

CESAR AUGUSTO ANTUNES TEIXEIRA

**Mecanismos de Ação Antitumoral da Corrente Elétrica Contínua: Um Estudo *in vitro*
em Adenocarcinoma Pulmonar**

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Marcos Morales

Rio de Janeiro

2013

CESAR AUGUSTO ANTUNES TEIXEIRA

**Mecanismos de Ação Antitumoral da Corrente Elétrica Contínua: Um Estudo *in vitro*
em Adenocarcinoma Pulmonar**

Tese de doutorado 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 Doutor 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^ª. Dr^ª. Lucimar Ferreira Kneipp
Fundação Oswaldo Cruz

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

Prof^ª. Dr^ª Magdalena Rennó
Faculdade de Farmácia – UFRJ Campus
Macaé

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

Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues
Instituto de Microbiologia
Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Aos meus pais, José Augusto e Aricélia

Aos meus avós, Almyr e Gitta

À minha mulher, Lizanne

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**, minha orientadora, amiga e “mãe científica”, que sempre acreditou em mim e neste trabalho, dividindo conquistas e responsabilidades, o foi e continua sendo parte essencial de minha formação e de meu caminho na Universidade. Agradeço em nome da boa e velha amizade e confiança que temos!

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 **Aricélia** e **José Augusto**, pela base em mim construída, pelo carinho e amor incondicional de sempre, pela confiança e estímulo desde o ventre. Que eu possa devolver a vocês e ao mundo o tanto que recebi de bom.

À minha esposa, **Lizanne**, pela compreensão incansável, o amor sublime e completo, pela amizade e companheirismo digno de almas unidas por forças difíceis de explicar. Obrigado por tudo o que foi, o que é e o que há de ser.

Aos meus irmãos, **José Paulo** e **Gustavo**, pelo amor além dos laços de sangue, pelos momentos leves e fortalecedores quando estamos juntos. Que sigamos fortes e juntos sempre.

Aos meus avós, **Almyr** e **Gitta**, pelo amor e energias enviadas a mim sempre, mesmo no pior dos momentos de suas estradas. Amo-lhes sempre e muito.

Aos irmãos **Eliezer**, **Felipe** e **Thiago**, pela amizade além do tempo e da distância, pela confiança mútua e momentos de apoio e celebração. Obrigado por serem dos que ficam, dentre tantos que se vão.

Ao compositor **Johann Sebastian Bach** e aos grupos **Ozric Tentacles** e **Mastodon**, por proverem música inspiradora, verdadeiros catalisadores da minha concentração e da imersão no mundo das idéias durante a redação deste trabalho.

À toda a equipe do nosso Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas: **Fortune Homsani**, pelo extraordinário senso de amizade e coletividade; **Gleyce Moreno**, pela presteza e ajuda incansável; **Camila Siqueira**, pela amizade e

apoio em nossas estradas paralelas; **Felipe Alves**, pelo entusiasmo rejuvenescedor e parceria firme; **Venício Veiga**, pela amizade e a habilidade em capturar o íntimo microscópico da natureza; **Thaís Menezes**, pela ajuda, dedicação e trabalho sério.

Ao Prof. Dr. **Antonio Galina** e **Douglas Messeder**, pela orientação, ajuda e disponibilização da estrutura do Laboratório de Fisiologia Mitochondrial para a realização dos experimentos de respirometria de alta resolução.

Ao Prof. Dr. **Kildare Miranda** e **Wendell Dias**, pela ajuda e orientação na análise dos corpos lipídicos.

Ao Prof. Dr. **André Luis Souza dos Santos** e Prof. Dra **Patrícia Zancan**, por comporem minha banca de acompanhamento e de avaliação, contribuindo com importante aconselhamento.

Aos Profs. **Celuta Alviano**, **Lucimar Kneipp**, **Magdalena Rennó**, e **Márcio Rodrigues**, 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 **FAPERJ**, pela bolsa de estudos.

*“Crescimento em nome do crescimento
é a filosofia da célula tumoral.”*

Edward Abbey

RESUMO

TEIXEIRA, Cesar Augusto Antunes. **Mecanismos de Ação Antitumoral de Correntes Elétricas Contínuas: Um Estudo *in vitro* em adenocarcinoma pulmonar.** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

A Eletroterapia Tumoral (ETT) consiste no tratamento de tumores sólidos com correntes elétricas contínuas de baixa intensidade (CE), uma abordagem terapêutica com inúmeros registros de sucesso clínico em todo o mundo. No entanto, esta técnica ainda carece de caracterização dos seus mecanismos bioquímicos e moleculares. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do tratamento com CE em aspectos bioquímicos e morfológicos da linhagem de células humanas de câncer de pulmão A549. As células foram tratadas utilizando-se um modelo *in vitro* que permite o tratamento de células com o fluxo anódico (FA) produzido pela CE. Para avaliar os danos agudos e tardios causados pelo FA, as células foram analisadas imediatamente e após tempos progressivos de tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelos métodos do MTT e de exclusão por azul de tripan. A apoptose foi investigada pela determinação da atividade enzimática de caspase-3 e a dissipação do potencial transmembrana mitocondrial, utilizando ensaio colorimétrico e citometria de fluxo com rodamina-123, respectivamente. A morfologia celular foi estudada por microscopia ótica e eletrônica de transmissão, e os corpos lipídicos foram analisados por morfometria e microanálise por raios X dos cortes ultrafinos. A função respiratória mitocondrial foi estudada por respirometria de alta resolução. Imediatamente após o tratamento com FA, a viabilidade celular sofreu redução proporcional à dose aplicada. Adicionalmente, uma queda significativa da viabilidade celular foi observada entre 18 e 24 h após o tratamento, o que foi acompanhado de um aumento tanto na atividade de caspase-3 quanto no número de células com potencial transmembrana reduzido. Imediatamente após o tratamento, a respirometria e a microscopia eletrônica revelaram marcantes perdas funcionais e danos ultraestruturais nas mitocôndrias. Em contraste, 24 h após o tratamento, as células apresentaram capacidade respiratória aumentada e um aumento expressivo do consumo não-mitocondrial de oxigênio, apesar de uma ultraestrutura mitocondrial preservada. Além disso, estas células

apresentaram um número aumentado de corpos lipídicos, ricos em lipídios insaturados, que podem estar relacionados com uma maior biossíntese e/ou armazenamento de ácidos graxos ou eicosanoides. Nossos dados mostram que o FA produz marcantes efeitos tardios, independentemente do contato contínuo com a CE ou seus produtos de eletrólise, que incluem apoptose envolvida com caspase-3, alterações no metabolismo celular de oxigênio e conteúdo de lipídios. Estes mecanismos são aqui descritos na linhagem A549 pela primeira vez, e estão possivelmente envolvidos com os efeitos antitumorais da ETT.

Palavras Chave: Eletroterapia Tumoral, Câncer de Pulmão, Corrente Elétrica Contínua, Mitocôndria, Apoptose, Fosforilação Oxidativa, Corpos Lipídicos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Cesar Augusto Antunes. **Mechanisms of Antitumoral Effects of Direct Electric Current: An *in vitro* study in Lung Adenocarcinoma.** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Electrochemical Therapy (ETT) consists of treatment of solid tumors with low-intensity direct electric currents (CE), a therapeutic approach with several successful clinical reports worldwide. However, this technique lacks characterization of its molecular and biochemical mechanisms of action. The aim of the present work was to study the effects of CE treatment on biochemical and morphological features of the A549 human lung cancer cell line. A549 cells were treated using an *in vitro* model that allows the treatment of cells with the anodic flow (FA) generated by CE. In order to verify the acute and late FA damage, the cells were analyzed immediately and after progressive times of post-treatment. Cell viability was assessed by MTT and trypan blue dye exclusion methods. Apoptosis was investigated by caspase-3 activity and mitochondrial transmembrane potential dissipation using a colorimetric assay and flow cytometry with rhodamine-123, respectively. Cell morphology was analyzed by optical and transmission electron microscopy and lipid droplets were studied by morphometric analysis and X-ray qualitative elemental microanalysis of the thin sections. Mitochondrial respiratory function was studied by cellular oxygen consumption determination using high resolution respirometry. A549 cell viability decreased immediately after treatment in a dose-dependent manner. Additionally, a significant drop in cell viability was observed between 18 and 24 h after treatment, which was accompanied by an increase in both caspase-3 activity and number of cells with reduced mitochondrial transmembrane potential. Immediately after treatment, high-resolution respirometry and transmission electron microscopy revealed marked functional impairment and ultrastructural damage of cellular mitochondria. Conversely, 24 h after treatment, the cells presented enhanced respiratory capacity and significantly increased non-mitochondrial oxygen consumption, despite a well-preserved mitochondrial ultrastructure. In addition, these cells presented an increased number of lipid bodies, rich in unsaturated lipids, which can be related to an augment

of fatty acids or eicosanoid storage 24 h after CE treatment. Our data show that AF produces remarkable late effects, independent from continuous contact with CE or its electrolysis products, including caspase-3-related apoptosis, alterations in cellular oxygen metabolism and lipid content. These mechanisms are described here in A549 lung cancer cells for the first time and are possibly involved with antitumoral effects of ETT.

Keywords: Electrochemical Therapy, A549 Human Lung Cancer, Direct Electric Current, Mitochondria, Apoptosis, Oxidative Phosphorylation, Lipid Bodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As seis características essenciais do câncer.	25
Figura 2: As quatro novas características essenciais do câncer.	30
Figura 3: Representação esquemática dos principais elementos estruturais de uma mitocôndria.	33
Figura 4: Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa.	35
Figura 5: Exemplos de inserção de eletrodos para ETT.	45
Figura 6: Sistema experimental para tratamento de células de cultura com corrente elétrica contínua.	58
Figura 7: Representação esquemática da reação de redução do MTT.	62
Figura 8: Estrutura do Azul de Tripán.	62
Figura 9: Viabilidade de células A549 imediatamente após doses crescentes de FA de CE pelo método do MTT.	70
Figura 10: Quantificação pelo azul de tripan da viabilidade de células A549 após exposição a doses crescentes de FA.	71
Figura 11: Viabilidade de células A549 após 1,2 C e 2,88 C de FA de CE na presença de concentrações crescentes de glutathiona reduzida (GSH).	72
Figura 12: Viabilidade de células A549 em tempos posteriores ao tratamento com 1,20 C de FA de CE.	73
Figura 13: Atividade enzimática de caspase-3 por método espectrofotométrico.	74
Figura 14: Análise de $\Delta\Psi_m$ de células A549 por citometria de fluxo em diferentes tempos após tratamento com 1,20 C de FA.	76
Figura 15: Micrografias de contraste de fase de células A549.	77
Figura 16: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de cortes ultrafinos de células A549.	79
Figura 17: Quantificação de corpos lipídicos por morfometria de cortes ultrafinos de MET.	80

Figura 18: Análise elemental por raios X da composição de corpos lipídicos de células A549.	81
Figura 19: Parâmetros respiratórios das células A549 determinados por respirometria de alta resolução.	82
Figura 20: Representação esquemática dos mecanismos de ação da ETT elucidados no presente trabalho e suas perspectivas.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema das doses resultantes dos tempos de tratamento utilizados.	60
Tabela 2: Componentes do consumo de oxigênio basal (R_{RO}) de células A549.	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- ADP – Adenosina Difosfato
- ANT – Adenina-Nucleotídeo Translocase
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BAK – BCL-2 homologous antagonist/killer*
- BAX – BCL-2-associated X protein*
- BCL-2 – B-cell lymphoma protein-2
- CE – Corrente Elétrica
- CYPD – Ciclofilina D
- CytC – Citocromo C
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EIM – Espaço Intermembranar Mitocondrial
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- ETT – Eletroterapia Tumoral
- FA – Fluxo Anódico
- FADD - Fas-Associated protein with Death Domain
- FC – Fluxo Catódico
- FCCP – Carbonil cianeto de 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
- FEI – Fluxo Eletroiônico
- GSH – Glutaciona Reduzida
- HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico
- MCP – Morte Celular Programada
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MTT - brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- NADH - Nicotinamida Adenina dinucleotídeo
- NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- OXPHOS – Fosforilação Oxidativa
- PBS - Phosphate Buffered Saline
- PMEM – Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial

PTPC – Permeability Transition Pore Complex

Rho123 – Rodamina 123

SFB – Soro Fetal Bovino

STEMP - Sistema de Transporte de Elétrons da Membrana Plasmática

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPM – Transição de Permeabilidade de Membrana

Uq – Ubiquinona

Uql – Ubiquinol

VDAC – Canal Aniônico Dependente de Voltagem

$\Delta\Psi_m$ – Potencial Transmembranar

SUMÁRIO

1 – Introdução	16
2 – Base Teórica	20
2.1 – O Câncer	20
2.1.1 – O Câncer de Pulmão	22
2.1.2 – As Características Essenciais de uma Célula Tumoral	23
2.2 – A Mitocôndria: Metabolismo e Morte Celular	32
2.2.1 – A Mitocôndria e a Respiração Celular	33
2.2.2 – A Mitocôndria e sua Relação com a Apoptose	37
2.3 – A Eletroterapia Tumoral	42
3 – Objetivo Geral	54
3.1 – Objetivos Específicos	54
4 – Materiais e Métodos	55
4.1 – Equipamentos	55
4.2 – Cultura de Células	56
4.3 – O Sistema Experimental de Tratamento com CE	57
4.4 - Tratamento das Células com Corrente Elétrica	59
4.4.1 – Teste de Citotoxicidade Causada por EROs	60
4.5 - Estudos de Viabilidade Celular	61
4.5.1 - Método do MTT	61
4.5.2 – Método de Exclusão do Azul de Tripán	62
4.5.3 – Avaliação do Potencial de Liberação de Células Viáveis pela CE	63
4.6 - Determinação da Atividade Enzimática de Caspase-3	63
4.7 - Análises Morfológicas	64
4.7.1 - Microscopia Ótica de Contraste de Fase	64
4.7.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	65
4.7.3 - Morfometria de Corpos Lipídicos	65
4.7.4 - Microanálise Elementar por Raios X dos Corpos Lipídicos	66
4.8 – Estudo da Função Respiratória: Spirometria de Alta Resolução	67
4.9 – Estudo do Potencial Transmembrana Mitocondrial: Citometria de Fluxo	68
5 – RESULTADOS	70
5.1 - Viabilidade Celular	70

5.1.1 - Curva de Resposta Dependente da Dose	70
5.1.2 - Participação de Espécies Reativas de Oxigênio no Dano Causado pelo FA	71
5.1.3 - Curva de Resposta Tardia ao Tratamento Elétrico	72
5.2 - Atividade Enzimática de Caspase-3	74
5.3 - Estudo do Potencial Transmembranar por Citometria de Fluxo	75
5.4 - Estudos Morfológicos	76
5.4.1 - Microscopia Ótica	76
5.4.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão e Morfometria	78
5.4.3 - Microanálise Elementar por Raios-X dos Corpos Lipídicos	80
5.5 - Consumo Celular de Oxigênio	81
6 – Discussão	83
7 – Conclusão	96
8 – Perspectivas	97
9 – Referências	99
ANEXO – Artigos Publicados no Período	114

1 - INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios no tratamento do câncer é encontrar formas de destruir as células tumorais provocando o mínimo de efeitos deletérios sobre os tecidos saudáveis. As terapias convencionais carecem de seletividade para as células neoplásicas e produzem uma série de efeitos indesejados, resultando em eficácia reduzida e efeitos adversos perigosos para o paciente. O desenvolvimento de abordagens terapêuticas complementares que tragam maior segurança e eficácia ao tratamento do câncer é importante para agregar opções ao atual arsenal terapêutico.

A Eletroterapia Tumoral (ETT) é uma técnica desenvolvida no início dos anos 80 que consiste na aplicação de uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade (CE) em tumores sólidos através da inserção de eletrodos conectados a uma fonte de corrente (NORDENSTRÖM, 1983, 1985). Resultados bastante promissores da ETT têm sido demonstrados, dentre os quais se incluem a regressão significativa de tumores, a melhoria de sobrevida e até mesmo a cura após estimulação elétrica das lesões. Uma das grandes vantagens da ETT reside em sua possibilidade de aplicação localizada, que restringe substancialmente seus efeitos citotóxicos à região tumoral, minimizando o sofrimento do tecido saudável, o que configura a ETT como uma terapia antitumoral altamente segura quando comparada à cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Além disso, o brando perfil de efeitos adversos, somado ainda ao baixo custo da estrutura e equipamentos necessários para a prática da ETT, torna esta terapia bastante atraente como opção terapêutica complementar do câncer.

À primeira vista, pode-se imaginar que um tecido vivo, quando submetido a um agente físico como a corrente elétrica, sofrerá danos imediatos e destruição desorganizada, derivados daquela agressão instantânea. Por sua vez, as células que resistissem a este primeiro desafio poderiam retomar o crescimento do tumor após certo tempo e a doença continuaria evoluindo após o tratamento. No entanto, o intrigante e promissor em relação à ETT é dado pelo fato de que, por um determinado mecanismo, os tumores simplesmente param de se desenvolver e até regredem, mesmo meses após uma única sessão de tratamento (XIN et al., 1997). Além disso, um dos paradigmas da ETT é o uso de correntes de baixa intensidade, da ordem de miliamperes, o que não é suficiente (nem desejável) para promover áreas muito extensas de necrose tumoral. Isto sugere que o efeito antitumoral da CE vai além da simples destruição imediata do tumor durante a sessão de ETT, passando por mecanismos biológicos deflagrados ao longo do tempo após o tratamento, que parecem não depender do contato contínuo com a CE.

O arranjo adequado dos eletrodos e a intensidade da CE aplicada permitem restringir o efeito antitumoral à área do tumor, reduzindo muito os efeitos sobre os tecidos saudáveis. Além disso, a ETT é uma técnica com uma série de outras vantagens intrínsecas, como o baixo custo e o brando perfil de efeitos adversos.

Além de ter efeito antitumoral por si, a ETT pode ser empregada em associação às terapias convencionais, potencializando a eficácia destas. O exemplo mais estudado é o uso da CE associada a quimioterápicos, na técnica conhecida como eletroquimioterapia (MIR et al., 1998; MARTY et al., 2006; SERSA et al., 2008).

Apesar de extensos relatos de sucesso terapêutico, a ETT carece de caracterização de seus exatos mecanismos de ação. Isso ajuda a gerar heterogeneidade nos protocolos clínicos de aplicação da terapia, onde os especialistas acabam por determinar os parâmetros terapêuticos (intensidade de corrente, tempos de tratamento, número, polaridade e posicionamento de eletrodos, etc.) com base no empirismo. A variabilidade dos protocolos de uso dificulta tanto a elaboração de protocolos reprodutíveis da ETT quanto a garantia de obtenção de resultados positivos. Assim, a compreensão das bases celulares e bioquímicas envolvidas com a atividade antitumoral das correntes elétricas contínuas é mandatória para a otimização do uso e consolidação desta terapia antitumoral (NILSSON et al., 2000).

Inúmeros estudos *in vitro* realizados por nosso grupo acrescentaram conhecimento acerca destes mecanismos de ação. O sistema experimental desenvolvido por Veiga e colaboradores permitiu revelar que o tipo de dano celular é diferente de acordo com a polaridade do eletrodo na vizinhança das células tratadas (HOLANDINO et al., 2000, 2001; VEIGA et al., 2000, 2005). As células próximas ao eletrodo negativo, denominado fluxo catódico (FC), morrem por necrose, com extensa lise celular. Já as células próximas do eletrodo positivo, referido como fluxo anódico (FA), além da necrose, apresentam também características de morte celular por apoptose (VEIGA et al., 2005), o principal tipo de morte celular programada. A supressão dos mecanismos pró-apoptóticos em células tumorais é um dos fatores que garantem o desenvolvimento dos tumores (FULDA 2009; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Sendo a ETT capaz de provocar a apoptose em células tumorais, este poderia ser um importante mecanismo responsável pelo efeito prolongado da ETT observado em estudos *in vivo*. Isto também posiciona o FA como componente vital para o sucesso

terapêutico da ETT. No entanto, os mecanismos exatos da deflagração de apoptose pelo FA ainda não são conhecidos e necessitam de caracterização.

O perfil metabólico peculiar das células tumorais vem atraindo as atenções de inúmeros grupos de pesquisa ao redor mundo, como um possível alvo terapêutico. A maior parte da energia obtida por inúmeros tipos de tumores vem do metabolismo glicolítico anaeróbico, mesmo na disponibilidade abundante de oxigênio. Esta preferência pela glicólise em detrimento da respiração mitocondrial em condições de aerobiose ganha o nome de efeito Warburg (WARBURG et al., 1924). A reversão deste fenótipo poderia levar as células tumorais à morte (BELLANCE et al., 2009). Um estudo prévio descreveu a CE como inibidora da via glicolítica, através da redução da atividade de sua principal enzima reguladora, a fosfofrutocinase-1 (BRITO, 2009). Entretanto, este efeito metabólico precisa ser mais bem estudado para caracterizar sua participação nos mecanismos antitumorais da ETT.

A mitocôndria desempenha papel central nos destinos da célula, funcionando como uma verdadeira usina de energia eletroquímica, gerenciadora do stress oxidativo e controladora de mecanismos de morte celular (NELSON & COX, 2008). Desta forma, esta organela pode representar um importante ponto de ligação entre os efeitos da ETT observados nos estudos *in vitro*. De fato, um estudo anterior demonstrou alterações na ultraestrutura mitocondrial de células em cultura (VEIGA et al., 2000). No entanto, ainda resta caracterizar os efeitos da CE sobre a função das mitocôndrias de células após tratamento elétrico.

No presente estudo, foram caracterizados importantes efeitos da CE sobre células de adenocarcinoma pulmonar da linhagem A549, nunca antes estudadas neste

modelo. Este trabalho ampliou os conhecimentos acerca dos mecanismos da ETT especialmente no que tange à indução de apoptose e aos efeitos sobre a função mitocondrial.

2 – BASE TEÓRICA

2.1 - O CÂNCER

Em organismos multicelulares, o funcionamento adequado de um órgão ou tecido é dependente de uma harmonia de comportamento biológico entre as células que os compõem. Essa harmonia baseia-se em sensíveis e intrincados sistemas bioquímicos de sinalização e regulação constante destas células, que as mantêm desempenhando suas funções específicas. Pode-se fazer a analogia do funcionamento destes sistemas ao de uma microssociedade, onde os indivíduos vivem sob códigos de conduta bem determinados, que visam à manutenção de uma coletividade. Eventualmente, algumas destas células podem sofrer mutações em genes relacionados à resposta a estes controles, sejam eles internos, na própria célula, ou externos, de comunicação entre elas. Isso pode resultar em comportamentos aberrantes, como a perda de sua funcionalidade original no tecido, morfologia incompatível, proliferação desenfreada, metabolismo acelerado, dentre outros. A presença e o desenvolvimento destas células anormais no tecido geram uma competição por espaço e nutrientes com as células normais, o que pode comprometer progressivamente o funcionamento do órgão ou tecido, colocando em risco a vida do organismo como um todo (ALBERTS et al., 2008).

Câncer é o nome que se dá ao conjunto de doenças que têm em comum a presença de células que acumulam mutações em diversos genes relacionados a manutenção de suas características regulares, que acabam por levar a uma proliferação desordenada com invasão de tecidos e órgãos (INCA,2012). O nome “câncer” é creditado a Hipócrates (460-370 a.C.), médico grego que é considerado o “Pai da Medicina”. Na percepção de Hipócrates à época, o aspecto de um tumor em crescimento, com projeções alongadas infiltrando-se e fixando-se no interior dos tecidos como “garras”, lembrava a forma de um caranguejo (HAJDU, 2011). Ele então passou a se referir à doença com a palavra *carcinós*, caranguejo em grego. Mais tarde, o médico romano Celsus (28-50 d.C.) traduziu o termo para câncer, sua versão em latim. Galeno, médico romano considerado um dos pais da Farmácia, utilizou também a palavra grega *oncos*, que significa “inchaço”, em uma referência ao aspecto comum a vários tipos de tumores (ACS, 2012). A denominação de Galeno acabou por compor o nome atual da parte da medicina que estuda o câncer, a oncologia.

O câncer é uma das maiores causas de morte humana, respondendo por 7,6 milhões de óbitos anuais, o que equivale a cerca de 13 % das mortes no mundo segundo dados de 2008 da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2008). Além disso, é uma doença em franca expansão, segundo projeções da OMS para as próximas décadas, que falam num aumento em 45 % nas mortes anuais por câncer até 2030 (WHO, 2012). No entanto, a mesma OMS estima que 40 % dos cânceres poderiam ser evitados com políticas de prevenção, que incluem simples adaptações no estilo de vida, como abandono do hábito de fumar, combate ao sedentarismo e ao sobrepeso, redução no consumo de álcool, dentre outros (WHO, 2012).

2.1.1 – O CÂNCER DE PULMÃO:

O tipo de câncer que mais mata no mundo é o de pulmão e de vias aéreas, 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 (WHO, 2008). 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, FORD & SAMET, 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., 2012), o que se deve, em parte, à ausência de ferramentas de diagnóstico precoce (HIRSCH, MERRICK & FRANKLIN, 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 99% e 90% de sobrevida dos tumores de próstata e mama, respectivamente (JEMAL et al., 2012). Em contrapartida, cerca de 76% dos pacientes de câncer de pulmão são diagnosticados em estágios avançados da doença, contra 15% do câncer de próstata, por exemplo, o que denota uma forte relação entre a dificuldade de diagnóstico precoce e a mortalidade da doença (HIRSCH, MERRICK & FRANKLIN, 2002; JEMAL *et al.*, 2012). 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.

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, 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).

2.1.2 – AS CARACTERÍSTICAS ESSENCIAIS DE UMA CÉLULA TUMORAL

Como discutido anteriormente, as células tumorais ou neoplásicas são células que adquiriram capacidade de sobrevivência e proliferação independentes e indiscriminadas, devido ao acúmulo de mutações em múltiplos genes responsáveis pela regulação de funções básicas da célula. Estes genes são classificados de acordo com sua função em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são codificadores de proteínas relacionadas a funções como proliferação e resistência à morte celular que, quando ativadas em excesso, contribuirão para o perfil

de agressividade tumoral. Em contrapartida, os supressores de tumor estão relacionados à regulação e controle destas funções, de forma que seu silenciamento contribuirá para o desenvolvimento da malignidade. Desta forma, a manutenção do comportamento biológico normal de uma célula é o fino equilíbrio entre as atividades destes dois tipos de genes. O fenótipo tumoral é composto por uma combinação da ativação de proto-oncogenes e silenciamento de genes supressores de tumor, em várias instâncias bioquímicas da célula (ALBERTS et al., 2008).

Apesar de serem inúmeros os genes envolvidos, a transformação de células normais em tumores parece seguir um pequeno número princípios gerais, onde estes genes estão diretamente ou indiretamente envolvidos. Hanahan e Weinberg, em uma completa e bem estruturada revisão da literatura no ano 2000, delinearam seis características essenciais adquiridas que definem uma célula como tumoral (Figura 1). Essas características se aplicam à grande maioria, senão à totalidade, dos tipos de câncer, variando apenas a ordem dos eventos e os mecanismos pelos quais elas podem se estabelecer.

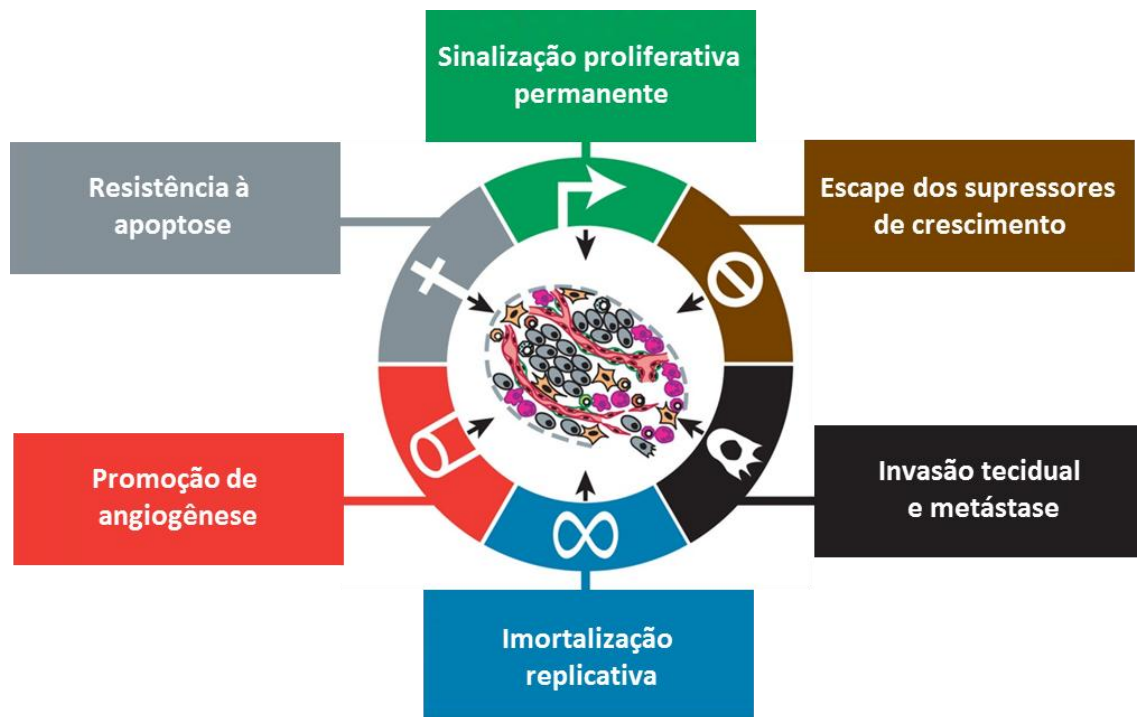


Figura 1: As seis características essenciais do câncer. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

- *Sinalização proliferativa permanente*: a proliferação ou mesmo o tamanho de células em um tecido é regido pela comunicação química entre as células que o compõe. Isso pode se dar por três tipos de moléculas: fatores de crescimento solúveis liberados de forma local e transitória no microambiente; componentes da matriz extracelular ou moléculas de interação célula-célula presentes em suas membranas. As células respondem a estes sinais através de receptores específicos, que deflagram um sinal intracelular ativando vias bioquímicas mitogênicas. As células tumorais adquirem independência desta sinalização externa através da ativação de proto-oncogenes que de alguma forma mantêm este sinal de forma contínua. Dentre os mecanismos já descritos destacam-se: a produção própria de fatores de crescimento, como tumores de pulmão produtores de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (MAREK et al., 2009), obtendo assim sinalização autócrina contínua; a expressão de

receptores anômalos, continuamente ativados independentemente da interação com fator de crescimento, com os inúmeros tipos de câncer que expressam receptores para fator de crescimento epidermal (EGFR) mutantes (DONEV et al., 2011); a expressão de enzimas permanentemente ativas das vias mitogênicas, que produzem proliferação independentemente do receptor, tendo como exemplo mutações na PI3-Kinase em alguns tipos tumorais (JIANG & LIU, 2009).

- *Escape da sinalização anti-proliferativa*: da mesma forma que a proliferação celular é estimulada por sinais externos, o equilíbrio do controle de crescimento celular no microambiente tecidual é estabelecido também por sinais inibidores de crescimento. As células tumorais desenvolvem resistência a estes sinais repressores, através do silenciamento de genes supressores de tumor relacionados à resposta a esses fatores. Um exemplo clássico é a proteína RB, associada ao retinoblastoma, que governa uma via de sinalização que integra a resposta a sinais intra e extracelulares, bloqueando ou liberando a progressão do ciclo celular. Células tumorais com anormalidades nesta proteína ficam sob constante sinalização pró-proliferativa (HANAHAN & WEINBERG, 2000; 2011). A p53, uma das mais importantes proteínas supressoras de tumor conhecidas, desempenha inúmeras funções na inibição do desenvolvimento tumoral. A p53 recebe sinal de sensores celulares e arquiteteta respostas a stress intracelular, dano excessivo ao DNA ou outras anormalidades. Dentre estas respostas, ela bloqueia o ingresso desta célula em crise na fase proliferativa do ciclo celular (GREEN & KROEMER, 2009). Mutações que levam à perda de função ou deleção de seu gene codificador TP53 promovem fortemente o fenótipo tumoral e são encontradas em aproximadamente metade dos tumores malignos conhecidos (GREEN & KROEMER, 2009). A p53 também tem papel regulador em outras

instâncias essenciais ao desenvolvimento tumoral, como a apoptose e o metabolismo energético, a serem discutidos a seguir.

- *Capacidade proliferativa ilimitada (imortalização)*: células normais apresentam um número limitado de divisões celulares. Isso ocorre devido à incapacidade do maquinário de replicação do DNA em duplicar as extremidades finais do cromossomos, de forma que uma parte do DNA é perdida a cada divisão celular. No entanto, nestas porções terminais encontram-se grandes regiões não-codificantes, repetições de hexanucleotídeos, chamadas telômeros. Estas regiões vão sendo perdidas a cada divisão, sem prejuízo funcional para a célula e protegendo assim o material codificante. Com o passar das gerações, os telômeros se esgotam e o DNA funcional começa a ser perdido, gerando instabilidade cromossômica e em última instância, morte celular. Este processo é denominado senescência e tem importante implicação nos processos de envelhecimento (BLASCO, 2005). A telomerase é uma DNA polimerase especializada em reconstruir estes telômeros. Ela é expressa em níveis produtivos em células de alta frequência replicativa, como as células embrionárias, mas praticamente ausente em células adultas não-imortalizadas. O frenético ritmo proliferativo das células tumorais em pleno desenvolvimento seria limitado pelo tamanho dos telômeros, que se esgotariam rapidamente. No entanto, a esmagadora maioria das células tumorais expressa níveis consideráveis de telomerase, possibilitando um número virtualmente ilimitado de divisões, processo denominado imortalização (SHAY & WRIGHT, 2005; HANAHAN & WEINBERG, 2000; 2011).

- *Promoção de angiogênese*: assim como os tecidos normais, os tumores precisam de um aporte de nutrientes adequado para manter seu crescimento, bem

como meios de escoamento de metabólitos tóxicos. Dessa forma, a ausência de vasculatura própria é um fator limitante para o desenvolvimento tumoral, quando este atinge um determinado tamanho. Células tumorais são capazes de sintetizar fatores de crescimento vascular, como por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que agem sobre os vasos próximos ao tumor fazendo-os produzir ramificações que passarão a irrigar o tumor em crescimento (HANAHAN & WEINBERG, 2000; 2011).

- *Capacidade de invadir e se instalar em outros tecidos (metástase)*: uma das últimas características adquiridas pelo tumor e um dos fatores que caracterizam alta malignidade tumoral é a capacidade de conduzir seu desenvolvimento para além do órgão/tecido primário onde surgiu. Para isso, as células precisam adquirir dois tipos de habilidades: a de se infiltrar no tecido onde se encontram até alcançar a corrente sanguínea ou linfática; a de se instalar e se adaptar a um novo microambiente, distante do tumor primário, no processo chamado de colonização. Para isso, a célula neoplásica passa a expressar de forma anômala proteínas que possibilitam a penetração na matriz extracelular, como enzimas da família das metaloproteinases de matriz (MMP) (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). Além disso, a redução na expressão de E-caderina, uma proteína de membrana responsável pela adesão da célula tumoral à matriz, que também age suprimindo a proliferação celular, confere mobilidade à célula e auxilia na capacidade de infiltração no tecido saudável (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Estas modificações são parte das características de um programa fenotípico denominado transição epitelial-mesenquimal, que ocorre fisiologicamente na fase de desenvolvimento embrionário, onde as células se encontram em constante migração e instalação em novos locais, dando origem aos órgãos e estruturas do corpo em desenvolvimento. Da mesma

forma, o processo inverso de transição mesenquimal-epitelial é a reversão deste fenótipo, onde a célula volta a expressar proteínas que permitirão sua instalação no novo local. Esta reversão fenotípica permite a expressão de proteínas de adesão específicas que serão decisivas para o desenvolvimento da nova micrometástase no processo de colonização, se tornando um novo foco tumoral (SCHEEL & WEINBERG, 2012). Em outras palavras, a célula tumoral utiliza-se patologicamente de programas celulares pré-existentes e passa a se comportar como uma célula embrionária irresponsiva a controles, com alto potencial de disseminação e agressividade, piorando muito o prognóstico dos pacientes.

- *Escape ou resistência à apoptose*: um dos mecanismos de controle fisiológico da disseminação de células com comportamento potencialmente prejudicial ao tecido é a indução da morte celular programada. A deflagração desta sinalização pode vir de sinais externos enviados por células adjacentes ou ainda de sensores internos da célula, sensíveis a situações de stress metabólico, dano no DNA provocado por proliferação intensa, etc. Ou seja, as mutações e alterações funcionais adquiridas pelas células tumorais seriam capazes de deflagrar a apoptose. No entanto, uma das mais importantes características das células tumorais é desenvolver mecanismos de escape através da superexpressão de proteínas anti-apopóticas (proto-oncogenes) ou supressão de proteínas pró-apoptóticas (genes supressores de tumor). Estes mecanismos serão discutidos mais adiante em especial.

Em 2011, os mesmos Hanahan e Weinberg realizaram uma nova revisão bibliográfica, adicionando o conhecimento produzido ao longo da última década sobre as características essenciais do câncer. Esta nova reflexão, levou ao posicionamento de

quatro outras características importantes para a tumorigênese e potencialmente comuns à grande maioria dos cânceres (Figura 2).

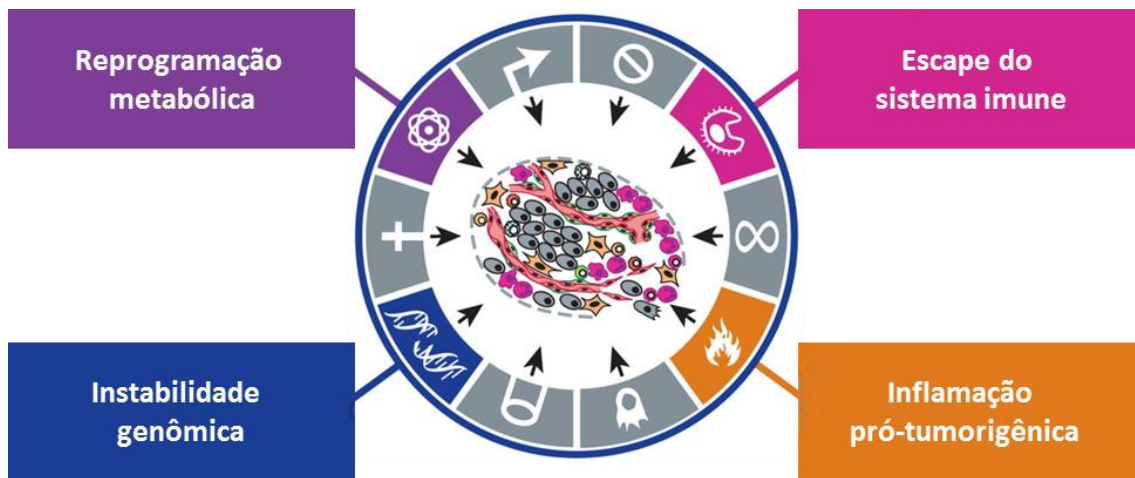


Figura 2: As quatro novas características essenciais do câncer. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

- *Instabilidade genômica:* ainda que possa ser provocada por agentes externos, a ocorrência de mutações é um fenômeno aleatório, que tem sua probabilidade reduzida fisiologicamente pela existência de inúmeros mecanismos de manutenção genômica. Dentre estes mecanismos encontram-se enzimas de detecção e reparo do DNA, bem como sistemas de interceptação de agentes mutagênicos, como os sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROS). A neutralização destes mecanismos cria um ambiente propício à ocorrência mais frequente de mutações, o que facilita a aquisição das outras características tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

- *Inflamação pró-tumorigênica e evasão da resposta imune:* a relação do câncer com o sistema imune é relativamente paradoxal, pois os efeitos podem ser opostos, dependendo do tipo de células e resposta envolvida. Na última década, muito se

descreveu sobre o papel da inflamação como pró-tumorigênica, especialmente a resposta do tipo inata. Os mecanismos pelos quais isso ocorre incluem a secreção de fatores de crescimento, a sinalização anti-apoptótica, a produção de EROs com ação mutagênica, dentre outros fatores, que podem auxiliar tanto o desenvolvimento inicial quanto a manutenção do crescimento inicial ou mesmo o potencial metastático dos tumores (GRIVENNIKOV, GRETEN & KARIN, 2010). Um exemplo ilustrativo é o da evolução do câncer de pulmão associado à inalação crônica ocupacional de material particulado de asbesto ou sílica, que não possuem potencial mutagênico direto. O desenvolvimento deste tipo de tumor é decisivamente catalisado pela inflamação crônica causada pela deposição destas partículas no pulmão (DOSTERT et al., 2010). Por outro lado, tumores possuem certo potencial imunogênico e sofrem controle estrito do sistema imune através de resposta adaptativa. Dentre possíveis mecanismos de escape, células tumorais podem secretar citocinas com função imunossupressora, que irão inibir funcionalmente células recrutadas para combatê-los (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Em última análise, os efeitos da inflamação pró-tumorigênica e da imunovigilância estão em equilíbrio, até o ponto onde a célula tumoral desenvolve mecanismos de escape e os efeitos potencializadores do desenvolvimento tumoral suplantam os efeitos repressores (GRIVENNIKOV, GRETEN & KARIN, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

- *Reprogramação metabólica*: as células tumorais apresentam um perfil metabólico único, descrito primariamente por Otto Warburg na primeira metade do século XX (WARBURG, 1956). Apesar da maior eficiência do metabolismo respiratório mitocondrial em comparação à glicólise na produção de energia, as células tumorais obtêm energia preferencialmente através da via glicolítica, mesmo na disponibilidade

abundante de oxigênio. Este fenômeno é referido como “glicólise aeróbica”, ou simplesmente efeito Warburg, em homenagem ao seu descobridor. Apesar de ter sido descrito há muito tempo, nas últimas décadas ele vem sendo caracterizado como parte essencial das adaptações necessárias a maioria dos cânceres, tendo em vista outras implicações não-energéticas desta readaptação metabólica, que influenciarão na manutenção de algumas das características essenciais do câncer já discutidas acima. Assim como a apoptose, a reprogramação metabólica será discutida em detalhes mais à frente.

Uma boa parte destes aspectos cruciais para a carcinogênese passa por aquela que é a organela centralizadora de importantes mecanismos de deflagração da morte celular, do maquinário respiratório de uso do oxigênio para produção de energia e gerenciadora do stress oxidativo celular: a mitocôndria.

2.2 - A MITOCÔNDRIA: METABOLISMO E MORTE CELULAR

As mitocôndrias possuem pelo menos duas características estruturais comuns de bactérias, o que suporta esta teoria de sua origem como um microorganismo independente (MARTIN & MÜLLER, 1998; BRINDENFALK et al., 2011), que são a presença de um DNA próprio e a existência de duas membranas em bicamada fosfolipídica, que são referidas como membrana interna e externa. A membrana interna possui a área muitas vezes maior que a externa, formando vilosidades no interior da organela, chamadas cristas mitocondriais. Assim, a superfície interna da mitocôndria é imensamente superior à externa, o que permite o abrigo de grande quantidade de proteínas voltadas para o espaço interior da organela, que é

denominado matriz mitocondrial (Figura 3). Entre estas membranas existe o chamado espaço intermembranar mitocondrial (EIM), que é o compartimento que torna possível a formação do gradiente eletroquímico usado para obtenção de energia pela cadeia respiratória e onde residem proteínas que irão deflagrar a morte celular em determinadas condições. Por isso, finas alterações de permeabilidade, integridade ou de conteúdo do EIM podem ser decisivas para o destino da célula.

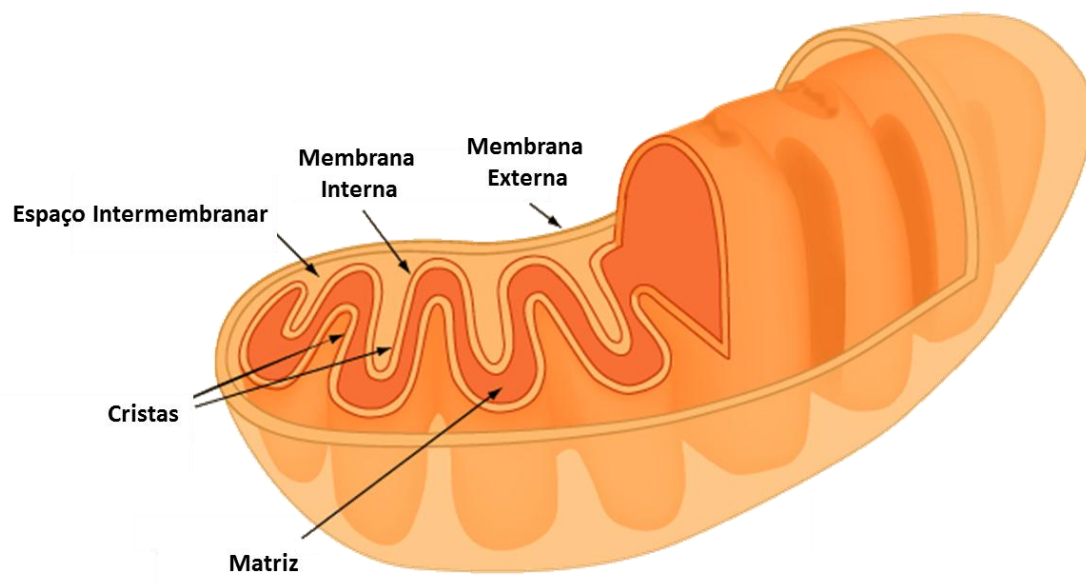


Figura 3: Representação esquemática dos principais elementos estruturais de uma mitocôndria. Adaptado de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/imgbio/mitoch.gif>.

2.2.1 – A MITOCÔNDRIA E A RESPIRAÇÃO CELULAR

Grande parte dos processos celulares de manutenção da vida depende de reações químicas que não são favoráveis termodinamicamente nas condições normais de sobrevivência dos organismos. Para ocorrerem em extensão biologicamente significativa, estas reações precisam estar acopladas a outras mais exergônicas, para que o saldo energético se torne favorável. A principal molécula doadora de energia

nestes processos é a adenosina trifosfato (ATP), cuja reação de perda de um dos grupamentos fosfato por hidrólise, gera como produto a adenosina difosfato (ADP), que fornece energia necessária para alavancar estas reações. Assim, a síntese de ATP a partir de nutrientes é um dos paradigmas da obtenção de energia para as células (NELSON & COX, 2008).

A produção de ATP pelas células baseia-se na oxidação de substratos como a glicose e os ácidos graxos, de forma que a energia resultante destas reações é canalizada para a fosforilação do ADP, formando o ATP. A fosforilação oxidativa (OXPHOS) é o mecanismo bioquímico pelo qual as células conseguem maximizar a obtenção da energia contida nos substratos carbônicos utilizados como nutrientes, oxidando-os até o limite. Para isso, a produção de ATP pela OXPHOS baseia-se no uso dos elétrons derivados da oxidação destes substratos para produzir um gradiente eletroquímico de prótons no EIM, cuja energia de dissipação é acoplada à fosforilação do ADP, sendo o oxigênio usado como acceptor final destes elétrons (NELSON & COX, 2008).

O maquinário da OXPHOS é composto por 5 complexos proteicos presentes na membrana mitocondrial interna (Figura 4). Quatro deles, que participam da cadeia de transporte de elétrons até o acceptor final, utilizam o potencial redutor destes elétrons para bombear prótons para o espaço intermembranar, produzindo o gradiente. Duas moléculas realizam o transporte destes elétrons entre os complexos da OXPHOS: a ubiquinona (Uq), molécula lipofílica que se encontra embebida na região apolar da membrana interna, e o citocromo C (CytC), proteína contendo heme que transita no EIM e interage com os complexos na membrana interna.

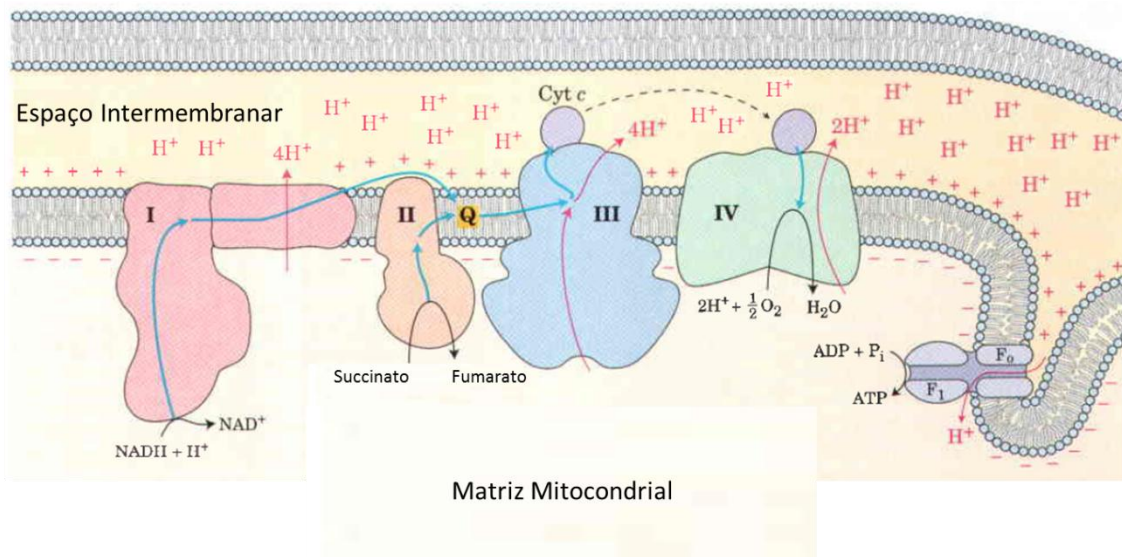


Figura 4: Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, mostrando cada um dos complexos envolvidos e o gradiente de prótons formado pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranar acoplado às reações de transferência de elétrons. I – NADH desidrogenase (Complexo I); II – Succinato desidrogenase (Complexo II); III – Complexo III; IV – Citocromo oxidase (Complexo IV); Q – Ubiquinona; Cyt C – citocromo C. Adaptado de Nelson & Cox, 2008.

O complexo IV, referido também como citocromo oxidase, transfere os elétrons do CytC para o aceptor final, o oxigênio, produzindo água (NELSON & COX, 2008, LENAZ & GENOVA, 2010). O gradiente eletroquímico mitocondrial possui dois componentes: o químico, que é a diferença de concentração de H^+ do EIM em relação à matriz mitocondrial, e o elétrico, que é o potencial transmembranar ($\Delta\Psi_m$) gerado por essa diferença. Juntos, estes elementos compõem a força-proto motriz (DE OLIVEIRA, AMOÊDO & RUMJANEK, 2012). O complexo V, adequadamente denominado ATP sintase, permite o fluxo de prótons do EIM de volta para a matriz, de forma que o fazendo com que esta estrutura gire. Este processo produz alterações conformacionais na proteína, que resultarão na catálise da reação de fosforilação do ADP. Desta forma, a força proto-motriz, que nada mais é do que a energia de dissipação do gradiente de

prótons formado no EIM pelo influxo destes prótons através da ATP sintase, é a responsável direta pela síntese de ATP (NELSON & COX, 2008, LENA Z & GENOVA, 2010).

Como discutido anteriormente, o metabolismo da célula tumoral é deslocado para a obtenção de ATP predominantemente pela glicólise ao invés da respiração celular, mesmo na disponibilidade de oxigênio. Este efeito é paradoxal à primeira vista, se considerarmos a maior eficiência energética do metabolismo respiratório. No entanto, muitas vantagens significativas desta adaptação metabólica vêm sendo descritas. Uma delas consiste na maior obtenção de intermediários da glicólise que podem ser desviados para vias anabólicas de obtenção de nucleotídeos e lipídios, o que é vital para células em intensa divisão (HSU & SABATINI, 2008). Este aspecto influencia diretamente na viabilização do perfil de proliferação sustentada das células tumorais.

Uma consequência direta da alta atividade respiratória mitocondrial é o eventual vazamento de elétrons dos sistemas de transferência dos complexos da OXPHOS. Como a oxidação completa do oxigênio até água necessita de quatro elétrons, a produção de espécies reativas de oxigênio pela OXPHOS ocorre quando espécies parcialmente reduzidas, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil ($OH\cdot$), são eventualmente liberados dos complexos antes da transferência de todos os elétrons necessários (NELSON & COX, 2008). Além disso, a redução parcial da Uq pode produzir uma espécie radicalar altamente reativa, que pode reagir com o oxigênio produzindo as EROs, como o superóxido (O_2^-) e o H_2O_2 . Os principais pontos de produção de EROs na OXPHOS são os complexos I e III (LENA Z & GENOVA, 2010).

Dessa forma, a redução da atividade mitocondrial no câncer previne o estresse oxidativo excessivo que seria produzido pela alta demanda energética das células tumorais, o que é mais uma vantagem do efeito Warburg para estas células (HSU & SABATINI, 2007). Este mecanismo também pode promover a resistência à apoptose mediada pelo acúmulo de EROs, contribuindo com a aquisição de mais uma das características essenciais de uma célula tumoral (SOLAINI, SGARBI & BARACCA, 2011).

Dessa forma, inúmeros estudos atuais vêm buscando formas de reverter este programa metabólico, redirecionando o metabolismo celular tumoral para a respiração mitocondrial, como uma forma de provocar morte seletiva das células tumorais (XIE et al., 2011; AYYANATHAN et al., 2012), inclusive em câncer de pulmão (SHI et al., 2010). Um dos mais relevantes destes estudos descreve o efeito do dicloroacetato, um inibidor da piruvato desidrogenase kinase, sobre a linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 (BONNET et al., 2007). Ao inibir esta enzima, o piruvato passa a ser mais convertido em acetil coenzima A, que é deslocado como substrato para a respiração mitocondrial, ativando assim a OXPHOS. Isso levou à reversão de características típicas do efeito Warburg, acompanhada de indução de apoptose e diminuição do crescimento dos tumores xenográficos obtidos a partir desta mesma linhagem celular, sem que efeitos adversos evidentes fossem observados nos animais tratados (BONNET et al., 2007).

2.2.2 – A MITOCÔNDRIA E SUA RELAÇÃO COM A APOPTOSE

Como já discutido, 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 pode ser conveniente para o bom funcionamento do organismo.

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 morte celular programada (MCP), marcada por características morfológicas específicas. É importante ressaltar que apoptose e MCP não devem ser tratados como sinônimos, pois atualmente conhecem-se várias outras modalidades de MCP, com vias de sinalização e contextos fisiológicos diferentes (KROEMER et al., 2009). A apoptose é a forma de MCP mais largamente estudada em seus mecanismos, assim como sua relação com o câncer.

Um dos aspectos da importância fisiológica da apoptose reside no fato que não há extravasamento de conteúdo intracelular, 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, WILLIAMSON & SCHLEGEL, 2000; FAN et al., 2004).

A decisão entre viver e morrer pode advir de condições internas da célula ou de sinais externos de controle. A célula tem sensores bioquímicos internos capazes de perceber situações onde sua viabilidade está em risco, tais como situações de estresse nutricional, estresse oxidativo, dano extenso ao DNA ou organelas, dentre outros. A deflagração da apoptose ocorre no ponto em que estes danos se tornam irreversíveis, e a eliminação deste indivíduo ocorre então por este mecanismo silencioso, com uma

mínima mobilização de células imunes. Por outro lado, o sinal para a morte celular pode vir das células adjacentes pela secreção de moléculas pró-apoptóticas, que se ligarão a receptores específicos, desencadeando a apoptose (ALBERTS et al., 2008).

A apoptose pode ser desencadeada por duas grandes vias gerais, que vão ser ativadas de acordo com a procedência do sinal de morte celular: a via intrínseca, quando o sinal é por sensores internos da célula, e a extrínseca, em resposta a sinalização externa mediada por receptores.

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 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, LIU & CUI, 2005; ALBERTS et al., 2008; LING et al., 2009).

Alterações no transporte de solutos e na manutenção da permeabilidade das membranas mitocondriais são possíveis deflagradoras de morte celular pela via intrínseca, que tem a mitocôndria como protagonista. A permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) é o fenômeno de liberação do conteúdo do EIM. A PMEM, além de dissipar o $\Delta\Psi_m$, libera no citoplasma o CytC, que participa da cadeia respiratória mitocondrial mas, uma vez no citossol, ativa iniciadores da via

intrínseca caspase-dependente de apoptose (BRUSTUGUN et al., 1998). O CytC 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, como a 3, 6 e 7 (INOUE et al., 2009). Dessa forma, a PMEM é o evento decisivo e irreversível pelo qual estará selado o destino da célula em direção à apoptose pela via mitocondrial.

Existem dois grandes mecanismos, ainda que interconectados, que podem levar à PMEM. O *permeability transition pore complex* (PTPC) consiste num complexo proteico supramolecular transmembrana, presente nas membranas mitocondriais. O PTPC é composto de diferentes proteínas agregadas por afinidade transitória. A composição do PTPC é altamente dinâmica, de forma que várias proteínas podem compô-lo, em momentos diferentes, o que torna difícil sua caracterização (VIANELLO et al., 2012). Dentre estas combinações possíveis, podem fazer parte o *canal aniônico dependente de voltagem* (VDAC), a *adenina-nucleotídeo translocase* (ANT) e a *ciclofilina D* (CYPD). O PTPC usualmente funciona como um canal de transporte controlado de substratos através das membranas mitocondriais, principalmente o ATP. A ativação prolongada do PTPC causa um intenso fluxo de solutos para dentro da matriz, a que se dá o nome de transição de permeabilidade de membrana (TPM). Esta condição leva ao inchaço da mitocôndria, culminando na PMEM, com perda de $\Delta\Psi_m$ e liberação das proteínas deflagradoras de apoptose no citossol (FULDA, GALLUZZI & KROEMER, 2010; VIANELLO et al., 2012].

Outro mecanismo que pode levar à PMEM envolve as proteínas da família *B-cell lymphoma protein-2* (BCL-2), que são um grupo de proteínas que agem sobre a membrana externa mitocondrial e têm relação direta com o controle da apoptose. Duas destas proteínas, a *BCL-2 homologous antagonist/killer* (BAK) – inserida na membrana externa mitocondrial – e a *BCL-2-associated X protein* (BAX) – livre no citossol em sua forma inativa – são capazes de se associar em oligômeros, formando poros na membrana mitocondrial externa que levarão à PMEM. Em contrapartida, a BCL-X_L e a BCL-2 propriamente dita (ambas inseridas na membrana externa da mitocôndria) agem inibindo esta oligomerização de BAX e BAK, prevenindo a formação de poros que levariam à PMEM (KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007; FULDA, GALLUZZI & KROEMER, 2010).

Há ainda outros membros da família BCL-2 que podem deflagrar a PMEM pela ação sobre as proteínas citadas. Denominadas *BH3-only* (BH3), estas proteínas se encontram livres no citossol e funcionam como sensores de stress intracelular (ADAMS & CORY, 2007). Em determinadas situações como stress oxidativo ou ausência de sinalização proliferativa, proteínas desta família como o Bim, Bad e Puma, podem ativar a oligomerização do BAK e/ou BAX ou ainda bloquear a ação inibitória de BCL-2 e BCL-X_L, promovendo então a apoptose pela PMEM.

Dessa forma, essas proteínas se dividem em membros pró-apoptóticos (membros BH3, BAX e BAK) e anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-X_L e outros), sendo que o equilíbrio entre a atividade destas proteínas no citossol pode determinar a resistência à apoptose ou a indução deste tipo de morte. A aquisição de mutações nestes genes são importantes para a carcinogênese na composição do perfil de resistência à

apoptose característico das células tumorais. De fato, o protótipo da família recebeu o nome de BCL-2 pelo fato de sua descoberta estar associada à sua alta expressão em linfoma folicular de células B altamente resistente à apoptose (PEGOGARO et al., 1984; GALLUZZI et al., 2010). Sabe-se também que alguns tipos de adenocarcinoma pulmonar têm a expressão de Bim reduzida, o que poderia dificultar a ocorrência de apoptose derivada da ausência de sinais proliferativos (SAKAKIBARA-KONICHI et al., 2012].

2.3 – A ELETROTERRAPIA TUMORAL

As bases de muitos processos fisiológicos passam pela formação de correntes e campos elétricos. Podemos destacar dentre estes a condução de impulsos elétricos entre células, que governam o funcionamento do cérebro e a contração dos músculos, e a migração celular nos processos de cicatrização, que também ocorrem sob orientação de um campo elétrico fisiológico (ZHAO, 2009). Dessa forma, é de se esperar que correntes e campos elétricos possam desempenhar papéis terapêuticos em inúmeras aplicações, o que de fato vem produzindo inúmeros estudos em diversos contextos de tratamento.

Dentre estas aplicações terapêuticas, a CE já foi amplamente utilizada em neurologia para o tratamento de uma série de condições psiquiátricas, na chamada terapia eletroconvulsiva. Esta abordagem, que consiste na instalação de eletrodos ao redor da cabeça do paciente de forma não invasiva, apresenta boa eficácia no tratamento de várias desordens psiquiátricas como depressão e esquizofrenia (UK ECT REVIEW GROUP, 2003). No entanto, muitas controvérsias permeiam seu uso, devido à

aplicação indiscriminada e sem anestesia em instituições manicomiais no passado, bem como questionamentos sobre a sua segurança. Desta forma, o uso atual da terapia eletroconvulsiva se restringe a emergências psiquiátricas ou como última opção em casos refratários ao tratamento farmacológico clássico (THIRTHALLI et al., 2012). A estimulação muscular com corrente elétrica já foi estudada tanto para prevenir perdas de massa muscular frente a longos períodos de repouso (STRASSER et al., 2009) quanto para o controle da dor e tratamento de lesões (DOWSWELL et al., 2009; PARKER et al., 2012). Além disso, interessantes estudos têm sido publicados sobre a aplicação da CE para a restauração de lesões na medula espinhal (GAN & GLAZER, 2006), com um promissor potencial de recuperação de movimentos locomotores por estes pacientes.

O uso da corrente elétrica para tratamento de tumores sólidos é objeto de estudo de vários grupos ao redor do mundo, com diversos estudos em animais (SCHAUBLE, HABAL & GULLICK, 1977; CHOU et al., 1997; TELLO et al., 2004) e humanos (NORDENSTRÖM, 1989; NORDENTSRÖM, 1994; GRIFFIN et al., 1994; XIN et al., 1997; VOGL et al., 2007). Esta técnica leva o nome de eletroterapia tumoral (ETT) e apresenta resultados promissores, com regressão significativa dos tumores tratados, melhoria de sobrevida e até relatos de cura após tratamento elétrico das lesões (XIN et al., 1997). A eficácia da ETT vem sendo demonstrada em inúmeros tipos de tumores *in vivo*, como sarcomas (CHOU et al., 1997), tumores de mama (GRIFFIN et al., 1994), pulmão (SAMUELSON, JÖNSSON & STAHL, 1983; NORDENSTRÖM, 1983, 1984, 1985; XIN et al., 1997), próstata (VOGL et al., 2007) e pâncreas (GRAVANTE et al., 2011).

A corrente elétrica pode ser definida como o deslocamento ordenado de cargas (*i.e.* partículas carregadas) através de um material condutor. O movimento destas partículas, no caso elétrons - que possuem carga negativa – ocorre quando é aplicado um campo elétrico. Existem dois tipos de corrente elétrica: a contínua e a alternada. A corrente contínua consiste no fluxo unidirecional dos elétrons entre dois pólos opostos definidos, que produzem o campo elétrico. Estes pólos são o cátodo, que atrai os elétrons, e o ânodo, que os repele. Eles são identificados por convenção pelos sinais “-” para o cátodo e “+” para o ânodo e o sentido da corrente é sempre do ânodo para o cátodo. Já na corrente alternada, estes pólos alternam de sinal várias vezes por segundo, bem como o sentido da corrente. Quando uma solução aquosa contendo íons é submetida a correntes elétricas, o acúmulo (no cátodo) ou a retirada (no ânodo) de elétrons das vizinhanças dos eletrodos promove reações químicas, no processo denominado eletrólise. Dessa forma, com a corrente contínua, estas reações são bem definidas, pois não há alternância entre os pólos.

A técnica de aplicação da ETT consiste na inserção de eletrodos no tumor ou em áreas adjacentes para passagem da CE (Figura 5). A polaridade e o posicionamento ideal dos mesmos serão decisivos para a eficácia da terapia e para boa delimitação da área afetada. O tipo de corrente utilizada na ETT é a corrente contínua, o que permite controlar o tipo de produtos de eletrólise gerado localmente através da escolha da polaridade dos eletrodos utilizados e suas posições no tumor.

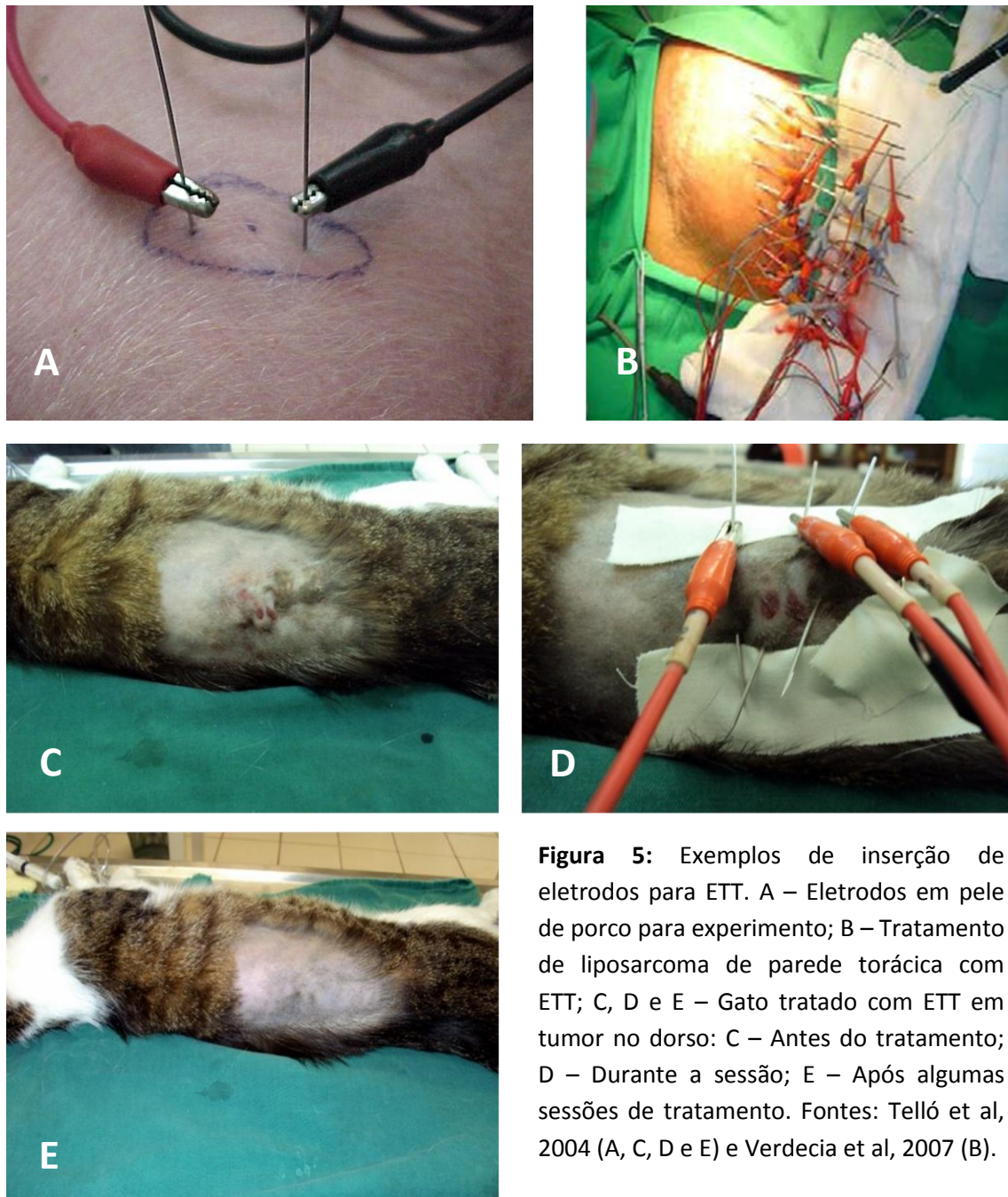


Figura 5: Exemplos de inserção de eletrodos para ETT. A – Eletrodos em pele de porco para experimento; B – Tratamento de lipossarcoma de parede torácica com ETT; C, D e E – Gato tratado com ETT em tumor no dorso: C – Antes do tratamento; D – Durante a sessão; E – Após algumas sessões de tratamento. Fontes: Telló et al, 2004 (A, C, D e E) e Verdecia et al, 2007 (B).

Os pacientes de câncer de pulmão são potenciais beneficiários de terapias complementares como a ETT que, associada aos métodos tradicionais de tratamento, pode auxiliar na redução da massa tumoral, com aumento da sobrevida do paciente. Em algumas situações, a ETT pode produzir uma regressão tumoral ao ponto de permitir que o paciente se torne passível ser submetido a procedimento cirúrgico curativo. Apesar da ETT ser mais facilmente aplicável a tumores mais superficiais, dois

dos mais emblemáticos estudos da ETT em seres humanos foram realizados justamente em pacientes de câncer de pulmão (NORDENSTRÖM, 1984; XIN et al., 1997), o que demonstra que não há limitação de técnica cirúrgica para acesso de tumores em órgãos mais internos como o pulmão para o tratamento com CE. Cabe ressaltar que, para estes procedimentos em tumores internos, é sempre necessária a avaliação do paciente no que diz respeito ao risco cirúrgico específico.

Um dos primeiros relatos de uso de correntes elétricas para o tratamento do câncer vem do final do século XIX, com o tratamento de tumores ginecológicos (MARTIN, 1886). Após um hiato de muitas décadas, o interesse neste tipo de abordagem se reacendeu com o trabalho de Humphrey e Seal, com bons resultados em sarcomas de rato (HUMPHREY & SEAL, 1959). O radiologista sueco Bjorn Nordenström foi um grande estudioso dos campos e correntes elétricas gerados por sistemas biológicos. No final da década de 70 e ao longo dos anos 80, ele realizou estudos em pacientes com câncer de pulmão utilizando corrente elétrica contínua. O maior deles contou com 20 pacientes com 26 tumores, com regressão de 46% dos tumores tratados, sem sinal de recidiva após 5 anos de tratamento (NORDENSTRÖM, 1978; 1983).

No fim da década de 80, o governo chinês iniciou um projeto de desenvolvimento da ETT. Entre 1987 e 1989 foram realizados estudos clínicos e implementados cursos de treinamento para os médicos chineses e a técnica foi introduzida na prática terapêutica do sistema de saúde do país. A partir daí surgiram os maiores estudos clínicos realizados com a ETT até hoje, com milhares de pacientes

ao longo da década de 90, incluindo alguns importantes ensaios com câncer de pulmão (XIN & LIU, 1994; XIN et al., 1997).

Alguns importantes grupos europeus também se dedicaram ao estudo da aplicação de correntes elétricas para o tratamento de tumores neste período. Miklavčič e colaboradores contribuíram com importantes conhecimentos sobre os mecanismos da ETT (MIKLAVČIČ et al., 1993) e sua associação com outras técnicas convencionais de tratamento (MIKLAVČIČ et al., 1997). Mais tarde, este grupo desenvolveria uma nova modalidade de tratamento, onde a corrente elétrica e suas reações químicas deixam de ser o foco principal. Essa nova abordagem consiste na aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem e curta duração, com vistas a promover perturbações na permeabilidade da membrana celular tumoral, no efeito conhecido como eletroporação. Isso permite a passagem de fármacos até então incapazes de penetrar na célula. A associação destes pulsos elétricos a quimioterápicos foi batizada de eletroquimioterapia e é extensamente estudada até hoje, com bons resultados clínicos (MIR et al., 1998; SERSA & MIKLAVČIČ, 2008; BRETON & MIR, 2012).

Mais recentemente, um importante grupo de investigação sobre a ETT surgiu em Cuba, onde existe um centro dedicado ao estudo de eletromagnetismo aplicado (CNEA, 2012) e modelos matemáticos de planejamento do tratamento (CABRALES et al., 2010), com estudos em animais (CABRALES et al., 2001; CIRIA et al., 2004) e humanos (VERDECIA et al., 2007). Na Europa, grupos na Alemanha, realizam estudos em pacientes de câncer de próstata (VOGL et al., 2007) e na Austrália, com ablação de tumores de pâncreas (GRAVANTE et al., 2011). No Brasil, temos o grupo do prof. Marcos Telló, com larga experiência no tratamento de animais em parceria com a

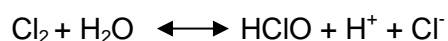
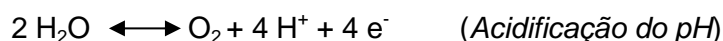
Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Sua dedicação no desenvolvimento e aplicação da técnica gerou um livro sobre o assunto, com relatos de casos de sucesso no tratamento de cães e gatos, bem como uma importante abordagem física e matemática da metodologia, com uma ótica baseada em sua formação como engenheiro elétrico (TELLÓ et al., 2004). Finalmente, no Rio de Janeiro, nosso grupo capitaneado pela professora Carla Holandino é o único até então dedicado ao estudo dos mecanismos de ação da ETT utilizando modelos *in vitro*.

Nordenström discutiu possíveis mecanismos envolvidos no efeito antitumoral da CE, como alterações de pH produzidas na vizinhança dos eletrodos, alterações no transporte eletro-osmótico da água e dos íons ao longo do tumor (NORDENSTRÖM, 1983). Ele descreve ainda que como a maioria dos tumores possui um excesso de cargas eletronegativas sobre sua superfície, o ânodo seria o eletrodo mais indicado para o tratamento, uma vez que a carga negativa do cátodo poderia dispersar as células tumorais por repulsão eletrostática. Isso poderia facilitar uma propagação de micrometástases durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1984). No entanto, outros trabalhos e mesmo o próprio autor também observou relativo sucesso com o uso do cátodo, apesar de alguns estudos mostrarem de fato que o ânodo é mais eficaz que o cátodo, em modelos *in vivo*. (NORDENSTRÖM, 1989; GRIFFIN et al., 1994; TAYLOR et al., 1994).

A passagem de corrente elétrica por tecidos vivos pode produzir alterações de temperatura, pela dissipação da energia elétrica em forma de calor, que é proporcional à resistividade elétrica do tecido. No entanto, na ordem de grandeza de correntes utilizadas na ETT, não são detectadas variações consideráveis de

temperatura (MIKLAVČIČ et al., 1993). Isso pode estar relacionado a observações que sugerem que a condutividade elétrica dos tumores é geralmente maior que a dos tecidos normais, seja por áreas de necrose (HAEMMERICH et al., 2003) ou mesmo por uma maior concentração intratumoral de íons como sódio e cloreto (SMITH et al., 1978). O tratamento eletroquímico também produz alterações de pH na vizinhança dos eletrodos, devido às reações eletroquímicas. De fato, as reações eletroquímicas na vizinhança dos eletrodos nas condições usuais da ETT produzem drásticas variações de pH, com alcalinização nas imediações do cátodo e acidificação próximo ao ânodo (MIKLAVČIČ et al., 1993; GRAVANTE et al., 2011). Estas variações de pH desempenham papel importante no dano produzido pela ETT, onde a acidificação do pH é capaz de induzir apoptose com ativação de caspase-3 (VON EULER et al., 2002). Além disso, os produtos de eletrólise gerados por cada pólo também são contrastantes; próximo ao cátodo predominam reações de redução e produção de gás hidrogênio, enquanto no ânodo ocorrem reações de oxidação, dando origem a espécies como superóxido, peróxido de hidrogênio, cloro molecular e hipoclorito, todas com importante potencial oxidante e que colaboram de forma decisiva para o dano provocado (MIKLAVČIČ et al., 1993; GRAVANTE et al., 2011). O resumo destas reações é o seguinte:

- Para o fluxo anódico:



- Para o fluxo catódico:



Os estudos dos mecanismos de ação da ETT contaram com um grande avanço com a concepção de um modelo *in vitro* por Veiga e colaboradores [1995]. Este modelo permite o estudo diferencial dos efeitos de cada componente do circuito elétrico sobre células de cultura (VEIGA, 1995; VEIGA et al., 2000, 2005; HOLANDINO, et al. 2001). Assim, células podem ser expostas separadamente à vizinhança do ânodo, recebendo o fluxo anódico (FA) ou ao cátodo, recebendo o fluxo catódico (FC). Há ainda uma terceira condição, onde as células não se encontram em contato com nenhum dos dois extremos, estando apenas submetidas ao campo elétrico no trajeto da corrente, condição essa denominada fluxo eletroiónico (FEI). A partir deste modelo, interessantes dados foram obtidos sobre os modos de ação de cada um destes componentes, como as principais diferenças entre os mecanismos de morte provocados pelo FC e o FA. O primeiro estudo publicado aplicando-se este modelo em células de mastocitoma murino da linhagem P815 mostrou que o dano provocado pelo FC era intrinsecamente dependente da alcalinização do pH produzida. Já no FA, a acidificação do meio não é a única responsável por produzir a morte celular, sendo indispensável também a presença de cloreto no meio, sugerindo um efeito decisivo das espécies reativas de cloro no dano produzido pelo FA (VEIGA et al., 2000). Um estudo subsequente em células humanas leucêmicas da linhagem K562 revelou que, independentemente da morte provocada imediatamente após o tratamento, todas as três condições experimentais inibem o aumento populacional das células ao longo do tempo pós-tratamento (HOLANDINO et al., 2001), o que também foi observado em estudos posteriores com outras linhagens (VEIGA et al., 2005; CAMPOS et al., 2010). Fato interessante é que este efeito se deu inclusive para o FEI, que não gera produtos de eletrólise nem provoca morte celular imediata. Isso pode estar relacionado a

observações posteriores de que o FEI é capaz de reduzir a atividade da principal enzima da via glicolítica, a fosfofrutocinase 1, ainda que de forma transitória (BRITO, 2009).

O estudo feito em células humanas leucêmicas da linhagem HL60 evidenciou que tanto o FA quanto o FC produzem necrose imediata; entretanto, o FA também é capaz induzir necrose imediata e apoptose após algumas horas do tratamento, sendo este um importante mecanismo molecular disparado pela ETT (VEIGA et al., 2005). A apoptose induzida pelo FA foi caracterizada através da observação da fragmentação do DNA total em gel de eletroforese e alterações morfológicas típicas (VEIGA et al., 2005). Estes dados corroboraram observações de um estudo com tumores de mama em ratos no ano anterior (VON EULER et al., 2004).

A literatura também mostra os efeitos da CE em inúmeros outros sistemas biológicos, produzindo efeito bactericida (VALLE et al., 2007; BIRBIR, URGUR & BIRBIR, 2008; TIEHM, LOHNER, AUGENSTEIN, 2009), fungicida (RANALLI et al., 2002) e parasiticida (SHARQUIE et al., 1998; HEJAZI, ESLAMI & DALIMI, 2004). O tratamento com CE de lesões cutâneas causadas por espécies de *Leishmania* já foi descrito em humanos (SHARQUIE et al., 1998) e em camundongos (HEJAZI, ESLAMI & DALIMI, 2004), com efeitos promissores para mais esta aplicação da CE. Isso motivou um estudo ultraestrutural dos efeitos da CE em um modelo *in vitro* com o protozoário não-patogênico *Herpetomonas samuelpessoai* (GOMES et al., 2012). Foram observadas alterações morfológicas em diferentes estruturas subcelulares, de acordo com a polaridade aplicada. Quando submetidos ao FC, foi possível detectar aparecimento de autofagossomas e figuras de mielina nos protozoários tratados, enquanto o FA

produziu marcantes alterações na membrana plasmática, com pontos de descontinuidade, projeções e irregularidade na superfície, bem como atividade exocítica aumentada na bolsa flagelar (GOMES et al., 2012). Estes resultados sugerem a participação da autofagia no dano celular promovido pelo FC, bem como alterações de superfície celular causadas pelo FA. De fato, alterações na expressão de alguns carboidratos de superfície também foram identificadas em células tumorais tratadas com os diferentes componentes do circuito elétrico (VEIGA et al., 2000), reforçando a hipótese de um importante efeito da CE sobre a superfície celular de eucariotos, o que pode contribuir decisivamente para a citotoxicidade.

Alguns destes estudos *in vitro* mostram também evidentes danos ultraestruturais às mitocôndrias, incluindo inchaço e desorganização das cristas (VEIGA et al., 2000; HOLLANDINO et al., 2000; GOMES et al., 2012). No entanto, ainda não foram descritos os efeitos do tratamento com CE sobre a função destas organelas.

Como discutido anteriormente, as espécies de cloro parecem ser essenciais para o dano provocado pelo FA (VEIGA et al., 2000). Englert e Schacter descreveram em 2002 a propriedade pró-apoptótica de cloraminas, que são espécies químicas resultantes da reação entre espécies cloradas com ácidos aminados. Como ambos estão presentes no meio eletrolítico principalmente nas imediações do FA, é possível que estas espécies sejam formadas neste contexto e que possam participar do mecanismo de ação da CE. Mais especificamente, já foi demonstrado que ácidos aminados são capazes de intermediar e potencializar o dano celular causado pelo hipoclorito (ROBASKIEWICZ, BARTOSZ & SOSZYNSKI, 2010), que é um dos produtos da oxidação do cloreto gerados pelo FA. Há ainda um estudo que demonstra a capacidade

da cloramina derivada da reação de taurina e peróxido de hidrogênio em oxidar a cofilina, uma proteína que participa da modulação estrutural da actina citoesquelética (KLAMT et al., 2009). Na presença desta cloramina, a cofilina foi oxidada e migrou para a mitocôndria, provocando apoptose por indução da PMEM sem a participação de proteínas da família BCL-2 como o BAX ou BAK, mas sim diretamente envolvida com a ativação do PTPC (KLAMT et al., 2009). Esta hipótese motivou a realização de experimentos com o FA na presença de glutamina em diversas concentrações do ácido aminado. Observou-se morfologia sugestiva de apoptose nas células da linhagem HL60 tratadas a partir da primeira hora de pós-tratamento com FA, indicando a participação de cloraminas na morte celular (VEIGA et al., 2005).

Com o objetivo de potencializar ainda mais os efeitos antitumorais da ETT, um recente trabalho de nosso grupo testou os efeitos da associação do FA com L-tirosina encapsulada num sistema nanoparticulado de policaprolactona frente a células de melanoma murino da linhagem B16F10. Foi verificado um aumento significativo da citotoxicidade da CE na presença destas nanopartículas quando comparado aos grupos controle, nos quais a linhagem B16F10 foi tratada com FA e com FA na presença de L-tirosina livre (CAMPOS et al., 2010).

Apesar de muitos aspectos relacionados aos efeitos antitumorais da ETT já serem conhecidos de forma descritiva, importantes detalhes acerca dos mecanismos bioquímicos e moleculares disparados pela CE ainda são desconhecidos. A compreensão dos mecanismos de indução de apoptose provocada pelo FA, bem como aspectos envolvidos com a respiração celular foram aprofundados no presente estudo,

com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ação envolvidos com esta promissora abordagem terapêutica.

3 – OBJETIVO GERAL

Caracterizar os mecanismos de ação da ETT no que tange a alterações bioquímicas relacionadas ao metabolismo e à morte tumoral provocada pela CE utilizando um modelo *in vitro* de adenocarcinoma pulmonar humano.

3.1 – Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos imediatos e tardios do FA sobre a viabilidade celular;
- Avaliar a participação de EROs no dano provocado pelo FA nas células tratadas;
- Investigar o envolvimento da caspase-3 na morte celular deflagrada pelo FA ao longo do tempo pós-tratamento;
- Avaliar os efeitos do FA sobre a ultraestrutura das células tratadas;
- Investigar os efeitos imediatos e tardios do FA sobre a estrutura e função mitocondriais e suas possíveis relações com a deflagração de morte celular.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Equipamentos

Centrífuga de placas – Cientec CT-6000R

Citômetro de Fluxo FACScan Becton Dickinson, NJ, USA

Espectrofotômetro de placa – Thermo Plate TP Reader

Estufa de cultura – FANEM – 002CB

Estufas de esterilização – Modelo 315SE - FANEM

Fonte de corrente elétrica – Instrutherm FA-3050

Microcentrífuga Refrigerada - Eppendorf 5810-R

Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1200 EX

Microscópio Eletrônico Morgagni 268, FEI, Hillsboro, OR

Microscópio Invertido Optika XDS-3, Bergamo, Itália

Microscópio óptico - Axioplan II / Zeiss

Oxígrafo de Alta Resolução Oroboros-O2K, Innsbruck, Austria.

Ultramicrótomo Leica EM UC6, Leica Microsystems, Vienna, Austria

4.2 - Cultura de Células

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. Esta linhagem foi iniciada em 1972 a partir de um 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 às garrafas de cultura, na forma de monocamada. Apresentam tempo de duplicação de cerca de 22 horas (GIARD et al., 1973; LIEBER et al., 1976). A linhagem A549 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 células A549 nunca haviam sido avaliados até o desenvolvimento deste projeto, conferindo ineditismo ao mesmo e agregando mais conhecimento acerca dos mecanismos antitumorais da CE.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² em estufa a 37°C, usando como fonte nutricional o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e com HEPES a 3g/L, devido à ausência de atmosfera de CO₂ na estufa. Os inóculos iniciais foram usualmente de 3,0 x 10⁵ células por garrafa, que atingiam a confluência ideal para passagem em aproximadamente 4 dias. Para o repique, as células foram lavadas com salina fosfato (PBS) pH 7,4 e incubadas com solução de tripsina a 0,05% por 3 a 5 minutos a 37°C, até que se soltassem da superfície da garrafa.

4.3 - O Sistema Experimental de Tratamento com CE

O modelo experimental utilizado neste estudo já foi previamente descrito e é utilizado rotineiramente em nosso laboratório (VEIGA et al., 2005; CAMPOS, 2008; BRITO, 2009; CAMPOS et al., 2010; GOMES, 2010; GOMES et al., 2011). Consiste numa placa de cultura de 24 poços com eletrodos de platina adaptados à sua tampa, arranjados de forma simétrica, onde três poços não contíguos são interligados com pontes de papel de filtro (Figura 6). Os eletrodos ficam ligados a uma fonte de corrente elétrica contínua e a intensidade é monitorada por um multímetro ligado em série ao circuito. Esse sistema permite que suspensões celulares sejam expostas a três diferentes situações ao longo do circuito elétrico: FC, onde as células estão posicionadas na vizinhança do cátodo; FA, próximo ao ânodo; e fluxo eletroiónico (FEI), onde as células não têm contato com os eletrodos ou com os produtos das reações eletrolíticas. As células controle são mantidas nas mesmas condições, exceto pela passagem de corrente elétrica no sistema.

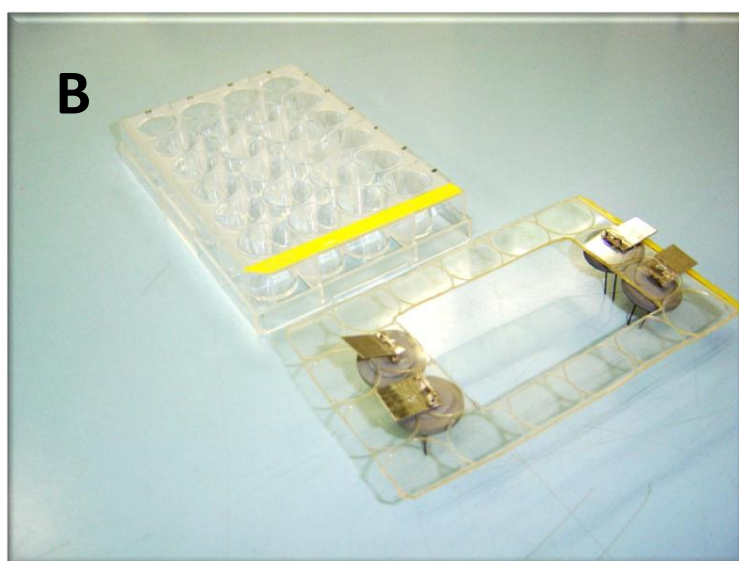
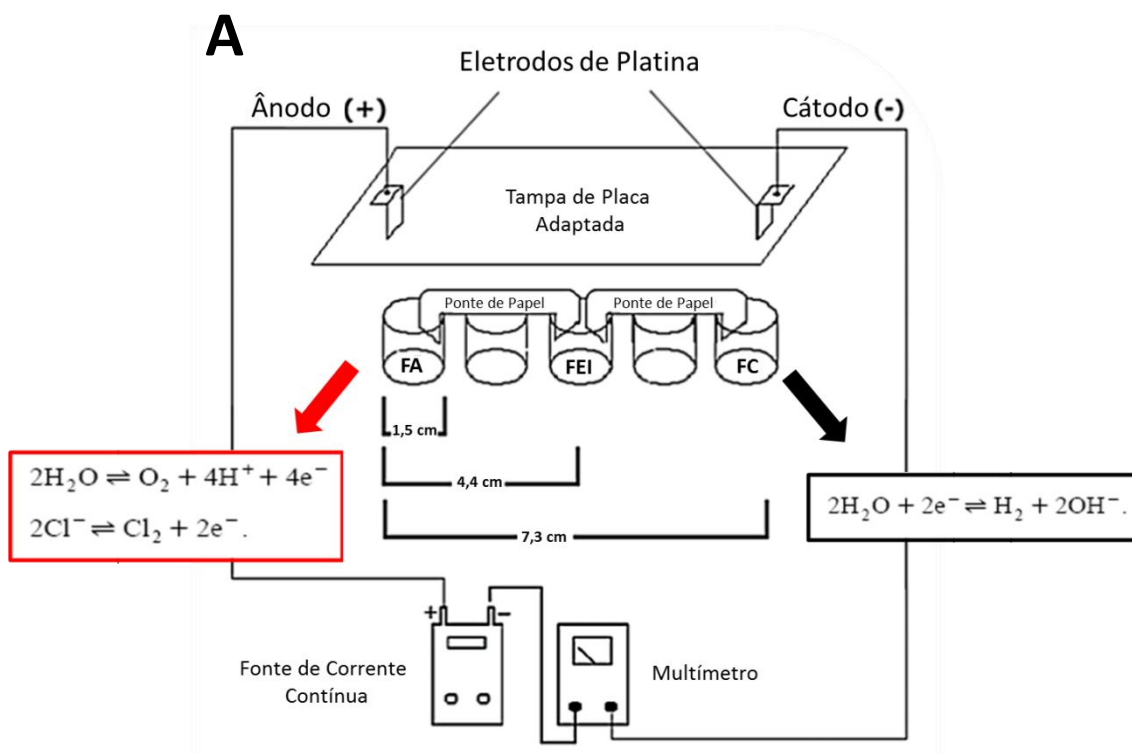


Figura 6: Sistema experimental para tratamento de células de cultura com corrente elétrica contínua. A) Representação esquemática do modelo experimental em placa de cultura de células de 24 poços. FA – Fluxo anódico; FEI – Fluxo eletro-iônico; FC – Fluxo catódico. As células controle são submetidas às mesmas condições, exceto pela passagem de corrente elétrica. B) Fotografia do sistema de placa de cultura com eletrodos adaptados.

4.4 - Tratamento das células com corrente elétrica:

As células foram semeadas na concentração de 4×10^5 células por poço. A placa foi incubada em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ *overnight* para adesão e formação da monocamada de células. Antes do tratamento, as células foram lavadas duas vezes e 2 mL de PBS foram adicionados aos poços para tratamento. O presente estudo se concentrou apenas no FA, de forma que as células foram tratadas nesta condição em temperatura ambiente utilizando-se 2,0 mA de CE, dose utilizada em estudos prévios com outras linhagens (HOLANDINO et al., 2001; VEIGA et al., 2000; 2005), por tempos crescentes: 2, 6, 10, 14, 18, 24 e 30 minutos. A carga elétrica aplicada, que corresponde a dose em ETT (NORDENSTRÖM, 1984), foi calculada para cada tempo de tratamento de acordo com a fórmula: $I = C/t$, onde “I” é a intensidade de corrente aplicada em Ampéres; “C” é a quantidade de carga, em Coulombs; e “t” é o tempo de tratamento, em segundos. Utilizando-se esta fórmula, as doses resultantes para cada tempo de tratamento encontram-se na Tabela 1. Após cada tratamento, as células foram incubadas com o PBS tratado por 15 minutos, antes de serem lavadas por três vezes com PBS novo. Ao longo deste trabalho, as células foram analisadas imediatamente após o tratamento e em tempos subsequentes após o mesmo. Para as análises imediatas, as células foram coletadas com tripsina imediatamente após as lavagens. Nos estudos de alterações tardias, as células após tratamento foram lavadas e incubadas com 2 mL de DMEM suplementado com SFB a 10% em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 4, 8, 18 ou 24 h. Alguns dos efeitos celulares da CE foram comparados com os da incubação contínua das células com $50\text{ }\mu\text{M}$ de cisplatina (CHENG et al., 2010), um quimioterápico já estabelecido na terapêutica.

Tabela 1: Esquema das doses resultantes dos tempos de tratamento utilizados.

	Tempo de tratamento com 2 mA	Carga Resultante Aplicada (Dose)
	2 min	0,24 C
	6 min	0,72 C
	10 min	1,20 C
	14 min	1,68 C
	18 min	2,16 C
	24 min	2,88 C
	30 min	3,60 C

$$I = C/t$$

I = Corrente (Ampéres)

C = Carga Elétrica (Coulombs)

t = Tempo de Tratamento (segundos)

4.4.1 – Teste de Citotoxicidade Causada por EROs:

Para avaliar a participação de espécies oxidantes na citotoxicidade induzida pelo FA, as células foram tratadas na presença de glutathione reduzida (GSH), um sequestrador destas espécies, em diversas concentrações. Para isso, a GSH foi adicionada à suspensão celular 15 minutos antes do tratamento nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM (GUTIÉRREZ-MARTIN et al., 2004; JARDIM-MESSEDER, CAMACHO-PEREIRA & GALINA, 2012). As células foram então tratadas nesta mesma solução em seguida, ou seja, na presença de GSH, com doses de 1,20 C (2 mA por 10 min) e 2,88 C (2 mA por 24 min). Como controles, células sem tratamento elétrico foram incubadas pelos mesmos tempos com as mesmas concentrações de GSH.

4.5 - Estudos de Viabilidade Celular

4.5.1 - Método do MTT

O brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um sal de tetrazólio hidrossolúvel, de cor amarelada em solução aquosa. Quando em contato com células viáveis, o anel tetrazólico presente em sua estrutura é reduzido por várias enzimas redutoras celulares. O produto desta reação é o formazan que, por ser insolúvel em água, acumula-se sob a forma de cristais (Figura 7). Estes cristais são então solubilizados 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). A solução de (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.

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e 400 µL de solução de tripsina foram adicionados a cada poço. Após a soltura das células, foram adicionados 400 µL de DMEM acrescidos de SFB 10% para inativar a tripsina. Em seguida, 180 µL desta suspensão celular foram incubados com 20 µL de solução de MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL, por 3 horas na ausência de luz, a 37°C. As placas foram então centrifugadas a 1200 x g por 10 min, o sobrenadante removido e os cristais formados solubilizados em DMSO. Em seguida, a absorbância foi lida a 492 nm em espectrofotômetro de placa.

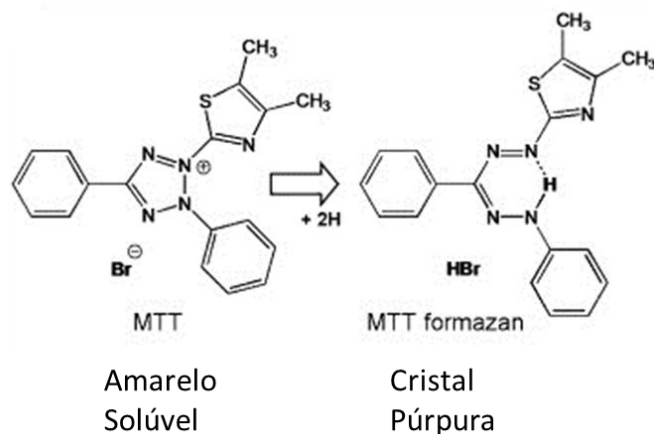


Figura 7: Representação esquemática da reação de redução do MTT. Adaptado de Stockert et al, 2012.

4.5.2 - Método de Exclusão do Azul de Tripan

Um dos parâmetros que caracteriza uma célula viável é a integridade de sua membrana plasmática, o que permite o controle da permeabilidade celular (KROEMER et al. 2009). O azul de tripan é um corante azul intenso com peso molecular de 960 Da, que penetra apenas em células com permeabilidade de membrana comprometida (Figura 8). Dessa forma, as células não-viáveis, ou com integridade de membrana comprometida, são permeáveis ao corante e identificadas ao microscópio ótico.

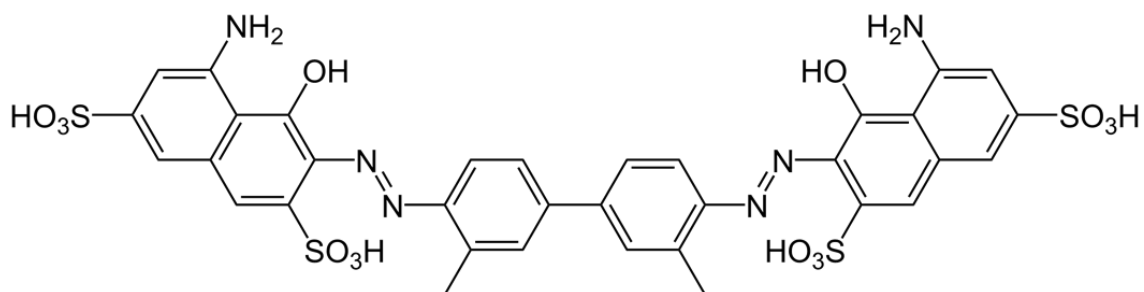


Figura 8: Estrutura do Azul de Tripan.

Uma alíquota de 20 μ L das diferentes suspensões celulares foi adicionada de uma solução de azul de tripan a 0,4% na proporção de 1:1 e imediatamente observada ao microscópio. A quantificação das células foi realizada em câmara de Neubauer, onde a quantidade de células viáveis e não-viáveis foi determinada (HOLANDINO et al., 2000).

4.5.3 – Avaliação do Potencial de Liberação de Células Viáveis pela CE

A CE pode eventualmente ser capaz de afetar a adesão das células ao substrato. Num contexto *in vivo*, isso poderia representar um risco de disseminação de células tumorais na corrente sanguínea, favorecendo a ocorrência de metástases. Para determinação da quantidade e viabilidade de células que se soltam da monocamada, o PBS de tratamento foi coletado e centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensão em 100 μ L de PBS novo. As células foram quantificadas pelo método do azul de Tripan como descrito anteriormente.

4.6 - Determinação da Atividade Enzimática de Caspase-3

A caspase-3 é a principal enzima efetora das principais vias apoptóticas caspase-dependentes. A atividade aumentada da enzima provê fortes indícios que a apoptose foi deflagrada pela via intrínseca ou extrínseca (COHEN et al., 1997; WANG, LIU & CUI, 2005; ALBERTS et al., 2008). A atividade desta enzima foi determinada imediatamente após e nos tempos de 4, 18 e 24 h após o tratamento com 1,20 C de FA, utilizando método colorimétrico. Este ensaio consiste na incubação do lisado celular com o peptídeo Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), substrato da caspase-3, ligado ao cromóforo *p*-nitroanilina. Na presença da enzima ativa, este substrato é clivado e

libera a *p*-nitroanilina de cor amarela, que absorve a 405 nm. Assim, a intensidade de cor gerada é proporcional à atividade enzimática de caspase-3 (MILLIPORE, 2010).

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se kit da marca Millipore® (*Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit*). Um mínimo de 2×10^6 células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de lise (provido pelo kit) sob homogeneização vigorosa. A seguir, a lise celular foi concluída por congelamento e descongelamento e a suspensão restante foi centrifugada a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e 20 μ L de cada amostra foram incubados com 70 μ L de tampão de ensaio e 10 μ L de solução de substrato a 3 mg/mL (providos pelo kit) em placa de 96 poços. Estas amostras foram então incubadas por 2 h a 37 °C ao abrigo da luz, seguindo com leitura em espectrofotômetro de placa a 405 nm. Os resultados foram então expressos em função do controle sem tratamento, ou seja, como quociente entre a absorbância de cada amostra e a do controle (VON EULER et al., 2002; PERCHELLET et al., 2004; ABE et al., 2009).

4.7 - Análises Morfológicas

4.7.1 - Microscopia Ótica de Contraste de Fase

A observação de células em cultura a fresco tem como vantagem estudar características originais do material sem qualquer tipo de artefato de técnicas de preparo de amostra, como coloração ou fixação. A morfologia das células A549 foi observada diretamente na placa de cultura em suas condições normais de cultivo. Esta observação foi realizada utilizando para isso um microscópio invertido acoplado a uma câmera digital para captura de imagens.

4.7.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise dos efeitos do tratamento elétrico na ultraestrutura celular foi realizada por MET seguindo protocolos já previamente descritos (VEIGA et al., 2005; LEWIS & KNIGHT, 1977). Um *pool* de 2×10^6 células foram coletadas em suspensão, lavadas em PBS e fixadas em glutaraldeído a 1,25% em tampão cacodilato pH 7,2 contendo CaCl_2 a 1,0 mM, a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com tampão cacodilato e a pós-fixação foi realizada com solução de tetróxido de ósmio a 1 %, contendo ferricianeto de potássio a 0,8% e CaCl_2 a 5 mM. Após nova lavagem, as células foram desidratadas com acetona pura e posteriormente incubadas em sequência com misturas acetona:epon de proporções 2:1, 1:1 e 1:2 e ao fim, emblocadas em resina Epon 812. Com o bloco de resina pronto, cortes ultrafinos foram obtidos com ultramicrótomo com lâmina de diamante e coletados em grades de cobre de 300 mesh, tratados com acetato de uranila e citrato de chumbo como contrastantes. As grades foram então observadas em microscópio eletrônico de transmissão.

4.7.3 - Morfometria de Corpos Lipídicos

A análise morfométrica associada à MET é capaz de prover importantes informações acerca do conteúdo e características das organelas no citoplasma de uma célula, através da análise de cortes ultrafinos. A morfometria se baseia na relação existente entre as medidas obtidas em secções transversais de uma estrutura e o volume real da mesma. Em outras palavras, é possível inferir quantitativamente sobre o volume de organelas e células através da determinação da área das mesmas em cortes ultrafinos (WEIBEL, 1969). Os corpos lipídicos presentes nas células A549

observados na MET foram analisados nestes cortes ultrafinos de MET através do método descrito previamente por Miranda e colaboradores (2004). O número, a área e o diâmetro dos corpos lipídicos foram determinados no citoplasma de células A549 sem tratamento e 24 h após o tratamento com 1,2 C de FA. Pelo menos 45 células observadas nos cortes ultrafinos foram analisadas com a ajuda do software ImageJ (National Institutes of Health, USA). A densidade volumétrica dos corpos lipídicos foi expressa como percentual do volume celular ocupado por estas organelas em células controle e tratadas.

4.7.4 - Microanálise Elementar por Raios X dos Corpos Lipídicos

A composição qualitativa do conteúdo dos corpos lipídicos foi determinada pela microanálise por raios X nos cortes ultrafinos de MET. Essa técnica baseia-se na propriedade dos átomos emitirem raios X quando submetidos a um feixe de elétrons. A energia e a quantidade dos raios X variam de acordo com as diferentes configurações eletrônicas de cada elemento químico, de forma que a análise das características destes raios permite caracterizar os elementos químicos presentes na amostra. A impregnação dos corantes e contrastantes utilizados no preparo de amostras para MET ocorre de acordo com as características químicas originais das estruturas da célula. Assim, a análise espectrométrica de raios X para determinar os elementos químicos impregnados em cada região dos cortes ultrafinos permite estudar e mapear a composição química predominante de organelas.

Os espectros de dispersão de energia de raios X foram obtidos como descritos previamente (MIRANDA et al., 2004), a partir da análise de cortes de 100 nm de espessura em um microscópio eletrônico de transmissão operando a 80 kV com

emissão de corrente de aproximadamente 7,5 μ A. Os raios X foram coletados por 100 segundos numa extensão de 0 a 10 KeV de energia e resolução de 10 eV por canal, utilizando um detector de Li-Si com uma janela de proteção NORVAR. O mapeamento elemental dos cortes ultrafinos foi adquirido utilizando a mesma intensidade de corrente por 120 minutos, com uma resolução de 256 x 256 pixels e um tempo de permanência de 50 μ s. As análises foram realizadas no software NSS 2.3 (Thermo Fisher Scientific, EUA), onde os dados das células tratadas e não-tratadas foram comparados.

4.8. – Estudo da Função Respiratória: Respirometria de Alta Resolução

A fim de avaliar os efeitos do tratamento com FA sobre a função mitocondrial e o metabolismo oxidativo nas células A549, foi utilizada a técnica de respirometria de alta resolução. Neste método, emprega-se o oxígrafo, equipamento capaz de medir consumo de oxigênio e suas pequenas variações em amostras vivas. Para isso, ele dispõe de um sensor polarográfico de oxigênio de alta sensibilidade posicionado numa câmara hermética onde a amostra é depositada. Acoplado a um computador com o software Oroboros O2k, as variações de concentração de oxigênio na câmara são medidas em tempo real e o consumo pela amostra é calculado por diferença (GNAIGER, 2001).

Os efeitos do FA sobre a função respiratória das células A549 foram avaliados imediatamente e 24 h após o tratamento com 1,20 C, utilizando o protocolo para células íntegras descrito por Hutter e colaboradores (2004). Foram utilizadas 5×10^5 células para cada análise na câmara, suspensas em DMEM sem SFB. A respiração basal das células tratadas e não tratadas foram medidas a 37 °C. Para a avaliação de

diferentes parâmetros respiratórios, diferentes inibidores da OXPHOS foram subsequentemente adicionados a esta mesma amostra na câmara do oxígrafo e seus efeitos sobre o consumo de oxigênio foram observados. Primeiramente, a respiração independente de oligomicina foi determinada adicionando-se oligomicina, um inibidor da ATP sintase, na concentração de 2 µg/mL. A respiração acoplada à síntese de ATP foi calculada pela diferença entre a respiração basal e a independente de oligomicina. Na sequência, a capacidade respiratória máxima foi determinada pela titulação com FCCP, uma base fraca capaz de carrear os prótons do espaço intermembranar através das membranas, agindo como um desacoplador da OXPHOS. A capacidade respiratória máxima foi alcançada com concentrações de FCCP entre 0,2 e 0,4 µM. Por fim, a respiração mitocondrial foi inibida de forma irreversível pela adição de 1 mM de KCN, um inibidor da citocromo oxidase, a enzima responsável pelo consumo do oxigênio na OXPHOS. Nesta última etapa, o consumo residual de oxigênio resultante representa o consumo não-mitocondrial de oxigênio, ou seja, o consumo realizado por outras organelas e processos bioquímicos celulares independentes da mitocôndria (AMOEDO et al., 2011).

4.9 – Estudo do Potencial Transmembrana Mitocondrial: Citometria de Fluxo

Os efeitos do tratamento com FA sobre o $\Delta\Psi_m$ foram estudados por citometria de fluxo utilizando como marcador o corante catiônico Rodamina 123 (Rho123). Este corante se acumula em locais com alto potencial, ou seja, principalmente o espaço transmembrana mitocondrial. Dessa forma, o acúmulo de Rho123 nas células é proporcional ao $\Delta\Psi_m$, o que é quantificado por citometria através da intensidade de fluorescência emitida pela Rho123 após excitação.

O $\Delta\Psi_m$ foi analisado imediatamente, 18 e 24 h após o tratamento com 1,20 C de FA, por metodologia previamente descrita (CHEN et al., 2009, LIN et al., 2012) com algumas adaptações. As células foram coletadas com tripsina como descrito previamente e uma suspensão contendo 5×10^4 células foi incubada por 30 min com Rho123 a 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 500 μL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo utilizando o leitor FL-1. Os efeitos do tratamento elétrico sobre o $\Delta\Psi_m$ foram comparados ao do desacoplador FCCP, que foi adicionado às células na concentração de 5 μM , imediatamente antes da incubação com Rho123 (KEJI et al., 2000).

5 - RESULTADOS

5.1 - Viabilidade celular

5.1.1 - Curva de resposta dependente da dose

A viabilidade das células A549 frente a doses progressivas de FA é mostrada nas Figuras 9 e 10, pelos métodos do MTT e do azul de tripan, respectivamente. Foi evidenciada uma mortalidade celular proporcional à dose aplicada, imediatamente após o tratamento. Pelo método do MTT, após doses na faixa de 0,72 a 2,16 C a viabilidade celular foi reduzida entre 34% e 56%, apesar de não haverem diferenças estatisticamente significativas entre essas doses neste experimento ($p > 0,05$).

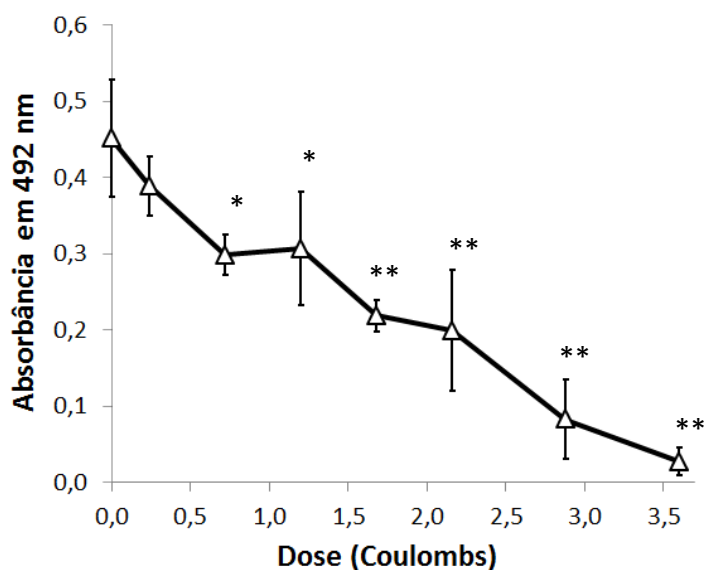


Figura 9: Viabilidade de células A549 imediatamente após doses crescentes de FA de CE pelo método do MTT. Diferenças em relação ao controle sem tratamento (dose = 0,0): * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$. Valores representam médias \pm desvios padrão de cinco experimentos independentes.

Já pelo azul de tripan, quedas significativas no número de células viáveis foram detectadas em doses menores, ocorrendo uma queda de 83% na viabilidade após 1,68

C. Comparativamente, uma redução de 80% na viabilidade quantificada pelo MTT só foi encontrada após tratamento com 2,88 C. A viabilidade celular no sobrenadante de tratamento revelou um número bem pequeno de células e, em sua maioria, não viáveis (Figura 12).

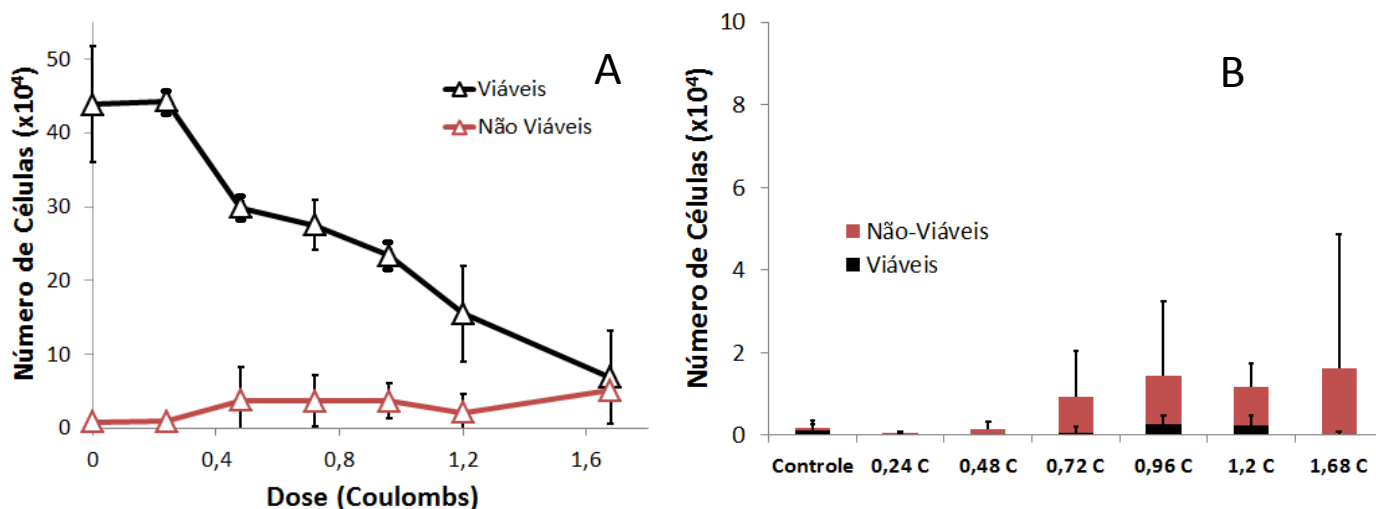


Figura 10: Quantificação pelo azul de tripan da viabilidade de células A549 após exposição a doses crescentes de FA. A) Células tratadas com FA. B) Células no sobrenadante após tratamento com FA. Valores representam médias \pm desvios padrão de cinco experimentos independentes.

5.1.2 - Participação de espécies reativas de oxigênio no dano causado pelo FA

A fim de avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio no dano induzido pelo FA, a viabilidade celular foi medida imediatamente após o tratamento na presença de glutathiona em diversas concentrações. Nenhuma das concentrações testadas exerceu efeito significativo sobre a viabilidade celular após tratamento com 1,2 C. No entanto, concentrações crescentes de glutathiona preveniram a queda da viabilidade celular após o tratamento com 2,88 C (Figura 11).

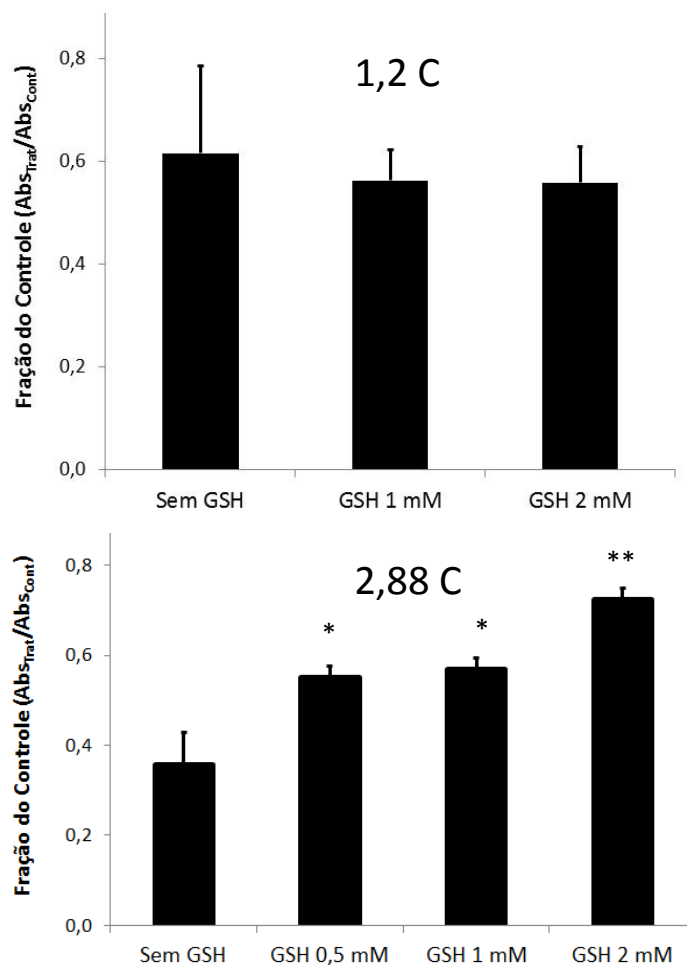


Figura 11: Viabilidade de células A549 após 1,2 e 2,88 C de FA de CE na presença de concentrações crescentes de glutatona reduzida (GSH) pelo método do MTT. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao tratamento sem GSH. Valores representam o quociente entre as absorbâncias das condições experimentais sobre a do controle não tratado; Médias \pm desvios padrão de três experimentos independentes.

5.1.3 - Curva de resposta tardia ao tratamento elétrico

Os efeitos tardios do tratamento com FA sobre a viabilidade celular foram avaliados depois de tempos crescentes de incubação em meio de cultura novo após o tratamento com 1,2 C (Figuras 12A e 12B). Após a esperada queda de absorbância imediata nas células tratadas com FA, observa-se uma recuperação da viabilidade celular, com perfil de crescimento semelhante à tendência do controle até 18 h após o

tratamento. No entanto, uma brusca queda acontece entre 18 e 24 h, de forma que a viabilidade atinge valores comparáveis aos das células que foram expostas à cisplatina 50 μM . Este padrão foi observado em ambas as técnicas (MTT e azul de tripan), com a diferença de que com 18 h a absorbância das amostras no MTT foi próxima à das células controle ($p > 0,05$), enquanto o número de células viáveis pelo azul de tripan neste tempo de tratamento foi aproximadamente a metade do controle. Vale lembrar que as células tratadas com FA não estavam mais expostas à corrente elétrica nem em contato com seus produtos eletrolíticos, diferentemente do tratamento com cisplatina, na qual o quimioterápico é mantido em contato durante toda a incubação.

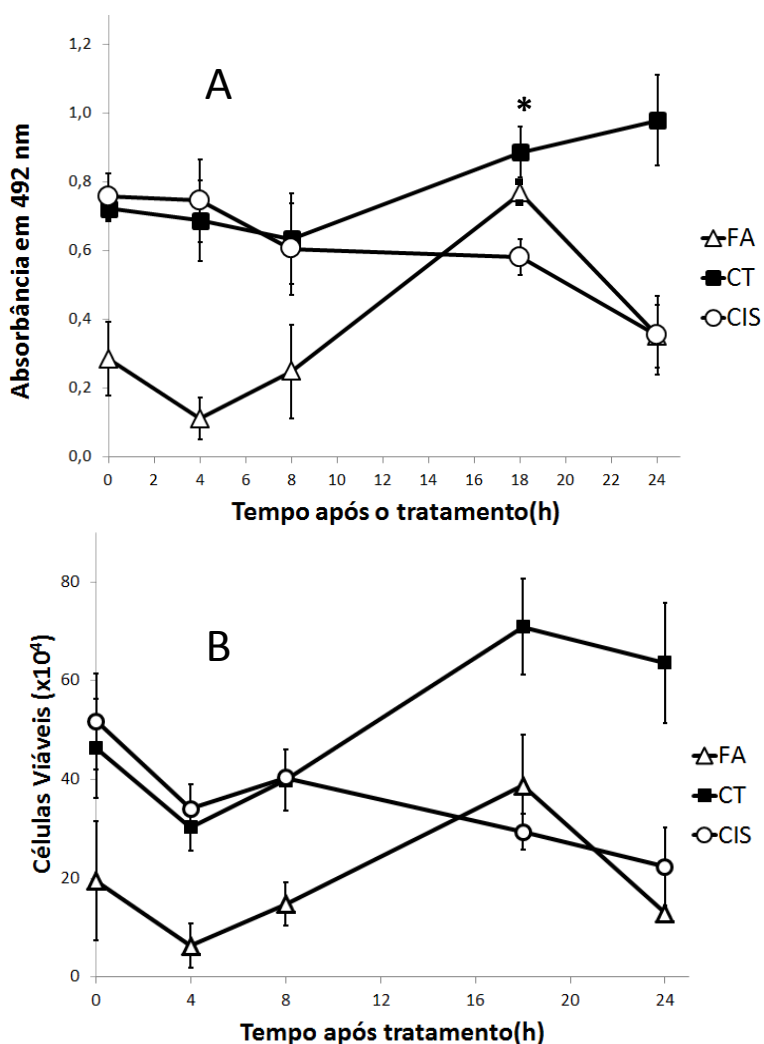


Figura 12: Viabilidade de células A549 em tempos posteriores ao tratamento com 1,20 C de FA de CE. A) Pelo método do MTT. B) Pelo método do azul de tripan. FA: fluxo anódico; CT: controle sem tratamento; CIS: células incubadas com cisplatina 50 μM ao longo dos respectivos tempos. Valores representam médias \pm desvios padrão de cinco experimentos independentes.

5.2 - Atividade enzimática de caspase-3

A atividade de caspase-3 ao longo do tempo após o tratamento foi avaliada por método espectrofotométrico (Figura 13). Observa-se um pico de atividade desta enzima 18 h após o tratamento com FA, o qual é o dobro da atividade das células controle não tratadas. No entanto, a atividade desta enzima retorna aos níveis normais após 24 h de pós-tratamento. Em paralelo, a atividade de caspase-3 aumentou proporcionalmente ao tempo de contato das células A549 com cisplatina a 50 μM .

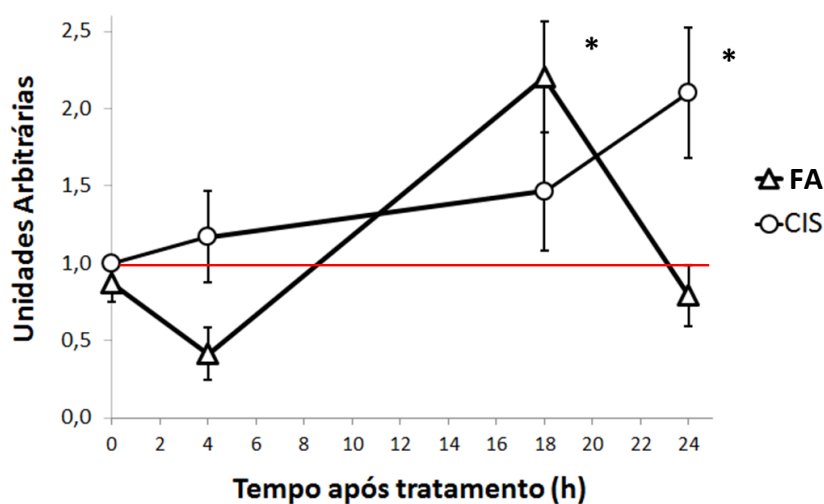


Figura 13: Atividade enzimática de caspase-3 por método espectrofotométrico. Controle = 1 (linha vermelha). * $p < 0,05$ em relação aos outros valores. Valores representam médias \pm desvios padrão de cinco experimentos independentes.

5.3 - Estudo do potencial transmembranar por citometria de fluxo

O potencial transmembranar das células A549 tratadas com FA (1,2 C) foi estudado por citometria de fluxo em diversos tempos após o tratamento (Figura 14). Observou-se um aumento no percentual de células com perda de potencial transmembranar, localizadas no quadrante superior esquerdo dos diagramas, com intensidade de fluorescência reduzida. Logo após o tratamento, houve um aumento no número de células com um potencial reduzido; entretanto não foi possível identificar populações bem definidas, o que é demonstrado por uma distribuição difusa dos eventos no diagrama. Já nos tempos de 18 e 24 h, foi observado um aumento semelhante de células com perda de potencial, mas com uma população celular claramente distinta das células com mitocôndrias preservadas. O percentual de células com perda de potencial praticamente triplicou em relação ao controle, tanto imediatamente após o tratamento quanto em tempos subsequentes de pós tratamento (18 e 24 h), atingindo níveis pouco inferiores aos de células tratadas com o desacoplador mitocondrial FCCP (Figura 14).

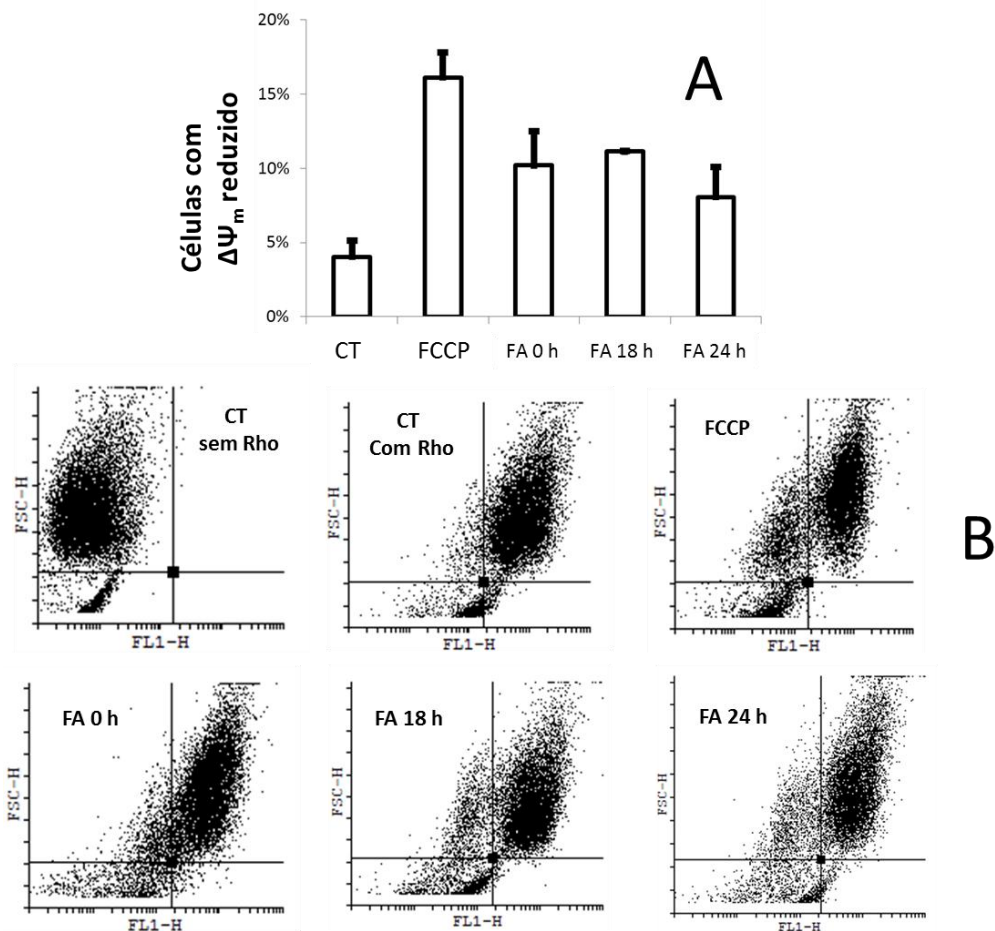


Figura 14: Análise de $\Delta\Psi_m$ de células A549 por citometria de fluxo em diferentes tempos após tratamento com 1,20 C de FA. A) Percentual de células com $\Delta\Psi_m$ reduzido após diferentes tempos de incubação. Valores representam o percentual da população celular no quadrante superior esquerdo de cada diagrama de pontos; média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. B) Diagramas de pontos representativos de cada situação experimental. FA: fluxo anódico; FCCP: células tratadas como desacoplador FCCP a 5 μ M; CT: células controle sem tratamento.

5.4 - Estudos morfológicos

5.4.1 - Microscopia ótica

O estudo morfológico das células tratadas com FA revelou profundas alterações na estrutura celular (Figura 15). Após 24 h de pós-tratamento, a análise por microscopia ótica de contraste de fase a fresco mostrou uma perda da morfologia

usual das células A549, que adquiriram uma forma arredondada, com perda da confluência da monocamada da cultura (Figura 15B). Num maior aumento, podem ser observadas estruturas com padrão sugestivo de apoptose (figura 15D - setas).

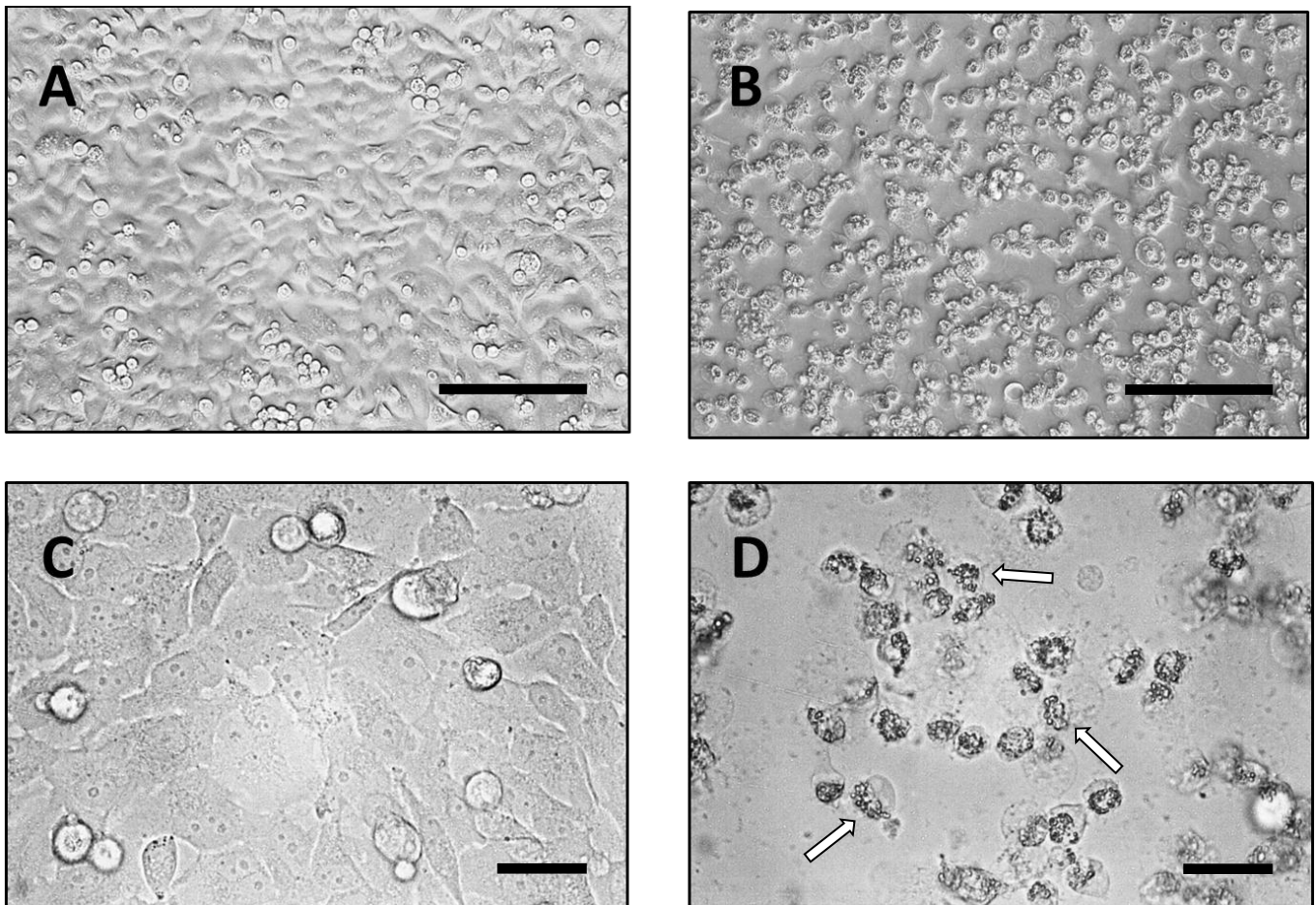


Figura 15: Fotomicrografias de contraste de fase de células A549. A) células controle sem tratamento. B) 24 h após o tratamento com 1,20 C. Micrografias de campo claro de células A549. C) células controle sem tratamento. D) 24 h após o tratamento com 1,20 C; Setas: células com padrão sugestivo de apoptose. Barras de escala: 10 μm (A e B) e 2 μm (C e D).

5.4.2 - Microscopia eletrônica de transmissão e morfometria

A análise por microscopia eletrônica de transmissão também revelou diversas alterações ultraestruturais (Figura 16). Imediatamente após o tratamento, foram evidenciadas modificações importantes na ultraestrutura das mitocôndrias, como desorganização das cristas (Figura 16B – setas negras) e inchaço da matriz (Figura 16B - detalhe), culminando com destruição completa desta organela (Figura 16B - estrela). Entretanto, tais alterações parecem ser reversíveis, uma vez que 24 h após o tratamento, nenhuma alteração significativa foi observada na ultraestrutura mitocondrial (Figura 16C). Em contrapartida, um grande número de figuras de mielina (Figura 16D – setas brancas finas) e corpos lipídicos (setas brancas grossas) foram encontrados no citossol destas células. A análise morfométrica dos cortes ultrafinos indicou um aumento de cerca de três vezes no número de corpos lipídicos em relação ao controle (Figura 17A). Em contrapartida, o diâmetro médio destes corpos lipídicos foi significativamente menor nas células tratadas (controle: $1,051 \pm 0,200 \mu\text{M}$; 24 h pós-tratamento: $0,766 \pm 0,193 \mu\text{M}$), mas ainda assim o volume das células ocupado por corpos lipídicos ainda é maior 24 h após o tratamento (Figura 17B).

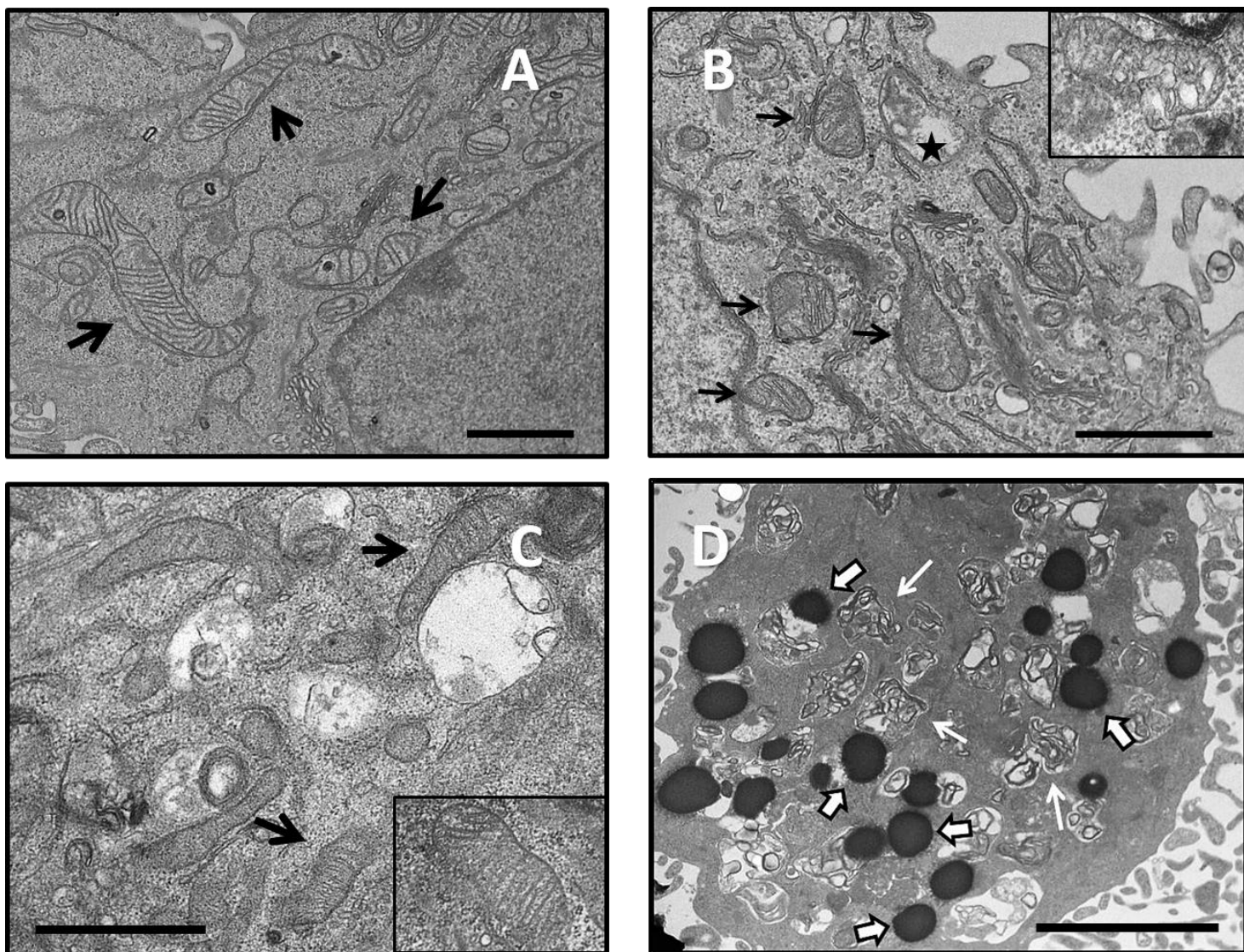


Figura 16: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de cortes ultrafinos de células A549. A) controle sem tratamento; B) imediatamente após 1,20 C de FA; C) e D) 24 h após 1,20 C de FA. Setas negras em A, B e C: mitocôndrias; estrela negra em B: mitocôndria inchada e destruída; inset em B: mitocôndria com inchaço de matriz; setas brancas grossas em D: corpos lipídicos; setas brancas finas em D: figuras de mielina. Barras de escala: A, B e C, 1 μm ; D, 2 μm .

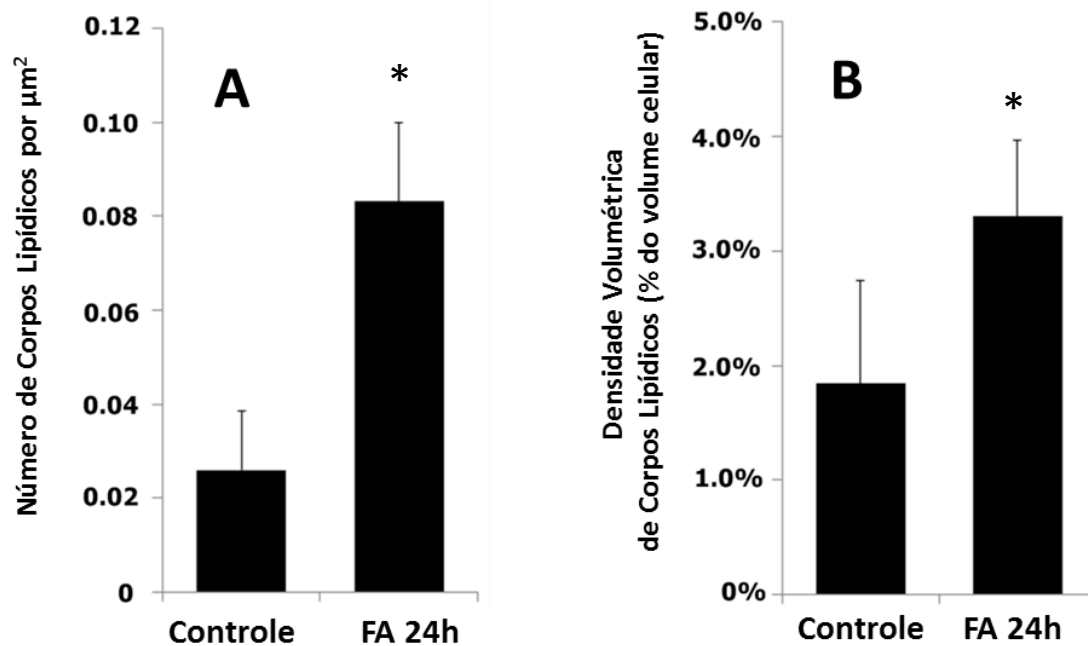


Figura 17: Quantificação de corpos lipídicos por morfometria de cortes ultrafinos de MET. A) Número de corpos lipídicos por superfície celular. B) Percentual total de ocupação do volume celular pelos corpos lipídicos. Valores representam médias \pm desvios padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.4.3 - Microanálise elementar por raios-X dos corpos lipídicos

A microanálise elementar por raios-X dos cortes ultrafinos evidenciou que estas organelas impregnam predominantemente ósmio, em igual teor independentemente do tratamento. Isto indica um conteúdo rico em lipídios insaturados nestes corpos lipídicos (Figura 18).

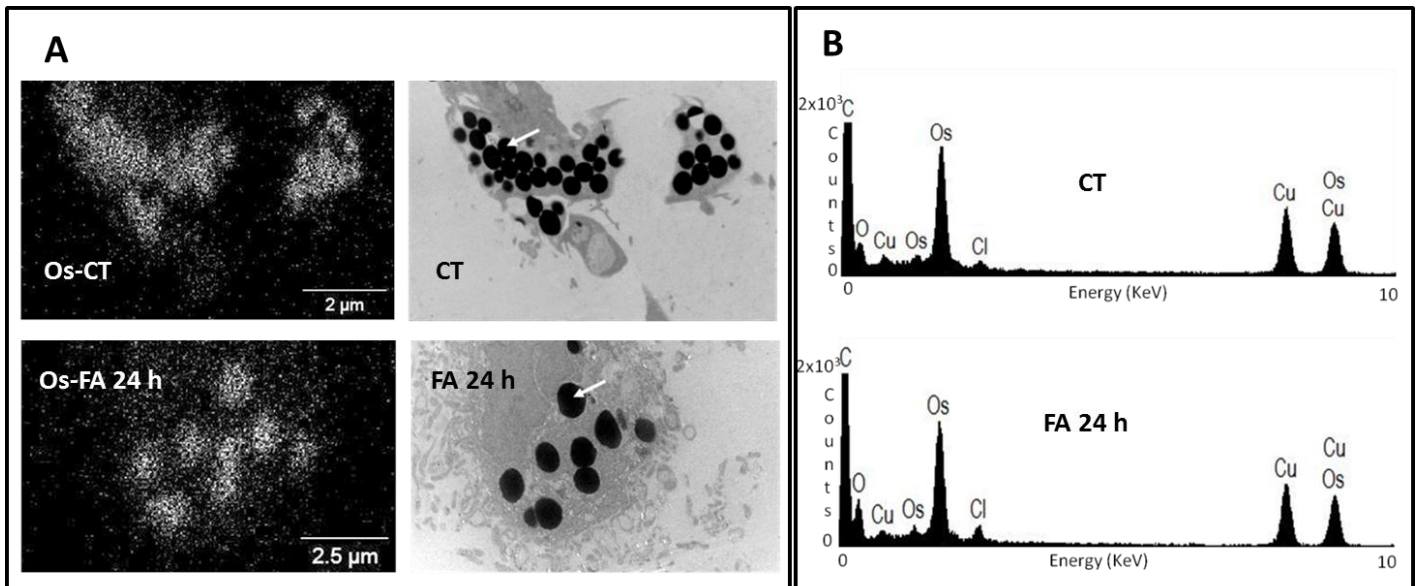


Figura 18: Análise elementar por raios X da composição de corpos lipídicos de células A549. A) Mapeamento elemental, mostrando a localização de áreas com maior densidade de ósmio (Os-CT e Os-FA 24 h – micrografias da esquerda) nos respectivos cortes ultrafinos do controle (CT) e células 24 h após tratamento com FA 1,20 C. B) microanálise qualitativa dos corpos lipídicos. Os dados mostram as mesmas contagens de ósmio (Os) em ambas as condições.

5.5 - Consumo celular de oxigênio

A respirometria de alta resolução revelou algumas interessantes alterações na função respiratória das células tratadas com FA (Figura 19). Imediatamente após o tratamento, a função mitocondrial foi substancialmente prejudicada, com respiração basal (R_{RO}), capacidade respiratória máxima (ETS) e respiração acoplada à síntese de ATP (R_{ATP}) reduzidos aproximadamente à metade quando comparados às células não tratadas (Figura 19A). Entretanto, após 24 h, o panorama foi bem diferente (Figura 19B). As células tratadas apresentaram uma capacidade máxima de respiração aumentada em cerca de 50 %. Além disso, observou-se um aumento no consumo não-mitocondrial de oxigênio (R_{OX}) que triplicou em relação ao das células controle,

respondendo por um percentual bem maior da respiração basal como mostrado na Tabela 2 (45,3% nas células 24 h após FA contra 20,3% nas células não tratadas).

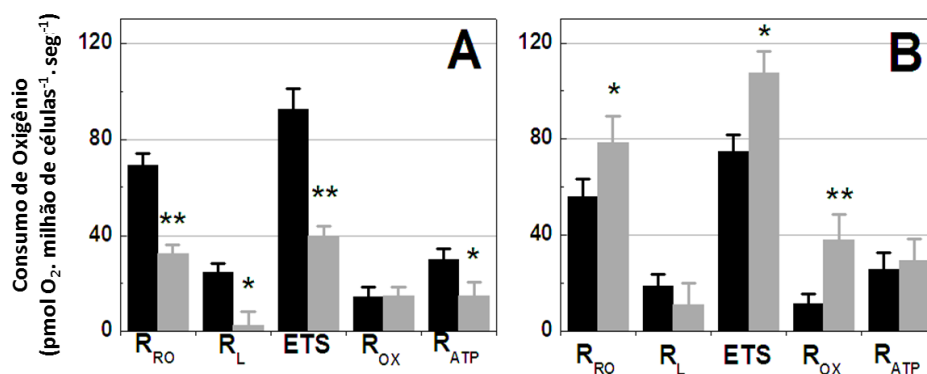


Figura 19: Parâmetros respiratórios das células A549 determinados por respirometria de alta resolução. Respiração basal (R_{RO}), respiração na presença de oligomicina (R_L), capacidade respiratória máxima (ETS), consumo residual de oxigênio (R_{OX}) e respiração acoplada à síntese de ATP (R_{ATP}). A) efeitos imediatos do tratamento com 1,20 C de FA. B) 24 h após o tratamento com 1,20 C de FA. Barras pretas: células controle sem tratamento; barras cinza: tratadas com FA. Os valores representam as médias \pm de seis experimentos independentes com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle.

Tabela 2: Componentes do consumo de oxigênio basal (R_{RO}) de células A549. A respiração mitocondrial foi calculada pela diferença entre R_{RO} e o consumo residual de oxigênio (R_{OX}).

	Respiração basal (R_{RO})			
	Respiração mitocondrial		R_{OX}	
	O_2 Cons*	% of R_{RO}	O_2 Cons*	% of R_{RO}
Controle	42.74 \pm 6.28	79.7%	10.89 \pm 3.29	20.3%
FA 24 h	38.62 \pm 7.02	54.7%	32.03 \pm 5.03	45.3%

* pmol O_2 · milhão de células⁻¹ · sec⁻¹

6 - DISCUSSÃO

A linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 mostrou-se mais resistente ao tratamento com FA quando comparadas a tipos celulares utilizados em outros estudos, como mastocitoma murino P815 (VEIGA et al., 2000), células de leucemia promielocítica aguda humana HL60 (VEIGA et al., 2005) e melanoma murino B16F10 (CAMPOS et al., 2010). Ou seja, a viabilidade destas células caiu a níveis menores do que a das células A549 submetidas às mesmas doses. Isso sugere uma capacidade maior desta linhagem em resistir aos agentes lesivos da CE, como espécies reativas de oxigênio e cloro ou variações de pH.

A viabilidade pelo método azul de tripan não evidenciou o aumento proporcional esperado no número de células não-viáveis em doses crescentes. Isso nos levou a aventar a possibilidade de que as células estivessem sendo desprendidas do substrato. No entanto, as medidas de viabilidade celular no sobrenadante das células após tratamento revelaram que o número de células que se desprendem do substrato, além de pequeno, é composto apenas de células mortas (Figura 10). Isso sugere que o risco de liberação de células tumorais viáveis pelo tratamento, o que poderia se configurar como um risco de facilitação de disseminação tumoral, é bem baixo quando o tratamento é feito nas condições avaliadas neste estudo. Além disso, a queda na viabilidade avaliada imediatamente após o tratamento, sem o aparecimento de células não-viáveis em quantidade proporcional, parece ser devida exclusivamente à lise necrótica.

Sabe-se que tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o tratamento com CE produz uma necrose imediata, pois promove alterações de pH e geração de produtos de eletrólise

(NILSSON et al., 2000; VEIGA et al., 2000; VEIGA et al., 2005). No entanto, este efeito não é totalmente desejável na ETT, pois pode provocar dor e queimaduras. Mais do que isso, a necrose promove reação inflamatória que, dependendo da intensidade, pode resultar em consequências sistêmicas perigosas para o paciente. No pior panorama, a extensa destruição de células tumorais pode produzir a chamada síndrome da lise tumoral, uma condição onde a liberação sistêmica massiva de eletrólitos e demais conteúdos intracelulares pode causar toxicidade sistêmica com risco de vida (GRIFFIN et al., 1994; McCURDY & SHANHOLTZ, 2012). Uma das propriedades que fazem da ETT uma promissora terapia é a redução do crescimento do tumor ou mesmo sua regressão dias ou mesmo meses após uma única sessão, como observado nos estudos clínicos de sucesso (NORDENSTRÖM, 1978; XIN & LIU, 1994; XIN et al., 1997; VOGL et al., 2007). Dessa forma, o ideal para a técnica seria encontrar a dose capaz de deflagrar este efeito tardio duradouro, produzindo o mínimo de necrose possível. Considerando este raciocínio e com base nos estudos de viabilidade imediata, foi escolhida a dose de 1,20 C para avaliar estes efeitos tardios nas células que sobreviveram à agressão inicial promovida pelo tratamento.

O perfil de viabilidade celular observado após o tratamento mostrou um comportamento interessante, até então nunca previamente observado em outras linhagens celulares testadas. Apesar do estresse produzido pelo FA, as células parecem manter seu ritmo de crescimento semelhante ao controle até 18 h após o tratamento, a julgar pela ascendência da viabilidade ao longo do tempo observada (Figura 12). No entanto, a queda brusca de viabilidade entre 18 e 24 h sugere a deflagração tardia de algum mecanismo de morte celular neste intervalo de tempo pós-tratamento. Outras linhagens apresentaram este perfil sugestivo de inibição de crescimento 24 h após o

tratamento, como o melanoma murino B16F10 (CAMPOS et al., 2010), as linhagens leucêmicas K562 (HOLANDINO et al., 2001) e HL60 (VEIGA et al., 2005). No entanto, exceto no estudo com esta última linhagem, nenhum dos desenhos experimentais contemplou os tempos anteriores a 24 h, o que não permitiu observar este fenômeno de variação da viabilidade nas primeiras horas após o tratamento. Essa informação nos conduz à hipótese de que haja uma possível inibição da proliferação celular, associada a um ou vários mecanismos adicionais de morte. A existência destes mecanismos tardios corroboraria as observações dos casos de sucesso clínico da ETT, onde ocorre regressão tumoral dias ou mesmo meses após a sessão de ETT (XIN et al., 1997). Um desses mecanismos é a apoptose induzida pelo FA descrita previamente nas células HL60 a partir de 4 h de pós-tratamento (VEIGA et al., 2005). A observação do padrão de fragmentação do DNA fortalece a hipótese de que esta é uma via envolvida, ao menos em parte, por esse fenômeno tardio. Isso nos levou a aprofundar a investigação sobre este mecanismo específico no presente estudo.

Os resultados de atividade de caspase-3 e das análises do $\Delta\Psi_m$ reforçaram a hipótese da participação da apoptose como mecanismo de morte induzido tardiamente pela ETT. O pico de atividade observado desta enzima (Figura 13) sugere que um ponto chave da dinâmica de efeito tardio da CE acontece por volta de 18 h após o tratamento com FA. O aumento da atividade de caspase-3 precede a brusca queda de viabilidade celular, o que sugere uma possível participação da apoptose mediada por caspases neste fenômeno. Ainda assim, outros parâmetros precisam ser estudados como a análise de expressão de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, por meio de marcação com anexina-V-FITC e análise por citometria de fluxo, para comprovação inequívoca desta hipótese.

Os perfis observados no estudo do $\Delta\Psi_m$ trouxeram importantes informações sobre os efeitos da CE. O percentual de células com $\Delta\Psi_m$ reduzido aumentou imediatamente após o tratamento e assim se manteve ao longo de todos os tempos estudados. Mas o perfil de distribuição das células no diagrama populacional diferiu visivelmente, o que leva a algumas ponderações acerca dos possíveis mecanismos que levaram a essa perda de $\Delta\Psi_m$. Associados às observações da MET, esses dados sugerem que os efeitos do FA sobre as mitocôndrias parecem ser diferentes ao longo do tempo de pós-tratamento elétrico.

Imediatamente após o tratamento, as células no quadrante superior esquerdo apresentaram marcação com Rho123 que parece ser linearmente proporcional à perda de volume celular (parâmetro dado pelo eixo das ordenadas – FSC). Essa perda de volume celular foi já observada em estudos morfológicos feitos com outras linhagens celulares tratadas com FA (HOLANDINO et al., 2001; VEIGA et al., 2000, 2005) e na própria A549 (TEIXEIRA, 2010). Assim, a menor retenção de Rho123 pode se dar simplesmente por essa perda imediata de volume. Em contrapartida, sabe-se que o acúmulo de EROS pode promover inchaço das cristas mitocondriais, devido à ativação do PTPC, no processo chamado de transição de permeabilidade de membrana (TPM). A ativação prolongada do PTPC, que usualmente funciona como um canal de transporte controlado de substratos através das membranas mitocondriais, causa um intenso fluxo de solutos para dentro da matriz. Esta condição pode levar ao inchaço da mitocôndria, culminando na ruptura de sua membrana externa, perda de $\Delta\Psi_m$ e liberação das proteínas deflagradoras de apoptose presentes no espaço intermembranar (FULDA, GALLUZZI & KROEMER, 2010). Este mecanismo também pode responder pelos resultados observados no estudo do $\Delta\Psi_m$ e o inchaço de matriz

mitocondrial observado por MET imediatamente após o tratamento com FA. A produção de cloraminas pode provocar PMEM por ativação do PTPC como previamente descrito (KLAMT et al., 2009), o que suporta parcialmente esta hipótese. No entanto, uma abordagem experimental mais específica deste mecanismo é necessária para uma avaliação mais precisa.

Adicionalmente, considerando os tempos de 18 e 24 h pós-tratamento, a citometria de fluxo permitiu caracterizar uma população bem definida, com tamanho preservado, mas apresentando perda de $\Delta\Psi_m$ em relação às células normais. Além disso, estas células não apresentaram alterações morfológicas em suas mitocôndrias. Este perfil de perda de $\Delta\Psi_m$ sem inchaço de matriz mitocondrial pode ser produzido por mecanismos distintos do TPM, sem envolvimento da PTPC. A permeabilização da membrana externa mitocondrial pode ser produzida por membros pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 que, uma vez ativados por estímulos pró-apoptóticos, translocam-se do citosol para a membrana mitocondrial e se associam para formar poros (KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007). A ativação de caspase-3 observada no tempo de 18 h corrobora esta observação, que poderia evidenciar um papel importante da apoptose deflagrada a partir da mitocôndria, como um dos efeitos tardios do tratamento com FA. Na sequência temporal, a ligeira queda no número de células com perda de $\Delta\Psi_m$ observada após 24 h em relação ao tempo anterior de 18 h aponta para um decréscimo da ocorrência de apoptose, assim como observado com a atividade de caspase-3. Por fim, para confirmar a ocorrência da apoptose por via intrínseca, é necessário avaliar os pontos de conexão entre esta despolarização da mitocôndria e a ativação de caspase-3, como a caspase-9 e as proteínas da família Bcl-2, tanto as pró quanto anti-apoptóticas (KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007).

O aumento do número de corpos lipídicos após a indução da apoptose já foi previamente descrito na literatura (HAKUMÄKI et al., 1999). Um interessante estudo de Boren & Brindle (2012) caracterizou a relação do acúmulo de corpos lipídicos com a disfunção mitocondrial e apoptose induzida por etoposídeo, um quimioterápico comum na terapêutica, em células de linfoma murino. Os pesquisadores mostraram que o quimioterápico aumentava a produção de EROs pela mitocôndria e que este estresse oxidativo inibia a β -oxidação de ácidos graxos. Os ácidos graxos livres no citossol, não sendo utilizados como fonte de energia pela β -oxidação mitocondrial, são redirecionados para incorporação em triacilgliceróis para armazenamento, justificando o aumento do número de corpos lipídicos (BOREN & BRINDLE, 2012). Desta forma, o aumento de corpos lipídicos nas células pós-tratamento pode corroborar os achados sugestivos de apoptose, como a atividade de caspase-3 e a morfologia característica observada na microscopia ótica. Assim, este mecanismo poderia eventualmente responder por parte do efeito tardio do tratamento com FA. É necessário avaliar se este aumento dos corpos lipídicos promovidos pela CE ocorre em tempos anteriores a 24 h, bem como caracterizar o perfil de metabolismo de ácidos graxos nestes tempos subsequentes ao tratamento.

Inúmeros estudos vêm caracterizando os corpos lipídicos como organelas dotadas de complexidade funcional que vai além do simples armazenamento de ácidos graxos na forma esterificada (FARESE & WALTHER, 2009; BOZZA & VIOLA, 2010). Estas organelas abrigam uma série de enzimas relacionadas à síntese de eicosanoides, e seu aumento em número está fortemente associado com o aumento de produção de mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas (ACCIOLLY et al., 2008). A alta impregnação de ósmio observada pela análise de raios X

dessas organelas (Figura 18) mostra que os corpos lipídicos das células A549 são ricos em lipídios insaturados. Sabe-se que ácidos graxos livres no citoplasma, incluindo o ácido araquidônico, podem deflagrar apoptose (CAO et al., 2000) e os corpos lipídicos podem desempenhar um importante papel na remoção destes lipídios do citossol, armazenando-os em suas formas esterificadas ou, no caso do ácido araquidônico, convertendo-o em prostaglandinas. Este é um dos mecanismos descritos como possíveis participantes da habilidade de escape de apoptose desenvolvida pelas células tumorais (CAO et al., 2000; ACCIOLLY et al., 2008). Considerando os dados sugestivos de apoptose observados 24 h após o tratamento com FA no presente estudo, pode-se sugerir que esse aumento na quantidade de corpos lipídicos seja uma resposta ao tratamento, talvez na tentativa de proteger as células de um risco de apoptose mediado pelo acúmulo aumentado de ácido araquidônico ou outros ácidos graxos livres no citossol. Por outro lado, o acúmulo de corpos lipídicos pode representar um aumento na síntese de ácidos graxos, que já foi associado a uma maior malignidade em alguns tipos de tumores (SWINNEN et al., 2006; KUHAJDA, 2006). O eventual papel do ácido araquidônico e do metabolismo de ácidos graxos devem ser especificamente investigados para ajudar a compreender o real significado biológico deste aumento de corpos lipídicos induzido pelo FA.

Os estudos da OXPHOS por oxigrafia de alta resolução demonstraram importantes alterações nos parâmetros respiratórios das células A549 tratadas com FA (Figura 19). Imediatamente após o tratamento, o estado de comprometimento respiratório das células A549 é consoante com as drásticas alterações observadas na análise ultraestrutural. Isso pode estar associado a duas possíveis causas: uma redução no número de mitocôndrias funcionais por destruição destas organelas; um prejuízo

funcional dos complexos da OXPHOS; ou ainda uma combinação de ambos. Estas células apresentaram um consumo reduzido de oxigênio e uma capacidade reduzida de respiração máxima.

O aumento substancial observado na capacidade respiratória das células A549 24 h após o tratamento com FA sugere efeitos interessantes da CE no metabolismo oxidativo. Já foi descrito que alguns tipos de câncer de pulmão possuem um número reduzido de mitocôndrias, além de atividade diminuída do complexo I da OXPHOS (BELLANCE et al., 2009). Estas características ajudam a compor o perfil metabólico das células tumorais, onde a obtenção energética pela OXPHOS é diminuída. Sugere-se que a reversão destas duas condições pode levar à morte das células tumorais, por reversão do efeito Warburg (BELLANCE et al., 2009). Ishikawa e colaboradores (2008) vão mais além: a atividade do complexo I, associada à produção de EROs pode regular inclusive a capacidade de metástase das células tumorais, o que situa a disfunção desta proteína e da OXPHOS como crucial no aparecimento e manutenção de importantes características de malignidade dos cânceres.

No entanto, é prudente lembrar que o consumo mitocondrial de oxigênio em situação basal não sofreu alterações significativas 24 h após o tratamento com FA, ainda que estas mitocôndrias fossem capazes de respirar mais. Dessa forma, é cedo para atestar a reversão do efeito Warburg, sendo necessários estudos sobre a via glicolítica e a produção de ATP pelas células tratadas para dissecar estes mecanismos. Além disso, ainda é necessário caracterizar o real envolvimento individual de cada complexo da OXPHOS neste efeito, através de estudos respirométricos com o uso de

substratos específicos para cada complexo da OXPHOS. Isso permitirá avaliar o ponto do maquinário respiratório da mitocôndria sobre o qual age o tratamento com CE.

Além disso, sabe-se que a proteína supressora de tumor p53, silenciada na maioria dos cânceres, age por vários mecanismos para prevenir o desenvolvimento tumoral. Dentre estes mecanismos, podemos destacar o fato da p53 ser uma conhecida deflagradora da apoptose (GREEN & KROEMER, 2009), além de promover a respiração mitocondrial por uma série de mecanismos, incluindo a reversão do efeito Warburg (LAGO et al., 2011). Um dos mais importantes e bem descritos destes mecanismos consiste no aumento da expressão da citocromo C oxidase, o complexo IV da OXPHOS, pela p53 (MATOBA et al., 2006). Além disso, o aumento da expressão da p53 também poderia corroborar a apoptose tardia observada nas células A549 e nas células HL60 detectada no estudo prévio de Veiga e colaboradores (2005); adicionalmente, a p53 também é capaz de modular a biossíntese de ácidos graxos, influenciando indiretamente a formação de corpos lipídicos nas células em apoptose (BOREN & BRINDLE, 2012). Dessa forma, a avaliação dos efeitos do FA sobre a expressão da p53 é um interessante parâmetro a ser avaliado como perspectiva futura, visto que a pluralidade de efeitos desta proteína poderia interconectar os inúmeros achados do presente estudo, tanto no que tange à indução de apoptose quanto às alterações no metabolismo respiratório da linhagem A549.

O parâmetro R_{R0} é composto pela soma do oxigênio utilizado pela OXPHOS e o consumo não-mitocondrial, dado pelo parâmetro R_{OX} , medido por oxigrafia de alta resolução após bloqueio da OXPHOS com KCN. Em nosso modelo, o R_{OX} representou 20,3% do consumo basal de oxigênio das células sem tratamento, o que é consoante

com o observado por Wu e colaboradores (2007), onde o R_{Ox} responde por cerca de 25% da respiração total da linhagem A549. Um dos mais curiosos achados do presente estudo foi o proeminente aumento do R_{Ox} provocado pelo FA nas células A549 após 24 h pós-tratamento, que triplicou em número absoluto e passou a responder por quase metade do consumo basal. Dentre os processos oxidativos não-mitocondriais, pode-se destacar o sistema de transporte de elétrons da membrana plasmática (STEMP). Consiste num processo que ocorre na superfície externa das células, que regenera NADH citoplasmático para alimentar a glicólise (HERST & BERRIDGE, 2007). Como a respiração mitocondrial (i.e. OXPHOS) não se altera após o tratamento com FA, esse aumento no R_{Ox} poderia estar associado a uma tentativa das células tratadas de manter a produção de ATP após uma agressão, o que não pode ser realizado pela mitocôndria devido ao efeito Warburg. As NADPH oxidases são outro grupo de enzimas que se encontram na membrana plasmática e são responsáveis pela produção de EROs a partir do oxigênio em uma série de processos fisiológicos (GEISZT, 2006). O aumento dos níveis de EROs associado a uma atividade aumentada de NADPH oxidases está envolvida no mecanismo de morte tumoral induzida por alguns quimioterápicos, como já foi documentado para o paclitaxel frente a mesma linhagem A549 (ALEXANDRE et al., 2006) e para a cisplatina frente a linhagens de próstata (ITOH et al., 2011). De fato, Wartenberg e colaboradores (2008) descrevem a indução de apoptose mediada por caspase-3 provocada pelo tratamento com campo elétrico; os mesmos autores sugerem que esta morte celular é fortemente mediada pela produção de EROs através da NADPH oxidase. Isso sugere que o FA pode provocar morte celular por mecanismos semelhantes na linhagem de pulmão A549, o que justificaria o aumento do consumo não-mitocondrial de oxigênio. Estas interessantes alterações no

metabolismo oxidativo provocadas pelo tratamento com FA serão mais bem compreendidas após estudos dos efeitos da CE sobre a via glicolítica e sobre o STEMP.

Von Euler descreve os efeitos do pH no dano induzido pela CE como principal responsável pela morte celular na ETT [VON EULER ET AL, 2004]. No entanto, as variações de pH em nosso sistema são bem menores do que as estudadas por estes autores, chegando apenas a 6,5 após 10 min de tratamento com FA (GOMES et al., 2012). Ainda assim, são produzidos efeitos citotóxicos significativos com doses baixas de CE em inúmeras linhagens celulares, sugerindo que as outras espécies químicas geradas pela eletrólise do meio contribuem para a citotoxicidade da CE com importância pelo menos comparável à das variações de pH. De fato, este estudo evidenciou a participação das EROs produzidas por eletrólise do meio pela CE no dano produzido, uma vez que a morte celular foi substancialmente reduzida quando o tratamento foi feito na presença de GSH em concentrações crescentes. No entanto, é possível que o dano provocado pelas EROs seja uma componente das fontes endógenas e exógenas, ou seja, diretamente produzidas pelo FA no meio eletrolítico ou derivadas da produção celular aumentada pelas alterações bioquímicas provocadas pelo tratamento. Ensaios específicos discriminatórios destas fontes trariam importantes informações sobre seu papel no dano induzido pela ETT.

Considerando o discutido até aqui, outro importante ponto de conexão entre estes dados observados que podem caracterizar o mecanismo de ação do FA é a situação do balanço oxirredutor no interior da célula. Como discutido anteriormente, o acúmulo de EROs pode participar de uma boa parte dos efeitos observados no presente estudo, desde as alterações do metabolismo mitocondrial até a deflagração

da apoptose, passando pelo acúmulo de corpos lipídicos. Estas EROs podem estar sendo geradas tanto pela eletrólise do meio de tratamento quanto podem ser produzidas pela própria célula, em decorrência do estresse do tratamento.

Apesar de apontarem tendências equivalentes tanto na análise imediata quanto ao longo do tempo após tratamento, observou-se uma clara discrepância quantitativa entre os resultados de viabilidade celular determinada pelos métodos do MTT e do azul de Tripán para a linhagem A549 (Figuras 9 e 10). Esta discrepância se fez digna de nota em dois aspectos: a brusca queda no número de células aos 14 minutos de tratamento, não acompanhada com proporcional decaimento na quantidade de cristais de formazan produzidos (*i.e.* absorbâncias); equivalência na quantidade de cristais de formazan produzida pelas células tratadas após 18 h em relação às células controle, quando o número de células viáveis nesta mesma condição quantificado pelo azul de Tripán era cerca de 50% menor. Estes dados sugerem que as células tratadas parecem reduzir o MTT a formazan com mais intensidade do que as células sem tratamento. Classicamente, as reações de redução do MTT eram atribuídas majoritariamente a enzimas mitocondriais, especialmente a succinato desidrogenase, que faz parte do Complexo II da fosforilação oxidativa. Alguns autores chegam a atribuir ao método a própria determinação de atividade mitocondrial (SARAVANAN, 2003; VAN MEERLOO, KASPERS & CLOOS, 2011). No entanto, vários mecanismos e locais intracelulares de redução do MTT já foram descritos. Berridge e colaboradores (1993) caracterizaram os principais agentes redutores do MTT como sendo o NADPH e o NADH e suas respectivas desidrogenases. Em contrapartida, a succinato desidrogenase contribuiria de forma discreta na redução do MTT em células viáveis (BERRIDGE, 1996; STOCKERT, 2012). Dessa forma, o maior consumo de MTT pelas

células tratadas pode estar em consonância com o aumento de consumo não-mitocondrial de oxigênio observado pela respirometria, pois pode estar relacionado ao aumento da atividade de enzimas como NADPH desidrogenases ou oxidases, que compõem o STEMP. Para estudar esta hipótese e eventualmente conectar estas observações com os dados obtidos com a respirometria, é necessário aferir o STEMP pelo método específico de WST-1, que é justamente um análogo do MTT, com a diferença de que não é permeável à membrana e é reduzido na face externa da membrana plasmática (HERST & BERRIDGE, 2007).

Além disso, outros estudos determinaram sítios celulares onde ocorrem predominantemente a reação de redução, como o retículo endoplasmático (BERRIDGE, 1996), endossomas, lisossomas e a redução ao nível da membrana plasmática (BERNAS & DOBRUCKI, 2000). Adicionalmente, Stockert e colaboradores demonstraram em estudo bem recente (2012) que os cristais de formazan se depositam preferencialmente nos corpos lipídicos de células da linhagem HeLa. Novamente, segundo este autor, a mitocôndria parece desempenhar papel coadjuvante como sítio de redução do MTT, sendo pouco o acúmulo de MTT, seja em sua forma tetrazólica ou formazan, nestas organelas. Se este comportamento se repetisse na linhagem A549 utilizada em nosso estudo, a quantidade de formazan proporcionalmente maior encontrada nas células 24 h após tratamento com FA poderia estar relacionada à maior quantidade de corpos lipídicos encontrada.

7 - CONCLUSÃO

- As células da linhagem de câncer de pulmão A549 são suscetíveis ao FA;
- O perfil de efeitos provocados pelo FA é diferente ao longo do tempo de pós-tratamento, podendo ser dividido em dois momentos:
 - *Efeitos imediatos:*
 - O risco de liberação de células tumorais viáveis no microambiente após o tratamento com FA nas doses e no modelo estudado é baixo;
 - O dano imediato provocado pelo FA tem forte participação da produção de espécies oxidantes;
 - O FA produz perda funcional e dano estrutural significativo sobre as mitocôndrias das células;
 - *Efeitos tardios:*
 - O efeito tardio do FA inclui a apoptose mediada por caspase-3, deflagrada entre 18 e 24 h após o tratamento;
 - A deflagração da apoptose é acompanhada de perda de $\Delta\Psi_m$, sugerindo fortemente a participação da via mitocondrial neste processo;
 - O FA induz o aumento de corpos lipídicos nas células tratadas após 24 h, o que pode estar relacionada à deflagração da apoptose ou disfunção mitocondrial;

- O FA modifica parâmetros de respiração celular, aumentando a capacidade respiratória máxima e o consumo de oxigênio por vias não-mitocondriais.

8 – PERSPECTIVAS

- Aprofundar a caracterização da apoptose induzida pelo FA por meio do estudo da expressão de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática;

- Correlacionar as observações de perda do $\Delta\Psi_m$ e a atividade aumentada de caspase-3 com uma possível deflagração da apoptose por via intrínseca, através da avaliação da atividade de caspase-9;

- Estudar a dinâmica de produção de EROs pelas células tratadas ao longo do tempo e sua relação com a morte celular tardia provocada pelo FA;

- Avaliar a atividade de NADH desidrogenases e NADPH oxidases, seus papéis na produção de EROs e sua relação com o consumo não-mitocondrial de oxigênio aumentado nas células tratadas com FA;

- Avaliar as causas da maior capacidade respiratória apresentada pelas células tratadas, caracterizando o envolvimento individual de cada complexo da OXPHOS neste efeito ou mesmo o efeito do FA sobre a biogênese de mitocôndrias;

- Estudar os efeitos do FA sobre a via glicolítica e a produção de ATP, a fim de melhor caracterizar os efeitos da CE sobre o metabolismo celular;

- Estudar os efeitos do FA sobre a proteína p53 e sua possível relação com as alterações metabólicas e deflagração de apoptose nas células tratadas com FA.

A seguir, uma representação esquemática dos mecanismos de ação da ETT elucidados no presente trabalho, com base nas conclusões e perspectivas apresentadas (Figura 20).

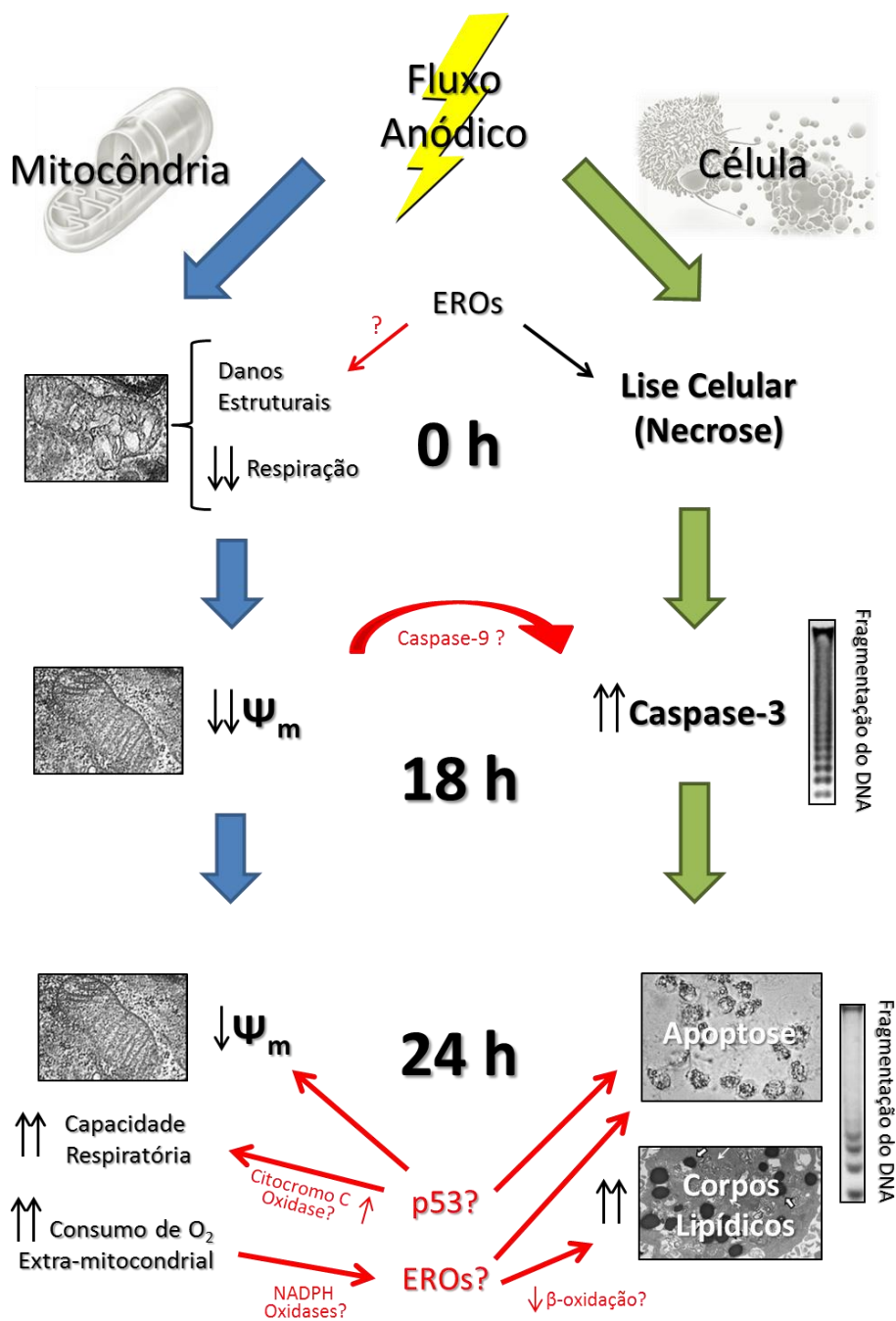


Figura 20: Representação esquemática dos mecanismos de ação da ETT elucidados no presente trabalho (em preto) e hipóteses de perspectivas futuras (em vermelho). Fragmentação do DNA: adaptado de Veiga et al., 2005.

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.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. **The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy.** *Oncogene*, v. 26 (9), p. 1324-1337, 2007.
- 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 Ed, Editora Garland. 2008.
- ALEXANDRE, J.; BATTEUX, F.; NICCO, C.; CHÉREAU, C.; LAURENT, A.; GUILLEVIN, L.; WEILL, B.; GOLDWASSER, F. **Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo.** *International Journal of Cancer*, v. 119 (1), p. 41-48, 2006.
- American Cancer Society (ACS). **The History of Cancer.** Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>; Acesso em 14/12/2012.
- AMOEDO, N.D.; RODRIGUES, M.F.; PEZZUTO, P.; GALINA, A.; DA COSTA, R.M.; DE ALMEIDA, F.C.; EL-BACHA, T.; RUMJANEK, F.D. **Energy metabolism in H460 lung cancer cells: effects of histone deacetylase inhibitors.** *PLoS One*, v. 6, e22264, 2011.
- AYYANATHAN, K.; KESARAJU, S.; DAWSON-SCULLY, K.; WEISSBACH, H. **Combination of sulindac and dichloroacetate kills cancer cells via oxidative damage.** *PLoS One*, v. 7 (7), e39949, 2012.
- BELLANCE, N.; BERNARD, G.; FURT, F.; BEGUERET, H.; SMOLKOVÁ, K.; PASSERIEUX, E.; DELAGE, J.P.; BASTE, J.M.; MOREAU, P.; ROSSIGNOL, R. **Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41 (12), p. 2566-2577, 2009.
- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J.W. **The role of plasma membrane in bio-reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 380 (1), p. 108-116, 2000.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S.; McCOY, K.D.; WANG, R. **The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts.** *Biochemica*, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BIRBIR, Y.; URGUR, G.; BIRBIR, M. **Inactivation of bacterial population in hide-soak liquors via direct electric current.** *Journal of Electrostatics*, v. 67, p. 640-645, 2008.

BLASCO, M.A. **Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond.** *Nature Reviews Genetics*, v. 6(8), p. 611-622, 2005.

BONNET, S.; ARCHER, S.L.; ALLALUNIS-TURNER, J.; HAROMY, A.; BEAULIEU, C.; THOMPSON, R.; LEE, C.T.; LOPASCHUK, G.D.; PUTTAGUNTA, L.; BONNET, S.; HARRY, G.; HASHIMOTO, K.; PORTER, C.J.; ANDRADE, M.A.; THEBAUD, B.; MICHELAKIS, E.D. **A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth.** *Cancer Cell*, v. 11 (1), p. 37-51, 2007.

BOREN, J.; BRINDLE, K.M. **Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation.** *Cell Death & Differentiation*, v. 19 (9), p. 1561-1570, 2012.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W.G. **Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion.** *Seminars in Cancer Biology*, v. 20(3), p. 161-168, 2010.

BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P. **Lipid droplets in inflammation and cancer.** *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 82 (4-6), p. 243-250, 2010.

BRETON, M.; MIR, L.M. **Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments.** *Bioelectromagnetics*, v. 33, p. 106-123, 2012.

BRINDEFALK, B.; ETTEMA, T.J.; VIKLUND, J.; THOLLESSON, M.; ANDERSSON, S.G. **A phylometagenomic exploration of oceanic alphaproteobacteria reveals mitochondrial relatives unrelated to the SAR11 clade.** *PLoS One*, v. 6 (9), e24457, 2011.

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

BRITO, L.M.; VEIGA, V.F.; ZANCAN, P.; HOLANDINO, C. **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.** Em: *III Evento Internacional del Electromagnetismo Aplicado*, p. 1-3, 2009.

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

CABRALES, L.B.; CIRIA, H.C.; BRUZÓN, R.P.; QUEVEDO, M.S.; ALDANA, R.H.; DE OCA, L.M.; SALAS, M.F.; PEÑA, O.G. **Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current.** *Bioelectromagnetics*, v. 22 (5), p. 316-322, 2001.

CABRALES, L.E.; NAVA, J.J.; AGUILERA, A.R.; JOA, J.A.; CIRIA, H.M.; GONZÁLEZ, M.M.; SALAS, M.F.; JARQUE, M.V.; GONZÁLEZ, T.R.; MATEUS, M.A.; BROOKS, S.C.; PALENCIA,

- F.S.; ZAMORA, L.O.; QUEVEDO, M.C.; SERINGE, S.E.; CUITIÉ, V.C.; CABRALES, I.B.; GONZÁLEZ, G.S. **Modified Gompertz equation for electrotherapy murine tumor growth kinetics: predictions and new hypotheses.** *BMC Cancer*, v. 10, p. 589, 2010.
- CALLAHAN, M.K.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. **Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes.** *Cell Death & Differentiation*, v. 7, p. 645-653, 2000.
- CAMPOS, V.E.B. **Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- CAMPOS, V.E.B.; TEIXEIRA, C.A.A.; VEIGA, V.F.; RICCI, E. JR; HOLANDINO, C. **L-Tyrosine-loaded nanoparticles increase the antitumoral activity of direct electric current in a metastatic melanoma cell model.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 1–11, 2010.
- CAO, Y.; PEARMAN, A.T.; ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M. **Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis.** *Proceedures of National Academy of Sciences USA*, v. 97, p. 11280–11285, 2000.
- CENTRO NACIONAL DE ELECTROMAGNETISMO APLICADO (CNEA). Site institucional. Disponível em: <http://www.cnea.uo.edu.cu/>. Acesso em: 14/12/12.
- CHEN, Z.; ZHANG, H.; LU, W.; HUANG, P. **Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1787, p. 553-560, 2009.
- CHENG, Y.J.; JIANG, H.S.; HSU, S.L.; LIN, L.C.; WU, C.L.; GHANTA, V.K.; HSUEH, C.M. **XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin.** *European Journal of Pharmacology*, v. 627, p. 75-84, 2010.
- CHOU, C.K.; MCDUGALL A.J.; AHN, C.; VORA, N. **Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current.** *Bioelectromagnetics*, v. 18, p. 14-24, 1997.
- CIRIA, H.C.; QUEVEDO, M.S.; CABRALES, L.B.; BRUZÓN, R.P.; SALAS, M.F.; PENA, O.G.; GONZÁLEZ, T.R.; LÓPEZ, D.S.; FLORES, J.M. **Antitumor effectiveness of diferente amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors.** *BMC Cancer*, v. 4, p. 87, 2004.
- 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.
- DE OLIVEIRA, M.F.; AMOÊDO, N.D.; RUMJANEK, F.D. **Energy and redox homeostasis in tumor cells.** *International Journal of Cell Biology*, ID 593838, 2012.

DELIKATNY, E.J.; COOPER, W.A.; BRAMMAH, S.; SATHASIVAM, N.; RIDEOUT, D.C. **Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria.** *Cancer Research*, v. 62 (5), p. 1394-1400, 2002.

DI FILLIPO, M. ; BERNARDI, G. **The early apoptotic DNA fragmentation targets a small number of specific open chromatin regions.** *PLoS One*, v. 4 (4), e5010, 2009.

DONEV, I.S.; WANG, W.; YAMADA, T.; LI, Q.; TAKEUCHI, S.; MATSUMOTO, K.; YAMORI, T.; NISHIOKA, Y.; SONE, S.; YANO, S. **Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer.** *Clinical Cancer Research*, v. 17 (8), p. 2260-2269, 2011.

DOSTERT, C.; PÉTRILLI, V.; VAN BRUGGEN, R.; STEELE, C.; MOSSMAN, B.T.; TSCHOPP, J. **Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.** *Science*, v. 320(5876), p. 674-677, 2008.

DOWSWELL, T.; BEDWELL, C.; LAVENDER, T.; NEILSON, J.P. **Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for pain relief in labour.** *Cochrane Database Systematic Review*, v. 2, CD007214, 2009.

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

FAN, X. ; KRAHLING, S. ; SMITH, D.; WILLIAMSON, P.; SHLEGEL, A. **Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes.** *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, p. 2863-2872, 2004.

FARESE, R.V. JR; WALTHER, T.C. **Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T.** *Cell*, v. 139 (5), p. 855-860, 2009.

FULDA, S. **Tumor resistance to apoptosis.** *International Journal of Cancer*, v. 124, p. 511–515, 2009.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. **Targeting mitochondria for cancer therapy.** *Nature Review Drug Discovery*, v. 9 (6), p. 447-464, 2010.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; VITALE, I.; RIGONI, A.; VACCHELLI, E.; MICHAUD, M.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. **Mitochondrial gateways to cancer.** *Molecular Aspects of Medicine*, v. 31 (1), p. 1-20, 2010.

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

GEISZT, M. **NADPH oxidases: new kids on the block.** *Cardiovascular Research*, v. 71 (2), p. 289-299, 2006.

GIARD, D.J.; AARONSON, S.A.; TODARO, G.J.; ARNSTEIN, P.; KERSEY, J.H.; DOSIK, H.; PARKS, W.P. **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *Journal of National Cancer Institute*, v. 51, p. 1417-1423, 1973.

GNAIGER, E. **Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply.** *Respiration Physiology*, v. 128 (3), p. 277-297, 2011.

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

GOMES, M.N.; TEIXEIRA, C.A.; BARBOSA, G.M.; FROES, M.T.; SILVA, M.B.; VEIGA, V.F.; SOARES, R.M.; DOS SANTOS, A.L.; HOLANDINO, C. **Effects of direct electric current on *Herpetomonas samuelpeσοai*: An ultrastructural study.** *Bioelectromagnetics*, v. 33, p. 334-345, 2012.

GRAVANTE, G.; ONG, S.L.; METCALFE, M.S.; BHARDWAJ, N.; MADDERN, G.J.; LLOYD, D.M.; DENNISON, A.R. **Experimental application of electrolysis in the treatment of liver and pancreatic tumours: principles, preclinical and clinical observations and future perspectives.** *Surgical Oncology*, v. 20 (2), p. 106-120, 2011.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. **Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53.** *Nature*, v. 458(7242), p. 1127-1130, 2009.

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

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. **Immunity, inflammation, and cancer.** *Cell*, v. 140(6), p. 883-899, 2010.

GUTIÉRREZ-MARTÍN, Y.; MARTÍN-ROMERO, F.J.; IÑESTA-VAQUERA, F.A.; GUTIÉRREZ-MERINO, C.; HENAO, F. **Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite.** *European Journal of Biochemistry*, v. 271 (13), p. 2647-2657, 2004.

HAEMMERICH, D.; STAELIN, S.T.; TSAI, J.Z.; TUNGJITKUSOLMUN, S.; MAHVI, D.M.; WEBSTER, J.G. **In vivo electrical conductivity of hepatic tumours.** *Physiological Measurement*, v. 24 (2), p. 251-60, 2003.

HAJDU, S.I. **A note from history: landmarks in history of cancer, part 1.** *Cancer*, v. 117 (5), p. 1097-1102, 2011.

HAKUMÄKI, J.M.; POPTANI, H.; SANDMAIR, A.M.; YLÄ-HERTTUALA, S.; KAUPPINEN, R.A. **1H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis.** *Nature Medicine*, v. 5 (11), p. 1323-1327, 1999.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v.144 (5), p. 646-674, 2011.

HEJAZI, H.; ESLAMI, G.; DALIMI, A. **The parasiticidal effect of electricity on *Leishmania major*, both in vitro and in vivo.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 98, p. 37–42, 2004.

HERST, P.M.; BERRIDGE, M.V. **Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1762, p. 170-177, 2007.

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

HOLANDINO, C. ; VEIGA, V.F. ; CAPELA, M.M.; MENEZES, S.; ALVIANO, C.S. **Damage induction by direct electric current in tumoural target cells.** *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 38, p. 554-607, 2000.

HOLANDINO, C. ; VEIGA, V.F. ; RODRIGUES, M.L.; MORALES, M.M.; CAPELLA, M.A.M.; ALVIANO, C.S. **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.

HSU, P.P.; SABATINI, D.M. **Cancer cell metabolism: Warburg and beyond.** *Cell*, v. 134 (5), p. 703-707, 2008.

HUERTA, S.; GOULET, B.S.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E.H. **Screening and Detection of Apoptosis.** *Journal of Surgical Research*, v. 139 (1), p. 143-156, 2007.

HUTTER, E.; RENNER, K.; PFISTER, G.; STÖCKL, P.; JANSEN-DÜRR, P.; GNAIGER, E. **Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts.** *Biochemical Journal*, v. 380, p. 919-928, 2004.

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

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **O que é câncer?** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee;> Acesso em 14/12/2012.

ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, M.; KOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, A.; IMANISHI, H.; NAKADA, K.; HONMA, Y.; HAYASHI, J. **ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis.** *Science*, v. 320, p. 661-664, 2008.

ITOH, T.; TERAZAWA, R.; KOJIMA, K.; NAKANE, K.; DEGUCHI, T.; ANDO, M.; TSUKAMASA, Y.; ITO, M.; NOZAWA, Y. **Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells.** *Free Radical Research*, v. 45 (9), p. 1033-1039, 2011.

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

JARDIM-MESSEDER, D.; CAMACHO-PEREIRA, J.; GALINA, A. **3-Bromopyruvate inhibits calcium uptake by sarcoplasmic reticulum vesicles but not SERCA ATP hydrolysis activity.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 44 (5), p. 801-807, 2012.

JIANG, B.H.; LIU, L.Z. **PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis.** *Advances in Cancer Research*, v. 102, p. 19-65, 2009.

KEIJ, J.F.; BELL-PRINCE, C.; STEINKAMP, J.A. **Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs.** *Cytometry*, v. 39, p. 203-210, 2000.

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

KLAMT, F. ; ZDANOV, S. ; LEVINE, R.L.; PARISER, A.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.; YU, L.R.; VEENSTRA D.; SHACTER, E. **Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin.** *Nature Cell Biology*, 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 and Differentiation*, v. 16, p. 3-11, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiological Reviews*, v. 87 (1), p. 99-163, 2007.

KUHAJDA, F.P. **Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway.** *Cancer Research*, v. 66 (12), p. 5977-5980, 2006.

KUO, C.; CHEN, B.C.; YU, C.C.; WENG, C.M.; HSU, M.J.; CHEN, C.C.; CHEN, M.C.; TENG, C.M.; PAN, S.L; BIEN, M.Y.; SHIH, C.H.; LIN, H.L. **Apoptosis signal-regulating kinase I mediates denbinobin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells.** *Journal of Biomedical Science*, v. 16, ID 43, 2009.

LAGO, C.U.; SUNG, H.J.; MA, W.; WANG, P.Y.; HWANG, P.M. **p53, aerobic metabolism and cancer.** *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 15, p. 1739-1748, 2011.

LENAZ, G.; GENOVA, M.L. **Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject.** *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 12 (8), p. 961-1008, 2010.

LEWIS, P.R.; KNIGHT, D.P. **Staining methods for sectioned material.** Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.

LIEBER, M.; SMITH, B.; SZAKAL, A.; NELSON-REES, W.; TODARO, G. **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *International Journal of Cancer*, v. 17, p. 62-70, 1976.

LIN, C.J.; LEE, C.C.; SHIH, Y.L.; LIN, C.H.; WANG, S.H.; CHEN, T.H.; SHIH, C.M. **Inhibition of mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolomide-induced apoptosis in glioma cells.** *PLoS One*, v. 7, e38706, 2012.

LING, H.; ZHOU, L.; JIA, X.; GAPTER, L.A.; AGARWAL, R.; NG, K.Y. **Polyporenic Acid C induces caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer A549 cells.** *Molecular Carcinogenesis*, v. 48, p. 498-507, 2009.

MAREK, L.; WARE, K.E.; FRITZSCHE, A.; HERCULE, P.; HELTON, W.R.; SMITH, J.E.; MCDERMOTT, L.A.; COLDREN, C.D.; NEMENOFF, R.A.; MERRICK, D.T.; HELFRICH, B.A.; BUNN, P.A. JR; HEASLEY, L.E. **Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells.** *Molecular Pharmacology*, v. 75 (1), 196-207, 2009.

MARTIN, F.H. **Electrolysis in gynaecology; with a report of three cases of fibroid tumour successfully treated by the method.** *Journal of American Medical Association*, v. 7, p. 61-68; 85-90, 1886.

MARTIN, W.; MÜLLER, M. **The hydrogen hypothesis for the first eukaryote.** *Nature*, v. 392(6671), p. 37-41, 1998.

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.** *European Journal of Cancer*, v. 4, p. 3-13, 2006.

MATOBA, S.; KANG, J.G.; PATINO, W.D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O.; HURLEY, P.J.; BUNZ, F.; HWANG, P.M. **p53 regulates mitochondrial respiration.** *Science*, v. 312, p. 1650-1653, 2006.

MCCURDY, M.T.; SHANHOLTZ, C.B. **Oncologic emergencies.** *Critical Care Medicine*, v. 40, p. 2212-2222, 2012.

MEADOWS, J.W.; PITZER, B.; BROCKMAN, D.E.; MYATT, L. **Expression and localization of adipophilin and perilipin in human fetal membranes: association with lipid bodies and enzymes involved in prostaglandin synthesis.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90 (4), p. 2344-2350, 2005.

MIKLAVČIČ, D.; AN, D.; BELEHRADEK, J.; MIR, L. **Host's immune response in electrotherapy of murine tumors by direct current.** *European Cytokine Network*, v. 8 (3), p. 275–279, 1997.

MIKLAVČIČ, D.; SERSA, G.; KRYZANOWSKI, M.; NOVAKOVIC, S.; BOBANOVIC, F.; GOLOUH, R.; VODOVNIK, L. **Tumor treatment by direct electric current-tumor temperature and pH, electrode material and configuration.** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 30, p. 209-220, 1993.

MILLIPORE, **Caspase-3 colorimetric activity assay kit – user manual.** Código de catálogo do produto: APT165, 2010.

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

MIRANDA, K.; DOCAMPO, R.; GRILLO, O.; DE SOUZA, W. **Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition.** *Protist*, v. 155 (4), p. 395-405, 2004.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 5a Ed. Nova York: W.H. Freeman and Company, 2008.

NILSSON, E. ; VON EULER, H. ; BERENDSON, J. THÖRNE, A.; WERSÄLL, P.; NÄSLUND, I.; LAGERSTEDT, A.S.; NARFSTRÖM, K.; OLSSON, J.M. **Electrochemical treatment of tumours.** *Bioelectrochemistry*. v. 51, p. 1-11, 2000.

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

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

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

NORDENSTRÖM, B. **Preliminary clinical trials of electrophoretic ionization in the treatment of malignant tumours,** *IRCS Medical Science*, v. 6, p. 537, 1978.

NORDENSTRÖM, B.E. **Electrochemical treatment of cancer. I: Variable response to anodic and cathodic fields.** *American Journal of Clinical Oncology*, v. 12(6), p. 530-536, 1989.

NORDENSTRÖM, B.E. **Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer.** *European Journal of Surgery Supplement*, v. 574, p. 93-109, 1994.

OHASHI, M.; MIZUSHIMA, N.; KABEYA, Y.; YOSHIMORI, T. **Localization of mammalian NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein on lipid droplets.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278 (38), p. 36819-36829, 2003.

PARKER, J.L.; KARANTONIS, D.M.; SINGLE, P.S.; OBRADOVIC, M.; COUSINS, M.J. **Compound action potentials recorded in the human spinal cord during neurostimulation for pain relief.** *Pain*, v. 153 (3), p. 593-601, 2012.

PEGORARO L, PALUMBO A, ERIKSON J, FALDA M, GIOVANAZZO B, EMANUEL BS, ROVERA G, NOWELL PC, CROCE CM. **A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia.** *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1984 Nov;81(22):7166-70.

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.

PUGLISI, M.; DOLLY, S.; FARIA, A.; MYERSON, J.S.; POPAT, S.; O'BRIEN, M.E.R. **Treatment options for small cell lung cancer – do we have more choice?** *British Journal of Cancer*, v. 102, p. 629–638, 2010.

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

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.

SAKAKIBARA-KONISHI, J.; OIZUMI, S.; KIKUCHI, J.; KIKUCHI, E.; MIZUGAKI, H.; KINOSHITA, I.; DOSAKA-AKITA, H.; NISHIMURA, M. **Expression of Bim, Noxa, and Puma in non-small cell lung cancer.** *BMC Cancer*, v. 12, ID 286, 2012.

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

SARAVANAN, B.C.; SREEKUMAR, C.; BANSAL, G.C.; RAY, D.; RAO, J.R.; MISHRA, A.K. **A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*.** *Veterinary Parasitology*, v. 113(3-4), p. 211-216, 2003.

SCHAFFER, J.E. **Lipotoxicity: when tissues overeat.** *Current Opinion Lipidology*, v. 14 (3), p. 281-287, 2003.

SCHAUBLE, M.K.; HABAL, M.B.; GULLICK, H.D. **Inhibition of experimental tumor growth in hamsters by small direct currents.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 101, p. 294-297, 1977.

SCHEEL, C.; WEINBERG, R.A. **Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links.** *Seminars in Cancer Biology*, v. 22(5-6), p. 396-403, 2012.

SERSA, G.; MIKLAVČIČ, D. **Electrochemotherapy of tumours.** *Journal of Visualized Experiments*, v. 22, p. 1038, 2008.

SHARQUIE, K.; AL-HAMAMY, H.; EL-YASSIN, D. **Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: the Baghdadin device.** *Journal of Dermatology*, v. 25, p. 234-237, 1998.

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

SHI, H.S.; LI, D.; ZHANG, J.; WANG, Y.S.; YANG, L.; ZHANG, H.L.; WANG, X.H.; MU, B.; WANG, W.; MA, Y.; GUO, F.C.; WEI, Y.Q. **Silencing of pkm2 increases the efficacy of docetaxel in human lung cancer xenografts in mice.** *Cancer Science*, v. 101 (6), p. 1447-1453, 2010.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2012.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 62 (1), p. 10-29, 2012.

SMITH, N.R.; SPARKS, R.L.; POOL, T.B.; CAMERON, I.L. **Differences in the intracellular concentration of elements in normal and cancerous liver cells as determined by X-ray microanalysis.** *Cancer Research*, v. 38 (7), p. 1952-1959, 1978.

SOLAINI, G.; SGARBI, G.; BARACCA, A. **Oxidative phosphorylation in cancer cells.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1807 (6), p. 534-542, 2011.

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. **MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.** *Acta Histochemica*, v. 114 (8), p. 785-796, 2012.

STRASSER, E.M. ; STÄTNER, S. ; KARNER, J., KLIMPFINGER, M.; FREYNHOFER, M.; ZALLER, V.; GRAF, A.; WESSNER, B.; BACHL, N.; ROTH, E.; QUITTAN, M. **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.** *Annals of Surgery*, v. 249 (5), p. 738-743, 2009.

SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y.; OHSAKI, Y.; FUJIMOTO, T. **Lipid droplets: size matters.** *Journal of Electron Microscopy*, v. 60 Suppl 1, p. S101-S116, 2011.

SWINNEN, J.V.; BRUSSELMANS, K.; VERHOEVEN, G. **Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets.** *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 9 (4), p. 358-365, 2006.

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

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

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

THIRTHALLI, J.; PRASAD, M.K.; GANGADHAR, B.N. **Electroconvulsive therapy (ECT) in bipolar disorder: a narrative review of literature.** *Asian Journal of Psychiatry*, v. 5, p. 11-17, 2012.

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

UK ECT REVIEW GROUP. **Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet*, v. 361 (9360), p. 799-808, 2003.

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

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.; CLOOS, J. **Cell sensitivity assays: the MTT assay.** *Methods in Molecular Biology*, v. 731, p. 237-245, 2011.

VEIGA, V.F. **Estudo dos Efeitos de Corrente Elétrica de Baixa Intensidade em Mastócitos Tumorais (Células P815).** Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBBCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

VEIGA, V.F.; HOLANDINO, 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.; MORALES, M.M.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L.; HOLANDINO, C. **Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms.** *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 42 (1), p. 61-74, 2005.

VERDECIA, M.J.; O'FARRIL, M.M.A.; JING-HONG, L.; CABRALES, L.E.B.; PALENCIA, F.S.; CIRIA, H.C.; BROOKS, A.S.; SALAS, M.F. **Primeras experiencias clínicas en Cuba sobre el uso de la electroterapia en cuatro pacientes con tumores sólidos malignos superficiales.** *MEDISAN*, v. 11, Disponível em: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_1_07/san07107.htm; Acesso em: 14/12/2012.

VIANELLO, A.; CASOLO, V.; PETRUSSA, E.; PERESSON, C.; PATUI, S.; BERTOLINI, A.; PASSAMONTI, S.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M. **The mitochondrial permeability**

transition pore (PTP) - an example of multiple molecular exaptation? *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1817 (11), p. 2072-2086, 2012.

VOGL, T.J.; MAYER, H.P.; ZANGOS, S.; SELBY, J.B. JR; ACKERMANN, H.; MAYER, F.B. **Prostate cancer: MR imaging-guided galvanotherapy--technical development and first clinical results.** *Radiology*, v. 245 (3), p. 895-902, 2007.

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

VON EULER, H.; SÖDERSTAEDT, A.; THÖRNE, A.; OLSSON, J.M.; YONGQING, G. **Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line. An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours.** *Bioelectrochemistry*, v. 58, p. 163-170, 2002.

WANG, Y. ; YANG, H. ; LIU, H.; HUANG, J.; SONG, X. **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.

WARBURG, O. **On respiratory impairment in cancer cells.** *Science*, v. 124, p. 269–270, 1956.

WARTENBERG, M.; WIRTZ, N.; GROB, A. NIEDERMEIER, W.; HESCHELER, J.; PETERS, S.C.; SAUER, H. **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.

WEIBEL, E.R. **Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology.** *International Review of Cytology*, v. 26, p. 235-302, 1969.

World Health Organization (WHO). **Questions and Answers.** Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>; Acesso em 14/12/2012.

World Health Organization (WHO). **Fact Sheet number 310: The Top Ten Causes of Death, 2008.** Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310_2008.pdf; Acesso em 28/06/2009.

WU, M.; NEILSON, A.; SWIFT, A.L.; MORAN, R.; TAMAGNINE, J.; PARSLAW, D.; ARMISTEAD, S.; LEMIRE, K.; ORRELL, J.; TEICH, J.; CHOMICZ, S.; FERRICK, D.A. **Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells.** *American Journal of Physiology*, v. 292, p. C125 – C136, 2007.

XIE, J.; WANG, B.S.; YU, D.H.; LU, Q.; MA, J.; QI, H.; FANG, C.; CHEN, H.Z. **Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and**

exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells. *International Journal of Oncology*, v. 38 (2), p. 409-417, 2011.

XIN, Y. ; LIU, D. **Electrostatic therapy (EST) of lung cancer and pulmonary metastasis : report of 15 cases.** *Europeana Journal of Surgery Supplement*, v. 574, p. 91-92, 1994.

XIN, Y.; XUE, F.; GE, B.; ZHAO, F.R.; SHI, B.; ZHANG, W. **Electrochemical treatment of lung cancer.** *Bioelectromagnetics*, v. 18, p. 8-13, 1997.

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

ANEXO – Artigos Publicados no Período

L-Tyrosine-loaded nanoparticles increase the antitumoral activity of direct electric current in a metastatic melanoma cell model

Vânia Emerich Bucco de Campos¹
Cesar Augusto Antunes Teixeira¹
Venicio Feo da Veiga²
Eduardo Ricci Júnior¹
Carla Holandino¹

¹Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, ²Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract: Inhibition of tumor growth induced by treatment with direct electric current (DC) has been reported in several models. One of the mechanisms responsible for the antitumoral activity of DC is the generation of oxidative species, known as chloramines. With the aim of increasing chloramine production in the electrolytic medium and optimizing the antitumoral effects of DC, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanoparticles (NPs) loaded with the amino acid tyrosine were obtained. The physical–chemical characterization showed that the NPs presented size in nanometric range and monomodal distribution. A slightly negative electrokinetic potential was also found in both blank NPs and L-tyrosine-loaded PCL NPs. The yield of the loading process was approximately 50%. Within 3 h of dissolution assay, a burst release of about 80% L-tyrosine was obtained. The *in vitro* cytotoxicity of DC was significantly increased when associated with L-tyrosine-loaded NPs, using a murine multidrug-resistant melanoma cell line model. This study showed that the use of the combination of nanotechnology and DC has a promising antineoplastic potential and opens a new perspective in cancer therapy.

Keywords: direct electric current, nanotechnology, cancer therapy, L-tyrosine, B16F10 cells

Introduction

Nanoparticulate systems show promise as active vectors because of their capacity to release substances.¹ The advantages of using this approach for drug delivery result from some interesting properties of these systems. Because of their small size, they can travel through the endothelium of inflammatory sites, epithelium (eg, intestinal tract and liver), and tumors or penetrate microcapillaries.² In addition to their biodegradability and biocompatibility, the use of these delivery systems result in increased bioavailability of transported drugs with minimal toxicity.^{3,4} Nanoparticle (NP) systems have recently been incorporated within cancer therapies, because of their ability to concentrate drugs at the tumor site, which enhances their cytotoxic effects on the cancer cells and therefore reduces systemic side effects.^{5–7}

Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) is an aliphatic polyester that is used to develop injectable sustained delivery systems, such as polymeric NPs.⁸ PCL NPs have been used as drug-carrier systems for amphotericin B,^{9,10} indomethacin,¹¹ griseofulvin,¹² tamoxifen,¹³ vaccines,¹⁴ magnetic composites,¹⁵ and cyclosporine A.¹⁶ PCL NP production by the double emulsion solvent evaporation method (DEEM) has been shown to exhibit satisfactory encapsulation efficiency for hydrophilic drugs.^{17–19}

Scientific investigations have demonstrated that electrotherapy (EChT) presents an effective approach for treating several types of cancer.^{20–22} EChT uses a low direct electric current (DC) to treat tumor tissue through two or more electrodes placed

Correspondence: Carla Holandino
Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco K, Segundo Andar, Sala 50, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Tel +55 21 2562 6444
Fax +55 21 2562 6445
Email cholandino@yahoo.com

within the tumoral zone or within its surrounding area. This treatment is noted for its significant effectiveness, minimal invasiveness, localized action, and low cost.^{23–25} Nordenström discussed the mechanisms associated with this therapy, such as pH alterations, electroosmotic transport of water, and the effects on ionic transmembrane flow, as partially responsible for the efficacy of EChT.^{26,27}

An important milestone for the study of EChT was the development of an *in vitro* experimental model for investigation of DC effects on culture cell lines.^{28–30} Using this model, Veiga et al showed that DC can destroy tumor cells via two distinct mechanisms: apoptosis and necrosis.³⁰ Both aforementioned mechanisms appear to be associated with the DC polarity: cells exposed to anodic flow (AF) undergo mostly apoptosis, whereas those exposed to cathodic flow (CF) die almost entirely as a result of necrosis.³⁰ These authors attributed the apoptotic cell death to chlorinated species (Cl^- , Cl_2 , HOCl) generated by AF, which react with amino acids to produce oxidizing and apoptosis-inducing molecules called chloramines. As a matter of fact, other studies developed using different reactive oxygen species have proven that oxidants, hypochlorous acid and chloramines, induced apoptotic cell death from the reaction of chlorinated species with free amino acids present in the cell suspension.^{31,32} Englert and Shacter³² compared the influence of different amino acids (taurine, arginine, lysine, glutamic acid, glutamine, and isoleucine) on the viability of lymphoma cells in the presence of oxidant compounds. These authors showed that depending on the kind of amino acids, cell death by necrosis or apoptosis was detected in the cellular medium. In their experimental model, the formation of chloramines generated by the reaction of H_2O_2 with glutamine and arginine induced exclusively apoptosis and necrosis, respectively.³² Indeed, Veiga et al confirmed this hypothesis by adding L-glutamine to the electrolytic medium during exposure of human leukemic cells to AF generated by DC.³⁰ Besides, L-tyrosine, L-glutamine, and L-tryptophan were also tested in B16F10 murine melanoma cells, and the highest cytotoxic effects induced by chloramines generated by DC stimulation were obtained in the presence of L-tyrosine (unpublished data). Considering this preliminary screening, L-tyrosine was the amino acid chosen for the present study.

Given the results of these previous works, it is likely that amino acid encapsulation within NPs may modulate chloramine production within the AF and, most importantly, increase its delivery to target cells. Targeted drug delivery would enhance the damage induced by these molecules and thus improves DC antitumoral activity. To verify this hypothesis,

the present work describes the use of nanotechnology in association with DC for the first time. L-Tyrosine was loaded onto PCL polymer, and the physical and chemical parameters of this loading process were determined. Additionally, the cytotoxicity of this association was evaluated in murine multidrug-resistant melanoma cell line B16F10. Our results show that the use of nanotechnology along with DC has a promising antineoplastic potential.

Material and methods

Chemicals

The following chemicals were purchased from VETEC Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil): polyvinyl alcohol (PVA), trypan blue powder, dichloromethane (DCM), L-tyrosine, monobasic sodium phosphate, dibasic potassium phosphate, and sodium chloride. The following cell culture items were purchased from Gibco Invitrogen Corporation (New York, NY): Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), glutamine, fetal bovine serum (FBS), sodium bicarbonate, sodium hydroxide, Pen Strep (penicillin 10,000 units/mL + streptomycin 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aqueous solution), and trypsin 1:250 powder. Finally, these items were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO): dimethyl sulfoxide, ethylenediaminetetraacetic acid, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT), and PCL.

Nanoparticle preparation

PCL NPs containing L-tyrosine were prepared by the double emulsification evaporation method. One hundred milligrams of PCL was briefly dissolved in 5 mL of DCM. This organic solution was emulsified in 1 mL of 1% PVA with 0.4 mg/mL of L-tyrosine aqueous internal phase for 1 min using an ultrasonicator (Ultrasonic Processor – UP 100 H, 60 W, 30 kHz; Hielscher, Germany) in an ice bath. This primary emulsion was poured into 20 mL of a 0.5% PVA aqueous solution and sonicated again with the same ultrasonic probe for 2 min under the same conditions to create the water for oil-in-water emulsion. The solvent (DCM) was evaporated with stirring at room temperature (28°C). NPs suspensions were purified twice by a 30-min centrifugation at 10,000 $\times g$ (Avanti J-2 cooled ultracentrifuge; Beckman Coulter, San Francisco, CA) for 40 min and followed by resuspension in 4 mL of distilled water.^{33–35}

The suspension was transferred into a glass vial and stored at -20°C . Freeze-drying was carried out in a lyophilizer (freeze dry system; Labconco, Brazil) and yielded powdered NPs.

The samples were stored at room temperature (28°C) before analysis. The lyophilized samples were resuspended in water and observed by optical microscopy to detect the presence of aggregates.³⁶

The process yield was calculated using Eq. 1:

$$Y(\%) = \left(\frac{M_{NP}}{M_T} \right) \times 100, \quad (1)$$

where $Y(\%)$ is the process yield, M_{NP} is the mass of NPs recovered after freeze-drying, and M_T is the mass of polymer plus the mass of L-tyrosine in formulation before the process. The encapsulation method was performed in triplicate ($n = 3$).

The NPs encapsulation efficiency was determined by a spectrophotometric method. The drug was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, g/L: 0.26 KH_2PO_4 , 2.17 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.71 NaCl), and the absorbance was measured at 275 nm (spectrophotometer; UV 2401 PC; Shimadzu Kyoto, Japan). The calibration curve was linear ($r = 0.999$) for L-tyrosine in a range of 20–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Drug concentrations were calculated based on the standard curve equation. Ten milligrams of freeze-dried NPs was dissolved in 5 mL of DCM to dissolve the polymer, and 5 mL of PBS was added to preferentially precipitate the polymer. The suspension was filtered through a membrane filter (0.22 μm ; Millex, The Netherlands) to remove the insoluble polymer and rediluted with PBS for analysis via the spectrophotometric method as described above. Encapsulation efficiency was calculated from Eq. 2:

$$EE = \left(\frac{M_1}{M_2} \right) \times 100, \quad (2)$$

where EE is the encapsulation efficiency, M_1 is the mass of L-tyrosine (μg) on the NPs, and M_2 is the mass of L-PCL (mg). The experiments were performed in triplicate ($n = 3$).

NPs were characterized by size, polydispersity index (PI), and electric potential (zeta potential). The size and PI of the particles were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer[®] 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) with a laser reader of 633 nm, operated at an angle of 173°, and a temperature of 25°C. The samples of L-tyrosine-loaded and unloaded PCL NPs were diluted: 1:400 (p/v) in distilled water, and 1 mL of this solution was added to a plastic cuvette. The zeta potential was measured in a 10^{-3} M NaCl aqueous solution using the electrophoretic mode of the device.³⁵ Each sample was measured in triplicate for each parameter.

NPs morphology was studied by transmission electron microscopy (Morgagni 268; FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). The sample preparation was performed from an aqueous suspension containing 50 mg of NPs in 20 mL of distilled water, and 10 μL of this suspension was placed on a carbon-coated electron microscopy grid following fixation with 10 μL of uranyl acetate 3% (w/v) for 1 min. The grid was properly dried and then examined using transmission electron microscope.³⁶

The release profile of L-tyrosine-loaded PCL NPs was assessed by a dissolution study with spectrophotometric analysis.³⁴ A 50-mg sample of NPs loaded with approximately 1.46 mg of L-tyrosine was resuspended in 10 mL of PBS, and this suspension was stirred at 200 rpm and 37°C. At time points of 1, 2, 3, 24, 48, 72, and 96 h, the entire content was withdrawn and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The supernatant was collected and filtered with a 0.22- μm cellulose nitrate membrane; the L-tyrosine concentration was determined by spectrophotometry at a wavelength of 275 nm (spectrophotometer, UV 2401 PC; Shimadzu). The remaining NPs precipitate was resuspended in 10 mL of PBS and returned to stirring at 37°C until the next sampling time.

Cell culture

B16F10 cells were obtained from Rio de Janeiro's Cell Bank (UFRJ, Brazil). They were cultured at 37°C in 25-cm² culture flasks containing DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FBS. pH was controlled by the addition of 3 g/L *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, 0.2 g/L NaHCO_3 , streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and penicillin (100 UI/mL) as previously described.^{28,37} The initial inoculum was 5×10^4 cells/mL, which was subcultured every 2 days as described elsewhere^{28,29} and maintained in a log-phase growth. Cell detachment was performed with 2 mL of trypsin 0.05% (w/v) for 2 min.

DC stimulation

After the detachment, B16F10 cells were collected by centrifugation, washed, and suspended (5.0×10^5 cells/mL) in PBS (pH 7.4) at 308 mOsm. The cellular suspensions were then distributed into a 24-well culture plate (2 mL of cell suspension/well). These wells were linked in series by filter paper bridges and fitted with platinum electrodes at their extremities, which were connected to a DC source (FA-3050 model; Instrutherm, Brazil). Control cells were presented with the same experimental conditions, except for the contact with the DC source (Figure 1). Following this approach, cell suspensions can be exposed directly to CF, AF, and DC

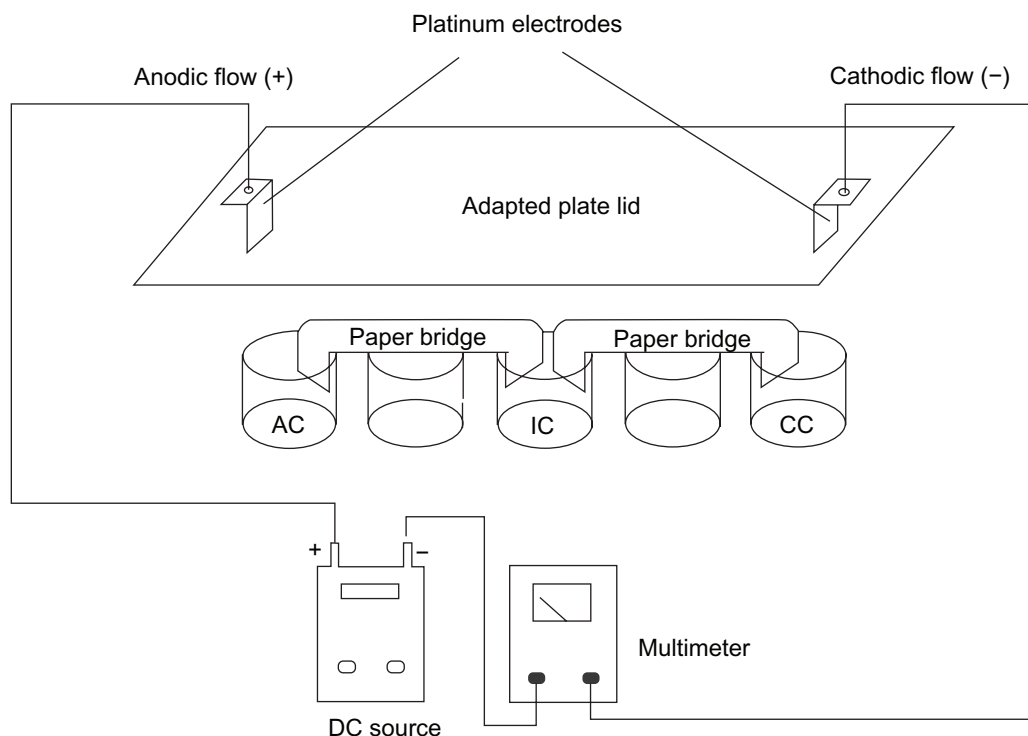


Figure 1 Schematic representation of the in vitro system used for DC treatment of B16F10 cells. The cell suspensions are distributed over each individual well and connected to a positive pole (AF) and negative pole (CF). An intermediary well, namely electroionic flow (FEI), is connected to the other wells by filter paper bridges moistened with phosphate saline buffer. Platinum electrodes are inserted into the AF and CF poles, allowing the system to be connected to a DC source and an amperimeter to monitor DC intensity. This distribution permits the separate exposure of cells to cathodic and anodic reactions, and to the DC (FEI). Control cells are exposed to the same conditions, except for the use of DC. Internal volume of each well is 0.84 cm³. The distance between the electrodes was 8 cm, and an electric field of approximately 2.5 V/cm was generated.

without contact with the electrodes, namely electroionic flow (EIF) at 25°C. The distance between the electrodes was 8 cm, and an electric field of approximately 2.5 V/cm was generated as a result. Cell suspensions were treated at room temperature with DC of 2 mA, for 0 (control), 2, 4, 6, 8, and 10 min, similar to the conditions previously used^{28–30,38} to assess cell viability. In all subsequent experiments, cells were treated for 6 min, an intermediate period that was representative of the alterations in morphology and viability. The B16F10 cells were preincubated for 30 min with different electrolytic suspensions, such as PBS, PBS + 181.19 mg of free L-tyrosine, PBS + 0.5 mg/mL of unloaded NPs, and PBS + 0.5 mg/L of L-tyrosine-loaded PCL NPs, which correspond to approximately 30 µg of L-tyrosine. After incubation, DC treatment was performed for 6 min, the electrolytic media was immediately removed, and all of the cells were washed twice with PBS. The cytotoxicity of the DC treatment was assessed by the MTT method after 24 h of incubation with DMEM supplemented with 10% FBS as described below.

Cell viability

Cell viability was assessed by measuring the cellular mitochondrial activity by the MTT method.^{39,40} After DC

treatment, cells were removed from the plate with trypsin (as described above) and resuspended in 2 mL of DMEM supplemented with FBS 10%; 180 µL of this cellular suspension was transferred to a 96-well microplate and incubated with 20 µL of a 5-mg/L solution of tetrazolium reagent (MTT; Sigma-Aldrich) for 3 h at 37°C. The supernatant was removed by centrifugation at 1100 rpm for 7 min using the CT-6000R Cientec centrifuge (Piracicaba, Brazil). The formazan crystals were diluted in 200 µL of pure dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and the absorbance was read at 490 nm on a plate-reading spectrophotometer (thermoplate). Viability was calculated as the proportion of absorbance of each sample compared to that of the controls ($\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}$). This experiment was performed in quintuplicate.

Cell growth

To evaluate the influence of DC treatment on B16F10 growth, the cells were suspended in 2 mL of PBS (10⁶ cells/mL) and treated for 6 min. After DC treatment, the cells were washed in PBS, and the suspensions containing similar cell numbers were cultivated in a 24-well plate in DMEM medium supplemented with FBS 10%. Aliquots of 25 µL of the cell suspensions were taken at 0, 24, and 48 h, and

the number of trypan blue-stained and -unstained cells was determined in a Neubauer chamber. For the quantitative assessment of growth inhibition, trypan blue-stained cells were not considered.^{28,29}

Results

Table 1 shows the quantitative analysis of the encapsulation process and the characterization parameters of the NPs. The double emulsion technique yielded NPs with high homogeneity, as detected by the low PIs. PCL-loaded and -unloaded NPs showed the same morphological characteristics, as could be observed by transmission electron microscope, such as an elliptic form and regular borders, with sizes in the nanometer range (Figure 2). Indeed, the mean NPs diameters measured at the Zetasizer ranged from 244.90 to 269.00 nm (Table 1). The unloaded NPs showed significantly lower mean diameters when compared to those of the L-tyrosine-loaded PCL NPs ($P < 0.001$). However, the size increase caused by amino acid insertion did not exceed 10% when compared to blank NPs.

The NP surface potential did not show significant alterations after L-tyrosine encapsulation or after AF exposure ($P > 0.05$) (Table 2). The overall process yield was approximately 50% for both preparations, and the encapsulation efficiency reached approximately 30%.

The release kinetics of L-tyrosine from loaded PCL NPs is shown in Figure 3. A burst release of approximately 80% of the total L-tyrosine was observed within the first 3 h of dissolution and subsequently followed by a drastic drop in the release rate. After 96 h, the NP content was virtually entirely released (data not shown).

Effects of various DC exposure times on B16F10 melanoma cell viability are shown in Figure 4A (immediately after exposure) and Figure 4B (24 h later). The AF and CF induced similar and statistically significant profiles of an immediate reduction in cell viability after four or more minutes of exposure, which was directly proportional to the stimulus time ($P < 0.01$). Twenty-four hours after DC exposure, the

same viability profile was observed for the AF and CF in comparison to untreated control cells. The electroionic flow did not induce statistically significant changes in cell viability either immediately or 24 h after DC exposure ($P > 0.05$).

Cell proliferation was assessed 24 and 48 h after a 6-min anodic stimulation (Figure 5). The time required to reduce the B16F10 cell viability to approximately 60% was 6 min. For the cell proliferation experiment, the initial inoculum of control and treated cells was 1.33×10^5 and 1.08×10^5 cells, respectively. After 48 h, the number of control cells increased from 1.33×10^5 to 2.55×10^5 . However, after 24 h of treatment, using AF induced a significantly impaired growth of B16F10 cells; the number of cells dropped from 1.08×10^5 to 0.68×10^5 , indicating a 54.7% reduction in cell number. This inhibition remained in this magnitude for 48 h of post-treatment, indicating that B16F10 cells were incapable of recovering their proliferation rates.

Effects of AF stimulation in the presence of free and encapsulated tyrosine on B16F10 viability are shown in Figure 6. This experiment showed that loaded- and unloaded-PCL NPs did not exhibit any cytotoxic properties. However, using AF stimulation in association with tyrosine-loaded NPs induced a 40% decrease in cell viability immediately (data not shown) and 24 h after treatment, indicating that this combination has a promising antineoplastic potential. Additionally, the loading process enabled the use of a significantly lower amount of tyrosine in its encapsulated form when compared to its free form. In fact, the amount of tyrosine in the nanosystem was 6000-fold smaller and yet induced higher mortality rates (data not shown).

Discussion

Among the morphofunctional features of solid tumors are the abnormal function of the lymphatic vasculature, which causes fluid retention, and an increased permeability of blood vessel walls. Both of these characteristics lead to a higher retention of NPs in the tumor area when compared to that of normal tissues, resulting in a passive selectivity of the system.⁷ Thus, a small particle size, which is directly related to the technique of NPs obtention, is crucial for the desired tissue penetration.⁴¹

The size of DEEM-yielded NPs depends on many factors, such as stirring speed, solution viscosity, organic/aqueous phase ratio, and PVA concentration in external aqueous phase.⁴² In the present work, the use of sonication in conjunction with DEEM produced fine, nanometric-scaled, homogeneous pools of loaded- or unloaded-PCL NPs. The polydispersity values obtained were approximately 0.1,

Table 1 Process yield, drug encapsulation efficiency, mean diameter, and PI of blank and L-tyrosine-loaded PCL NPs ($n = 3 \pm SD$)

	Process yield (%)	Encapsulation efficiency ($\mu\text{g}/100 \text{ mg of NP}$)	Polydispersity index
Blank NP	50 ± 1	–	0.075 ± 0.02
L-Tyrosine-loaded PCL NPs	52 ± 2	30 ± 1.2	0.130 ± 0.02

Notes: Statistically significant difference between blank NP and L-tyrosine-loaded PCL NPs. * $P < 0.001$.

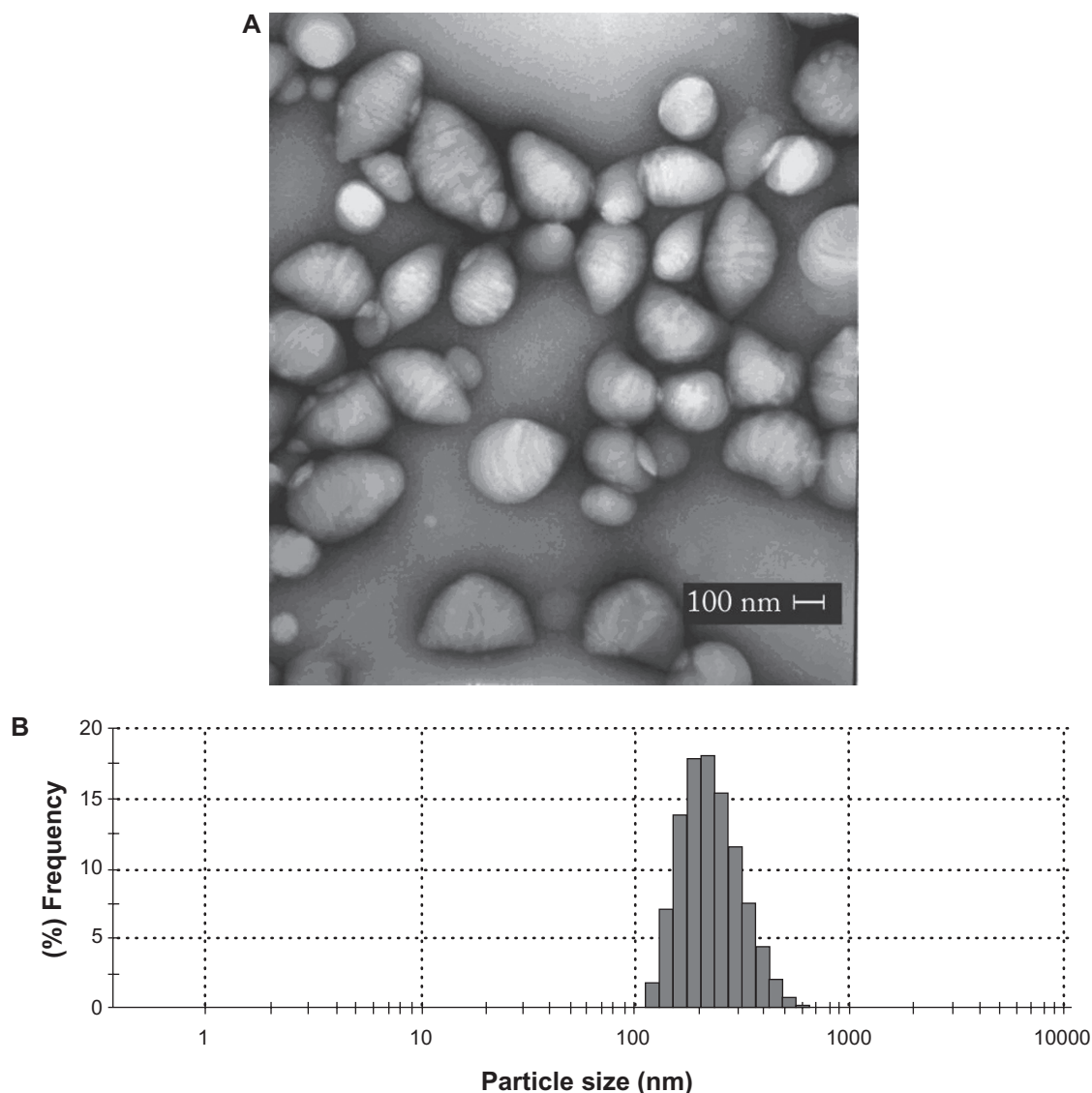


Figure 2 Morphological features and mean diameter of L-tyrosine-loaded PCL NPs. **A)** Transmission electron micrograph of PCL NPs loaded with L-tyrosine. Scale bar: 100 nm. **B)** Diameter distribution of PCL NPs loaded with L-tyrosine determined by photon correlation spectroscopy, showing that most NPs presented diameter in the nanometer scale. The experiments were done three times independently ($n = 3$).

indicating a monomodal distribution of particle size and a very high quality of preparation.⁴³ Furthermore, the loading yield is comparable to other findings in the literature^{4,17} and is probably due to the low solubility of L-tyrosine in PBS aqueous phase. The surface charge of NPs can be characterized by the zeta potential,⁴⁴ which reflects the electric potential

Table 2 Zeta potential analyses of blank and L-tyrosine-loaded PCL NPs

	Before anodic flow	After 6 min of anodic flow
Blank NP	-1.38 ± 0.16	-1.83 ± 0.23
L-Tyrosine-loaded PCL NPs	-1.76 ± 0.19	-2.10 ± 0.25

Notes: The experiments were done three times independently ($n = 3 \pm SD$).

of particles and is influenced by their chemical composition as well as the medium in which they are dispersed.² To assess the influence of AF stimulation on the surface charge of the NPs, zeta potentials were also measured before and after a 6-min AF exposure for both preparations (loaded- and unloaded-NPs). Indeed, the surface potentials became slightly more electronegative after AF, although this increase did not prove to be statistically significant in our analysis ($P > 0.05$).

The majority of the amino acid content was released from loaded NPs within the first 3 h at a rate of 80%. The release speed depends on the nature of both polymer and encapsulated molecule.³ The burst release effect observed in our system can be explained by molecules associated predominantly with the surface and the outer layers of the NP.^{3,4}

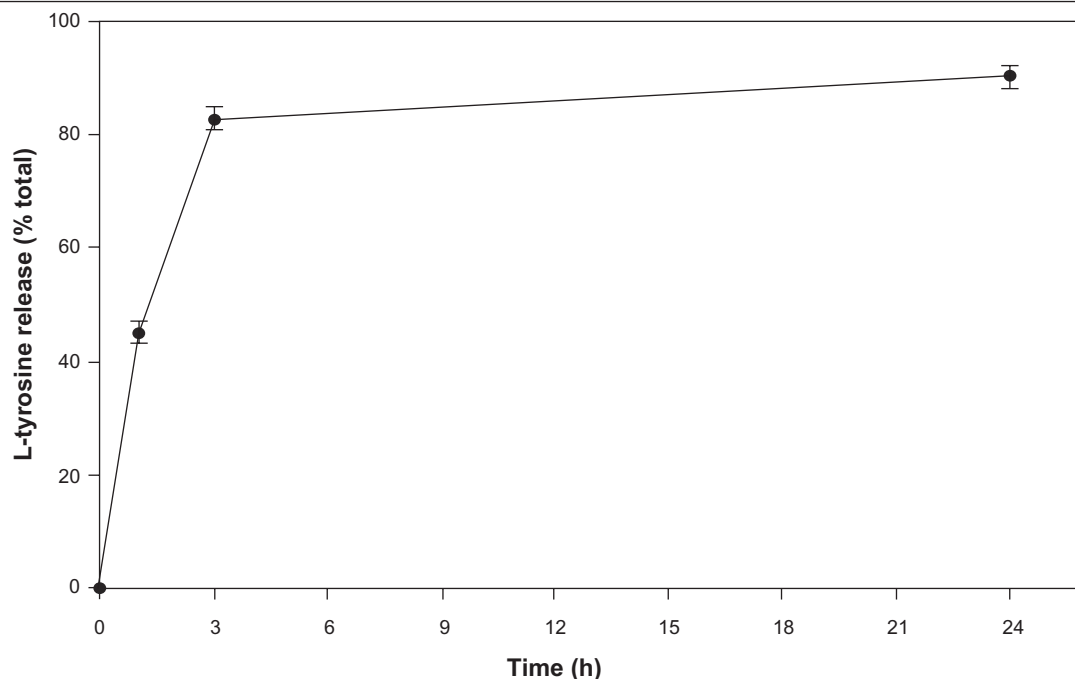


Figure 3 Release kinetics of L-tyrosine from PCL NPs in a period of 24 h. The experiments were done three times independently ($n = 3 \pm \text{SD}$).

The sustained release is due to the semicrystalline structure of PCL NPs and the pores formed in its polymeric matrix during the encapsulation process.¹⁸ Once in an aqueous environment, the PCL NP matrix slowly undergoes erosion, allowing penetration of water into its structure and the outward diffusion of L-tyrosine.

This *in vitro* release study determined that a preincubation time of 30 min was adequate to ensure the delivery of a significant amount of L-tyrosine. In addition, exposure of B16F10 cells to a 6-min AF treatment in PBS resulted in an immediate cell death of approximately 50% and significant impairment of growth recovery after 24 h. These conditions have been defined as the most suitable parameters for comparing the different experimental groups.

DC is a physical agent capable of destroying different kinds of tumor cells, characterizing a tumor therapy (EChT). This treatment is noted for its great effectiveness, minimal invasiveness, local effect, and low cost.^{24–26} The principal tumor damage induced by DC has been attributed to the formation of electrolysis products, which were capable of killing the tumor cells.²¹ Our research group has detected the effects of pH acidification and alkalization induced by AF and CF on different tumor cell lines.^{28–30,38} However, in these studies, tumor death was not only attributed exclusively to the electrolysis damage, but also to the oxidant species generated by the AF.^{29,30} In fact, the acidification of the AF-treated medium could not be held responsible for the cell

killing, as the pH variation induced by anodic reactions is not significant (6.5 after 10 min of stimulation).³⁰ Besides, when the pH was artificially mimetized by the addition of HCl drops, cell viability was not diminished at equivalent rates as detected by AF generated by DC source, suggesting the role of other electrolysis products, such as reactive chlorine and oxygen species, in tumor killing.³⁰

It is common knowledge that DC can both change surface cell receptors and also modify cell membrane permeability.^{28,29,45} In fact, this latter property is used therapeutically to ease drug penetration into tumor cells, a combined technique known as electrochemotherapy.^{46–48} In the present study, NPs were produced with PCL; this polymer has a negative electrokinetic potential, probably due to the presence of some residual functional groups with negative charges on the monomer employed in PCL polymerization.⁴⁴ After the loading process and the anodic stimulation, we detected a modification of the zeta potential, but the NPs remained negatively charged. As shown in Table 2, these values varied between -1.38 and -2.10 mV. Thus, the increase in the cytotoxic effect detected from using tyrosine-loaded NPs in conjunction with AF is probably not due to changes in electrostatic interactions. The use of NPs containing amino acids guaranteed a constant production and/or delivery of chloramines to tumoral cells, which is reflected in increased cellular mortality. In fact, using DC in conjunction with L-tyrosine-loaded PCL

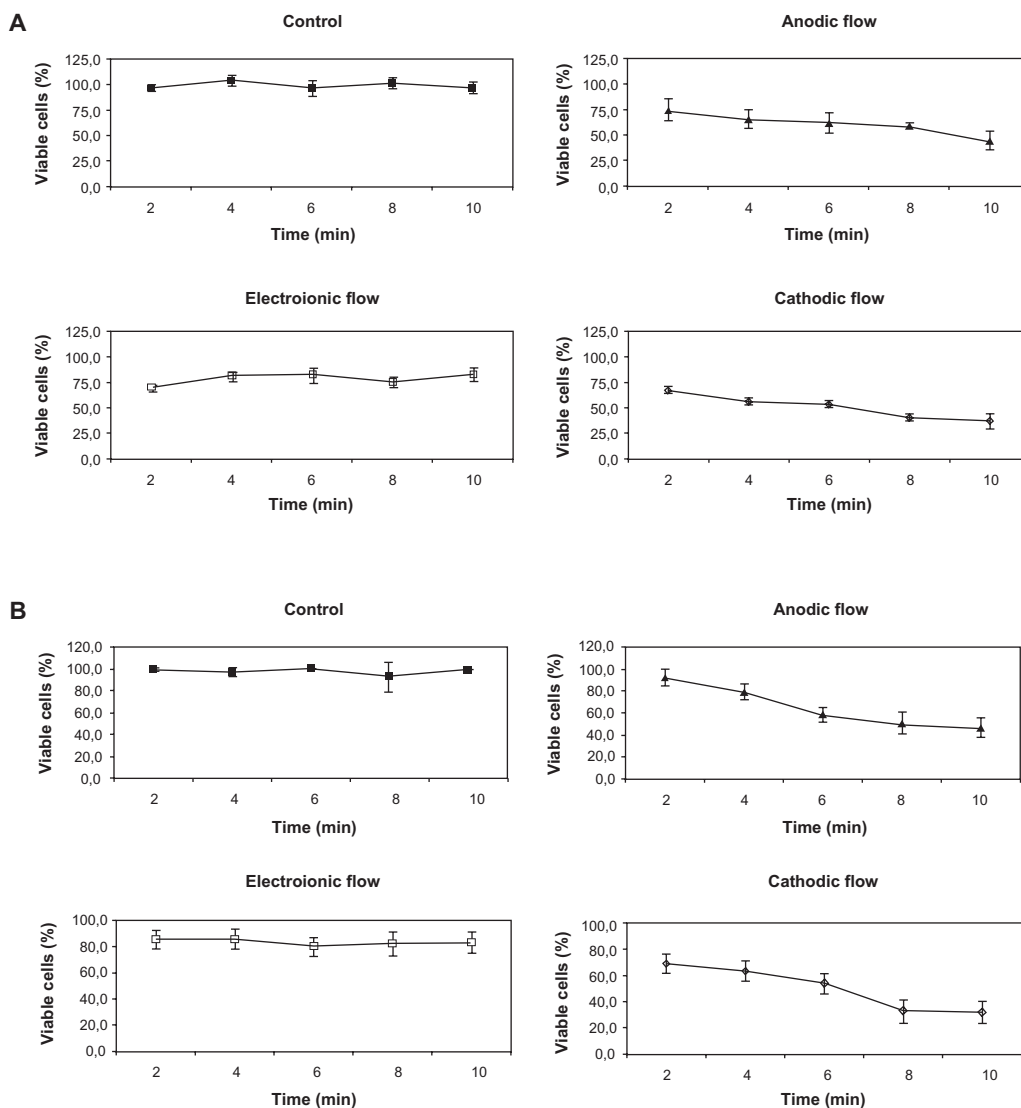


Figure 4 Kinetics of trypan blue incorporation by both treated and untreated B16F10 cells. **A**) B16F10 cells were treated with 2 mA of DC for periods varying from 0 to 10 min and their viability assayed immediately by the trypan blue method. Black squares represent the viability of control cells (■), and the open symbols represent the cells treated by the CF (◊), AF (▲), and electroionic flow (□). Anodic and cathodic stimuli induced significant differences in the B16F10 viability when compared to untreated cells ($P < 0.01$), except for the AF stimulus of 2 min. Besides, the electroionic flow stimuli did not induce any changes in cell viability ($P > 0.05$). **B**) B16F10 cells were treated for periods varying from 0 to 10 min, and their viability was assayed by the trypan blue method 24 h after the treatment. Black squares represent the viability of control cells (■), and the open symbols represent the cells treated by the CF (◊), AF (▲), and electroionic flow (□). This graph shows that the cell viability was not recovered, except for the cells treated for 4 min with the AF stimulus. As detected immediately after treatment, the electroionic flow stimuli did not induce any changes in cell viability ($P > 0.05$).

NPs reduced B16F10 viability to approximately 50%; this reduction in viability probably resulted from chloramines generated within the electrolytic medium, which led to cell destruction by apoptosis.^{31,49,50} Interestingly, the total amount of encapsulated amino acid tested was 6000-fold lower than that used in the free amino acid experiment (data not shown), which justified the use of NPs systems to improve the cytotoxicity of DC.

Additionally, necrotic cell death induced by DC is an undesirable aspect of this therapy and seems to be directly associated to DC intensity, polarity, and time of exposure.³⁰ This is an important aspect that cannot be neglected in EChT,

due to the triggering of inflammatory response as well as the disarray of tumor structure, which may lead to a systemic spread of tumor cells. The constant release of chloramines obtained from the interaction of amino groups present in the tyrosine and the chlorine species generated by DC is a possible strategy to promote cell death by apoptosis rather than necrosis, using milder DC intensity/time of exposure regimens. Besides, EChT application is most useful in the treatment of solid tumors⁵¹ in which different electrode configurations and DC intensities are applied. This procedure is not standardized in the literature, yet it has presented good results in making inoperable tumors into operable ones^{52,53} and in destroying tumor mass by necrosis.⁵⁴

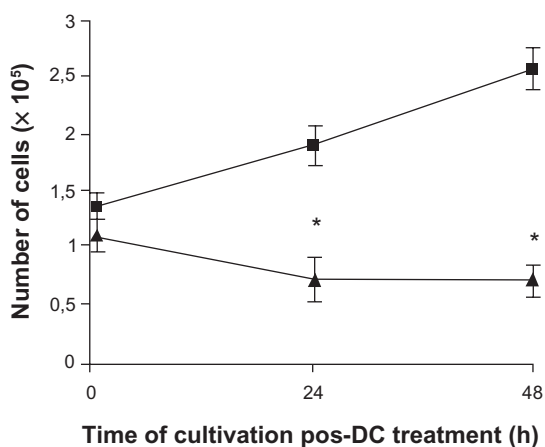


Figure 5 Treatment of B16F10 cells with DC inhibits cell proliferation. Cells were treated with 2 mA of AF for 6 min (▲) and inoculated into fresh media. The number of cells treated and untreated (■) was quantified by trypan blue dye after 24 h and 48 h, considering only the cells that were not permeable to the dye (viable cells). The proliferation rate of treated cells was 54.7% lower than the untreated cells. Results of five independent experiments expressed as mean \pm SD are shown.

The use of nanotechnology and EChT was first applied in C56BL/6Y black mice previously inoculated with B16F10 cells with the aim to verify the possibility of translating the in vitro model to treatment of in situ melanoma. In this model, the L-tyrosine-loaded PCL NPs must be injected into the solid tumor to avoid NP leakage to normal cells, protecting these cells from DC damage. The preliminary results obtained showed that the association of L-tyrosine-loaded PCL NPs with DC induced an almost total destruction of these cancer cells after 48 h of treatment, as detected by optical and electronic microscopy analyses, with no side effects in important organs, such as liver and breast. The safety of this treatment for normal cells is probably attributed to the use of

a biodegradable polymer (PCL) as loader of tyrosine, which is a natural amino acid present in living animals, therefore, avoiding adverse effects common in traditional anticancer treatment. These results are still awaiting confirmation, and there are many challenges that need to be faced to permit the translatability of in vitro results to in vivo models. Before we can consider the use of L-tyrosine-loaded PCL NPs associated with DC for in situ cancer treatment, we must face challenges, such as the need for a higher number of animals to be studied, inoculation of different kinds of tumors, and different electrode configurations and DC intensities among others.

Conclusion

Nanotechnology is generating new perspectives in a number of scientific fields. Its applications in cancer medicine are currently being investigated with very promising results in an in vitro model. The never-before-described use of the combination of this technology with EChT aims to make DC tumor treatment even more efficient and opens the door for a new cancer therapeutic approach. One of the problems associated with EChT is the occurrence of necrosis, which seems to be directly proportional to the DC intensity applied. The use of nanotechnology in conjunction with DC may promote apoptotic cell death over necrotic damage, especially when the AF is applied in the presence of amino acid-loaded NPs. In fact, this hypothesis is being tested in C56BL/6Y black mice previously inoculated with B16F10 cells, and the results obtained so far, however preliminary, are quite successful, without any side effects commonly found in traditional anticancer treatment, probably due to the use of a biodegradable polymer loaded with a natural amino acid.

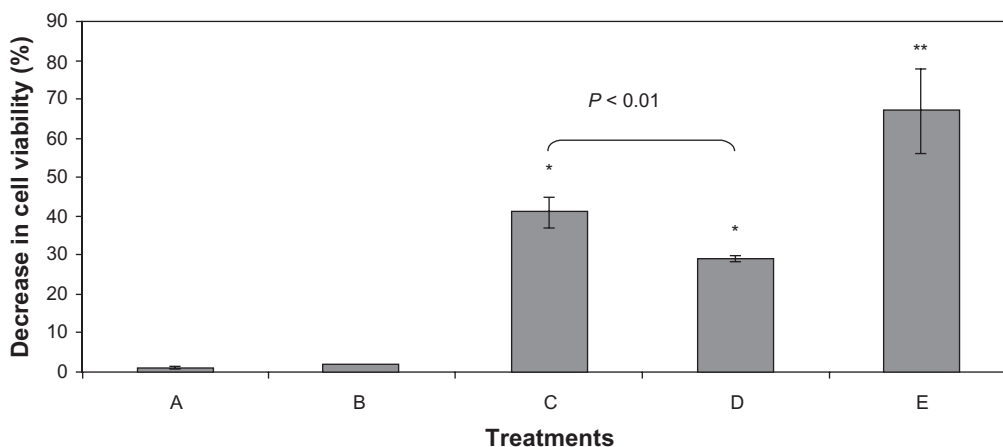


Figure 6 Decrease in the B16F10 viability induced by different experimental conditions measured by MTT assay. Cells were treated with **A**) L-tyrosine-loaded PCL NPs, **B**) unloaded NPs, **C**) 6 min of AF, **D**) unloaded NPs plus AF, and **E**) L-tyrosine-loaded PCL NPs plus AF. The percentage of viability decrease was determined immediately (data not shown) and 24 h after treatment. The major cell viability decrease (around 60%) was obtained when the L-tyrosine-loaded PCL NPs were associated with AF. Results of three independent experiments expressed as mean \pm SD are shown.

Notes: *Significantly different from control with $P < 0.05$.

Acknowledgments

We thank Dr Marcio Lourenço Rodrigues for critical reading of the manuscript. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Fundação José Bonifácio (FUJB).

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1–2):113–142.
- Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2009;86(3):215–223.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001;70(1–2):1–20.
- Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2002;6(4):319–327.
- Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*. 2001;71(1):53–69.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6315–6320.
- Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008;26(1):74–85.
- Chawla JS, Amiji MM. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm*. 2002;249(1–2):127–138.
- Espuelas M, Legrand P, Campanero M, et al. Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):419–427.
- Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm*. 2004;278(1):1–23.
- Park SJ, Lee YM, Hong SK. Release behaviors of porous poly(butylene succinate)/poly(epsilon-caprolactone) microcapsules containing indomethacin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006;47(2):211–215.
- Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm*. 2005;294(1–2):261–267.
- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm*. 2005;293(1–2):261–270.
- Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. Diphtheria toxoid loaded poly-(epsilon-caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*. 2006;38(2):96–105.
- Yang J, Park SB, Yoon HG, Huh YM, Haam S. Preparation of poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *Int J Pharm*. 2006;324(2):185–190.
- Yenice I, Mocan M, Palaska E, et al. Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp Eye Res*. 2008;87(3):162–167.
- Benoit MA, Baras B, Gillard J. Preparation and characterization of protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *Int J Pharm*. 1999;184(1):73–84.
- Berman B, Perez O, Zell D. Immunological strategies to fight skin cancer. *Skin Therapy Lett*. 2006;11(5):1–7.
- Tewes F, Munnier E, Antoon B, et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66(3):488–492.
- Miklavcic D, Jarm T, Cemazar M, et al. Tumor treatment by direct electric current. Tumor perfusion changes. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1997;43:253–256.
- Nilsson E, von Euler H, Berendson J, et al. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*. 2000;51(1):1–11.
- Ciria HC, Quevedo MS, Cabrales LB, et al. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer*. 2004;4:87.
- Nordenström BEW. Biologically closed electric circuits: activation of vascular interstitial closed electric circuits for treatment of inoperable cancers. *Bioelectromagnetics*. 1984;3:137–153.
- Nordenström BE. Electrochemical treatment of cancer. I: Variable response to anodic and cathodic fields. *Am J Clin Oncol*. 1989;12(6):530–536.
- Nordenström BE. Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer. *Eur J Surg Suppl*. 1994;(574):93–109.
- Nordenström BEW. Preliminary clinical trials of electrophoretic ionization in the treatment of malignant tumors. *IRCS Med Sci Biomed Technol*. 1978;6:537–540.
- Nordenström BE, Eksborg S, Beving H. Electrochemical treatment of cancer. II: Effect of electrophoretic influence on adriamycin. *Am J Clin Oncol*. 1990;13(1):75–88.
- Holandino C, Veiga VF, Rodrigues ML, Morales MM, Capella MA, Alviano CS. Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukemic cells. *Bioelectromagnetics*. 2001;22(7):470–478.
- Veiga V, Holandino C, Rodrigues M, Capella M, Menezes S, Alviano C. Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an in vitro analysis. *Bioelectromagnetics*. 2000;21(8):597–607.
- Veiga VF, Nimrichter L, Teixeira CA, et al. Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochem Biophys*. 2005;42(1):61–74.
- Wagner BA, Britigan BE, Reszka KJ, McCormick ML, Burns CP. Hydrogen peroxide-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells is mediated by the oxidants hypochlorous acid and chloramines. *Arch Biochem Biophys*. 2002;401(2):223–234.
- Englert RP, Shacter E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20518–20526.
- Santoyo S, Ga de Jalón E, Ygartua P, Renedo M, Blanco-Prieto M. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *Int J Pharm*. 2002;242(1–2):107–113.
- Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, et al. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *Int J Pharm*. 2007;344(1–2):53–61.
- Ricci-Júnior E, Marchetti JM. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *Int J Pharm*. 2006;310(1–2):187–195.
- Fonseca ME, Frimer N, Mendonça RE, Couceiro JN, Machado RD. A combined staining technique developed for virus particle observation in the electron microscope. *Rev Bras Biol*. 1984;44(1):37–40.
- Freshney NW, Goonasekera SD, Feig LA. Activation of the exchange factor Ras-GRF by calcium requires an intact Dbl homology domain. *FEBS Lett*. 1997;407(1):111–115.
- Holandino C, Veiga VF, Capella MM, Menezes S, Alviano CS. Damage induction by direct electric current in tumoural target cells. *Indian J Exp Biol*. 2000;38(6):554–558.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
- Meira DD, Marinho-Carvalho MM, Teixeira CA, et al. Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol Genet Metab*. 2005;84(4):354–362.

41. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res.* 2000; 60(16):4440–4445.
42. Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials.* 2001;22(3):231–241.
43. Graf A, Ablinger E, Peters S, Zimmer A, Hook S, Rades T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *Int J Pharm.* 2008;350(1–2):351–360.
44. Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *J Colloid Interface Sci.* 2008;322(2): 505–515.
45. Holandino C, Capella MA, Angluster J, Silva-Filho FC, Menezes S, Alviano CS. Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in *Escherichia coli*. *Indian J Biochem Biophys.* 1998;35(5):284–290.
46. Janigro D, Perju C, Fazio V, et al. Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. *BMC Cancer.* 2006;6:72.
47. Colombo L, González G, Marshall G, et al. Ion transport in tumors under electrochemical treatment: in vivo, in vitro and in silico modeling. *Bioelectrochemistry.* 2007;71(2):223–232.
48. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2008; 34(2):232–240.
49. Peskin AV, Winterbourn CC. Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate, and methionine and with intracellular glutathione. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(10):1252–1260.
50. Klamt F, Shacter E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J Biol Chem.* 2005;280(22): 21346–21352.
51. Salzberg M, Kirson E, Palti Y, Rochlitz C. A pilot study with very low-intensity, intermediate-frequency electric fields in patients with locally advanced and/or metastatic solid tumors. *Onkologie.* 2008;31: 362–365.
52. Griffin DT, Dodd NJ, Moore JV, Pullan BR, Taylor TV. The effects of low level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumor regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer.* 1994;69(5):875–878.
53. Fosh BG, Finch JG, Lea M, et al. Use of electrolysis as an adjunct to liver resection. *Br J Surg.* 2002;89(8):999–1002.
54. Plesnicar A, Sersa G, Vodovnik L, Jancar J, Zaletel-Kragelj L, Plesnicar S. Electric treatment of human melanoma skin lesions with low level direct electric current: an assessment of clinical experience following a preliminary study in five patients. *Eur J Surg Suppl.* 1994;(574): 45–49.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Effects of Direct Electric Current on *Herpetomonas samuelpessoai*: An Ultrastructural Study

Marina das Neves Gomes,^{1†} Cesar Augusto Antunes Teixeira,^{1†} Gleyce Moreno Barbosa,¹ Marcela Teso Froes,¹
Maria Bernadete Silva,¹ Venicio Feo da Veiga,² Rosangela Maria de Araújo Soares,³
André Luis Souza dos Santos,⁴ and Carla Holandino^{1*}

¹Laboratory of Multidisciplinary Pharmaceutical Sciences, Department of Drugs,
Faculty of Pharmacy, Centre of Health Sciences (CCS),
Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes
(IMPPG), CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratory of Protist Biology, Department of General Microbiology, IMPPG, CCS,
UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratory for Integrated Studies of Microbial Biochemistry,
Department of General Microbiology, IMPPG, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

The literature shows that the effects of direct electric currents on biological material are numerous, including bactericidal, fungicidal, parasiticidal, and anti-tumoral, among others. Non-pathogenic trypanosomatids, such as *Herpetomonas samuelpessoai*, have emerged as important models for the study of basic biological processes performed by a eukaryotic cell. The present study reports a dose-dependent anti-protozoan effect of direct electric treatment with both cathodic and anodic current flows on *H. samuelpessoai* cells. The damaging effects can be attributable to the electrolysis products generated during electric stimulation. The pH of the cell suspension was progressively augmented from 7.4 to 10.5 after the cathodic treatment. In contrast, the anodic treatment caused a pH decrease varying from 7.4 to 6.5. Transmission electron microscopy analyses revealed profound alterations in vital cellular structures (e.g., mitochondrion, kinetoplast, flagellum, flagellar pocket, nucleus, and plasma membrane) after exposure to both cathodic and anodic current flows. Specifically, cathodic current flow treatment induced the appearance of autophagic-like structures on parasite cells, while those submitted to an anodic current flow presented marked disorganization of plasma membrane and necrotic appearance. However, parasites treated in the intermediary chamber (without contact with the electrodes) did not present significant changes in viability or morphology, and no pH variation was detected in this system. The use of *H. samuelpessoai* as a biological model and the direct electric current experimental approach used in our study provide important information for understanding the mechanisms involved in the cytotoxic effects of this physical agent. Bioelectromagnetics 33:334–345, 2012.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *Herpetomonas samuelpessoai*; direct electric current; trypanosomatid; morphology; viability; ultrastructure

Grant sponsors: Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Jose Bonifacio Foundation (FUJB); Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES).

[†]Both authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Carla Holandino, Laboratory of Multidisciplinary Pharmaceutical Sciences, Department of Drugs, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rua Professor

Rodolfo Rocco s/n, CCS, Bloco B ss, sala 011, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.
E-mail: cholandino@gmail.com

Received for review 7 February 2011; Accepted 18 September 2011

DOI 10.1002/bem.20712

Published online 19 October 2011 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

INTRODUCTION

The literature shows that the effects of the interaction between direct electric currents (DC) and biological material are numerous, including bactericidal [Valle et al., 2007; Birbir et al., 2008, 2009; Tiehm et al., 2009], fungicidal [Ranalli et al., 2002], and parasiticidal actions [Sharquie et al., 1998; Hejazi et al., 2004; Dalimi et al., 2005]. Electric stimulation is also used for the regeneration of ulcerated tissue [Huckfeldt et al., 2007; Talebi et al., 2007], tendon healing [Nessler and Mass, 1985], bone fracture healing [Ciombor and Aaron, 2005; Jennings et al., 2008], and skin repair [Carley and Wainapel, 1985; Lee et al., 1993]. The anti-tumoral activity of DC has also been characterized as causing inhibition of tumor growth in both animals and humans [Schauble et al., 1977; Nordenström, 1983, 1994; Griffin et al., 1994; Chou et al., 1997]. The anti-tumoral activity of DC was primarily described by Nordenström [1978], who showed the efficacy of electric treatment in destroying lung tumors. This therapy, named tumoral electrotherapy (ETT), is largely used nowadays in countries such as China [Xin, 1994] and Cuba [Verdecia et al., 2007], with outstanding clinical results. Despite its widespread use in these countries, the DC mechanisms of action are not yet fully known, but appear to involve local electrolysis [Nordenström, 1983].

An important achievement for the studies of ETT was the development of an *in vitro* experimental model in order to investigate the effects of DC on culture cell lines [Holandino et al., 2001; Veiga et al., 2000, 2005]. Veiga et al. [2000] observed marked alterations in vital structures of mouse mastocytoma P815 cells, depending on the duration of treatment and polarity of the electrode. In that study, anodic current flow (AF) and cathodic current flow (CF) treatments caused a decrease in cell viability, although the latter was more effective in generating cell lysis. Similarly, DC treatment induced changes in multidrug-resistant leukemia cells [Holandino et al., 2000] and human leukemic cells [Veiga et al., 2005], such as membrane damage, alterations in the cell shape and chromatin organization, mitochondrial swelling and condensation, cytoplasmic swelling and matrix rarefaction. Additionally, chlorinated species (Cl^- , Cl_2 , HOCl) generated by AF can react with amino acids producing oxidizing and apoptosis-inducing molecules called chloramines. As a matter of fact, other studies developed with different reactive oxygen species have proved that hypochlorous acid induced apoptotic cell death through its reaction with free amino acids present in the cell suspension

[Englert and Shacter, 2002; Wagner et al., 2002]. Indeed, two previous works confirmed this hypothesis by adding the amino acids glutamine and tyrosine to the DC treatment medium, which induced the early death of HL60 cells [Veiga et al., 2005] and multidrug-resistant mouse melanoma B16F10 cells [de Campos et al., 2010] after their exposure to the AF generated by DC.

Non-pathogenic trypanosomatids have emerged as important models for the study of basic biological processes performed by an archetypal eukaryotic cell. In this context, several Brazilian researchers have used *Herpetomonas samuelpessoai*, a monoxenous trypanosomatid, as a very interesting model to study physiological, genetic, biochemical, and ultrastructural aspects of flagellate trypanosomatids [Angluster et al., 1977; McGhee and Cosgrove, 1980; Soares et al., 1984; Santos and Soares, 2007]. *H. samuelpessoai* was originally isolated from the predatory insect *Zelus leucogramus* (Hemiptera: Reduviidae) [Galvao et al., 1970], which can be easily cultivated either in complex or chemically defined medium at 26 °C (insect vector temperature) or 37 °C (mammalian temperature) [Roitman et al., 1972]. These characteristics make this microorganism particularly well suited for the study of the influence of growth conditions on cell surface properties [Angluster et al., 1977; Pereira et al., 2009]. Moreover, the potential of these insect parasites to grow at 37 °C without previous adaptation is a requirement for them to be able to develop in the human body [McGhee and Cosgrove, 1980; Morio et al., 2008]. Recently, Morio et al. [2008] reported the isolation, from the blood of a human immunodeficiency virus-positive patient, of a flagellated protozoan genetically related to *H. samuelpessoai*, which is usually an insect parasite. In fact, *H. samuelpessoai* presents humoral and cellular cross-immunity factors in common with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., which suggests similarities among their surface components [Souza et al., 1974; Elias et al., 2006; Pereira et al., 2009, 2010a,b].

The present study aimed to verify the biological effects caused by the action of DC on the viability and morphological features of *H. samuelpessoai* cells.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and Cultivation

The protozoan *H. samuelpessoai* was maintained by weekly transfers in a chemically defined medium [Roitman et al., 1972]. Cells were grown at

28 °C, for 48 h to reach the exponential growth phase and then kept at 4 °C [Santos et al., 2001]. For the experiments, cells were grown in 50 ml flasks containing 10 ml of autoclaved Roitman's defined medium. The inoculum consisted of 0.1 ml of a 48 h culture containing about 2×10^6 cells/ml. Parasite growth was estimated by determining the cell concentration in a Neubauer haemocytometer (Bright-Line, BOECO, Hamburg, Germany).

DC Treatment

The experimental system consisted of a 24-well cell culture dish equipped with platinum electrodes arranged symmetrically, in which three, non-contiguous wells were linked by filter paper bridges (Fig. 1A). This independent chamber system allows cell suspensions to be separately exposed to three different situations along the electric circuit: the CF, in which the cells are placed in the vicinity of the cathode; the AF, near the anode; and the electroionic current flow (EIF) system, in which cells do not have contact with the electrodes or DC electrolytic products. Control cells were kept in an identical culture dish in the same conditions but unexposed to DC. The *H. samuelpessoai* cells were suspended in phosphate-buffered saline (PBS; 8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 2.17 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l KH_2PO_4 , pH 7.2) at a concentration of around 1.0×10^6 cell/ml, and 2 ml of this cell suspension were treated with 2 mA of DC. Samples (AF-, CF- and EIF-treated cells and untreated control cells) were collected by interrupting the DC treatment after specific times (0, 2, 4, 6, 8, and 10 min) for the cell viability experiments. For morphological studies, 4 and 10 min treatments were chosen for analyses. The entire experimental procedure was performed in a maximum of 45 min, including sampling, and all analyses were conducted immediately after treatment times at room temperature (25.0 °C), which was monitored with a thermometer. The higher temperature achieved inside the wells was 25.4 °C after 10 min of treatment, as previously reported by Veiga et al. [2000]. The system was connected to a DC source (Model ETM 901, KLD Biosystems Electronic Equipment, São Paulo, Brazil), whose intensity was monitored using a multimeter. In order to determine the electric field generated at specific points of this experimental system, the potential gradient was measured along the three experimental wells. For this, one lead of a multimeter was connected to the anode and the other was positioned at the three different points of the electric circuit, at different distances at the same times at which cells were tested (Fig. 1A). These measures allowed the determination

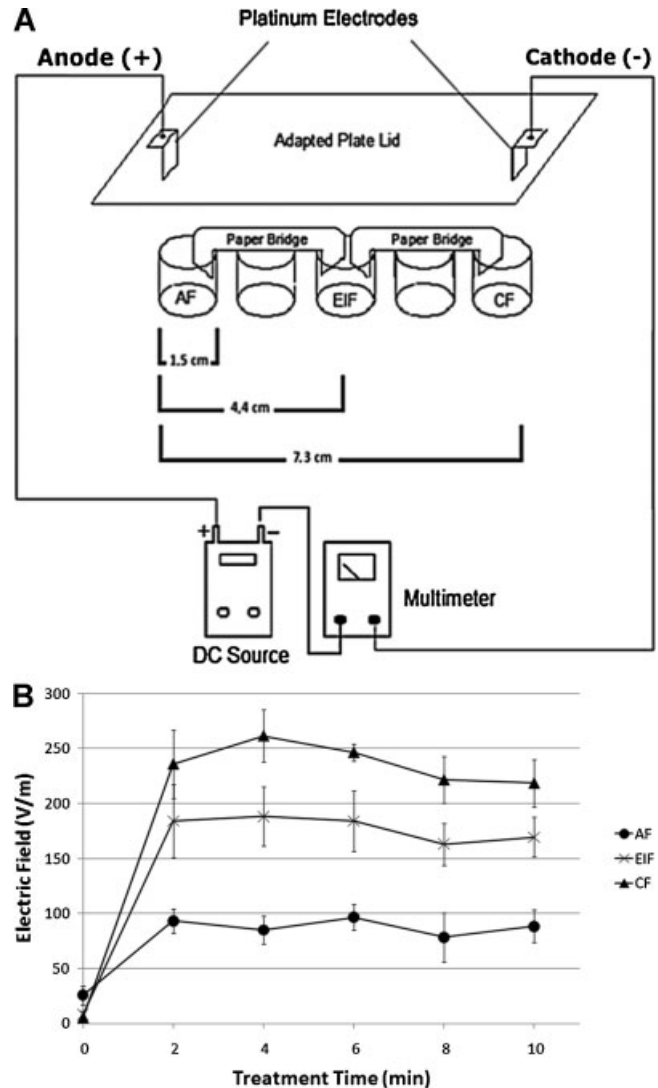


Fig. 1. **A:** Schematic representation of the 24-well plate used for DC treatment of *H. samuelpessoai*. The cell suspensions are distributed over each individual well (AF, anodic current flow; EIF, electroionic current flow; CF, cathodic current flow). **B:** Electric field measurements in the different treatment situations after 2, 4, 6, 8 and 10 min of DC treatment. Measurements of potentials were performed considering the distances indicated in Figure 1A.

of the electric field variations, as can be seen in Figure 1B. The electric fields were 88 V/m (AF wells), 177 V/m (EIF wells), and 237 V/m (CF wells). Alterations in pH induced by AF, EIF, and CF were monitored by measuring the cell suspension pH after each period of treatment using a pHmeter (Model MPC 227, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

Cellular Viability and Optical Microscopy Analysis

In order to evaluate the viability of the trypanosomatid treated with DC, aliquots of 25 μl were

taken after each time point and then mixed with 25 μ l of Trypan blue dye. The total number of viable cells was determined using the Neubauer haemocytometer. Non-viable cells were considered as Trypan blue-stained cells that retained their shape [Holandino et al., 2000; Veiga et al., 2000]. For viability determination, each independent experiment with electrical treatment was done on different days with different inoculums of *H. samuelpessoai*. Each replicate consisted of a simultaneous treatment of one well for each experimental condition (AF, CF, EIF, and Control). On each day of the experiment, two replicates were performed for all experimental situations, and the final data were a result of four different days of experiments. In order to evaluate the morphological alterations, cells treated with DC for 4 and 10 min were collected by centrifugation, washed in PBS solution, smeared onto slides and air-dried, and stained using the May–Grunwald–Giemsa method [Veiga et al., 2005]. Three independent preparations were analyzed by optical microscopy. At least 200 cells in each preparation were examined with a light microscope (Axioplan 2, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Images were obtained using a digital camera attached to the microscope.

Ultrastructural Analysis

The ultrastructural aspects of *H. samuelpessoai* cells, before and after DC treatment for 4 and 10 min, were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). For this study, parasite cells were collected by centrifugation, washed in PBS, and fixed with 1.25% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, containing 1.0 mM CaCl_2 at 4 °C. Cells were then washed three times with 0.1 M sodium cacodylate buffer and post-fixed for 1 h at room temperature in 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl_2 . After rinsing, cells were dehydrated in acetone, incubated in an acetone–epon mixture (2:1; 1:1; 1:2) and embedded in Epon 812 resin obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), as described by Lewis and Knight [1977]. Ultrathin sections were prepared with a diamond knife in an ultramicrotome (Leica EM UC6, Leica Microsystems, Vienna, Austria), collected in 300 mesh cooper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a transmission electron microscope (Morgagni 268, FEI, Hillsboro, OR).

Statistics

All data were statistically analyzed using Sigma-Plot software version 11.0 (Systat Software, San Jose, CA). The data were also analyzed by one-way

ANOVA, and differences in mean values among the treatment groups were compared using the Holm-Sidak method. *P*-values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as significant.

RESULTS

DC treatment had a marked effect on the cellular viability of *H. samuelpessoai* (Fig. 2A). Both the CF and AF treatments induced an identical and significant ($P < 0.05$) decrease in the number of viable cells, which was proportional to the duration of treatment, culminating in killing around 60% of profiles

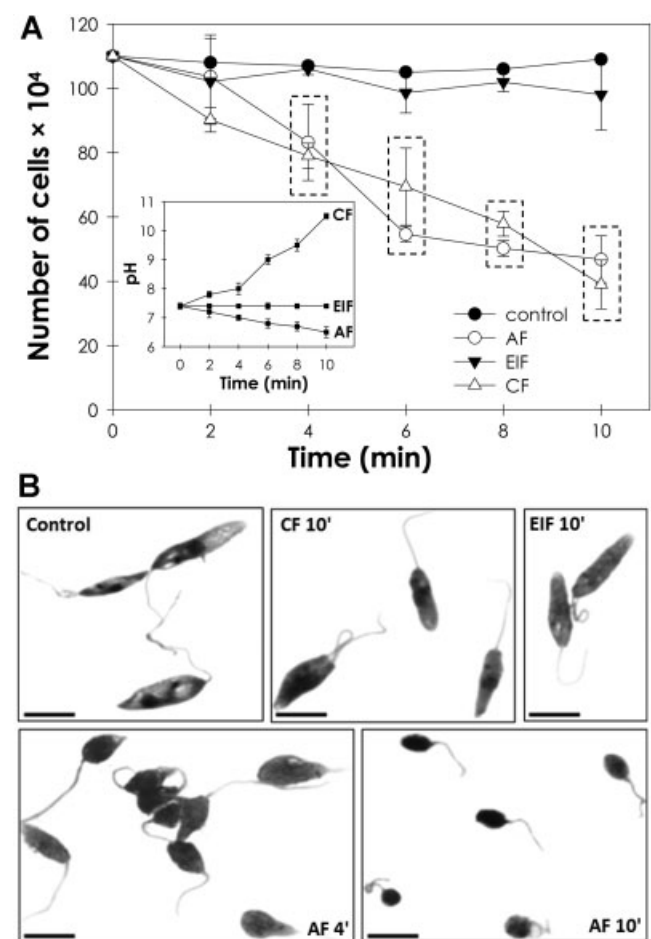


Fig. 2. **A:** Number of viable cells quantified using the Trypan blue exclusion method immediately after treatment times. Alterations in the cell suspension pH after each treatment are shown in the inset. Results are expressed as means \pm SD of four independent experiments done in duplicate. Dashed boxes highlight viability values significantly different from control ($P < 0.05$) (AF, anodic current flow; EIF, electroionic current flow; CF, cathodic current flow). **B:** Optical microscopic observations of the parasite cells after treatments with DC in comparison to untreated cells (Control). Similar results were observed after the treatment for 4 and 10 min with CF and EIF (data not shown). Bars = 10 μ m.

after 10 min of exposure (Fig. 2A). However, the EIF stimulus did not induce a significant alteration in parasite viability when compared with the untreated cells (Fig. 2A).

In order to evaluate the influence of pH on parasite viability, this parameter was measured at all the intervals of electric treatment (0–10 min). After CF treatment, the pH of the parasite suspension was progressively augmented from 7.4 to 10.5 (Fig. 2A, inset). In contrast, AF treatment caused a decrease in pH varying from 7.4 to 6.5. As expected, EIF stimulation did not cause pH changes in the suspension (Fig. 2A, inset).

The AF promoted some alterations in the cell morphology at the optical microscopy level; the parasites became short and round and were able to incorporate more Giemsa stain (Fig. 2B, panels AF 4' and AF 10'), compared to the other groups (Fig. 2B, panels CF 10', EIF 10' and Control). Therefore, we carried out an ultrastructural analysis of *H. samuelpeessoai* following treatment of the flagellate cells with DC for 0 (Fig. 3), 4 (Figs. 4 and 6), and 10 min (Figs. 5 and 7).

Observation of untreated *H. samuelpeessoai* by TEM showed elongated cells containing a centrally located nucleus, a single mitochondrion with compact condensation of the kinetoplast DNA (kDNA), and a homogenous cytoplasm containing organelles with typical morphology (Fig. 3A,B). Cells treated with EIF, which had not been directly exposed to the electrolysis products, presented normal ultrastructural aspects when compared with the untreated cells (data not shown). Conversely, TEM analyses of parasites under the stimulus of both the AF and CF revealed profound damage in vital cellular structures (Figs. 4–7).

CF treatment for 4 min caused an intense disorganization of the plasma membrane including shedding (Fig. 4B–E; thick black arrows) and ruptures (Fig. 4D–F; thin black arrows), as registered using TEM. Flagellar membrane and flagellar pocket regions were also affected by the presence of membrane shedding (Fig. 4A–C; black arrowheads) and membrane dilatation (Fig. 4G; white diamond). Other alterations were observed such as: cytoplasm vacuolization (Fig. 4A,H,K; black stars); appearance of autophagosomes containing abnormal damage or concentric membrane structures inside the organelle (Fig. 4H; thick white arrows); formation of myelin figures (Fig. 4J; double arrow); endoplasmic reticulum profiles surrounding cytoplasmic vacuoles (Fig. 4I; thin white arrows); detection of concentric membranes in the cytoplasm (Fig. 4K; black square); and plasma membrane constriction, indicating sites

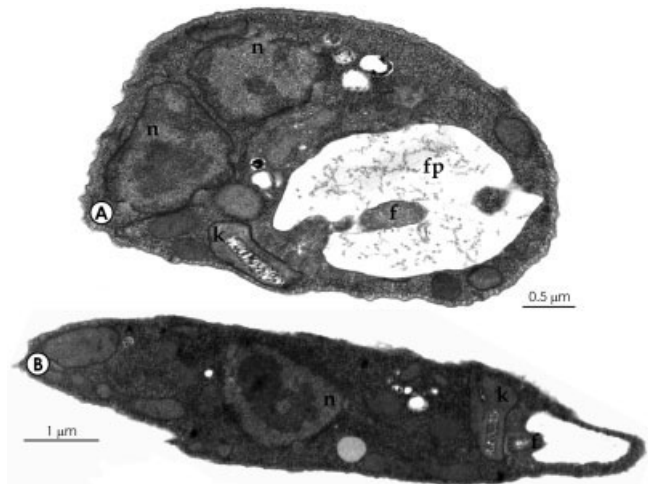


Fig. 3. Transmission electron microscopy of DC-untreated promastigote cells of *H. samuelpeessoai*. Usual ultrastructural features were observed in (A) transversal and (B) longitudinal parasite sections, including the nucleus (n), a single mitochondrion with compact condensation of the kinetoplast DNA (k), a homogenous cytoplasm containing organelles with typical morphology, flagellum (f), and flagellar pocket (fp). Note in (A) that the cell is in the division process and two nuclei can be seen.

of vesicles pinched off and containing several concentric membranes (Fig. 4F; black-filled diamond).

Figure 5 shows morphological alterations induced by CF after 10 min, showing the appearance of membrane projections (Fig. 5A; thick black arrows) and swelling of mitochondria (Fig. 5B–D; black diamond). A marked loss in the kDNA condensation was observed (Fig. 5C: upper image: untreated cell; lower image: DC-treated cell). Vacuolization (Fig. 5D,E; black stars), shedding in the flagellar membrane (Fig. 5E; arrowheads) and concentric vesicle membranes inside the flagellar pocket (Fig. 5E; thin black arrows) were also observed on treated cells. Condensed nuclear DNA in electron-dense clusters (Fig. 5F; thick white arrows) were also registered.

After AF for 4 min, several ultrastructural alterations were observed (Fig. 6). The damage consisted of different kinds and extensions of plasma membrane projections (Fig. 6A–E,I; thick black arrows); dilatation of the flagellar membrane (Fig. 6B,D,E; black-filled diamond); intense exocytic activity in the region of the flagellar pocket (Fig. 6D,E,G; arrowheads); shedding of flagellar membrane fragments (Fig. 6E; thin black arrow); shedding of large vesicles from plasma membrane (Fig. 6E,H,I; open arrows); detachment of surface materials (Fig. 6G,H; double arrows); loss of kDNA (Fig. 6G; black circle); and cell polarity (Fig. 6F). The parasite cells become

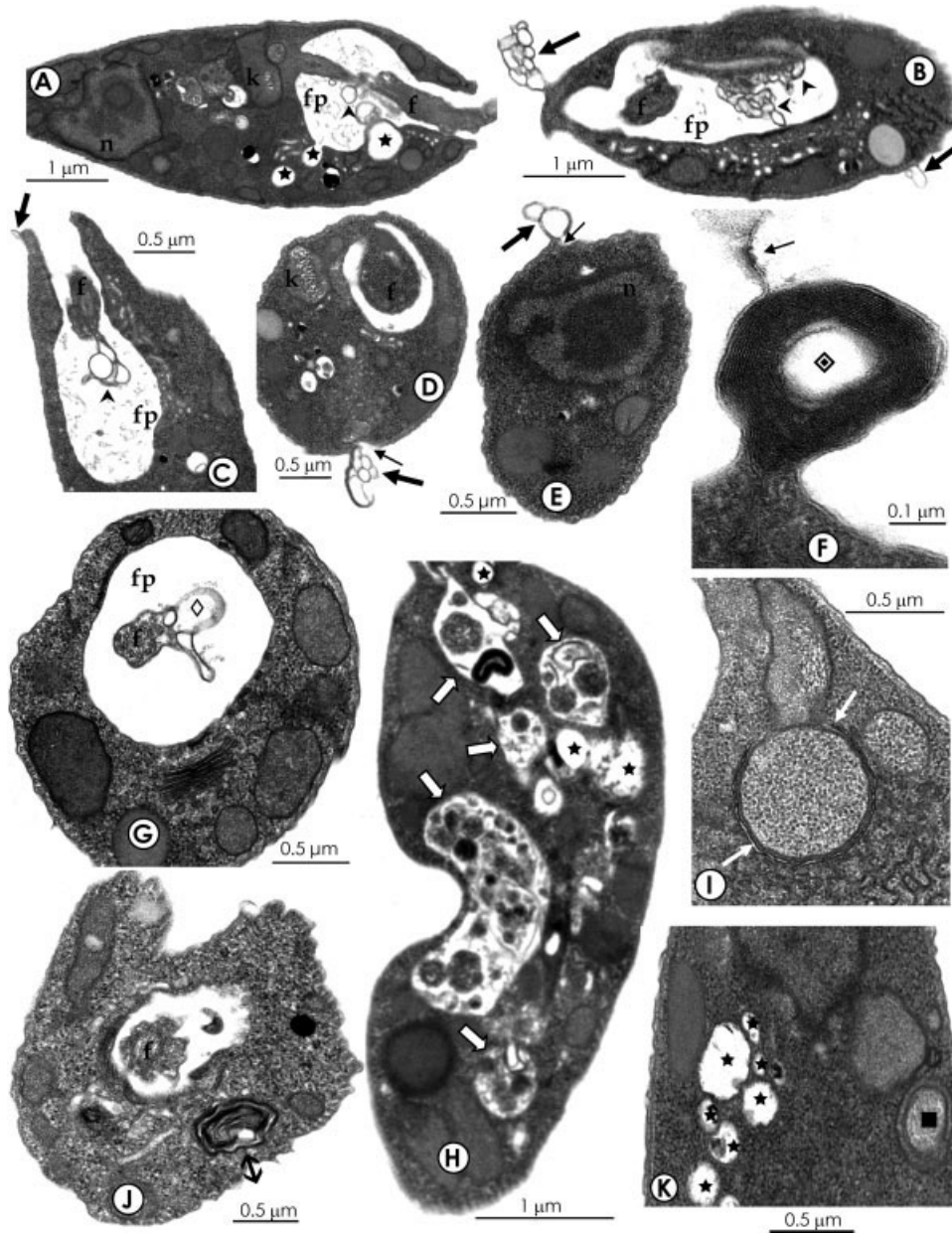


Fig. 4. Transmission electron micrographs of ultrathin sections of *H. samuelpessoai* cells after 4 min of CF treatment with their respective scale bars (A to K). The ultrastructural alterations observed are marked in the figures (n, nucleus; f, flagellum; fp, flagellar pocket; k, kinetoplast).

less electron dense, with loss of cytoplasmic content (Fig. 6I,J) and cytoplasm vacuolization (Fig. 6H–J; black stars).

After 10 min of AF treatment *H. samuelpessoai* cells presented shedding of vesicles from the plasma membrane (Fig. 7A; thin black arrows); vesicles inside the flagellar pocket (Fig. 7A,B; arrowheads); and plasma membrane projections (Fig. 7C; thick black arrows). The majority of the treated parasitic cells presented typical necrotic appearance with

intense destruction of intracellular organelles, including the nucleus, and a loss of cytoplasmic content (Fig. 7B,C).

DISCUSSION

DC can produce several biological effects on living systems, which are largely studied for therapeutic purposes. Generation of oxidative/reductive

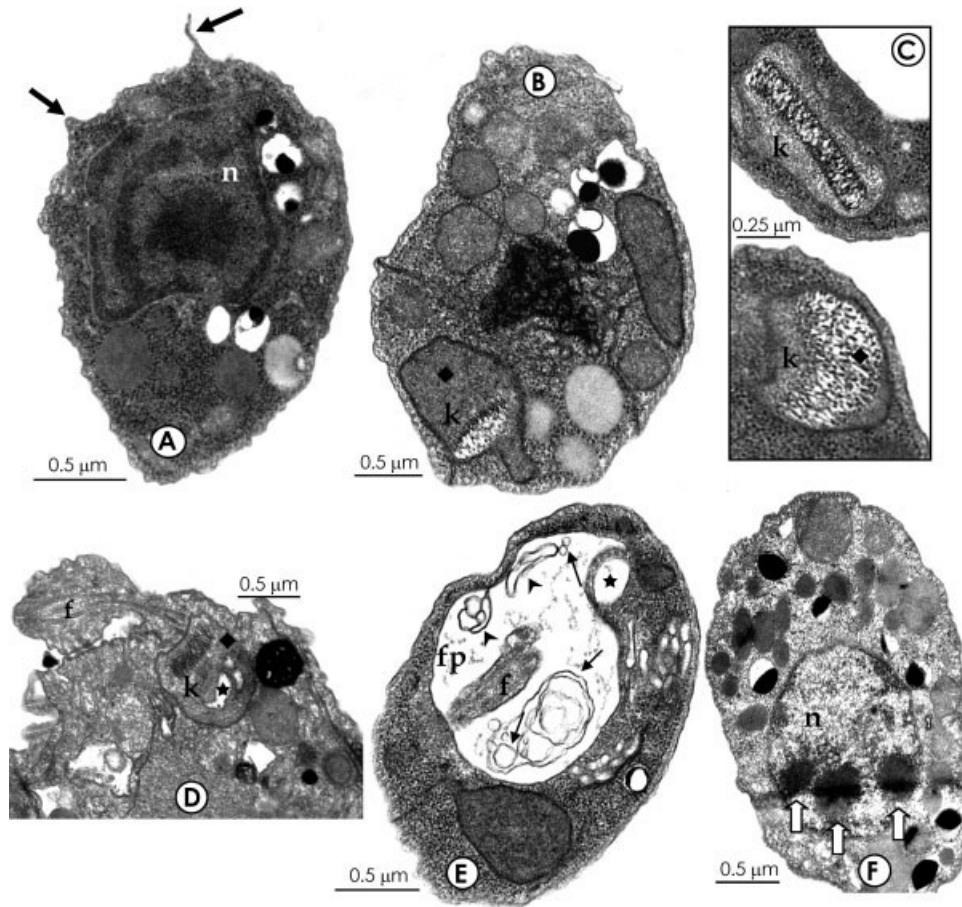


Fig. 5. Transmission electron micrographs of ultrathin sections of *H. samuelpeessoai* cells after 10 min of CF treatment with their respective scale bars (A to F). The ultrastructural alterations observed are marked in the figures (n, nucleus; f, flagellum; fp, flagellar pocket; k, kinetoplast).

electrolysis products and pH variation are thought to be the main events responsible for cell and tissue destruction after DC application [Veiga et al., 2000; Holandino et al., 2001; von Euler et al., 2002].

The nature of electrolysis products varies with the polarity used in the DC treatment. Near the anodic polarity, there is the formation of oxygen, chlorine gas, hypochlorite and hydrogen ions, leading to acidification of pH. On the other hand, around the cathode, hydrogen gas and hydroxyl ions are released, thus leading to alkalization of pH [Samuelsson and Jönsson, 1980; Nilsson et al., 2000; Veiga et al., 2000]. Acidic pH certainly accounts for the damage caused by AF, especially in in vivo conditions. However, the magnitude of the pH decrease observed in this model (less than 1 pH unit after 10 min of DC) would not be enough to cause significant damage in *H. samuelpeessoai* cells, as previously reported by Santos et al. [2002]. Additionally, when P815 cells were submitted to an artificial decrease in pH

(obtained by the addition of HCl to the electrolytic medium), cell death did not occur. Nevertheless, the artificial alkalization mimicking pH variations induced by CF produced a similar damage profile in P815 cells. This previous work excluded the possibility that the damage caused by the AF could be attributed solely to the generation of H^+ ions, which cannot be concluded for damage caused by the CF [Veiga et al., 2000].

The exact mechanisms of DC are not well understood yet. However, AF has been found to lead to necrosis and apoptosis in its typical pattern [Veiga et al., 2000, 2005; Vijk, 2004]. The products generated by the AF and CF would determine the mechanism of cell death, since these products induce damage to vital structures such as mitochondria and the plasma membrane [Veiga et al., 2000, 2005; Holandino et al., 2001]. Besides, some authors have reported that chlorinated oxidative species generated by AF can react with some amino acids yielding

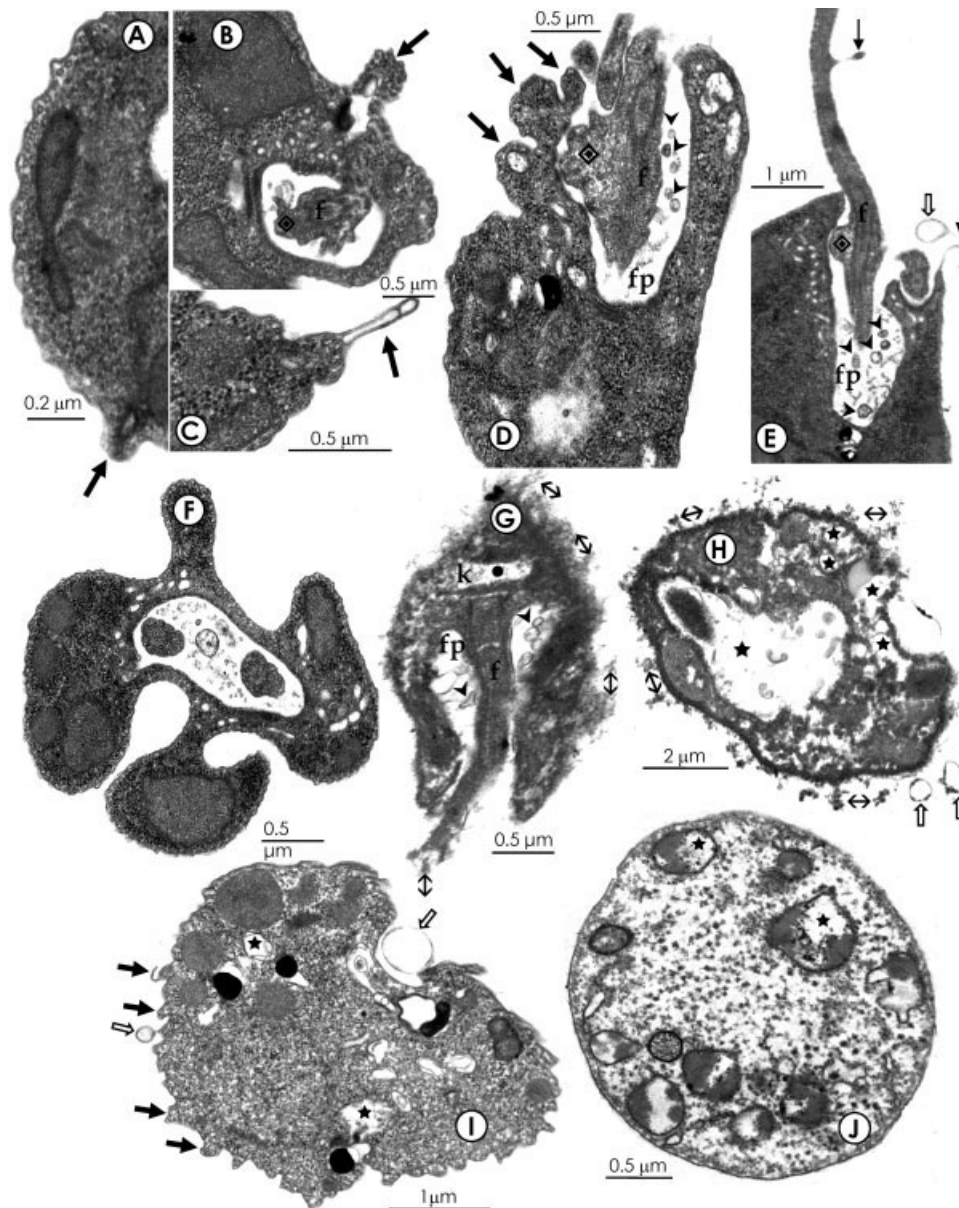


Fig. 6. Transmission electron micrographs of ultrathin sections of *H. samuelpeessoai* cells after 4 min of AF treatment with their respective scale bars (A to J). The ultrastructural alterations varied from discrete changes in the parasite cells to their total destruction (n, nucleus; f, flagellum; fp, flagellar pocket; k, kinetoplast).

chloramines, which can induce apoptosis in tumor cells [Naito et al., 1997; Veiga et al., 2005].

Electrical stimulation was used by Sharquie et al. [1998] for the treatment of cutaneous *Leishmania* lesions in 146 patients in 54 weekly, 10 min sessions of DC between 5 and 15 mA. Of the 146 injuries, 135 (92.5%) had complete or partial improvement after 4–6 weeks. In 2004, an in vitro and in vivo study with *Leishmania major* showed loss of protozoan viability and healing of lesions in infected mice after DC exposure [Hejazi et al., 2004]. It is

also known that electrical stimulation may play an important role in promoting the healing of intractable ulcers and other cutaneous lesions, leading to skin regeneration [Wolcott et al., 1969; Huckfeldt et al., 2007; Talebi et al., 2007]. Thus, it is possible that DC treatment could act as a dual mechanism in leishmaniasis treatment, helping the regeneration of skin at the lesion site while killing the parasite at the same time.

Considering the physiological similarities of *H. samuelpeessoai* with *T. cruzi* and *Leishmania* spp.,

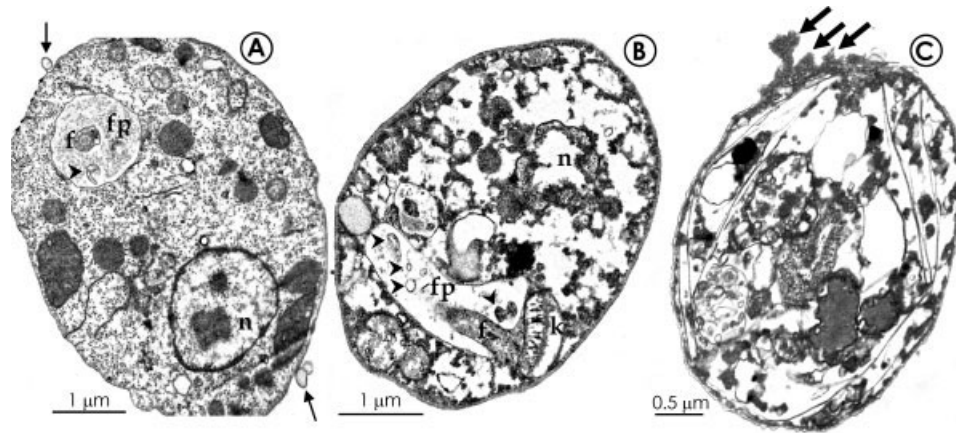


Fig. 7. Ultrastructural aspects of 10 min of AF-treated *H. samuelpessoai* cells. The majority of the treated parasitic cells presented typical necrotic appearance. Each micrograph (A to C) is followed by its respective scale bar (n, nucleus; f, flagellum; fp, flagellar pocket; k, kinetoplast).

it is reasonable to imagine that the alterations detected in the present study with *H. samuelpessoai* could also be observed in its pathogenic counterparts. *H. samuelpessoai* presents growth over a wide temperature range, from 25 °C (the main temperature used in in vitro DC experiments) to 37 °C (the physiological temperature of the host). Since DC damage is not directly associated with temperature variations [Veiga et al., 2000], the results obtained in the present study (at 25 °C) could possibly be extended to the in vivo environment present in mammalian organisms (at 37 °C). However, this aspect should be investigated in further studies using *H. samuelpessoai* as a suitable biological model.

The present study reported a dose-dependent anti-protozoan effect of DC on *H. samuelpessoai*. The 2 mA intensity applied caused a decrease in cell viability that was directly proportional to the time of exposure, both in the AF and CF. On the other hand, EIF did not induce any effect on *H. samuelpessoai* cell viability, corroborating previous findings that the electrolysis products generated near the electrodes are the main agents responsible for cell killing [Veiga et al., 2000, 2005; Holandino et al., 2001]. A conclusion about the role of these chemical products in DC mechanisms could be assessed by the evaluation of damage after incubation of untreated cells with DC-treated medium. Another interesting approach to prove that the cytotoxic effects of DC could be attributed to the generation of reactive oxygen species (ROS) would be to add ROS scavengers into the electrolytic medium and measure cell viability.

The use of 2 mA DC treatment induced important morphological changes in different tumor cell lines. These alterations are probably caused by the

electrolysis products yielded by CF and AF, while EIF preserved the ultrastructural features of cells. This finding suggests that the generation of toxic electrolysis products might be essential for the occurrence of the cellular modifications [Holandino et al., 2000; Veiga et al., 2000]. In fact, AF promoted some important alterations in *H. samuelpessoai* morphology detected using optical microscopy. In contrast, the analyses of Giemsa slides prepared from the CF-treated cells showed no detectable cellular alterations, despite the significant decrease in cell viability. However, the damage detected in vital subcellular structures, observed using TEM, corroborated the extension of cell death. These data suggest a proportional relationship between the occurrence of cell morphological abnormalities and decreases in viability.

The comparison of the ultrastructural alterations induced by DC in tumor cells and in *H. samuelpessoai* showed damage in similar subcellular structures, suggesting that DC acts on the same cell targets in both parasite and human cells. Interestingly, CF-treated parasite cells confirmed the presence of autophagosomes, vesicles containing concentric membranes and organelle leftovers, as well as vacuoles surrounding the endoplasmic reticulum. These features are both suggestive of autophagy, an attempt of the cell to recycle damaged structures. These effects were similar to those induced by lysophospholipid analogues, which are plant isolates active against trypanosomatid parasites such as *Leishmania amazonensis* [Santa-Rita et al., 2004]. In addition, DC damage detected in mitochondria of *H. samuelpessoai* may suggest that electric treatment affects the energy metabolism of the protozoan.

Many of the ultrastructural alterations observed in the *H. samuelpessoai*-treated cells can also be directly or indirectly associated with changes in the physical and chemical properties of membrane lipids. These changes can be caused by oxidation or reduction of these molecules by the electrolytic products generated by AF and CF, respectively. The myelin-like structures observed in CF-treated cells have been previously described as an accumulation of abnormal lipids with different physical properties induced by methyltransferase inhibitors in promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* [Rodrigues et al., 2002]. On the other hand, AF clearly caused a marked destabilization on the surface structure of the cell, resulting in an irregular pattern with many membrane projections and detaching fragments. In addition, the intense exocytic activity in the flagellum pocket is a possible sign of a significant change in membrane plasticity or even an active secretion of abnormal membrane lipids, as detected in *L. amazonensis* [Rodrigues et al., 2002].

Our group has previously showed that DC treatment induced important alterations in *Escherichia coli* surface properties, including fatty acid components of the cellular membrane [Holandino et al., 1998]. This aspect modified the agglutination index of *Saccharomyces cerevisiae* cells to the surface of *E. coli*, indicating that electric treatment may modulate microorganism adhesion ability. These cellular membrane alterations have also been detected in DC-treated tumor cells. DC treatment altered the membrane distribution of anionic sites, as well as the surface carbohydrate expression of P815 mouse mastocytoma cells. These alterations could be detected after 2 mA of CF and AF, which induced a diminished binding of concanavalin A and an increased binding of sialic acid- and fucose-specific lectins, respectively [Veiga et al., 2000].

Considering the morphological surface changes observed in *H. samuelpessoai*, it is likely that molecules involved in parasite–host cell interactions would be affected by DC, which could represent an interesting effect in a therapeutic context. The present study showed that DC killed *H. samuelpessoai* cells by multiple mechanisms, depending on the polarity applied. The ultrastructural alterations induced by the DC presented in this article bring important information for understanding the mechanisms involved in the cytotoxic effects of this physical agent.

CONCLUSION

Our results demonstrated some biological effects of DC on cell viability and morphological features of

H. samuelpessoai. The damage induced by DC in mitochondria suggests possible alterations in the energy metabolism of this protozoan. The anti-protozoan effect comes to join the realm of promising medical applications of electrical treatment as a simpler, cheaper, and safer therapeutic approach.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marcos Telló for his electrical engineering expertise and for the contribution on determination of the electrical properties of the experimental system.

REFERENCES

- Angluster J, Bunn MM, De Souza W. 1977. Effect of 2-deoxy-D-glucose on differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*. *J Parasitol* 63:922–924.
- Birbir Y, Degirmenci D, Birbir M. 2008. Direct electric current utilization in destruction of extremely halophilic bacteria in salt that is used in brine curing of hides. *J Electrostat* 66:66388–66394.
- Birbir Y, Urgur G, Birbir M. 2009. Inactivation of bacterial population in hide-soak liquors via direct electric current. *J Electrostat* 67:640–645.
- Carley P, Wainapel S. 1985. Electrotherapy for acceleration of wound healing: Low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 66:443–446.
- Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. 1997. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics* 18:14–24.
- Ciombor D, Aaron R. 2005. The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin* 10:579–593.
- Dalimi A, Ghasemikhah R, Hashemi B. 2005. *Echinococcus granulosus*: Lethal effect of low voltage direct electric current on hydatid cyst protoscoleces. *Exp Parasitol* 109:237–240.
- de Campos VEB, Teixeira CA, Veiga VF, Ricci E Jr, Holandino C. 2010. L-tyrosine-loaded nanoparticles increase the anti-tumoral activity of direct electric current in a metastatic melanoma cell model. *Int J Nanomed* 5:961–971.
- Elias CGR, Pereira FM, Silva BA, Alviano CS, Soares RMA, Santos ALS. 2006. Leishmanolysin (gp63 metalloproteinase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology* 132:37–47.
- Englert RP, Shacter E. 2002. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: Amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:20518–20526.
- Galvao AB, Oliveira RL, Carvalho A, Veiga GP. 1970. *Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). *Rev Gaiana Med* 16:229–236.
- Griffin D, Dodd N, Moore J, Pullan B, Taylor T. 1994. The effects of low-level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: Tumour regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer* 69:875–878.
- Hejazi H, Eslami G, Dalimi A. 2004. The parasitocidal effect of electricity on *Leishmania major*, both *in vitro* and *in vivo*. *Ann Trop Med Parasitol* 98:37–42.

- Holandino C, Capella MA, Angluster J, Silva-Filho FC, Menezes S, Alviano CS. 1998. Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in *Escherichia coli*. *Indian J Biochem Biophys* 35:284–290.
- Holandino C, Veiga VF, Capella MMA, Menezes S, Alviano CS. 2000. Damage induction by direct electric current in tumoural target cells. *Indian J Exp Biol* 38:554–607.
- Holandino C, Veiga VF, Rodrigues ML, Morales MM, Capella MAM, Alviano CS. 2001. Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukemic cells. *Bioelectromagnetics* 22:470–478.
- Huckfeldt R, Flick A, Mikkelsen D, Lowe C, Finley P. 2007. Wound closure after split-thickness skin grafting is accelerated with the use of continuous direct anodal microcurrent applied to silver nylon wound contact dressings. *J Burn Care Res* 28:703–707.
- Jennings J, Chen D, Feldman D. 2008. Transcriptional response of dermal fibroblasts in direct current electric fields. *Bioelectromagnetics* 29:394–405.
- Lee R, Canaday D, Doong H. 1993. Review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair. *J Burn Care Rehabil* 14:319–335.
- Lewis PR, Knight DP. 1977. Staining methods for sectioned material. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- McGhee R, Cosgrove W. 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 44:140–173.
- Morio F, Reynes J, Dollet M, Pralong F, Dedet JP, Ravel C. 2008. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpeessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 46:3845–3847.
- Naito Y, Yoshikawa T, Fujii T, Boku Y, Yagi N, Dao S, Yoshida N, Kondo M, Matsui H, Ohtani-Fujita N, Sakai T. 1997. Monochloramine-induced cell growth inhibition and apoptosis in a rat gastric mucosal cell line. *J Clin Gastroenterol* 25:5179–5185.
- Nessler J, Mass D. 1985. A direct-current electrical stimulation of tendon healing *in vitro*. *Clin Orthop Relat Res* 217:303–312.
- Nilsson E, Von Euler H, Berendson J, Thörne A, Wersäll P, Näslund I, Lagerstedt AS, Narfström K, Olsson JM. 2000. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry* 51:1–11.
- Nordenström BEW. 1978. Preliminary clinical trials of electrophoretic ionization in the treatment of malignant tumors. *IRCS Med Sci* 6:537–540.
- Nordenström BEW. 1983. Biologically closed electric circuits. Clinical, experimental and theoretical evidence for an additional circulatory system. Stockholm: Nordic Medical Publications.
- Nordenström B. 1994. Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer. *Eur J Surg Suppl* 574:93–109.
- Pereira FM, Elias CGR, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. 2009. Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpeessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology* 136:45–54.
- Pereira FM, Dias FA, Elias CGR, d'Avila-Levy CM, Silva CS, Santos-Mallet JR, Branquinha MH, Santos ALS. 2010a. Leishmanolysin-like molecules in *Herpetomonas samuelpeessoai* mediate hydrolysis of protein substrates and interaction with insect. *Protist* 161:589–602.
- Pereira FM, Santos-Mallet JR, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM, Santos ALS. 2010b. Influence of leishmanolysin-like molecules of *Herpetomonas samuelpeessoai* on the interaction with macrophages. *Microbes Infect* 12:1061–1070.
- Ranalli G, Iorizzo M, Lustrato G, Zanardini E, Grazia L. 2002. Effects of low electric treatment on yeast microflora. *J Appl Microbiol* 93:877–883.
- Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, Souza W. 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:487–499.
- Roitman C, Roitman I, Azevedo HP. 1972. Growth of an insect trypanosomatid at 37 °C in a defined medium. *J Protozool* 19:346–349.
- Samuelsson L, Jönsson L. 1980. Electrolytic destruction of lung tissue. *Acta Radiol Diagn* 21:711–714.
- Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, Castro SL. 2004. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 54:704–710.
- Santos ALS, Soares RM. 2007. Effect of sphingosine and phorbol-12-myristate-13-acetate on the growth and dimethylsulfoxide-induced differentiation in the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:601–604.
- Santos ALS, Batista L, Abreu C, Alviano C, Angluster J, Soares R. 2001. Developmentally regulated protein expression mediated by dimethylsulfoxide in *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Curr Microbiol* 42:111–116.
- Santos ALS, Souto-Pradrón T, Alviano CS, Lopes AHCS, Soares RMA, Meyer-Fernandes JR. 2002. Secreted phosphatase activity induced by dimethylsulfoxide in *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Arch Biochem Biophys* 405:191–198.
- Schauble M, Habal M, Gullick H. 1977. Inhibition of experimental tumour growth in hamsters by small direct currents. *Arch Pathol Lab Med* 101:294–297.
- Sharquie K, Al-Hamamy H, El-Yassin D. 1998. Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: The Baghdadin device. *J Dermatol* 25:234–237.
- Soares RMA, Alviano CS, Silva-Filho FC, Esteves MJG, Angluster J, De Souza W. 1984. Effect of dimethylsulfoxide on the cell surface of *Herpetomonas samuelpeessoai*. *J Submicrosc Cytol* 16:735–739.
- Souza MCM, Reis AP, Silva WD, Brener Z. 1974. Mechanism of acquired immunity induced by “*Leptomonas pessoai*” against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Protozool* 21:579–583.
- Talebi G, Torkaman G, Firoozabadi M, Mofid M, Shariat S, Kahrizi S. 2007. Effects of micro-ampere direct current stimulation on injury potential and its relation to wound surface area in guinea pig. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007:3516–3519.
- Tiehm A, Lohner S, Augenstein T. 2009. Effects of direct electric current and electrode reactions on vinyl chloride degrading microorganisms. *Electrochim Acta* 54:3453–3459.
- Valle E, Zanardini P, Abbruscato P, Argenzio G, Lustrato G, Ranalli G, Sorlini C. 2007. Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures. *J Appl Microbiol* 103:1376–1385.
- Veiga VF, Holandino C, Rodrigues ML, Capella MAM, Menezes S, Alviano CS. 2000. Cellular damage and altered carbohydrate

- expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: An *in vitro* analysis. *Bioelectromagnetics* 21:597–607.
- Veiga VF, Nimrichter L, Teixeira CAA, Morales MM, Alviano CS, Rodrigues ML, Holandino C. 2005. Exposure of human leukemic cells to direct electric current: Generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 42:61–74.
- Verdecia M, O’Farrill M, Jing-hong L, Cabrales LB, Palencia FS, Ciria HMC, Brooks SA, Sala MS. 2007. First clinical experiences in Cuba on the use of electrotherapy in four patients with malignant superficial solid tumours. *MEDISAN* 11:1–13.
- Vijk AK. 2004. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: Necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis. *Int J Hydrogen Energ* 29:29663–29665.
- von Euler H, Soderstedt A, Thornec A, Olsson J, Yongqin G. 2002. 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* 58:163–170.
- Wagner BA, Britigan BE, Reszka KJ, McCormick ML, Burns CP. 2002. Hydrogen peroxide-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells is mediated by the oxidants hypochlorous acid and chloramines. *Arch Biochem Biophys* 401:223–234.
- Wolcott L, Wheeler P, Hardwicke H, Rowley B. 1969. Accelerated healing of skin ulcers by electrotherapy: Preliminary clinical results. *South Med J* 62:795–801.
- Xin Y. 1994. Organisation and spread of electrochemical therapy (ECT) in China. *Eur J Surg Suppl* 577:25–30.