladamente (CAMPOS *et al.*, 2010). Estes promissores dados, observados na linhagem murina de melanoma multirresistente B16F10, motivaram novos estudos em modelos *in vivo* dessa interessante associação.

3. NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER:

3.1. Nanotecnologia e sistemas de liberação de fármacos:

O desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos tem como objetivo a obtenção de formulações farmacêuticas capazes de liberar o princípio ativo em um alvo específico, aumentando sua biodisponibilidade no local desejado. Este conceito, também denominado vetorização, permite uma potencialização dos efeitos terapêuticos e uma redução dos efeitos tóxicos dos fármacos, devido à essa característica de liberação sítio-específica, que permite um maior controle da absorção e distribuição tecidual do fármaco. Essas propriedades fazem deste tipo de abordagem um alvo de intensa pesquisa e aplicação no tratamento do câncer, uma vez que os efeitos adversos sistêmicos representam uma grande desvantagem do uso dos quimioterápicos em formulações convencionais (ALEXIS *et al.*, 2008).

O conceito de nanotecnologia em aplicações farmacêuticas, mais especificamente na liberação de fármacos, está baseado na produção de partículas biodegradáveis que contêm moléculas do fármaco a serem liberadas exclusivamente no órgão alvo, ou em grupamento de células específicas, como as tumorais em melanomas (KIRPOTIN *et al.*, 2006; RICCI & MARCHETTI, 2006).

Diversos sistemas de liberação de fármacos podem ser obtidos, utilizando-se materiais e técnicas de diversas naturezas para obtenção de diferentes matrizes carreadoras biodegradáveis. Os exemplos mais comuns são: lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, micropartículas e nanopartículas poliméricas (ALEXIS *et al.*, 2008).

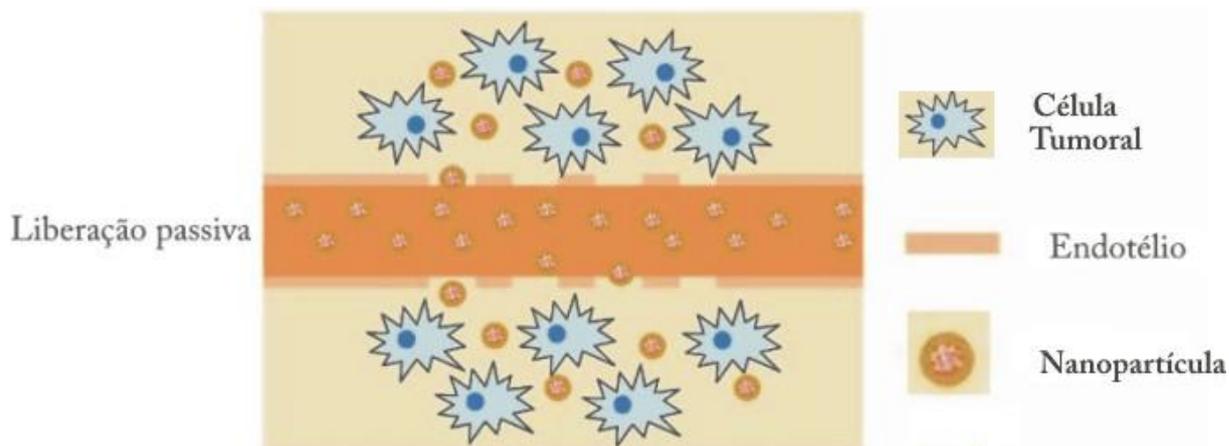


Figura 3: Representação esquemática da liberação de sistemas nanoparticulados no tecido tumoral. A permeabilidade aumentada da vasculatura tumoral faz com que as nanopartículas se acumulem nesta região (adaptado de ALEXIS *et al.*, 2008).

3.2. Nanopartículas poliméricas (Np):

As Np constituem sistemas modernos e promissores para a liberação sustentada e seletiva de fármacos. Podem ser definidas como partículas coloidais sólidas que contêm um fármaco encapsulado em sua estrutura, podendo ser preparadas por métodos físicos, físico-químicos ou químicos (HANS & LOWMAN, 2002; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). As Np podem ser utilizadas para a liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, proteínas e peptídeos, e podem ser formuladas para que a liberação ocorra em diferentes órgãos do organismo ou mesmo permanecerem por tempos estendidos na circulação sistêmica (HANS & LOWMAN, 2002).

Na estrutura tumoral, o funcionamento anormal do sistema linfático e a permeabilidade aumentada dos capilares sanguíneos resultam na retenção das Np no interstício das células tumorais. Isso leva a uma tendência de maior acúmulo das Np nos tumores do que em tecidos saudáveis, aumentando os efeitos citotóxicos do fármaco na região tumoral (ALEXIS *et al.*, 2008), como pode ser visto no esquema

da Figura 3. Isso torna esse tipo de sistema atraente do ponto de vista da terapia oncológica.

Os termos micro e nanopartículas são usados de acordo com o tamanho das partículas. As partículas com tamanho entre 1 a 999 nm são denominadas nanopartículas, enquanto que partículas maiores que 1000 nm são ditas micropartículas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; HANS & LOWMAN, 2002). Dessa forma, devido ao seu tamanho nanométrico, as Np podem ser administradas por qualquer via, permitindo ainda que sejam injetadas na circulação sanguínea sem riscos à saúde, uma vez que seu tamanho é menor que o diâmetro dos menores capilares (SOPPIMATH *et al.*, 2001; HANS & LOWMAN, 2002).

As Np podem ser classificadas quanto a sua estrutura interna em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas matriciais, monolíticos, onde fármaco se encontra disperso superficialmente na matriz polimérica. As nanocápsulas constituem sistemas reservatórios com o fármaco localizado no núcleo do sistema, o qual é envolvido por uma parede polimérica externa que forma a cápsula (SOPPIMATH *et al.*, 2001; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Esses sistemas apresentam excelente estabilidade o que é uma vantagem quando comparados aos sistemas microemulsivos e lipossomais (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998) e se estende durante todo o processo de preparação e armazenamento. As Np podem ainda ser liofilizadas, esterilizadas por radiação e posteriormente, redispersas, sem problemas de alteração do tamanho e do conteúdo do fármaco (VENIER-JULIENE, 1990).

A liberação do fármaco das nanopartículas depende de uma série de fatores, como: (1) desorção do fármaco adsorvido na superfície da partícula; (2) difusão do fármaco através dos poros e canais da matriz polimérica; (3) difusão do fármaco

através da parede polimérica, no caso de nanocápsulas; (4) erosão da matriz polimérica que provoca desprendimentos de fragmentos de polímero formando poros e canais e (5) erosão combinada com difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Vários métodos são utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas. Para encapsular compostos de natureza hidrofílica, o mais utilizado é a técnica de emulsão múltipla ou método da dupla emulsificação e evaporação do solvente (DEES). Inicialmente a droga hidrofílica e um estabilizante são dissolvidos em água; essa primeira emulsão é preparada pela dispersão da fase aquosa dentro de um solvente orgânico contendo o polímero dissolvido, o qual é então reemulsificado em outra fase aquosa contendo um estabilizante. Por último, o solvente orgânico é evaporado e as nanopartículas são coletadas por centrifugação, lavadas e liofilizadas (LOWMAN & HANS, 2002).

3.3. Propriedades da Poli- ϵ -Caprolactona (PCL)

A poli- ϵ -caprolactona (Figura 4) é um poliéster biodegradável com baixo ponto de fusão, cerca de 60 °C, que tem sido estudado como polímero para sistemas de liberação de fármacos, sendo geralmente obtido pela polimerização por abertura do anel ϵ -caprolactona (ROSA, 2002; RICCI & MARCHETTI, 2006).

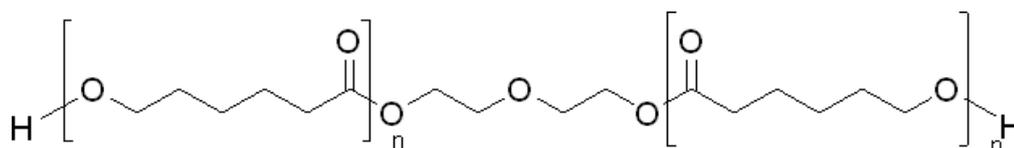


Figura 4. Estrutura da poli- ϵ -caprolactona.

A degradação da PCL *in vitro* ocorre essencialmente por erosão homogênea em dois estágios: o primeiro ocorre por cisão dos grupos ésteres da cadeia, acompanhada por perda linear da massa molecular, sendo sua duração dependente da massa molecular inicial. O segundo estágio começa na faixa de massa molecular

abaixo de 15.000 Daltons e além da perda em massa molecular, ocorre também perda da força de tensão (PITT, 1981). A degradação *in vitro* pode ser aumentada na presença de lipases (AMIJI & CHAWLA, 2002), e *in vivo* por esterases e adsorção de proteínas plasmáticas (THOMA & SCHUTERMANN, 1991). Esta adsorção faz com que as moléculas do polímero passem para uma forma expandida, aumentando a sua solubilidade e, conseqüentemente, acelerando a sua degradação (MAKINO *et al.*, 1987).

A escolha do método de obtenção das Np e encapsulação do fármaco deve ser norteada pelas características físico-químicas tanto da substância a ser encapsulada quanto do polímero. Quanto à substância, deve-se conhecer a polaridade, a solubilidade e a estabilidade frente à luz, ao oxigênio e ao calor. Quanto ao polímero, deve-se conhecer a polaridade, a solubilidade, a taxa de degradação, a estabilidade e o ponto de fusão. (RICCI & MARCHETTI, 2006).

4. OBJETIVOS:

4.1. Objetivo Geral:

- Caracterizar os mecanismos de ação envolvidos com a morte celular provocada pela corrente elétrica contínua, através de modelos de *in vitro* e *in vivo*, visando ampliar o conhecimento e racionalizar o uso deste agente físico como terapia antitumoral.

4.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a susceptibilidade da linhagem celular A549 aos danos induzidos pela CE, através de curvas dose-resposta;
- Estudar os efeitos de variações de dimensões físicas do aparato de estimulação elétrica na capacidade de produzir morte celular, comparando dois sistemas *in vitro*;
- Analisar as alterações morfológicas decorrentes do tratamento elétrico em células da linhagem A549 por microscopia óptica;
- Avaliar qualitativamente a ocorrência de apoptose em células tratadas com CE por análise da fragmentação de DNA;
- Investigar alterações na atividade enzimática de caspase 3 em células tratadas com CE;
- Investigar alterações na expressão gênica das caspases 3 em células tratadas com CE;
- Desenvolver um modelo *in vivo* para estudo dos efeitos da CE em melanoma murino;
- Avaliar as alterações histológicas e ultraestruturais de células B16F10 implantadas em camundongos C56Bl/6Y.

5. MATERIAL E MÉTODOS:

5.1. Material

5.1.1. Equipamentos e Utensílios:

Balança analítica – Mettler Toledo – AG 204

Capela de Fluxo Laminar – VECO – ULFS 12

Estufa de cultura – FANEM – 002CB

Estufas de esterilização – Modelo 315SE - FANEM

Espectrofotômetro de placa – Thermo Plate TP Reader

Espectrofotômetro - Shimadzu UV 2401 PC

Espectrofotômetro de microgota - Thermo Fisher Scientific Nanodrop 2000c

Fluorímetro de placa

Fonte de Corrente elétrica – Instrutherm FA-3050

Garrafas para cultura de células - TPP

Micropipetas – Labmate e Eppendorf

Microscópio eletrônico de transmissão – Morgagny 265/ FEI

Microscópio invertido - Olympus

Microscópio óptico - Axioplan II / Zeiss

Placas de 24 e 96 poços

Microcentrífuga Refrigerada - Eppendorf 5810-R

Centrífuga de placas – Cientec CT-6000R

Termociclador para PCR em tempo real – Eppendorf Mastercycler EP

Realplex 2

Sonicador - Ultrasonic Processor – UP 100 H

Ultracentífuga - Beckman Coulter Avanti J-25

Ultramicrotomo – Laica EM UC6

Capelas de Fluxo Laminar Veco E Pachane

5.1.2. Reagentes:

Acetona - MERCK®;

Azul de tripan – VETEC®;

Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) – GIBCO®;

Bouin;

Cloreto de sódio – USB®;

CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) - SIGMA®;

Dimetilsulfóxido (DMSO) – VETEC®

Diclorometano – VETEC®;

DTT – Ditioneitol – SIGMA ALDRICH®

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético – SIGMA-ALDRICH®;

Giemsa - MERCK®;

Glutamina – GIBCO®;

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

Hidróxido de sódio (NaOH) – GIBCO®;

L-tirosina - VETEC®;

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – GIBCO®;

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

Policaprolactona – SIGMA ALDRICH®;

Sacarose;

Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO®;

Substrato Fluorogênico para Caspase 3 Ac-DEVD-AFC - BD PHARMINGEN®

Tampão Salina Fosfatado (PBS);

Tiopental sódico - CRISTÁLIA®;

Tripsina - GIBCO®;

Tris (hidroximetil) aminometano – (Tris base) – MERCK®;

Triton X-100;

Xilol – VETEC®.

5.2. Métodos:

5.2.1. Cultura de Células:

5.2.1.1. Preparo do meio de cultura DMEM:

O meio de cultura DMEM foi preparado em lotes de 900 mL. Para isso, foram pesados 3,0 g de HEPES, 0,2 g de NaHCO₃, 0,3 g de glutamina e dissolvidos em 900 mL de água purificada. O pH do meio, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. A solução final foi esterilizada em sistema de filtragem com membrana de 0,22 µm de tamanho de poro, em capela de fluxo laminar. As soluções foram distribuídas em recipientes de vidro fechados e armazenados em geladeira a 4°C. Imediatamente antes do uso, o meio de cultura foi colocado em estufa a 37°C para ajuste da temperatura ideal para manipulação das células. Para cultivo das células, o meio era suplementado com soro fetal bovino (SFB) como fonte de fatores de crescimento, a uma concentração final de 10 %.

5.2.1.2. Preparo da solução de tripsina:

A solução aquosa de tripsina foi preparada contendo: 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCL, 0,1 g de dextrose, 0,58 g de NaHCO₃, 0,5 g de tripsina, 0,2 g de EDTA e 0,45 mL de vermelho fenol a 1 %, os quais foram dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1.000 mL de solução. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana esterilizante de 0,22 µM de poro, distribuída em recipientes de vidro fechado e mantida em congelador a – 20 °C (solução estoque) e em geladeira a 4 °C (solução para uso).

5.2.1.3. Preparo do tampão salina fosfato (PBS):

O tampão salina fosfato (PBS) foi preparado a partir da dissolução de: 0,2 g de KH₂PO₄, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl e 1,44 g de Na₂HPO₄ dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1.000 mL de solução. O pH da solução foi ajustado, quando necessário, para 7,4 com NaOH 1 N. A solução foi distribuída em recipientes de vidros fechados e autoclavados durante 20 min a 120 °C. Após o resfriamento a temperatura ambiente, os frascos foram mantidos em geladeira a 4 °C.

5.2.1.4. Preparo do Azul de Tripán:

Foi preparada inicialmente uma solução estoque do corante a 0,4 % da seguinte maneira: 400 mg do corante azul de tripan foram adicionados a 90 mL de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de K₂HPO₄. Em seguida, o

volume da solução foi ajustado para 100 mL com água purificada. A solução foi aquecida até solubilização completa e o pH ajustado para 7,2 com auxílio da solução de NaOH 1 N. Essa solução estoque foi diluída à concentração de 0,2 %, com água purificada e mantida em geladeira.

5.2.1.5. Cultivo das células da linhagem A549:

As células de adenocarcinoma pulmonar A549 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² em estufa a 37°C, usando como fonte nutricional o meio DMEM suplementado com SFB a 10%. Os inóculos foram usualmente de $3,0 \times 10^5$ células por garrafa, que atingiam a confluência ideal para passagem em aproximadamente 4 dias. Para o repique, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de tripsina por 3 a 5 minutos a 37°C, até que se soltassem da superfície da garrafa. A viabilidade e a concentração celular foram determinadas pelo método do azul de tripan (diluição do corante na proporção de 1:1 com a suspensão celular) e contagem na câmara de Neubauer (HOLANDINO *et al.*, 2000).

5.2.2. Tratamento com Corrente Elétrica:

Os sistemas *in vitro* utilizados para tratamento consistem em placas de cultura de células de 24 ou 96 poços adaptadas com eletrodos de platina imersos nas suspensões celulares, conforme esquematizado na figura 5. Os poços da placa são interligados em série por pontes de papel de filtro umedecidas com solução salina, fechando-se o circuito elétrico. Dessa forma, as células podem ser submetidas a 3 situações experimentais distintas: a proximidade do eletrodo positivo, onde recebem

o fluxo anódico (FA), do eletrodo negativo, onde são expostas ao fluxo catódico (FC), ou ainda posicionadas no meio do circuito, interligadas por pontes de papel de filtro, que permitem a passagem apenas do campo elétrico e do fluxo eletroiónico (FEI).

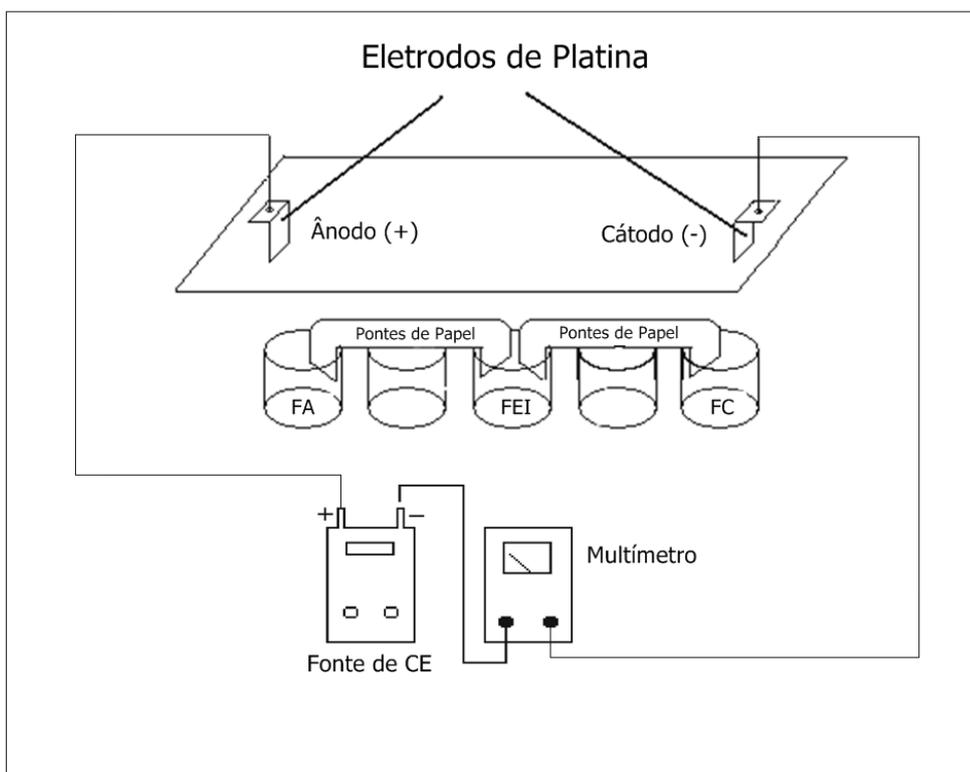


Figura 5: Representação esquemática do sistema experimental utilizado para tratamento elétrico das células A549, que permite avaliação isolada do efeito do fluxo anódico (FA), catódico (FC) e eletroiónico (FEI).

Estes sistemas são variações do modelo padronizado em nosso laboratório por Veiga e colaboradores em 2000, que utilizava cubetas de acrílico (Figura 6A) fabricadas sob medida. Uma adaptação equivalente para placas de 24 poços (Figura 6B) comumente usadas em laboratório foi desenvolvida recentemente (CAMPOS, 2008) e a versão para placas de 96 (Figura 6C) foi introduzida no presente trabalho. Neste último, a razão entre a superfície de contato do eletrodo e o volume de meio eletrolítico é maior e os efeitos dessa diferença na capacidade de provocar morte

celular foram avaliados neste trabalho. A tabela 3 mostra as diferenças entre as dimensões dos sistemas utilizados.

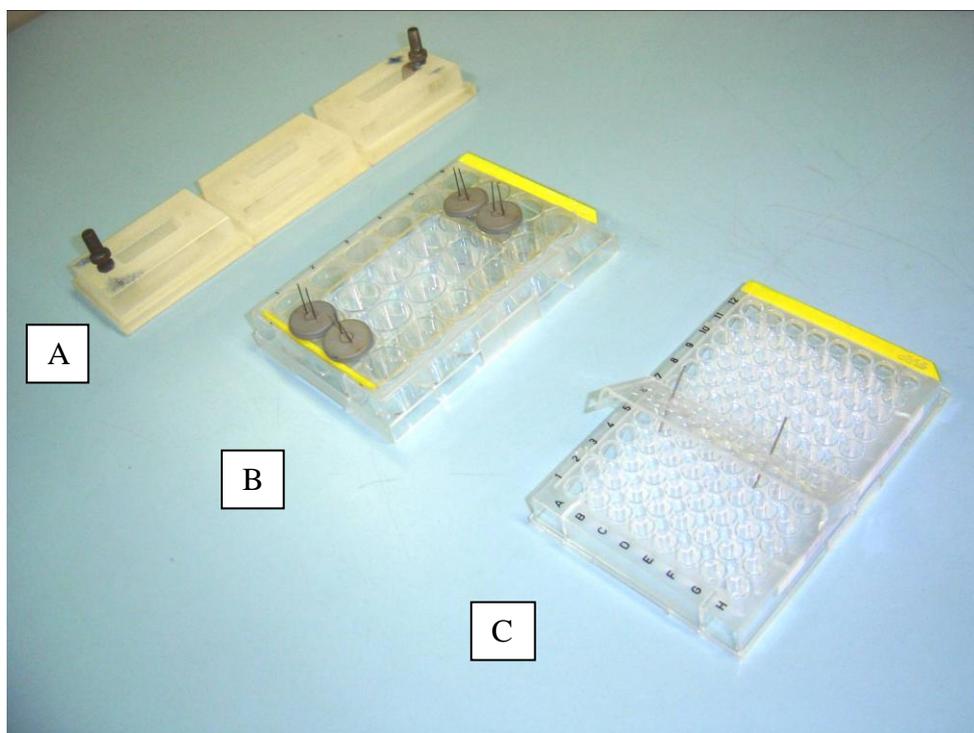


Figura 6: Aparatos utilizados para tratamento elétrico das células A549, que permitem avaliação isolada do efeito de cada componente do circuito. A – Primeiro sistema desenvolvido por Veiga e colaboradores em 2005, em cubetas de acrílico. B – Sistema de eletrodos adaptados em placa de 24 poços e C – de 96 poços.

Tabela 3: Dimensões dos dois sistemas utilizados para tratamento das células com corrente elétrica.

Modelo	Distância entre os eletrodos	Tamanho das pontes de papel	Volume de solução no poço	Superfície de contato do eletrodo com a solução
24 poços	8 cm	5,3 x 0,8 cm	2,0 mL	60 mm ²
96 poços	4 cm	2,9 x 0,3 cm	0,2 mL	6 mm ²

Para estimulação elétrica, as células foram coletadas das garrafas e semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células por poço), e 96 poços (1×10^5 células por poço) e incubadas de um dia para o outro a 37°C para formação de monocamada. Antes do tratamento, as células foram lavadas com PBS e tratadas com diferentes intensidades e tempos de CE em 2,0 e 0,2 mL de PBS, nos modelos de 24 e 96 poços, respectivamente. As intensidades utilizadas foram de 0,5 mA, 1,0 mA, 1,5 mA para o sistema de 96 poços e 2,0 mA para o de 24 poços, por tempos que variaram entre 2 e 24 minutos.

5.2.3. Viabilidade Celular:

5.2.3.1 Preparo da solução de MTT:

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

5.2.3.2. Determinação da Viabilidade Celular:

O MTT é um sal de tetrazólio hidrossolúvel, de cor amarelada em solução aquosa. Quando em contato com células viáveis com função mitocondrial preservada, o anel tetrazólico presente em sua estrutura é reduzido por redutases mitocondriais. O produto desta reação é o formazan que, por ser insolúvel em água, acumula-se sob a forma de cristais. Estes cristais são então coletados e diluídos em DMSO, resultando numa solução de coloração púrpura, cuja intensidade de cor é

medida por espectrofotometria a 492 nm. Dessa forma, a intensidade de púrpura dessa solução é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan formados que, por sua vez, é proporcional à quantidade de células viáveis. (MOSMANN, 1983).

Após os tratamentos, as células foram incubadas em solução de MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL em DMEM + 10% SFB por 3 horas na ausência de luz a 37°C. As placas foram então centrifugadas a 1200 x g por 10 min e os cristais formados diluídos em DMSO. Em seguida, a absorbância obtida a 492 nm em espectrofotômetro foi comparada àquela obtida com o respectivo grupo controle (células sem tratamento).

5.2.4. Análises Morfológicas:

5.2.4.1. Preparo da solução de Bouin:

Foram preparadas três soluções distintas, a saber: Solução I [solução de ácido pícrico saturado]; Solução II [mistura de 75 % da solução I com 25 % de formalina]; Solução III [mistura de 1 parte de ácido acético glacial em 20 partes da solução II]. Esta solução III foi a utilizada para realizar a fixação no método de Giemsa.

5.2.4.2. Preparo da solução de Giemsa:

O corante Giemsa foi diluído na proporção de 1:10 água destilada, filtrado para a remoção de precipitados e armazenado à temperatura ambiente.

5.2.4.3. Coloração pelo método de Giemsa:

Para análise por microscopia óptica das alterações morfológicas induzidas pela CE, as células foram cultivadas em lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após os tratamentos, as células foram fixadas por 5 minutos em Bouin, sendo, em seguida, lavadas abundantemente com álcool 70% para retirada da solução. Após fixação, as lamínulas foram incubadas em solução de Giemsa por 3 horas, para coloração. O excesso de corante foi retirado por lavagem com água destilada através da imersão das lamínulas em 50 mL de água contendo 4 gotas de ácido acético glacial. Sucessivas etapas de desidratação foram realizadas, onde as lamínulas foram embebidas por 10 segundos nos seguintes solventes em sequência: acetona 100% por duas vezes; acetona 70% e xilol 30%; acetona 50% e xilol 50%; acetona 30% e xilol 70%; xilol 100% por duas vezes. O sistema lâmina-lamínula foi montado com auxílio da resina Permount e os estudos morfológicos foram feitos em microscópio ótico (VEIGA *et al.*, 2005).

5.2.5. Atividade enzimática de Caspase-3

5.2.5.1. Preparo do tampão de lise para ensaio de atividade enzimática:

A solução utilizada para extração das proteínas e também como meio reacional para medição da atividade de caspases foi composta pelo tampão HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM (quelante de cátions), sacarose 10% (p/v) e o detergente CHAPS 0,1% (p/v).

5.2.5.2. Ensaio de atividade enzimática de Caspase-3:

A caspase-3 é a enzima efetora das principais vias apoptóticas: a intrínseca e a extrínseca. A atividade aumentada da enzima significa que a apoptose foi de fato deflagrada por uma das duas vias (COHEN *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008). A atividade desta enzimas foi medida por ensaio fluorimétrico, onde o peptídeo Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), substrato da caspase-3, ligados ao fluoróforo 7-amino-4-trifluorometil cumarina (AFC) são incubados por 2 horas a uma concentração final de 70 μ M com o extrato das células lisadas, adicionado de DTT a uma concentração final de 10 mM. As caspases ativadas clivam a ligação peptídeo-AFC liberando o fluoróforo, que é então dosado por fluorimetria, em comprimentos de onda de 400nm para excitação e 505 para emissão, onde a densidade de fluorescência é proporcional à atividade enzimática (VON EULER *et al.*, 2002; PERCHELLET *et al.*, 2004; ABEA *et al.*, 2009).

5.2.6. Expressão gênica de Caspase-3:

Uma das características das células tumorais é a expressão alterada de genes relacionados à deflagração da apoptose. Assim, os genes das caspases são considerados genes supressores de tumor e sua expressão diminuída pode levar à resistência à apoptose. Para avaliar os efeitos da CE sobre a expressão de caspase-3 foi usada a técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) quantitativo em tempo real.

O RNA foi extraído das células pelo método do kit TRIzol® e tratado com

transcriptase reversa, que sintetiza DNA complementar a partir deste RNA total, o chamado cDNA, que é livre de íntrons (CONNOLLY *et al.*, 2006). Após o desenho e obtenção dos primers específicos para cada um dos três transcritos a serem analisados, o cDNA relativo a cada tratamento é submetido ao PCR em tempo real, cujo princípio baseia-se na reação de PCR convencional em presença de uma molécula que emite fluorescência quando intercalada em fitas de DNA, o SYBR green®. Dessa forma, a intensidade de fluorescência em cada condição é proporcional ao número de cópias de DNA existentes no mesmo. Este aumento progressivo na quantidade de DNA, decorrente da amplificação pela Taq Polimerase é monitorado fluorimetricamente em tempo real por um sistema automatizado, gerando um dado quantitativo do número de cópias iniciais do gene pesquisado em cada amostra. (GIULIETTI *et al.*, 2001).

5.2.7. Fragmentação do DNA:

5.2.7.1. Preparo do tampão de lise:

A solução de lise celular para extração de DNA foi composta de Tris HCl 100 mM, EDTA 10 mM e Triton X-100 a 0,5 % (v/v) em água ultrapura.

5.2.7.2. Extração do DNA e eletroforese em gel de agarose:

Uma quantidade mínima de 5×10^6 células totais foram coletadas da placa de cultura com o auxílio de um espalhador de células (“cell scraper”) e ressuspensas em 400 μ L de tampão de lise. O rompimento das células deu-se por

homogeneização intensa com a pipeta e 20 minutos de sonicação. O extrato foi centrifugado a 14000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo DNA solúvel foi tratado com RNase T1 numa concentração de 0,5 mg/mL por 1 h a 37 °C e, em seguida, com Proteinase K a 0,4 mg/mL por 1h a 37 °C. A precipitação do DNA solúvel foi realizada com a adição de isopropanol na proporção 1:1 e de solução de NaCl 5 M na proporção de 1:5 em cada amostra, e incubados de um dia para o outro em congelador a -20 °C. As amostras foram então centrifugadas a 14000 x g por 20 minutos a 4°C e o precipitado resultante diluído em 40 µL de água ultrapura e aplicado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para eletroforese a 80 V (VEIGA *et al.* 2005). A observação do perfil eletroforético se deu em transiluminador UV onde o padrão de bandas em “escada” é uma evidência qualitativa da presença de células apoptóticas na amostra analisada (HUERTA *et al.*, 2007).

5.2.8. Tratamento elétrico de melanoma murino *in vivo* associado à Nanotecnologia:

5.2.8.1. Linhagem B16F10:

A linhagem B16F10 (número no ATCC: CRL-6475) é derivada de um melanoma murino com alto potencial de metástase (BRILES *et al.*, 1978). Produzem melanina em grande quantidade e são largamente utilizadas em modelos animais de melanoma (KISHI *et al.*, 2009). As células foram cultivadas nas mesmas condições descritas para a linhagem pulmonar A549.

5.2.8.2. Indução de melanoma em camundongos:

Os animais escolhidos para o modelo foram camundongos C56Bl/6Y fêmeas, com 9 semanas de idade, tratados de acordo com o protocolo do Comitê de Ética de Uso de Animais da UFRJ (número de protocolo: DFBCICB036). A indução dos tumores foi realizada através da inoculação subcutânea de células da linhagem B16F10 no flanco direito dos animais (Figura 7), na quantidade de 5×10^5 por animal, suspensas num volume de 100 μL de meio DMEM. O desenvolvimento tumoral ocorreu em 14 dias, quando então as dimensões dos tumores foram determinadas com paquímetro e o volume calculado pela fórmula (KISHI *et al.*, 2009):

$$\text{Volume (cm}^3\text{)} = 0,52 \times (\text{largura})^2 \times (\text{comprimento})$$

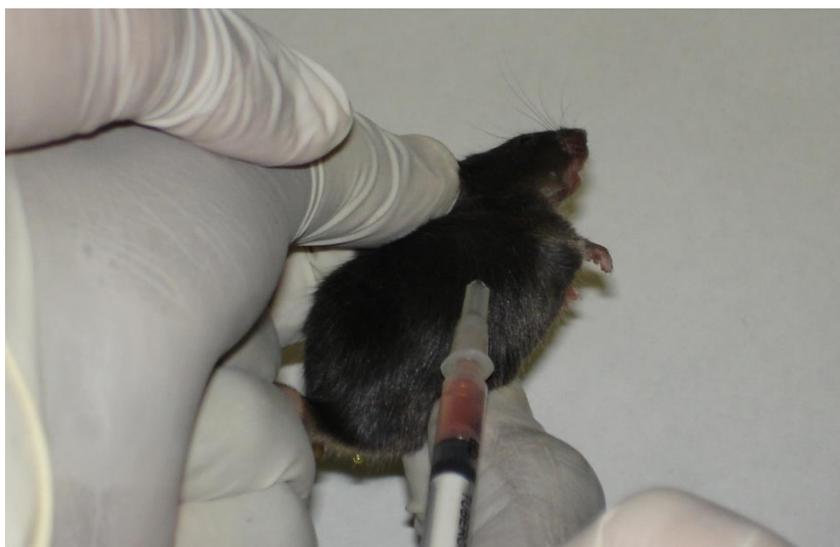


Figura 7: Inoculação de camundongo com células B16F10 no dorso.

5.2.8.3. Preparo das suspensões de ácidos aminados e Np:

Para avaliar o efeito da encapsulação do ácido aminado em associação com a corrente elétrica, ele foi testado na forma livre e encapsulado nas Np, bem como foi também testada uma suspensão de Np vazias, reproduzindo *in vivo* as condições previamente avaliadas *in vitro* (CAMPOS, 2008; CAMPOS *et al.*, 2010). O ácido aminado L-tirosina (tir) foi escolhido para este estudo, por ter apresentado o maior efeito potencializador do efeito da CE dentre ácidos aminados testados neste estudo *in vitro* prévio (CAMPOS, 2008).

As nanopartículas foram obtidas pelo mesmo método previamente utilizado em nosso laboratório por Campos em 2008. L-tirosina foi pesada e diluída em água destilada a uma concentração de 0,4 mg/mL com o auxílio de um banho de ultrassom por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada 1,0 mL de uma fase aquosa contendo álcool polivinílico (PVA) a 2%, como tensoativo, e essa solução foi emulsificada em 5,0 mL de diclorometano contendo 100 mg de PCL (fase orgânica). Essa primeira emulsão (A/O) foi gotejada por 5 minutos em uma solução aquosa externa de PVA a 0,5 %, para obtenção de Np vazias. Para a encapsulação da L-tirosina, 30 mg do ácido aminado foram adicionados a esta solução nesta etapa. Esta emulsão foi submetida a sonicação a uma potência de 100 Watts, amplitude de 60 e ciclo contínuo. O diclorometano foi evaporado à temperatura ambiente (25 °C), com suave agitação, promovida por um agitador magnético, durante 3 horas. As nanopartículas em suspensão foram centrifugadas em ultracentrífuga a 20 °C durante 40 min, a uma velocidade de 10000 rpm. A lavagem se deu ressuspendendo as nanopartículas em água, seguida de nova lavagem por centrifugação, sendo este procedimento repetido por três vezes para total remoção dos resíduos de

diclorometano, do ácido aminado não encapsulado e do tensoativo. Após esse processo de lavagem, as Np foram ressuspensas em PBS numa concentração final de 15 mg/mL. Essa concentração de Np é equivalente a 45 µg/mL de L-tirosina encapsulada (CAMPOS, 2008; CAMPOS *et al.*, 2010). Finalmente, uma solução de L-tirosina a 180 mg/mL foi preparada para avaliação do aminoácido livre em associação com a corrente elétrica (CAMPOS *et al.*, 2010).

5.2.8.4. Inoculação das Np e tratamento dos animais:

Os 24 animais foram divididos em 5 grupos: controle com tumor (4 animais), tratados com corrente elétrica apenas (grupo 1), mais as suas associações com L-tirosina livre (grupo 2), Np vazias (grupo 3) e Np contendo L-tirosina (grupo 4), com 5 animais cada.

Os animais foram anestesiados com tiopental numa dose de 35 mg/kg por via intraperitoneal. Após sedação, 0,2 mL das diferentes suspensões foram injetadas por via intratumoral nos animais dos respectivos grupos: L-tirosina livre; Np vazias; Np contendo L-tirosina, dividindo o volume em 3 ou 4 pontos diferentes do tumor. Dois eletrodos de platina/ródio, sendo um cátodo e um ânodo, com um diâmetro de 1,2mm foram então inseridos próximo à base do tumor numa profundidade aproximada de 1 cm. A dose de corrente utilizada foi de 5 mA por 10 min.

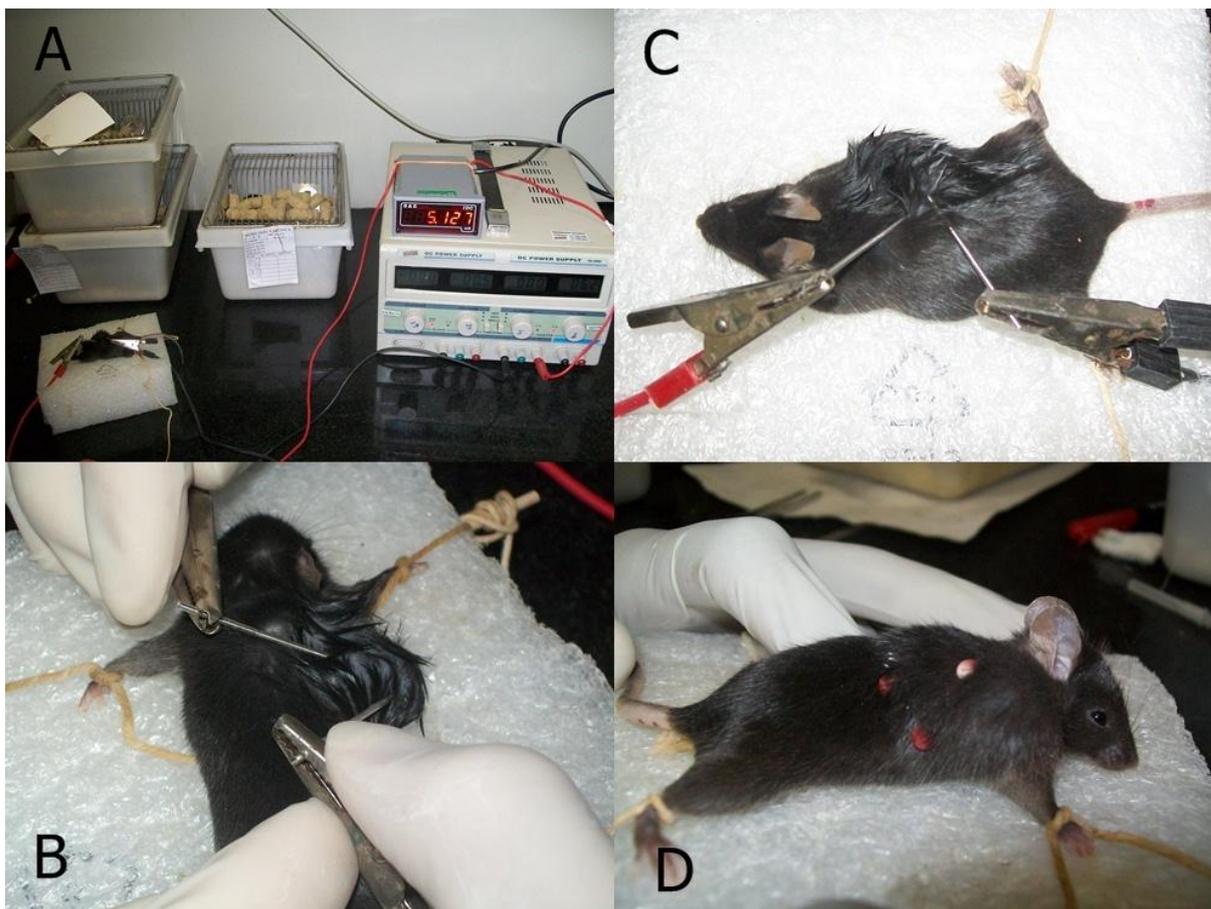


Figura 8: Tratamento dos camundongos C56Bl/6Y portadores de melanoma induzido por inoculação de células B16F10. A – Visão geral do aparato de tratamento; B – Inserção dos eletrodos no tumor; C – Animal durante tratamento; D - Animal após tratamento, com evidência de gases produzidos pelas reações eletroquímicas no local de inserção dos eletrodos.

Após o tratamento, os animais foram acomodados em gaiolas com água e ração *ad libitum* por 48 horas. Findo este tempo, foram sacrificados por deslocamento cervical, submetidos a abertura do peritônio, decapitados e fixados inteiros em paraformaldeído a 4% para fixação histológica por pelo menos 24h.

5.2.8.5. Microscopia óptica:

Fragments do tumor e do fígado de cada animal foram dissecados e imobilizados em blocos de parafina. Em seguida, cortes deste material foram obtidos

com a ajuda de um micrótomo e as lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina. O material foi observado ao microscópio ótico de campo claro para análise das alterações morfológicas induzidas pelo tratamento.

5.2.8.6. Microscopia eletrônica de transmissão:

Fragmentos da lesão tumoral foram primeiramente fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio para seguir a segunda fixação, que foi realizada com ácido ósmico 1%. A preparação foi novamente lavada e, em seguida, desidratada com acetona. Por fim, o material foi impregnado com resina Epon e polimerizado. O material devidamente emblocado foi levado a um ultramicrótomo onde foram feitos os cortes ultrafinos para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.

6. RESULTADOS:

6.1. Efeitos da CE sobre a linhagem A549 no sistema de placa de 96 poços:

6.1.1. Citotoxicidade induzida por CE:

A viabilidade das células A549 foi avaliada pelo método do MTT imediatamente após serem submetidas a 0,5 mA, 1,0 mA e 1,5 mA de corrente elétrica contínua no modelo de placa de 96 poços, em tempos variando entre 2 e 24 minutos. Estes experimentos evidenciaram que a morte celular mostrou-se proporcional ao tempo de exposição e à intensidade de corrente aplicada.

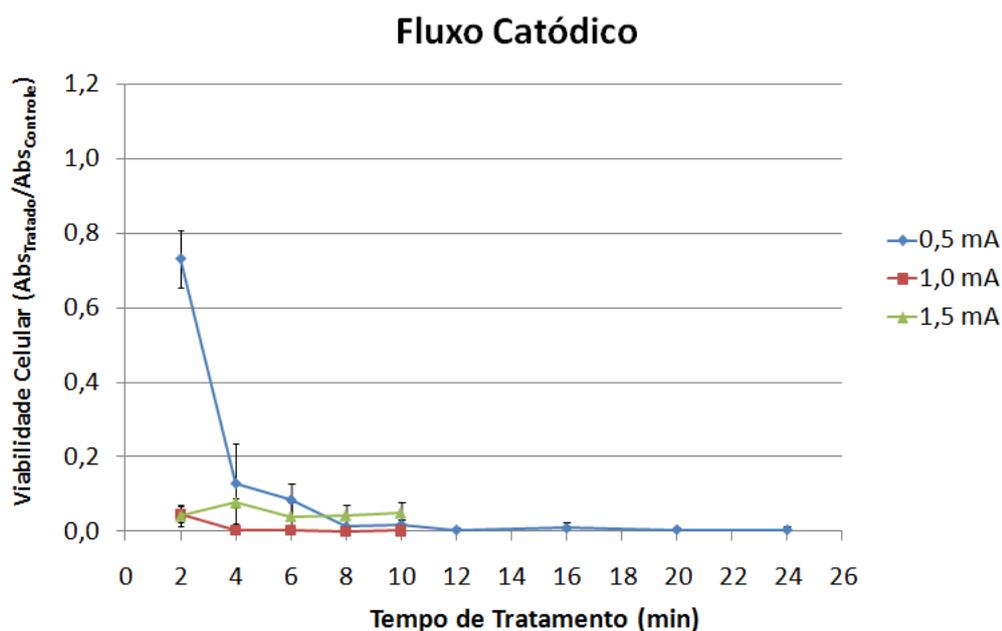


Figura 9: Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo catódico nos diferentes tempos de exposição e intensidades de corrente. A viabilidade foi expressa em unidades arbitrárias pela razão $\text{Abs}_{\text{Tratado}}/\text{Abs}_{\text{Controlo}}$, de forma que a controle = 1. Modelo utilizado: placa de 96 poços. Resultado de 5 experimentos realizados de forma independente.

No fluxo catódico a morte celular se deu em grande extensão nos primeiros minutos de exposição em quase todas as intensidades (Figura 9). Apenas os estímulos anódico e catódico foram capazes de induzir morte celular imediata da linhagem A549, sendo que o fluxo eletroíônico não foi capaz de induzir alterações significativas de viabilidade celular em nenhuma das intensidades de corrente ou tempos de exposição (Figura 10). Já no fluxo anódico, a viabilidade celular nos estímulos de 0,5 mA, 1,0 mA e 1,5 mA caiu a cerca de 50% com 14, 10 e 6 minutos de exposição, respectivamente (Figura 11).

Assim, estes tempos e intensidades de tratamento anódico (1,5 mA por 6 min; 1,0 mA por 10 min; 0,5 mA por 14 min) foram os tratamentos escolhidos para estudo de alterações tardias induzidas pelo estímulo elétrico nas células sobreviventes .

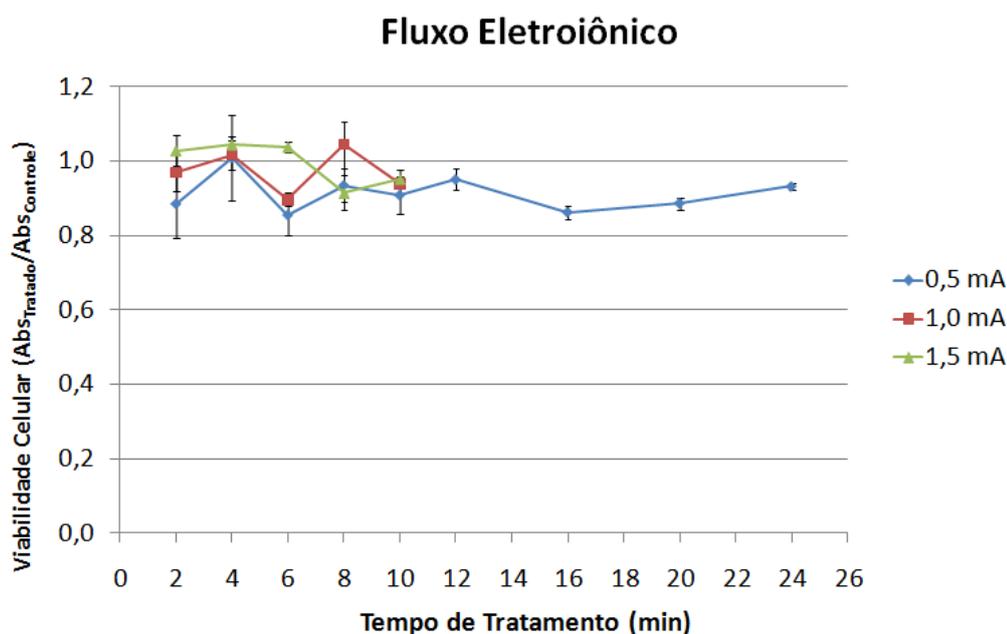


Figura 10: Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo eletroíônico nos diferentes tempos de exposição e intensidades de corrente. A viabilidade foi expressa em unidades arbitrárias pela razão $Abs_{Tratado}/Abs_{Controlo}$, de forma que a controle = 1. Modelo utilizado: placa de 96 poços. Resultado de 5 experimentos realizados de forma independente.

Os efeitos tardios do tratamento elétrico foram avaliados apenas para o FA e FEI, uma vez que o FC induziu uma morte celular muito intensa logo nos primeiros minutos de tratamento. Assim, as células tratadas com FA e FEI foram lavadas com PBS, re-incubadas em meio DMEM suplementado com SFB, a 37 °C por 24 h. Após a incubação, a viabilidade celular foi novamente avaliada por MTT. Os dados sugerem que as células A549 tratadas pelo FA e FEI retomaram seu crescimento, porém numa velocidade significativamente reduzida quando as mesmas foram tratadas com 1,5 mA por 6 minutos, tanto no fluxo anódico quanto no fluxo eletroônico (Figuras 12 e 13). Nos outros tratamentos testados (1,0 mA por 10 min e 0,5 mA por 14 min), foi observado um crescimento semelhante ao controle.

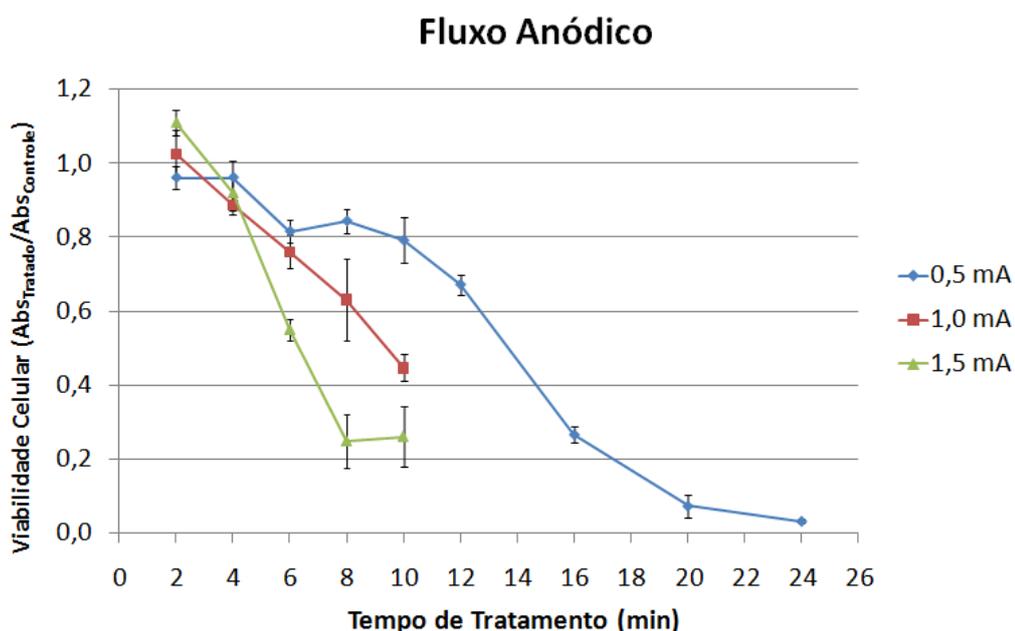


Figura 11: Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com fluxo anódico nos diferentes tempos de exposição e intensidades de corrente. A viabilidade foi expressa em unidades arbitrárias pela razão $Abs_{Tratado}/Abs_{Controlo}$, de forma que a controle = 1. Modelo utilizado: placa de 96 poços. Resultado de 5 experimentos realizados de forma independente.

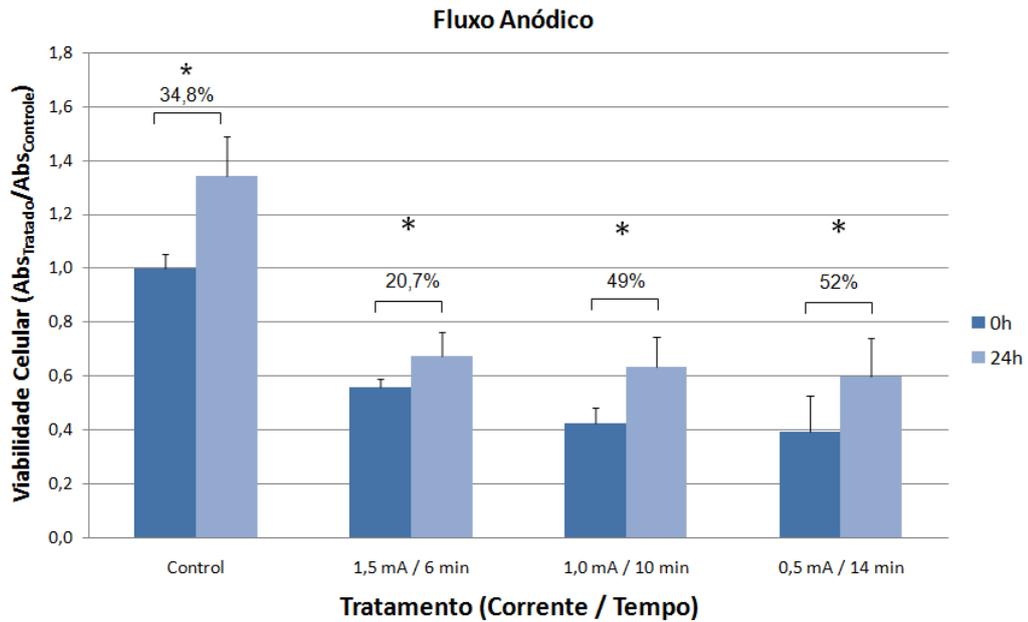


Figura 12: Viabilidade celular da linhagem A549 incubada com meio de cultura por 24 horas após o tratamento anódico em sistema de placa de 96 poços. A viabilidade foi expressa em unidades arbitrárias pela razão $Abs_{Tratado}/Abs_{Control}$, de forma que a controle = 1. Resultado de 5 experimentos realizados de forma independente. *diferença estatisticamente significativa entre o estímulo imediato e seu correspondente de 24h.

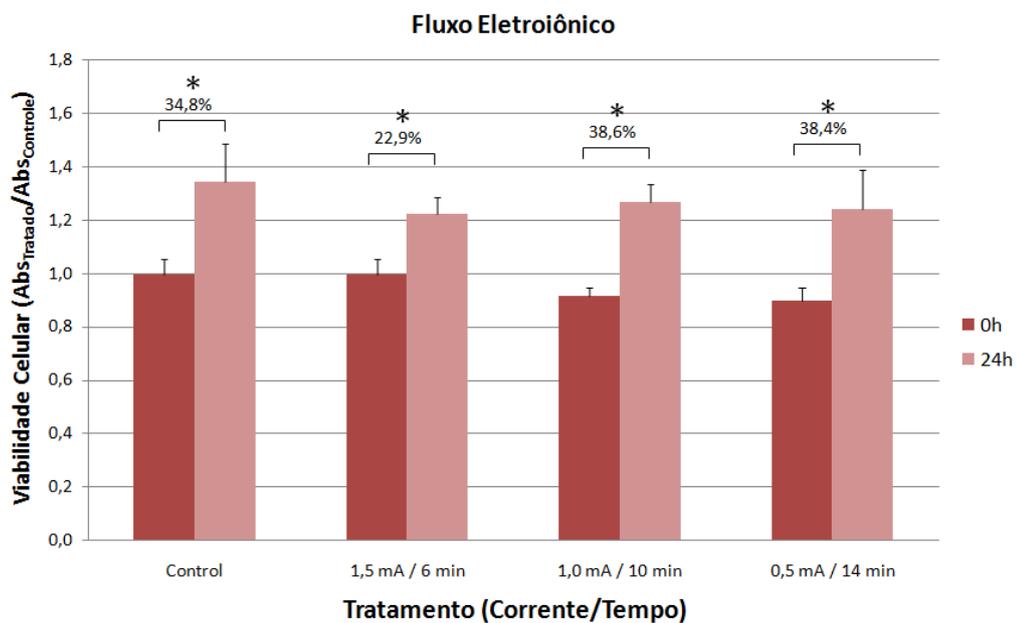


Figura 13: Viabilidade celular da linhagem A549 incubada com meio de cultura por 24 horas após o tratamento com fluxo eletroiónico em sistema de placa de 96 poços. A viabilidade foi expressa em unidades arbitrárias pela razão $Abs_{Tratado}/Abs_{Control}$, de forma que a controle = 1. Resultado de 5 experimentos realizados de forma independente. *diferença estatisticamente significativa entre o estímulo imediato e seu correspondente de 24h.

6.1.2. Expressão gênica de caspase-3:

A variação de expressão de caspase-3 após diferentes tratamentos anódicos, utilizando o modelo de 96 poços, seguidas de 3 horas de incubação com meio de cultura é mostrada na figura 14. Em paralelo, utilizou-se como controle positivo de indução de apoptose mediada por caspases o tratamento das células com cisplatina 50 μ M por 24 horas (CHENG *et al.*, 2010). Verificou-se pouca mudança na expressão de caspase-3 após 3 horas de quaisquer dos estímulos elétricos testados, sendo observado exuberante aumento da expressão desta enzima nas células tratadas com cisplatina (cerca de 3 vezes em relação ao controle sem tratamento).

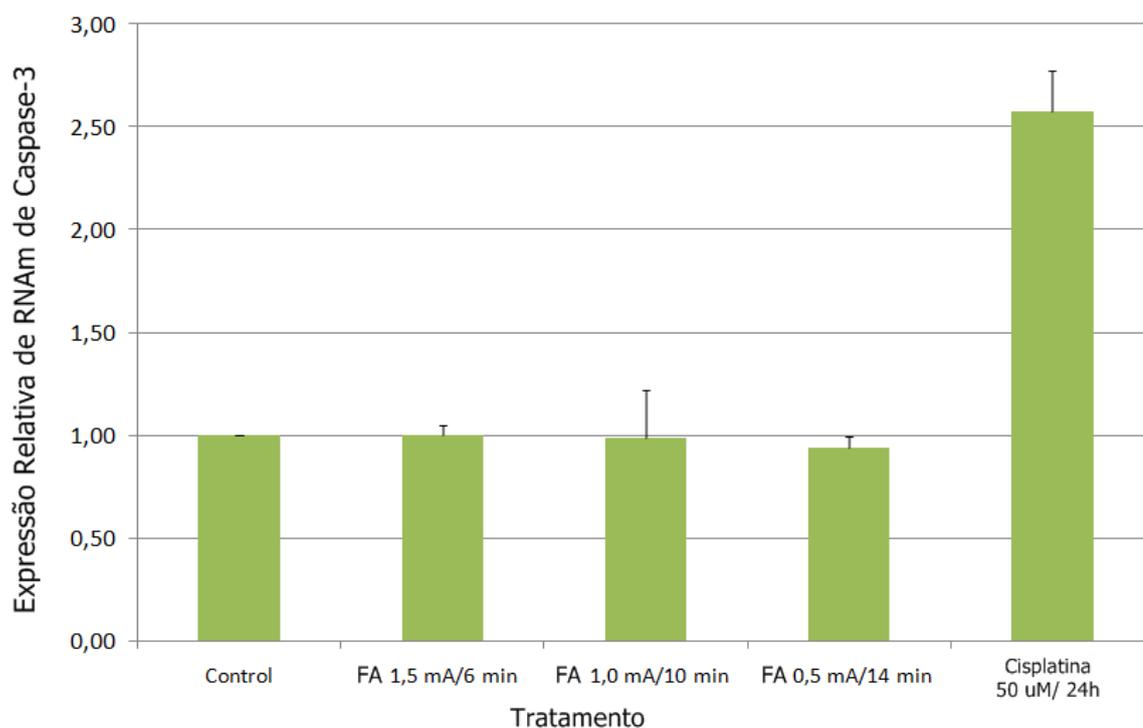


Figura 14: Expressão relativa de Caspase 3 após diversos tratamentos, seguidos de 3 horas de incubação com meio de cultura suplementado, exceto o estímulo com cisplatina, o qual foi avaliado imediatamente após o tratamento. Resultado de 3 experimentos realizados de forma independente.

6.2. Efeitos da CE sobre a linhagem A549 no sistema de placa de 24 poços:

6.2.1. Citotoxicidade induzida por CE:

A suscetibilidade das células A549 avaliada no modelo experimental de placa de 24 poços se mostrou muito diferente do modelo de menor escala, como mostra a curva dose-resposta da figura 15. Foi preciso uma dose muito maior de corrente elétrica (tempo e intensidade) para produzir a mesma extensão de dano celular. Além disso, verificamos ser importante manter as células tratadas em contato com os produtos de eletrólise por pelo menos 15 minutos antes da substituição do meio eletrolítico por DMEM suplementado com SFB.

Este modelo não foi capaz de induzir morte celular na mesma extensão do que o de menor escala. A viabilidade celular caiu a aproximadamente 60% após 10 minutos de tratamento com 2,0 mA, valor que foi alcançado com uma menor dose (1,5 mA por 6 minutos) no modelo de placa de 96 poços.

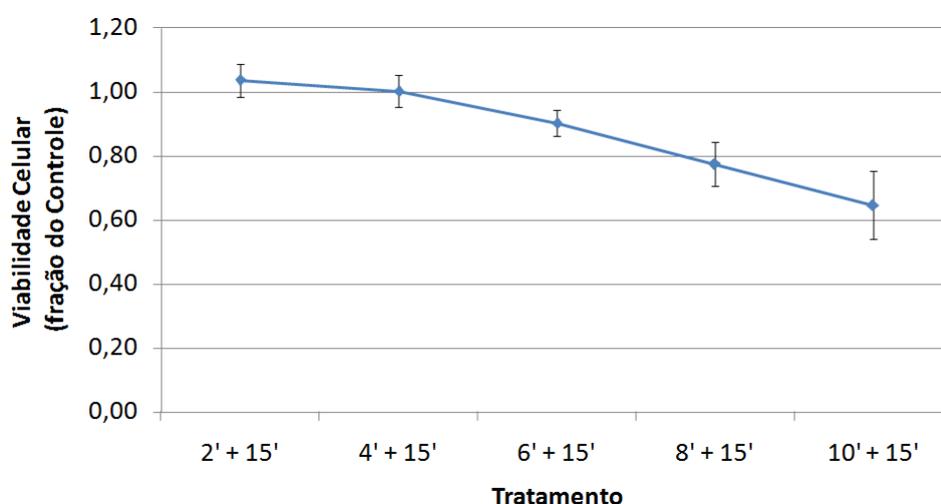


Figura 15: Viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após tratamento elétrico com 2 mA nos diferentes tempos de exposição, utilizando modelo de placa de 24 poços. As células foram deixadas por 15 minutos em contato com os produtos de eletrólise, antes da lavagem com PBS não tratado. Resultado de 3 experimentos realizados de forma independente.

6.2.2. Avaliação Morfológica da linhagem A549 tratada com CE:

A morfologia da linhagem A549 foi avaliada por coloração de Giemsa realizada imediatamente após o tratamento por 10 minutos com o FA a 2,0 mA, seguido de incubação por 15 minutos com os produtos de eletrólise. A análise das lâminas indicou que o tratamento com FA foi capaz de provocar uma perda da confluência da monocamada, acompanhada do aparecimento de projeções de membrana celular (“blebs”), focos de fragmentação celular e condensação nuclear, características sugestivas de apoptose (Figura 16, linha C). Quatro horas depois do tratamento, um grande número de células apresentou picnose, drástica perda citoplasmática e condensação nuclear (Figura 16, linha D). O tratamento com 6 minutos foi capaz de provocar alterações imediatas semelhantes, ainda que em menor escala (Figura 16, linha B).

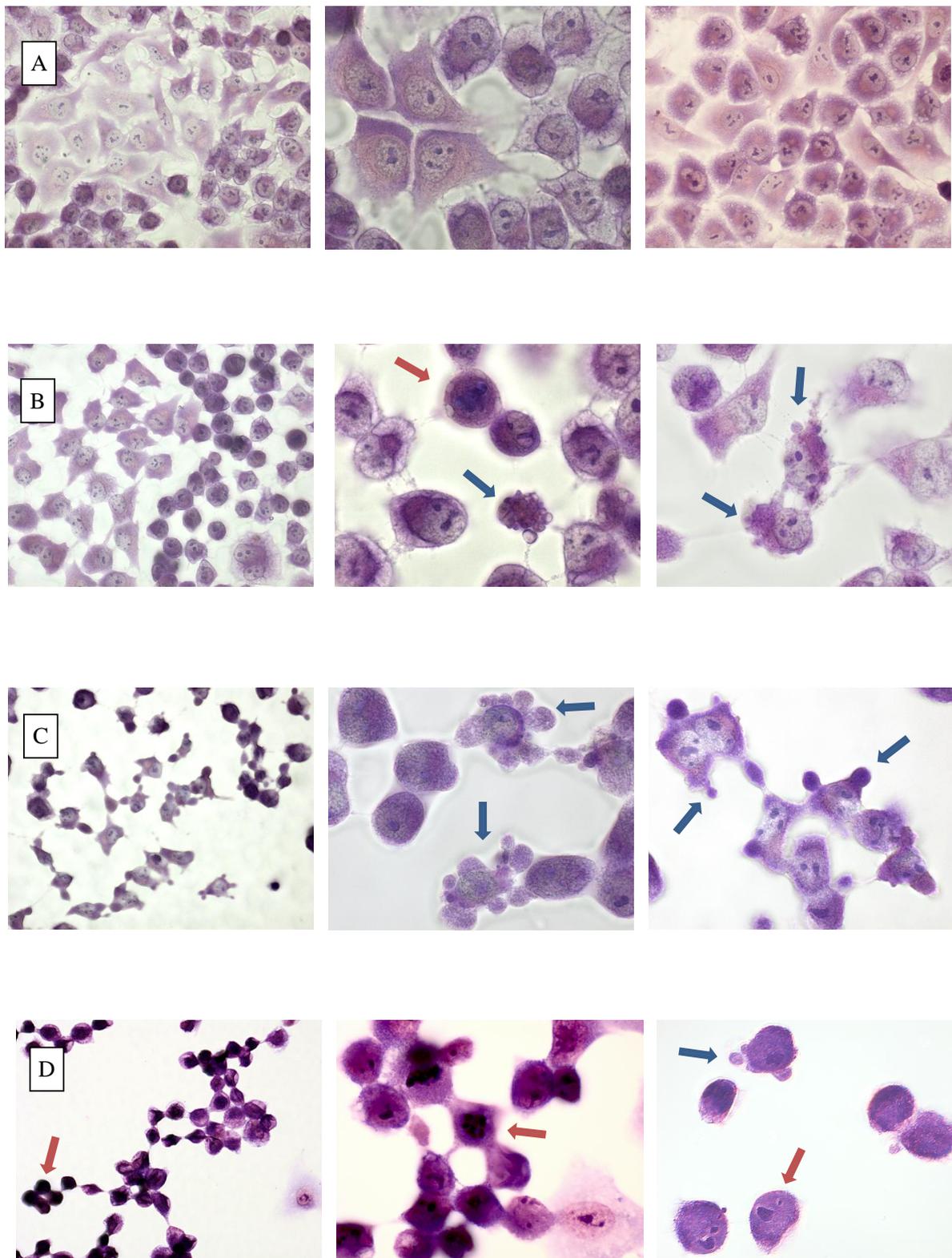


Figura 16: Fotomicrografias de células A549 coradas pelo método de Giemsa. *Linha A* - Células controle; *Linha B* - imediatamente após tratamento com 6 minutos de FA; *Linha C* - imediatamente após tratamento com 10 min de FA; *Linha D* - 3 horas após tratamento com 10 min de FA. As setas azuis indicam as alterações de membrana (“blebs”). Setas vermelhas indicam células com condensação e/ou fragmentação nuclear. Aumentos de 40x (primeira coluna de fotos) e 100x (segunda e terceira colunas).

6.2.3. Atividade enzimática de caspase-3:

A atividade enzimática de caspase-3 foi medida após o tratamento por 10 minutos com o FA a 2,0 mA, seguido de incubação por 15 minutos com os produtos de eletrólise. Após este tempo, as células na monocamada foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com DMEM suplementado com SFB 10%, a 37 °C por 24 h. Como controle positivo foram utilizadas células tratadas com cisplatina 50 μ M por 24 horas (CHENG *et al.*, 2010). Findo esse tempo, a análise por fluorimetria indicou um aumento de 42% na atividade de caspase-3 das células tratadas com FA em relação ao controle, ainda maior do que o aumento induzido pela cisplatina (Figura 17).

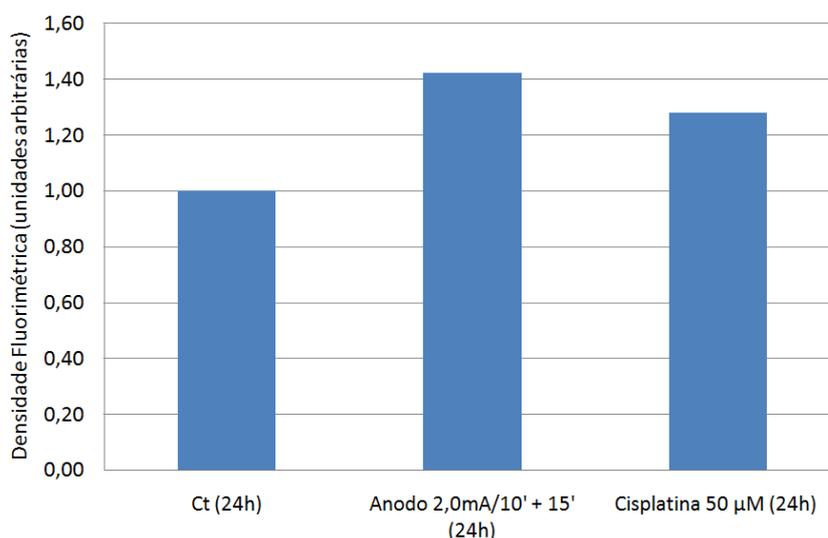


Figura 17: Atividade enzimática de Caspase 3 por fluorimetria em células A549 após 24 horas dos respectivos tratamentos (n=1).

6.2.4. Análise da Fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose:

A ocorrência de apoptose também foi confirmada pela fragmentação de DNA em múltiplos de aproximadamente 200 pares de base, observada 18 h após o tratamento anódico por 10 minutos, seguido de incubação por 15 minutos com os produtos de eletrólise. (Figura 18). Além disso, o rastro observado na corrida eletroforética evidencia a fragmentação necrótica desorganizada.

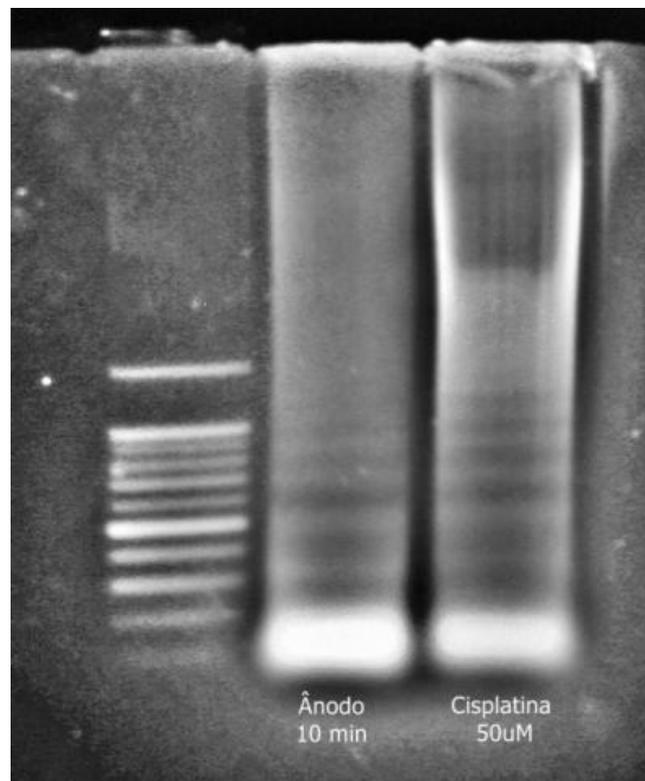


Figura 18: Gel de eletroforese de DNA total de células após 18h de tratamento com FA e 18h de incubação com cisplatina 50 μ M: Perfil de fragmentação organizada com bandas de pesos múltiplos de 200 pb indicativo de apoptose (n=1). Coluna da esquerda: Padrão de massa molecular onde a diferença entre cada banda é de 100 pb.

6.3. Efeitos *in vivo* da CE em associação com L-Tirosina encapsulada em Np de PCL em melanoma de camundongo:

Os efeitos *in vivo* decorrentes da associação de nanotecnologia à ETT foram pela primeira vez avaliados em modelo murino. Neste estudo piloto, verificamos que a mortalidade dos animais neste estudo piloto foi muito alta: dos 20 animais tratados com corrente elétrica, independente da associação, apenas um de cada grupo sobreviveu. Além disso, a inoculação das células B16F10 gerou melanomas de tamanhos muito heterogêneos de animal para animal (Tabela 4). No entanto, significativas alterações puderam ser observadas pela análise morfológica dos tumores dos animais sobreviventes

Tabela 4: Tamanho dos tumores obtidos por inoculação de células B16F10 em dorso de camundongos nos respectivos grupos tratados e mortalidade dos animais. Em vermelho: animais mortos nas primeiras 48 h após o tratamento. Em preto: animais sobreviventes 48 h após o tratamento e sacrificados ao fim deste tempo para análise histopatológica.

G1 - CE apenas	Volume Tumoral (mm ³)	G3 - CE + Np	Volume Tumoral (mm ³)
Animal 1	0,616	Animal 1	1
Animal 2	0,56	Animal 2	9,18
Animal 3	1,32	Animal 3	4,06
Animal 4	12,312	Animal 4	12,312
Animal 5	0,728	Animal 5	0,462
G2 - CE + tir livre	Volume Tumoral (mm ³)	G4 - CE + Np + tir	Volume Tumoral (mm ³)
Animal 1	0,405	Animal 1	7,92
Animal 2	0,72	Animal 2	6,84
Animal 3	0,924	Animal 3	8,352
Animal 4	1,21	Animal 4	1,989
Animal 5	2,04	Animal 5	1,232

A análise dos melanomas por microscopia óptica evidenciou que todos os grupos tratados com CE apresentaram características sugestivas de necrose e focos hemorrágicos. No entanto, esta necrose se mostrou muito mais intensa no grupo 5, onde a associação de CE e o ácido aminado encapsulado foi utilizada, onde observa-se apenas a matriz tecidual totalmente livre de corpos celulares (Figura 19). O próprio aspecto macroscópico do tumor neste grupo se mostrou diferenciado no momento da dissecação, com uma textura muito frágil ao toque, num aspecto de liquefação, indicando grande perda de conectividade estrutural.

A análise ultraestrutural dos melanomas também evidenciou padrões de necrose em todos os grupos tratados, com descontinuidade da membrana plasmática e perda de conteúdo intracelular. Em todos os grupos tratados, também se evidenciaram células com sinais de condensação nuclear, especialmente no grupo 2, e aumento de vacuolização (Figura 20). A análise do tecido hepático não evidenciou nenhum tipo de alteração patológica e os pulmões não evidenciaram sinais de metástase visíveis macroscopicamente, indicando ausência de toxicidade do tratamento a órgãos vitais como fígado e pulmões (dados não mostrados).

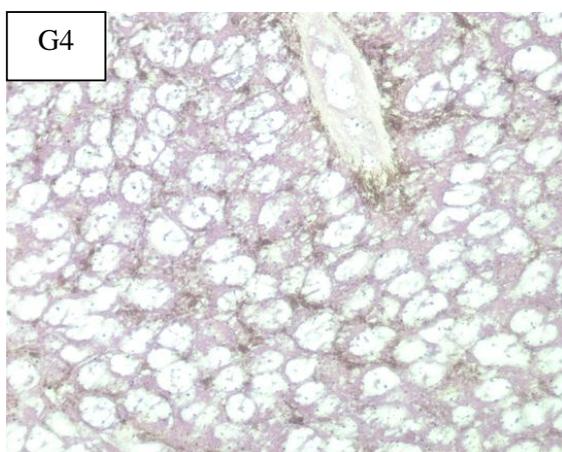
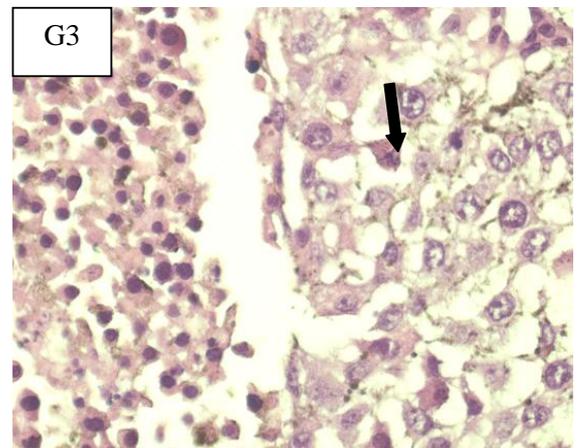
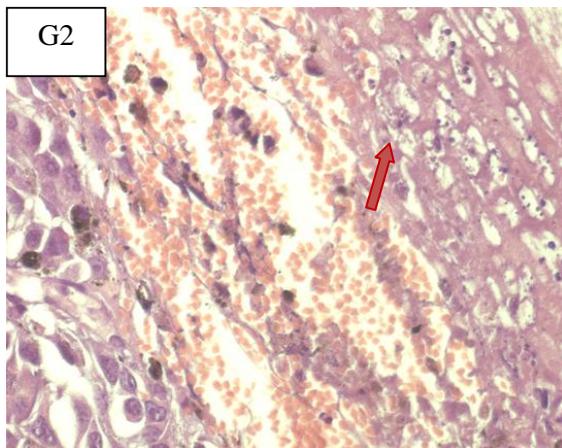
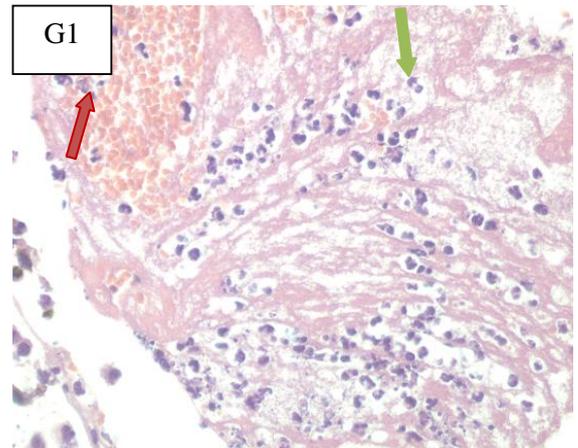
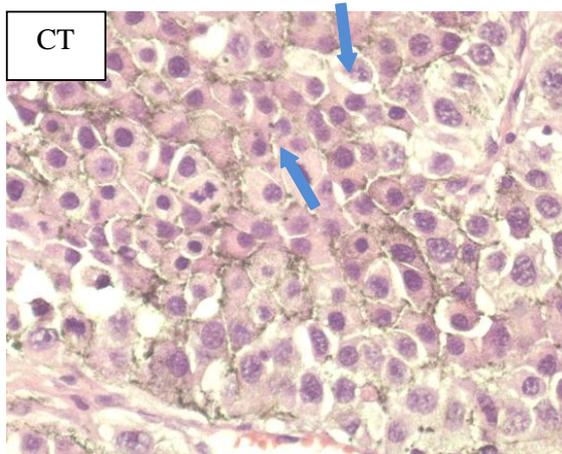


Figura 19: Fotomicrografias de cortes de melanoma murino corados por hematoxilina/eosina observados por microscopia óptica (aumento de 40x). CT (Tumor não tratado): células com características típicas, em intensa divisão celular (setas azuis); G1 (Apenas CE), G2 (CE + tirosina livre) e G3 (CE + Nps vazias): com áreas de necrose (setas verdes), hemorragia (setas vermelhas), inflamação e depósitos de melanina (setas negras); G4 (CE + Nps + tirosina): necrose intensa, com ausência de corpos celulares, apenas matriz tecidual.

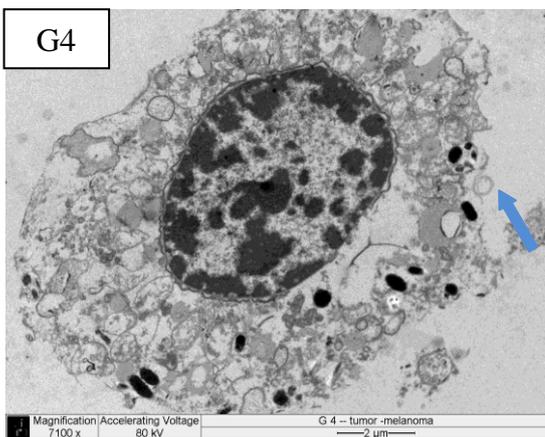
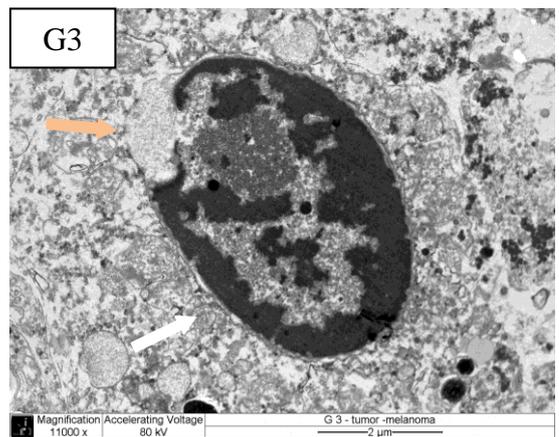
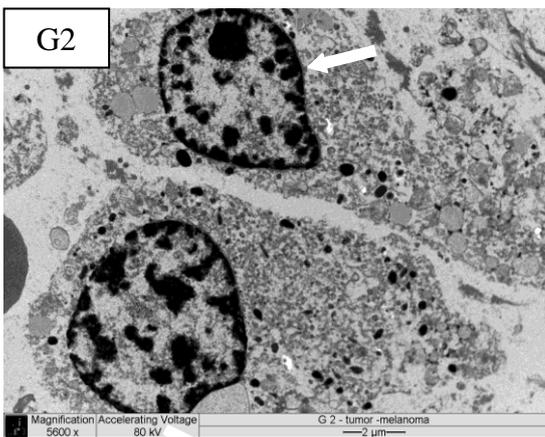
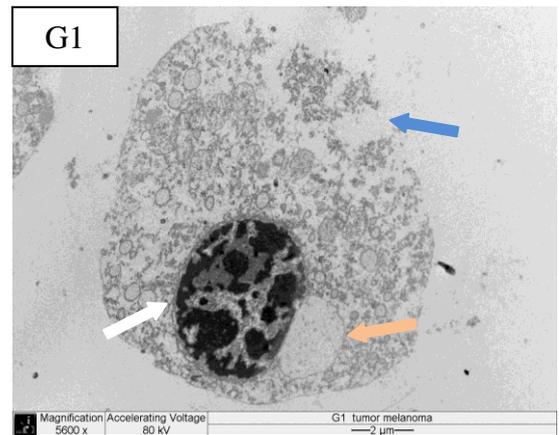
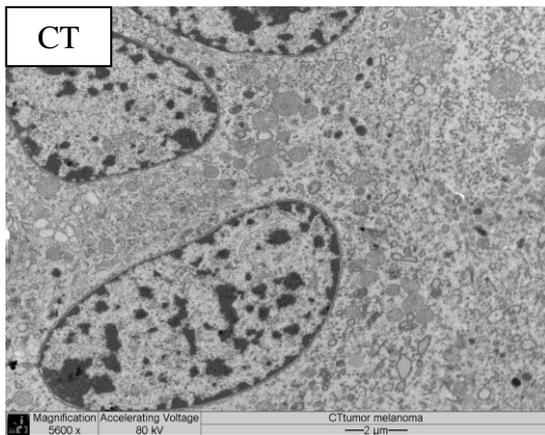


Figura 20: Fotomicrografias de cortes ultrafinos de melanoma murino observados por microscopia eletrônica de transmissão: CT (Tumor não tratado): células com características típicas, morfologia preservada; G1 (Apenas CE), G2 (CE + tirosina livre), G3 (CE + Nps vazias) e G4 (CE + Nps + tirosina): condensação nuclear (setas brancas), descontinuidade da membrana plasmática, (setas azuis), projeções da membrana nuclear (setas alaranjadas) e vacuolização aumentada.

7. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS:

Vasta é a literatura que evidencia a capacidade da corrente elétrica de provocar morte celular, sendo por isso aplicada na terapêutica do câncer. No entanto, um circuito elétrico é composto por pelo menos 4 componentes físicos, que podem exercer efeitos independentes sobre sistemas biológicos: os pólos anódico e catódico, o campo elétrico e o campo magnético. Dessa forma, tanto as vantagens quanto as desvantagens desta abordagem terapêutica são uma resultante da combinação destes componentes. Assim, para uma otimização da terapia, se faz necessária a compreensão dos efeitos isolados de cada um destes componentes. O modelo *in vitro* utilizado no presente estudo permite avaliar os efeitos das diferentes polaridades, assim como do campo elétrico sobre as linhagens celulares.

O perfil de resposta dose-dependente de células de cultura ao tratamento elétrico já havia sido demonstrado neste sistema em diversos tipos celulares tumorais, como as linhagens leucêmicas HL60 (VEIGA *et al.*, 2005) e K562-Lucena resistente a vincristina (HOLANDINO *et al.*, 2001), de mastocitoma murino P815 (VEIGA *et al.*, 2000; HOLANDINO *et al.*, 2000) e de melanoma metastático murino B16F10 (CAMPOS *et al.*, 2010). Este perfil de resposta foi também observado na linhagem pulmonar A549, apesar desta linhagem se mostrar significativamente mais resistente ao tratamento anódico com a mesma intensidade de 2,0 mA. Comparando as respostas celulares frente ao mesmo modelo de 24 poços, a viabilidade celular da linhagem A549 imediatamente após o tratamento anódico sofreu diminuição de cerca de 40% após 10 minutos de tratamento, diferentemente dos resultados obtidos com todas as outras linhagens previamente testadas, onde a partir de 6 minutos foi possível detectar queda semelhante na viabilidade celular (HOLANDINO *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2010).

Os estudos que envolvem a ETT definem a dose de corrente elétrica aplicada como a quantidade de carga elétrica (Q) em coulombs (NORDENSTRÖM, 1983; GRIFFIN *et al.*, 1994; CHOU *et al.*, 1997; VON EULER *et al.*, 2004), que é dada pelo produto da intensidade de corrente em ampéres (i) pelo tempo em segundos (t), segundo a fórmula: $Q = i \times t$. Comparando os dois modelos experimentais utilizados em nosso trabalho (placa de 96 poços e placa de 24 poços), pode-se concluir que a dose de corrente aplicada não é a única preditiva da capacidade destrutiva da CE. Nestes modelos *in vitro*, a relação superfície de contato/volume de meio eletrolítico foi maior no modelo de 96 poços, e isso se refletiu na extensão dos danos detectados na linhagem A549. Os protocolos *in vivo* indicam igualmente que a profundidade de inserção dos eletrodos é tão relevante quanto a dose de corrente elétrica na determinação do tipo e a quantidade dos danos celulares. Na metodologia utilizada por Chou e colaboradores, a profundidade de inserção do eletrodo utilizada é dita como dependente das dimensões do tumor (CHOU *et al.*, 1997). No entanto, este aspecto não é habitualmente referenciado com clareza na descrição dos métodos de importantes estudos *in vivo* realizados com ETT (GRIFFIN *et al.*, 1994; GRIFFIN *et al.*, 1995; XIN *et al.*, 1997; VON EULER *et al.*, 2004). Assim como a mesma dose de um fármaco pode provocar efeitos de diferentes magnitudes dependendo da via e da forma de administração, a superfície de contato, a quantidade e a posição relativa dos eletrodos no tumor podem influenciar dramaticamente a resposta terapêutica às mesmas doses de CE aplicadas.

Além de avaliar a suscetibilidade da linhagem A549 à corrente elétrica, esta construção de curvas dose-resposta permitiu identificar o tempo de exposição necessário para levar a 50% de morte celular imediata para cada intensidade de

corrente no modelo de 96 poços (14 minutos a 0,5 mA; 10 minutos a 1,0 mA e 6 minutos a 1,5 mA) e no modelo de 24 poços (10 minutos a 2,0 mA). Estes foram os pontos escolhidos para estudo das alterações celulares e moleculares induzidas tardiamente pela CE nas células sobreviventes, avaliando inclusive algumas eventuais diferenças entre tratamentos rápidos com altas intensidades de CE e exposições longas a doses menores de corrente.

A capacidade proliferativa da linhagem A549 mostrou-se pouco afetada pelos estímulos anódico e eletroônico num período de 24 horas após o tratamento. Ainda assim, é perceptível um menor incremento de viabilidade celular no tratamento anódico com 1,5 mA por 6 minutos em relação às demais condições, sugerindo que tratamentos curtos com intensidades maiores de CE podem ser mais capazes de retardar o desenvolvimento tumoral do que sessões longas de menor amperagem. No entanto, ensaios mais específicos para proliferação celular, como por exemplo, a medição da incorporação de bromodeoxiuridina no DNA, se fazem necessários para conclusões mais precisas acerca desse suposto efeito antiproliferativo (VON EULER *et al.*, 2002).

Uma vez que outras linhagens celulares apresentaram características sugestivas de apoptose frente ao fluxo anódico no mesmo modelo de 24 poços (VEIGA *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2010), é esperado um comportamento semelhante da linhagem A549. A visível perda de confluência das células na monocamada imediatamente após o tratamento com 2 mA por 10 minutos pode ser justificada pela morte celular provocada por necrose imediata, bem como por alterações de membrana provocada pela CE, o que poderia responder pela mudança do aspecto espreado das células para uma forma arredondada (Figura 14). Após 3 horas, este processo culmina com abundância de células em picnose,

com núcleos condensados e/ou fragmentados, característicos de corpos apoptóticos. Estas imagens sugerem que, além deste processo compatível com apoptose ser deflagrado num curto espaço de tempo, as alterações morfológicas seguem um curso temporal progressivo. Interessante ressaltar que uma dose de corrente menor (2,0 mA por 6 minutos) foi capaz de produzir, ainda que em menor escala, um perfil semelhante de alterações morfológicas imediatas, mesmo não sendo acompanhado de decréscimo significativo na viabilidade celular.

A avaliação dos efeitos do fluxo anódico sobre a expressão do RNA-m de caspase-3 em células A549 foi feita apenas no modelo de 96 poços, após 3 horas do tratamento elétrico com 0,5 mA, 1,0 mA e 1,5 mA. Nestas situações experimentais, não foram evidenciadas variações significativas de expressão do RNA-m de caspase-3 em relação a células não tratadas (Figura 14). No entanto, o eventual aumento de expressão do RNA-m pode ser um evento tardio, e este espaço de tempo pode ser curto para uma repercussão detectável na produção de RNA-m desta enzima. Além disso, não descartamos a possibilidade de aumentar a exposição aos produtos de eletrólise para detecção de variações nesta expressão gênica. Dessa forma, a expressão gênica de caspase-3 será avaliada em novos experimentos aplicando tempos maiores de contato com os produtos de eletrólise gerados, e também em tempos mais longos de incubação pós-estímulo, como 24 h.

Ainda que não exista alteração de expressão de caspase-3, isso não exclui a possibilidade da ocorrência de apoptose caspase-dependente. Por isso, foi avaliada a atividade enzimática direta de caspase-3, que pode ser um processo mais rapidamente deflagrado do que a regulação positiva do gene (HUERTA *et al.*, 2007). No presente estudo foi observado um aumento de 42% na atividade de caspase-3, 24 horas após o tratamento, utilizando-se o sistema de 24 poços. Von Euler e

colaboradores avaliaram a possibilidade das variações de pH decorrentes do tratamento elétrico serem indutoras de morte por apoptose (VON EULER *et al.*, 2002). O resultado destes estudos indicou que a acidificação do meio leva a um marcante aumento de atividade enzimática de caspase-3, a partir de um pH de 5 por um tempo de exposição de 30 minutos (VON EULER *et al.*, 2002). Já foi previamente demonstrado que, no modelo utilizado por Veiga e colaboradores que o tratamento com 10 minutos de fluxo anódico, o pH do meio eletrolítico diminui de 7,2 para 6,5 (VEIGA *et al.*, 2000). Assim, este aumento na atividade de caspase-3 provavelmente não está sendo causado por acidificação, de forma que outros produtos de eletrólise, como espécies reativas de oxigênio e cloro, podem ser co-responsáveis por essa propriedade pró-apoptótica do fluxo anódico.

A fragmentação organizada do DNA é produzida pela ativação de endonucleases ativadas pela cascata apoptótica (DANIAL *et al.*, 2004; HUERTA *et al.*, 2007; KROEMER *et al.*, 2009). Foi o terceiro marcante achado que, associado às características morfológicas e a ativação de caspase-3, consolidou a ocorrência de apoptose em células A549 tratadas com o fluxo anódico. Este fenômeno foi evidenciado pelo padrão de DNA em escada observado no gel de agarose, que fornece informações qualitativas sobre a presença de células em apoptose naquela população. Assim, o uso de técnicas quantitativas como o uso de citometria de fluxo com marcadores específicos para apoptose, como anexina V, podem ser úteis para ampliar os estudos envolvendo apoptose e fluxo anódico.

Os resultados obtidos com A549 evidenciaram importantes indícios da ocorrência de apoptose mediada por caspases no tratamento anódico, o qual foi dependente do tempo de contato com os produtos de eletrólise gerados. Além disso, a comparação entre os modelos de placa de 96 e 24 poços indicaram que a área de

contato com a suspensão eletrolítica também influenciou a extensão dos danos celulares decorrentes da estimulação anódica. Estes resultados motivam o desenvolvimento de novos experimentos envolvendo outras técnicas de biologia celular e molecular para o aprofundamento dos mecanismos envolvidos com a atividade antitumoral da CE.

Embora a intensidade de 5 mA já tenha sido utilizada em outros estudos com camundongos por tempos até superiores que 10 minutos (GRIFFIN *et al.*, 1994; CHOU *et al.*; 1997), a elevada mortalidade dos animais observada neste experimento piloto indicou que para o nosso modelo experimental esta intensidade foi demasiado grande. O tipo de eletrodo utilizado que, para os camundongos C56Bl/6Y, se mostrou grosseiro, pode ter sido co-responsável pela alta mortalidade observada em nosso experimento. Se faz necessária uma curva de doses para otimização dos parâmetros de tratamento, visando minimizar essa mortalidade.

A pronunciada necrose vista poucos dias após o tratamento do tumor com CE com L-tirosina encapsulada sugeriu um efeito diferenciado desta combinação, apesar de não terem sido encontrados indícios da ocorrência de apoptose. Idealmente, é desejável que a ETT seja capaz de provocar regressão tumoral tardia por mecanismos como, por exemplo, a apoptose, sem gerar extensas áreas de necrose, devido à intensa e até potencialmente fatal reação inflamatória causada por essa destruição tecidual massiva e desorganizada (GRIFFIN *et al.*, 1994). Entretanto, este experimento piloto nos permitiu observar preliminarmente danos histopatológicos e ultraestruturais significativos, sugerindo uma possível potencialização dos efeitos da ETT pela L-tirosina nanoencapsulada, como detectada por Campos e colaboradores em modelo *in vitro* (CAMPOS *et al.*, 2010). No entanto a já discutida mortalidade dos animais não permitiu que obtivéssemos

um espaço amostral significativo para concluir acerca deste efeito. Sendo assim a dose de corrente elétrica para próximos estudos deve ser revista, visando tanto minimizar o dano necrótico quanto evitar uma mortalidade iatrogênica.

Como etapas futuras, se fazem necessários estudos dos efeitos da CE sobre linhagens celulares de outros tipos histológicos de câncer pulmonar de alta agressividade, como o de grandes células e o de pequenas células. Também fazem parte do futuro deste projeto a avaliação do papel das espécies reativas de oxigênio no dano induzido pelo tratamento anódico e seu possível papel como indutor de apoptose. Estudos de outras enzimas da família das caspases também serão realizados a fim de caracterizar a principal via envolvida com a deflagração desta morte celular.

8. CONCLUSÕES:

- A linhagem A549 se mostrou suscetível à corrente elétrica, apesar de ter demonstrado uma resistência sensivelmente maior ao fluxo anódico quando comparado às outras linhagens previamente estudadas;
- A extensão do dano causado pelo fluxo anódico é proporcional não apenas à dose de corrente utilizada, mas também à superfície de contato do eletrodo com o meio eletrolítico;
- O fluxo anódico parece ser capaz de provocar morte celular apoptótica, identificada pelo perfil típico de fragmentação de DNA e observação de alterações morfológicas compatíveis com apoptose na linhagem A549;
- O tratamento anódico parece ser capaz de provocar aumento de atividade de caspase-3, o que sugere a participação dessa enzima na deflagração de apoptose;
- A expressão gênica de caspase-3 na linhagem A549 não sofreu alterações frente ao tratamento anódico nas condições estudadas;
- Além de aumentar a mortalidade dos animais do estudo, a alta dose de corrente foi um dos determinantes para a ocorrência de extensas áreas de necrose em todos os tumores tratados, como observado na análise histopatológica;
- A associação de L-tirosina nanoencapsulada à CE parece produzir um dano mais intenso quando comparado a CE isoladamente em modelo *in vivo* de melanoma murino, o que pode corroborar resultados prévios obtidos com a mesma linhagem *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS:

ABE, A; YAMADA, H. Harmol induces apoptosis by caspase-8 activation independently on Fas/Fas ligand Interaction in human lung carcinoma H596 cells. *Anti-Cancer Drugs*, v. 20, p. 373–381, 2009.

ALBERG, A.J.; FORD, J.G; SAMET J.M. Epidemiology of Lung Cancer: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest*, v. 132, p. 29S-55S, 2007.

ALBERTS, B. *et al.* Molecular Biology of The Cell. 5a Edição, *Editores Garland*. 2008.

ALEXIS, F. *et al.* New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology*, v. 26, p. 74-85, 2008.

BERGUES, L. *et al.* Antitumoral effect of the direct electric current on subcutaneous tumours. In: *17th Intern Cancer Congress*, v.1, p. 35-39, 1998.

BRILES, E.B. *et al.* Isolation and metastatic properties of detachment variants of B16 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst*, v. 60, p. 1217-1222, 1978.

BRITO, L.M. *et al.* The electro-ionic low generated by a direct electric current delays cell growth and modifies the glycolytic metabolism of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. In: *III Evento Internacional del Electromagnetismo Aplicado*, p. 1-3, 2009.

BRUSTUGUN, O.T.; FLADMARK, K.E.; DOSKELAND, S.O. *et al.* Apoptosis induced by micro injection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ*, v. 5, p. 660-668, 1998.

CALLAHAN, M.K.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ*, v. 7, p. 645-653, 2000.

CAMPOS, V.E.B. Estudo da potencialidade de aminoácidos encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer. *Dissertação (Farmácia) - Faculdade de Farmácia UFRJ*, 2008.

CAMPOS, V.E.B.; TEIXEIRA, C.A.A; VEIGA, V.F. *et al.* L-Tyrosine-loaded

nanoparticles increase the antitumoral activity of direct electric current in a metastatic melanoma cell model. *Int. J. Nanomedicine*, v. 5, p. 1–11, 2010.

CHAWLA, J. S; AMIJI, M. M. Biodegradable poly(o-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharmaceutics*, v. 249, p. 127-138, 2002.

CONNOLLY, M.A. Purification of RNA from Animal Cells Using Trizol. *Cold Spring Harb. Protoc.*; doi:10.1101/pdb.prot4104, 2006.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemistry Journal*, v. 326, p. 1-16, 1997.

COUNIS, M.F.; TORRIGLIA, A. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie*, v. 88, p. 1851-1858, 2006.

CHENG, Y.J.; JIANG, H.S. ; HSU, S.L. *et al.* XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin. *Eur. J. Pharmacol*, v. 627, p. 75-84, 2010.

CHOU, C-K. ; MCDUGALL A.J. ; AHN, C. *et al.* Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics*, v. 18, p. 14-24, 1997.

DANIAL, N.N.; KORSMAYER S.J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, v. 116, p. 205–219. 2004.

DI FILLIPO, M. ; BERNARDI, G. The early apoptotic DNA fragmentation targets a small number of specific open chromatin regions. *PLoS*, v. 4(4), p. e5010, doi:10.1371/journal.pone.0005010, 2009.

EISENBERG-LERNER, A. ; BIALIK, S. ; SIMON, H.U. *et al.* Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, v. 16, p. 966-975, 2009.

ENGLERT, R. P. & SHACTER, E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species. *J Biol Chem*, v. 277, p. 20518–20526, 2002.

FAROKHZAD, O. C. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo, *PNAS*, v. 103, p. 6315-6320, 2006.

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*, v. 5 (11), p. 876-85, 2005.

FAN, X. ; KRAHLING, S. ; SMITH, D. *et al.* Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol Biol Cell*, v. 15, p. 2863-2872, 2004.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J. Cancer*, v. 124, p. 511–515 2009.

GAM, J.C. ; GLAZER, A.P. Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts. *Eur Spine J*, v. 15, p. 1301-1311, 2006.

GIARD, D.J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst*, v. 51, p. 1417-1423, 1973.

GRIFFIN, D.T. ; DODD, N.J.F ; MOORE, J.V. *et al.* The effects of low-level direct-current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumor regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer*, v. 69, p. 875-878, 1994.

GRIFFIN, D.T. ; DODD, N.J.F. ; ZHAO, S. *et al.* Low level direct electric current therapy for hepatic metastases. I. Preclinical studies on normal liver. *Br J Cancer*, v. 72, p. 31-34, 1995

GIULLIETI, A. ; OVERBERG, L. ; VALCKX, D. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v. 25, p. 386-401, 2001.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70. 2000.

HANS, M. L. & LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Material Science*, v. 6, p. 319-327, 2002.

HIRSCH, F.R. ; MERRICK, D.T. ; FRANKLIN W.A. Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention. *Eur Respiratory J*, v. 19, p. 1151-1158, 2002.

HITOMI, J. ; CHRISTOFFERSON, D.E. ; NG, A. *et al.* Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, v. 135, p. 1311-1323, 2008.

HOLANDINO, C. Alterações em células tumorais induzidas por corrente elétrica

contínua de baixa intensidade: um estudo *in vitro*. Tese de Doutorado defendida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

HOLANDINO, C. ; VEIGA, V.F. ; CAPELA, M.M. *et al.* Damage induction by direct electric current in tumoural target cells. *Indian J Experimental Biology*, v. 38, p. 554-607, 2000.

HOLANDINO, C. ; VEIGA, V.F. ; RODRIGUES, M.L. *et al.* Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein _expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. *Bioelectromagnetics*. v. 22, p. 470-478, 2001.

HUERTA, S. ; GOULET, B.S. ; HUERTA-YEPEZ, S. *et al.* Screening and Detection of Apoptosis. *J Surg Res*, v. 139 (1), p. 143-156, 2007.

INOUE, S. ; BROWNE, G. ; MELINO, G. *et al.* Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ*, v. 16, p. 1053-1061, 2009.

JEMAL, A. ; SIEGEL, R. ; XU, J. *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, v. 58, p. 71–96, 2008.

JAMESON, J.L., Harrison's Principles of Internal Medicine; Capítulo 85 - Neoplasms of the lung 551-562; 17^a Edição. Editora McGraw Hill, 2008.

KERR, J.F.R. ; WYLLIE, A.H. ; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIRPOTIN, D. B. *et al.* Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.*, v. 66 (13), p. 6732-40, 2006.

KISHI, Y. ; KUBA, K. ; NAKAMURA, T. *et al.* Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngenic mouse tumor models. *Cancer Sci*, v. 100 (7), p. 1351-1358, 2009.

KLAMT, F. ; ZDANOV, S. ; LEVINE, R.L. *et al.* Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol*, v. 11(10), p. 1241-1247, 2009.

KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; VANDENBEELE, P. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Diff*, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUO, C. ; CHEN, B.C. ; YU, C.C. *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase I mediates denbinobin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *J Biomed Sci*, v. 16, p. 43, 2009.

KURINNA, M.S. ; TSAO, C.C. ; NICA, A.F. *et al.* Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res*, v. 64, p. 7852-7856, 2004.

LAUNAY, S. ; HERMINE, O. ; FONTENAY, N. *et al.* Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, v. 24, p. 5137-5148, 2005.

LIEBER, M. *et al.* A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, v. 17, p. 62-70, 1976.

LING, H. ; ZHOU, L. ; JIA, X. *et al.* Polyporenic Acid C induces caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer A549 cells. *Molecular Carcinogenesis*, v. 48, p. 498-507, 2009.

LUO, X. ; CHEN, B. ; ZHENG, R. *et al.* Hydrogen peroxide induces apoptosis through the mitochondrial pathway in rat Schwann cells. *Neurosci Lett*, 2010

MAKINO, K. *et al.* Effects of plasma proteins on degradation properties of poly(L-lactic) microcapsules. *Pharm. Res.*, v. 4, p. 62-65, 1987.

MARTY, M.; SERSA, G. ; GARBAY, J.R. *et al.* Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer*. v. 4, p. 3-13, 2006.

MAYER, M. ; NOBLE, M. N-Acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 7496-7500, 1994.

MIR, L.M. ; GLASS, L.F. ; SERSA, G. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer*, v. 77(12), p. 2336-2342, 1998.

MORA-HUERTAS, C. ; FESSI, H. ; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, v. 385(1-2), p. 113-142, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J.Immunol.Meth*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NILSSON, E. ; VON EULER, H. ; BERENDSON, J. *et al.* Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*. v. 51, p. 1-11, 2000

NORDENSTRÖM, B. "Biologically Closed Electric Circuits." Stockholm, Sweden: *Nordic Medical Publications*. 1983.

NORDENSTRÖM, B. Biologically closed electric circuits for treatment of inoperable cancer. *J Bioelectr*, v. 3, p. 137–153, 1984.

NORDENSTRÖM, B. Electrochemical treatment of cancer. *Ann Radiol*, v. 28, p. 128-129, 1985.

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

NORDENSTRÖM, B.E. Electrochemical treatment of cancer. I: Variable response to anodic and cathodic fields. *Am J of Clin Oncol*, v. 12(6), p. 530-536, 1989.

QUINTANAR-GUERRERO, D. ; ALLEMANN, E. ; FESSI, H. *et al.* Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticle from performed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

PERCHELLET, E.M. ; WANG, Y. ; WEBER, R.L. *et al.* Synthetic 1,4-anthracenedione analogs induce cytochrome c release, caspase-9, -3, and -8 activities, poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage and internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells by a mechanism which involves caspase-2 activation but not Fas signaling. *Biochem Pharmacol*, v. 67, p. 523–537, 2004.

PITT, C. G. ; GRATZL, M.M. ; KIMMEL, G.L. *et al.* Aliphatic polyester. 2. The degradation of poly(D-L-lactide), poly(ϵ -caprolactone) their copolymers *in vivo*. *Biomaterials*, v. 2, p. 215-220, 1981.

PUGLISI, M. ; DOLLY, S. ; FARIA, A. *et al.* Treatment options for small cell lung cancer – do we have more choice? *Br J Cancer*, v. 102, p. 629 – 638, 2010.

RAMIREZ, L.H. ; ORLOWSKI, S. ; AN, D. *et al.* Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. *Br J Cancer*, v. 77(12), p. 2104-2111, 1998.

RICCI, E. J.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p.187-195, 2006.

ROBASZKIEWICZ, A. ; BARTOSZ, G. SOSZYNSKI, M. N-Chloroamino acids mediate the action of hypochlorite o A549 lung cancer cell in culture. *Toxicology*, v. 270, p. 112-120, 2010.

ROSA, D. S. *et al.* Evaluation of PHB, PHB-V and PCL biodegradation in composted soil. *Polímeros*, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

SAMUELSSON, L. ; JÖNSSON, L. ; STAHL, E. Percutaneous treatment of pulmonary tumors by electrolysis. *Radiologe*, v. 23(6), p. 284–287, 1983.

SCHAUBLE, M.K. ; HABAL, M.B. ; GULLICK, H.D. Inhibition of experimental tumor growth in hamsters by small direct currents. *Arch Pathol Lab Med*, v. 101, p. 294-297, 1977.

SERSA, G. ; MIKLAVCIC, D. Electrochemotherapy of tumours. *J. Vis. Exp.* v. 22, p.1038, 2008.

SHAY, J.W. & WRIGHT, W.E. Senescence and immortalization: role of telomers and telomerase. *Carcinogenesis*, v. 26(5), p. 867-874, 2005.

STRASSER, E.M. ; STÄTNER, S. ; KARNER, J. *et al.* Neuromuscular electrical stimulation reduces skeletal muscle protein degradation and stimulates insulin like growth factors in an age and current-dependent manner: a randomized, controlled clinical trial in major abdominal surgical patients. *Ann Surg*, v. 249(5), p. 738-43, 2009.

SOPPIMATH, K. S. ; AMINABHAVI, T.M. ; KULKARNI, A.R. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. *J. Control. Rel.*, v. 70, p. 1-20, 2001.

TAYLOR, T.V. ; ENGLER, P. ; PULLAN, B.R. *et al.* Ablation of neoplasia by direct current. *Br J Cancer*, v. 70, p. 342-345, 1994.

TELLÓ, M.. O uso da corrente elétrica no tratamento do câncer. Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, cap. 1 e 4, 2004.

THOMA, K.; SCHLUTERMANN, B. Biodegradierbare polymer all retardierungsprinzip fur arzneistoffe. *Pharmazie*, v. 46, p. 821-830, 1991.

VEIGA, V.F. Estudo dos Efeitos de Corrente Elétrica de Baixa Intensidade em Mastócitos Tumorais (Células P815). *Dissertação Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBBCF)*, UFRJ, 1995.

VEIGA, V.F. ; HOLLANDINO, C. ; RODRIGUES, M.L. *et al.* Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an in vitro analysis. *Bioelectromagnetics*, v. 21(8), p. 597-607, 2000.

VEIGA, V.F. ; NIMRICHTER, L. ; TEIXEIRA, C.A.A. *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, v. 42(1), p. 61-74, 2005.

VENIER-JULIENNE, M. C.; BENOIT, J. P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticle as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.*, v. 71, p. 121-128, 1996.

VON EULER, H. ; SÖDERSTAEDT, A. ; THÖRNE, A. *et al.* 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, p. 163-170, 2002.

VON EULER, H. ; STRÄHLE, K. ; THÖRNE, A. *et al.* Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). *Bioelectrochemistry*, v. 62, p. 57-65, 2004.

XIN, Y. ; LIU, D. Electrostatic therapy (EST) of lung cancer and pulmonary metastasis : report of 15 cases. *Eur. J. Surg. Suppl.* v. 574, p. 91-92, 1994

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

WANG, Y. ; YANG, H. ; LIU, H. *et al.* Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *Biomed Central Cancer*, v. 9, p. 174-186, 2009.

WANG, Z.B. ; LIU, Y.Q. ; CUI, Y.F. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Intern*, v. 29, p. 489-496, 2005.

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

WARTENBERG, M. ; WIRTZ, N. ; GROB, A. *et al.* Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*, v. 29, n. 1, p. 47-54, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Fact Sheet number 310: The Top Ten Causes of Death - November 2008. (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310_2008.pdf); visitado em 28/06/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Fact Sheet number 297: Cancer – February 2009 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>); visitado em 28/06/2009.

ZHAO, M. Electrical fields in wound healing – An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol*, v. 20(6), p. 674-682, 2009.