

RAFAEL DE OLIVEIRA ANDRETTE

**“EFEITO DE CAMPOS ELÉTRICOS EXÓGENOS EM
CÉLULAS TUMORAIS – UTILIZAÇÃO EM
QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS MELANOCÍTICAS
B16F10”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia - USP/Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Versão Original

São Paulo
2012

RESUMO

ANDRETTE, R. A. **Efeito de Campos Elétricos Exógenos em Células Tumorais - utilização em quimioterapia de células melanocíticas B16F10**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A célula submetida a danos pela ação de agentes físicos e químicos sofre alterações no seu metabolismo desencadeando diversos sinais para efetuar o reparo. Quando o dano for do tipo DSB (*Double Strand Break* – dano na dupla fita) em DNA, um dos sinais atestados experimentalmente é um pulso elétrico extremamente rápido (um transiente elétrico) e intrinsecamente presente em todas as células. Com isso seria possível, em princípio, interferir no processo de reparação do DNA pela exposição a campos elétricos exógenos. Neste trabalho exploramos a possibilidade de uso terapêutico desses campos de forma complementar ao tratamento de neoplasias, expondo-as simultaneamente a campos elétricos e quimioterápicos. O quimioterápico utilizado para induzir DSB foi o Etoposídeo com exposição combinada a Campos Elétricos Estáticos (CEE) de 1000 V/cm. Estudamos a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 e fibroblastos humanos normais (FN1). Foram mensuradas as condições de viabilidade pelo teste de citotoxicidade – MTT (comparadas com o Paclitaxel PCF) em função da concentração, bem como análise em função do tempo de exposição, concomitante de Anexina V e Iodeto de Propídio (PI), apoptose via Caspase 3 e potencial mitocondrial via Rodamina 123 para períodos de 2, 4, 6 e 24 horas. Também foi realizada uma análise qualitativa da concentração celular e morfologia, via coloração com Vermelho Neutro, através de microscopia óptica. Todos os testes quantitativos foram avaliados quanto à significância estatística via o teste ANOVA. Os resultados referentes aos efeitos isolados do CEE indicaram uma redução média de quase 25% na viabilidade via MTT, e diminuição média do potencial mitocondrial de 15% em ambas as linhagens estudadas. Nenhum aumento de morte celular foi detectado pela ação isolada do campo elétrico. Os resultados combinados do CEE com o Etoposídeo induziram um aumento expressivo na mortalidade celular, reduzindo a IC₅₀ do Etoposídeo de 0,49 mmol para 0,20 mmol na linhagem tumoral B16F10, e de 0,46 mmol para 0,15 mmol nas células de fibroblasto FN1. A combinação do CEE com o paclitaxel não resultou em qualquer redução da viabilidade celular. Com concentrações de 0,212 e 0,425 mmol de Etoposídeo, e exposição simultânea ao campo elétrico, mensurou-se uma redução média de 54% na viabilidade. Quantificou-se um aumento médio de 15% na apoptose, via Caspase 3, após 2h em células FN1 e 4h em células B16F10, dobrando-se os valores obtidos isoladamente ao Etoposídeo nesses mesmos períodos de tempo. A detecção da apoptose e necrose via Anexina V/PI revelou um aumento de 20 para 40% na mortalidade com o tratamento combinado. Os resultados indicam que há uma redução no metabolismo mitocondrial pela ação isolada do CEE nas células, sem resultar em mortalidade. O tratamento combinado do campo elétrico com o quimioterápico Etoposídeo indica a ocorrência de uma interferência seletiva no mecanismo de reparo para danos do tipo DSB, neutralizando a sinalização de reparo. Como resultado, há um acúmulo de danos no DNA que desencadeiam os processos de morte celular mensurados.

Palavras chave: Campos Elétricos Estáticos. Quimiossensibilização. Melanoma. Interferência Elétrica em Reparo. Indutor de Apoptose. Quebra na Dupla Fita.

ABSTRACT

ANDRETTE, R. A. **Exogenous Electric Fields Effects in Tumoral Cells - Use in chemotherapy of melanocytic cells B16F10**. 2012. 113 p. Thesis (PhD in Biotechnology) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A cell submitted to damages caused by physical and chemical agents undergoes alterations in its metabolism, giving rise to many signals in order to accomplish repair. When damage in DNA is a DSB (*Double Strand Break*), one of the signals experimentally observed, and described by several biological cell models, is a very fast electrical pulse (an electric transient) present in all cells. Giving this, it would be possible, in principle, to interfere in the DNA repairing process by exposure to exogenous electric fields. The possibility of therapeutic usage of electric fields as complementary intervention in cancer treatment, by means of simultaneous exposure of tumors to chemotherapy and electric fields is investigated and addressed in this work. It was used the chemotherapeutic Etoposide to induce DSB with combined exposition to 1,000 V/cm Static Electric Fields (SEF). We studied the tumor strain of the murine melanoma B16F10 and of normal human fibroblasts (FN1). Viability conditions were measured with the cytotoxicity test – MTT – (compared with the antineoplastic Paclitaxel PCF) as function of concentration, as well as analysis as function of exposure time, concomitant Annexine V and Propidium Iodine (PI), apoptosis via Caspase 3 and mitochondrial potential via Rodamin 123 at time periods of 2, 4, 6 and 24 hours. Was also performed a qualitative analysis of cellular concentration and morphology by coloring with Neutral Red, through optical microscopy. All quantitative tests were checked for statistical significance by the ANOVA test. Results referring to isolated effects of the SEF showed an average viability reduction of 25%, via MTT, and an average decrease of 15%, approximately, in the mitochondrial potential for both of the studied strains. Exposure only to the electric field didn't cause any cell death. The combined results of SEF with Etoposide induced a substantial increase of cell deaths, reducing Etoposide IC₅₀ from 0.49 mmol to 0.20 mmol in the tumor strain B16F10, and from 0.46 mmol to 0.15 mmol in the fibroblast cells FN1. Association of the SEF with paclitaxel didn't alter the cell viability. With Etoposide concentrations of 0.212 and 0.425 mmol, and simultaneous exposure to the electric field, an average viability reduction of 54% was measured. An apoptosis average increase of 15%, via Caspase 3, was evaluated after 2h in FN1 cells and after 4h in B16F10 cells. The sole application of Etoposide, in these same times, doubled the apoptosis. Detection of apoptosis and necrosis via Annexine V/PI exhibited cell death increase from 20% to 40% when combined with electric field exposure. The results point to a reduction of the mitochondrial metabolism by the sole exposure of cells to the electric field, without leading to cell death. The combined treatment of electric field with the chemotherapeutic Etoposide indicates the existence of a selective interference in the repairing mechanism for DSB damages, neutralizing in this way the *repair signaling*. As a result, the accumulation of damages in DNA triggers cell death processes.

Key words: Static Electric Field. Chemosensibilization. Melanoma. Electric Interference in Repair. Apoptosis Inducer. Double Strand Break.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Célula Tumoral e suas Características Biológicas

Sob as leis naturais que regem o domínio da biologia, organismos celulares evoluíram para adaptações complexas objetivando a sobrevivência. De organismos unicelulares para a complexidade dos tecidos, as leis da seleção natural têm sido executadas de forma intrigante ao explorar todas as possibilidades e diversidades de comportamento.

Células tumorais que ultrapassam os limites homeostáticos e realizam uma divisão descontrolada de forma sustentável, adquirem diversas aberrações que impulsionam o crescimento, a sobrevivência, a migração e a invasão para se estabelecerem em órgãos distantes. Para conseguir essas proezas, as células tumorais necessitam superar as restrições homeostáticas condicionantes do meio multicelular, criando mecanismos metabólicos extremamente complexos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011). A condição evolutiva que permite a gênese tumoral muitas vezes também impede o sucesso do tratamento ao produzir cânceres resistentes, e muitas vezes intratáveis. Aumentando a imensa dificuldade do desafio há o fato de que mais de 100 tipos de células, de diferentes tecidos, são suscetíveis ao desenvolvimento tumoral (INCA; 2011).

A fim de combater eficazmente o tumor devemos compreender os princípios básicos e processos biológicos que conferem o crescimento agressivo e imortal, independentemente da sua origem. Na escala celular é preciso entender os circuitos complexos que determinam o ciclo de divisão, sobrevivência, migração e invasão, assim como sua capacidade de tolerar falhas no seqüenciamento genético e resistência incomum aos danos resultantes das divisões desordenadas (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011).

1.1.1 Ciclo Celular e a Genética Tumoral

O desenvolvimento do câncer tem ligação direta com eventos no ciclo celular, que consiste em uma série de eventos programados que resultam em uma procissão precisamente regulada com fases distintas: G0, G1, S, G2 e M (ALBERTS et al, 2008). O relógio do ciclo celular serve como um regulador mestre deste evento, sinalizando o momento para as células se dividirem, fase de repouso e inibição do crescimento quando não é necessário. O ciclo não é um evento isolado nas células do tecido, e tem por objetivo garantir que a seqüência correta de eventos ocorra no momento certo e nas circunstâncias adequadas (na presença de sinais de crescimento, nutrição, integridade do DNA, etc). Uma perturbação em uma das proteínas envolvidas no ciclo celular pode levar ao crescimento

anormal e/ou à propagação das células aberrantes que, por sua vez, promovem a gênese tumoral (MCGILL e MCGLADE, 2005).

Quando a integridade do ciclo celular está preservada as células conservam a capacidade de se dividir quando necessário, e mais importante, manter a capacidade de permanecer em repouso quando o crescimento não é indicado. A interrupção do ciclo celular por agentes externos pode levar à proliferação descontrolada, um dos primeiros passos envolvidos no desenvolvimento tumoral (HARTWELL e KASTAN, 1994; CHAO et al, 2011).

Geneticamente o câncer surge do acúmulo de mutações genéticas e alterações epigenéticas que alteram a função dos genes e sua expressão. Nos últimos anos muitos e novos oncogenes e genes supressores de tumor têm surgido a partir de análises genômicas de cânceres humanos (STRATTON et al, 2009). Coletivamente, mutações somáticas nos pares de bases foram identificadas em muitos genes por meio de esforços de sequenciamento do DNA (FORBES et al, 2008). Análises com a tecnologia de microarrays, ou microarranjos de DNA, têm sido utilizadas para medir os ganhos e perdas em número de cópias do genoma, bem como a expressão alterada dos genes. Estes esforços têm fornecido informações importantes sobre os mecanismos biológicos subjacentes ao desenvolvimento da tumorigênese, permitindo caracterizar as condições genômicas que levam ao desenvolvimento de neoplasias e novas abordagens para a intervenção clínica (STUART e SELLERS 2009; BERGER et al, 2010).

Com a formação da massa tumoral primária, cinco características tumorais aparecem com a progressão da doença: a auto-suficiência em sinais de crescimento; a insensibilidade à inibição do crescimento (ou aos fatores de anticrescimento) e sinais de morte celular programada; o potencial de replicação ilimitada e geração de vasos sanguíneos (angiogênese) (HANAHAN e WEINBERG; INCA, 2011).

1.1.2 O Melanoma

O melanoma é uma doença neoplásica produzida pela transformação maligna dos melanócitos normais, células responsáveis pela produção do pigmento melanina. Essas células migram no desenvolvimento fetal para diversas áreas, incluindo a pele, meninges, membranas mucosas, esôfago superior, e os olhos. Em cada um desses locais os melanócitos demonstraram um potencial de transformação maligna, mas o local mais

comumente associado com a transformação melanocítica é a pele, na região entre a junção da derme e epiderme (GIROUARD, 2011).

O Brasil contribui com apenas 4% das neoplasias malignas dos tumores de pele que ocorrem no mundo (sendo este o mais freqüente, correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados no país) e tem predominância em adultos de pele clara. Apesar de uma alta taxa de cura para o melanoma localizado na fase inicial (98,3% de taxa de sobrevivência em 5 anos), suas características de metástase rápida e proliferação para locais distantes do ponto de origem, favorecem uma rápida queda da taxa de sobrevivência para 16% em 5 anos (INCA, 2011).

Atualmente, a espessura vertical do tumor em milímetros (denominada índice de Breslow) fornece a melhor indicação do estágio do melanoma (BALCH et al, 2001). Tal parâmetro pode ser aperfeiçoado utilizando-se outras referências, tais como: presença de ulceração, a penetração das células tumorais nas camadas cutâneas, a taxa de mitose, a presença de proteínas expressas na metástase, à disseminação do tumor para os linfonodos, e a evidência de metástases à distância (PAWLIK E SONDAK, 2003; BARNHOLTZ-SLOAN et al; WAINSTEIN e BELFORT, 2004).

Assim como 70% das mutações somáticas que induzem a oncogênese, os melanomas sofrem supressões gênicas que afetam o cromossomo no locus 9p21. Sua importância para o ciclo é explicada em parte pelo seu papel, que permite duas transcrições distintas nos genes supressores de tumor: p16INK4A e p19ARF (STARK e HAYWARD, 2007). A perda do gene p16INK4A impede a supressão na atividade do blastoma via aumento da ativação do complexo D1 CDK4/6 ciclina e a perda do complexo IRA, resultando na supressão da atividade da p53 através da ativação ampliada da MDM2. Desse modo, a exclusão do locus inteiro realiza a inativação de dois caminhos críticos para o desenvolvimento da supressão tumoral (KANNAN, SHARPLESS, XU; 2003). Esta desregulamentação é conhecida por ser fundamental para a imortalização de células primárias e de sua eventual transformação oncogênica (BARDEESY, et al.; 2001).

1.2 A Morte Celular

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos

órgãos e tecidos (MEIER, FINCH e EVAN, 2000). Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas (YU e CHOI, 2000). Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (HENGARTNER, 2000). Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: *apoptose*, *autofagia*, *necrose*, *mitose catastrófica* e *senescência* (OKADA e MAK, 2004; DIMRI, 2005). Em 2009, o Comitê da Nomenclatura em morte celular (DCNTs) propôs um conjunto de recomendações para a definição de células com morfologias distintas de mortes e para o uso adequado de terminologia relacionada à morte celular, incluindo "apoptose", "necrose" e "mitose catastrófica". Devido às descobertas bioquímicas dos últimos anos, o DCNTs atualizou as definições de morte celular de forma que pudessem ser enquadradas tanto as descobertas *in vivo* quanto *in vitro* (GALLUZZI et al, 2012). Dentro dos processos destacaremos os mecanismos de **necrose** e **apoptose**.

1.2.1 Necrose

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma injúria que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (Figura 1.1). Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (DEGTEREV et al, 2005). Por muito tempo foi considerada uma resposta passiva aos danos celulares, um mecanismo meramente acidental de morte celular, definida pela ausência de características morfológicas de apoptose ou autofagia. (GALLUZZI et al, 2007; KROEMER et al, 2009). Estudos recentes indicam que a necrose também pode ser regulada geneticamente, (DEGTEREV et al, 2005; HITOMI, et al, 2008; CHO et al.; HE et al.; ZHANG et al.; 2009) indicando que a necrose pode ocorrer de forma regulamentada, com um papel de destaque em várias configurações fisiológicas e patológicas (VANDENABEELE et al, 2010).

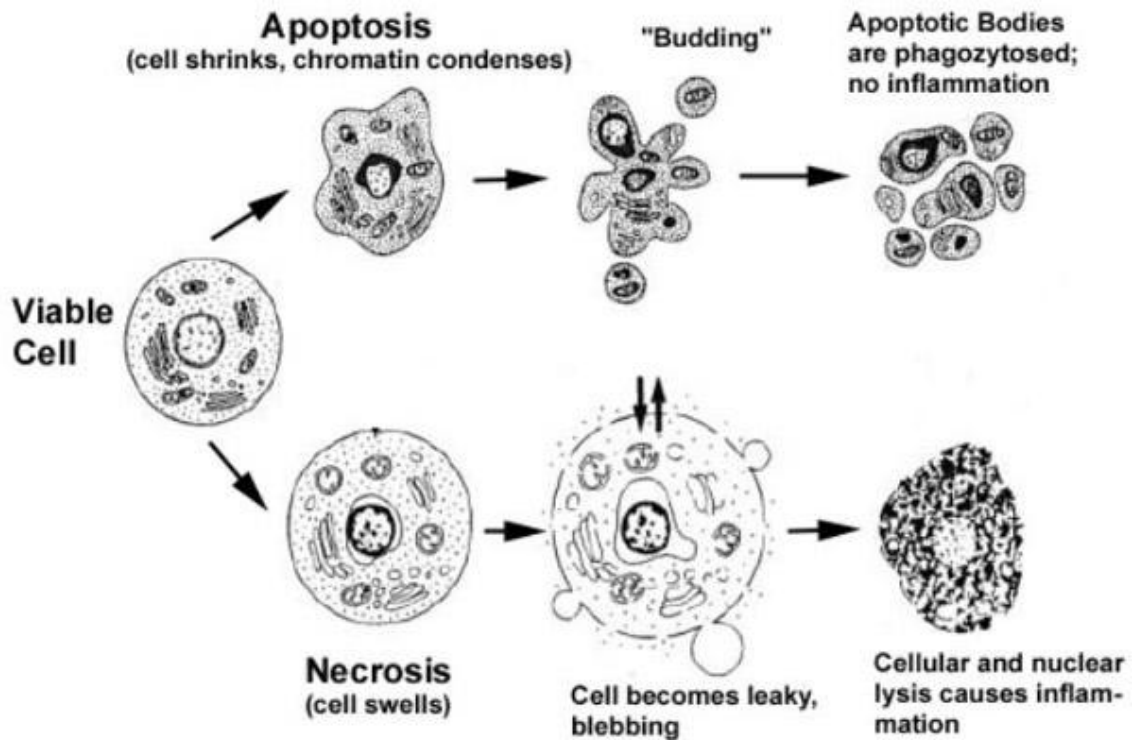
Vários fatores podem induzir necrose regulamentada, incluindo danos no DNA (ZONG et al, 2004; BANO et al, 2005; CHO et al.; HE et al.; ZHANG et al.; 2009). Quando as caspases (e em particular a caspase-8) são inibidas por manipulações genéticas

ou bloqueadas por agentes farmacológicos (por exemplo, produtos químicos inibidores da caspase), pode ocorrer a ativação da morte celular por necrose (GALLUZZI et al, 2007; CHO et al.; HE et al.; ZHANG et al, 2009; VANDENABEELE et al, 2010).

1.2.2 Apoptose

O termo "morte celular programada" foi proposto para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964; KERR, WYLLIE; CURRIE, 1972). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH e NAGASHREE, 2005). A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas (Figura 1.1). De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta; a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho e rompem-se, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Essas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004) (Figura 1.1). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, que possui um padrão característico. A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte das células, caracterizada por um processo ativo de alterações morfológicas e bioquímicas, a apoptose. A apoptose é também um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA for lesado. A compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer (GRIVICICH; REGNER e ROCHA, 2007).

Figura 1.1 – Alterações morfológicas da morte celular por apoptose e necrose.



A apoptose apresenta redução no volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos para fagocitose. Na necrose há expansão e rompimento da membrana com presença de lise celular, liberando seu conteúdo e provocando resposta inflamatória.

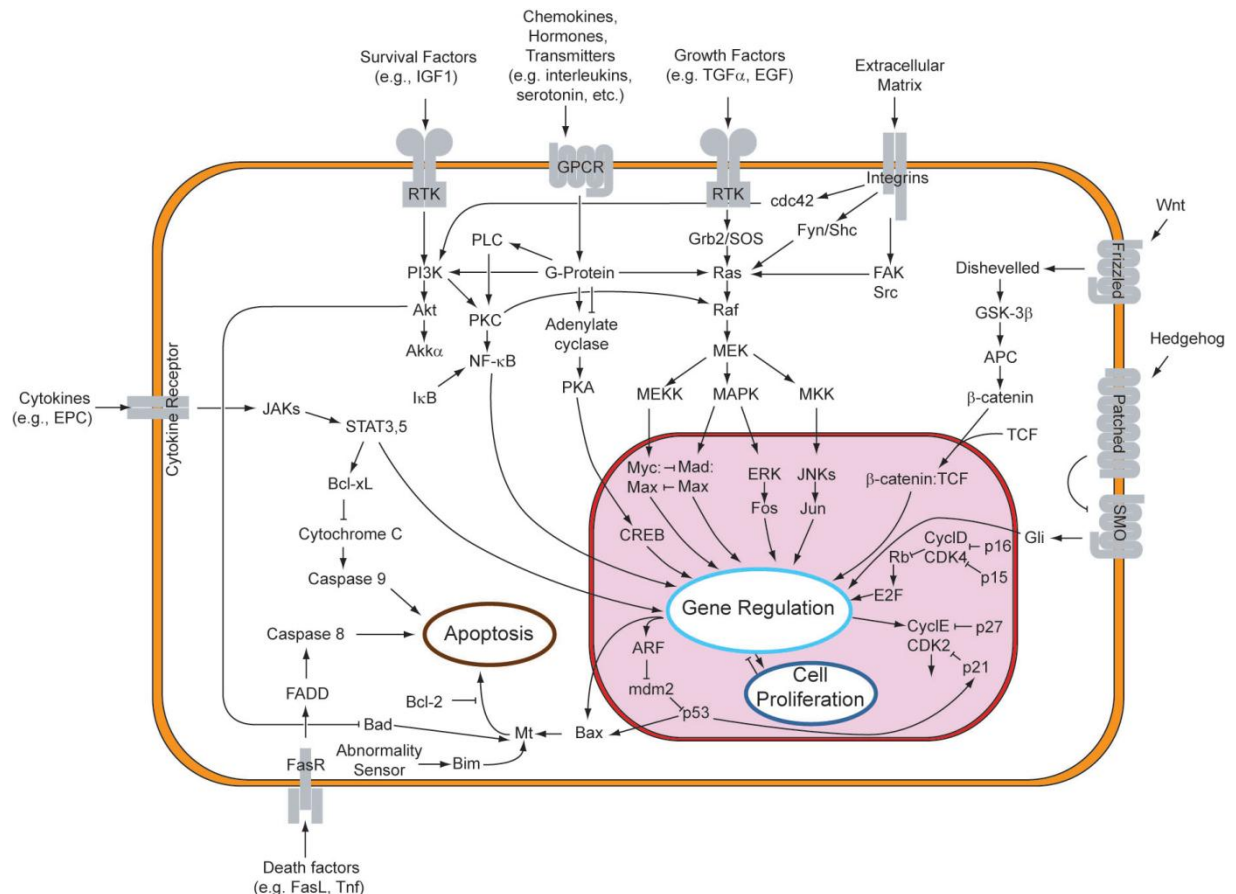
Fonte: CRUCHTEN e BROECK, 2002.

Os fenômenos de apoptose se dividem tradicionalmente em dois tipos: *intrínseca* e *extrínseca*. A apoptose intrínseca atua em resposta a várias condições de estresse intracelular (por exemplo, danos ao DNA e sinais de sobrecarga citosólica de Ca^{2+}), em que os sinais pró-sobrevivência e pró-morte são gerados e convergem para um mecanismo de controle centrado na mitocôndria. Quando os sinais letais prevalecem, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa que leva à dissipação do potencial mitocondrial transmembrana, retenção da síntese de ATP mitocondrial e alteração no potencial mitocondrial em atividades dependentes de transporte. Além disso, as cadeias respiratórias ficam desacopladas gerando as espécies reativas de oxigênio e liberação de proteínas para o citosol que normalmente são confinadas dentro do espaço intermembranar mitocondrial (figura 1.2) (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007).

A "apoptose extrínseca" é um termo amplamente utilizado para indicar casos de morte celular por apoptose induzidos por sinais de estresse extracelular; são captados e propagados pelos receptores transmembrana específicos (WAJANT, 2002; SHUTZE,

TCHIKOV e SCHNEIDER-BRACHERT, 2008; MEHLEN e BREDESEN, 2011) A apoptose extrínseca pode ser iniciada pela ligação de ligantes letais como: o ligante FAS/CD95, o fator de necrose tumoral α (TNF α) e superfamília de ligantes TNF (figura 1.2) (WAJANT, 2002).

Figura 1.2 – Mapa das reações protéicas que desencadeiam a apoptose.



Os reguladores centrais de apoptose são uma classe de proteases denominadas caspases. As caspases iniciadoras (incluindo caspase 2, 8, 9, 10, 11, e 12) são estreitamente ligadas aos sinais pró-apoptóticos. Uma vez ativadas, essas caspases clivam e ativam caspases efetoras que por sua vez executam a apoptose pela clivagem de proteínas celulares específicas.

Fonte: Cell Signaling Technology (CST), 2011.

1.3 Topoisomerases e Antineoplásicos

As topoisomerases são enzimas do tipo ubiquitina que induzem uma quebra transitória no DNA (CHAMPOUX 2001; WANG 2002; POMMIER et al 2010). Entre elas destacam-se as topoisomerases I e II (Top1 e Top2) que são particularmente relevantes para a apoptose, e devido a isso também são alvos de uma ampla gama de drogas antitumorais. A maioria dos medicamentos clínicos que visam Top1 ou Top2 converte as DNA-topoisomerase em indutores de quebras no DNA com danos irreversíveis, que iniciam o programa de apoptose (LIU, 1989; POMMIER 2006; NITISS 2009). A Topoisomerase II

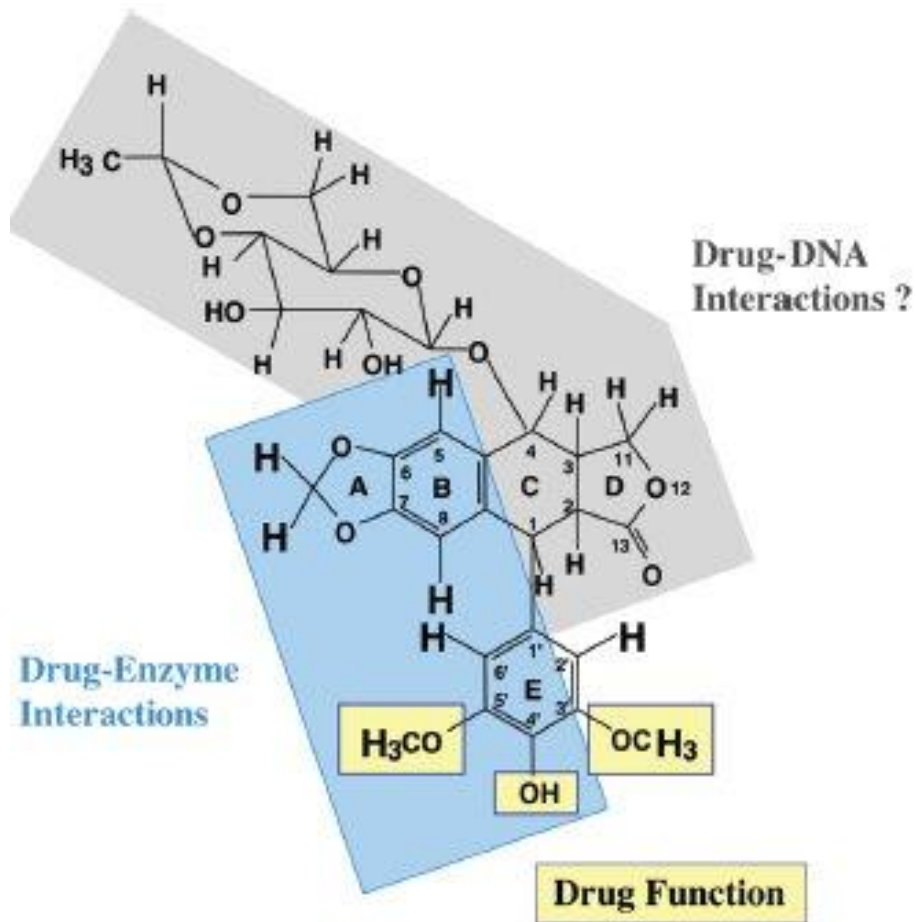
(Top2) é um importante alvo de drogas antitumorais, como o Etoposídeo, que são amplamente utilizadas em uma grande variedade de tumores. A maioria das drogas que alvejam Top2 induz danos ao DNA como uma consequência direta da atividade catalítica da enzima. Todas as DNA topoisomerases são clivadas, formando um complexo covalente entre a enzima e o DNA, e agentes que perturbam o ciclo catalítico têm o potencial para interceptar a enzima e introduzir danos no DNA (figura 1.3) (DOMBERNOWSKY et al 1996; WALKER e NITISS 2002; BALDWIN e OSHEROFF 2005; CHOI et al.; VERBORG et al 2008; LIEU et al 2009). O dano ao DNA pela intervenção na topoisomerase inclui danos tanto em quebras na fita dupla (DSB) como nas proteínas covalentemente ligadas ao DNA. Agentes que provocam o aprisionamento de topoisomerases de DNA foram denominados “venenos de topoisomerase” ao matar as células, em grande parte, através de enzimas que mediam as vias de reparo aos danos, evento crítico na resposta clínica à redução de tumores. Além da importância clínica dada às drogas que tem a Top2 como alvo específico, essas drogas têm servido como compostos modelo para estudar as respostas celulares a danos no DNA. Diferentemente dos agentes alquilantes e das radiações ionizantes, o alvo dos venenos de topoisomerase são muito específicos, atuando em tipos específicos de danos ao DNA (NITISS et al, 2009).

A ação da Top2 é dividida entre dois monômeros, que clivam dois filamentos de DNA (cada monômero cortando um fio), levando a um estado intermediário de ligações covalente 5`-fosfotirosil de ambas as subunidades do DNA. A geração da ligação fosfotirosil preserva a energia da ligação fosfodiéster, permitindo que a indução da quebra enzimática não necessite um co-fator de alta energia. Mesmo que Top2 não utilize o ciclo completo catalítico dependente de ATP, ainda necessita de reações de hidrólise por ATP para modular as mudanças conformacionais necessárias para o ciclo de reação completa. A enzima transitoriamente abre uma "porta" que permite a passagem da dupla fita de DNA intacta. Após esta passagem a ruptura é selada por reversão dos títulos fosfotirosil, reformando o DNA. Os venenos de Top2 interferem com as reações de quebra e reunificação da reparação (figura 1.3). Um dos principais mecanismos para interferir com a reação de quebra-reunificação é a inibição da enzima mediadora da religação; drogas como o Etoposídeo atuam com este tipo de inibição (ROBINSON e OSHEROFF 1991). Para outras drogas, como as elipticinas, não há evidência clara de inibição na religação, sendo possível que algumas outras drogas estimulem enzimas de clivagem que são mediadas pelo DNA (FROELICH-AMMON et al,1995; ROBINSON et al, 1992).

1.3.1 Apoptose e a Topoisomerase II

Em alguns tipos de células, a apoptose depende do receptor de membrana FASs (também conhecido como APO-1 e CD95). FAS é um membro da família denominada *fator de necrose tumoral* (TNF). A ligação cruzada da FAS pelo seu ligante natural (FASL) induz a agregação de FAS que recruta o FADD, uma proteína adaptadora (CHINNAIYAN et al. 1995) que vincula-se à procaspase-8 para formar o complexo *DISC* (MEDEMA et al. 1997). Quando ocorre a oligomerização no DISC este se liga à procaspase-8 (SALVESEN e DIXIT, 1999), esse complexo (DISC-caspase-8) ativado induz a apoptose por dois caminhos diferentes, dependendo do tipo de célula (SCAFFIDI et al. 1998). Em células do tipo I, o complexo DISC é suficiente para a caspase-8 clivar e ativar caspases efetoras. Em células de tipo II o complexo DISC ativa quantidades menores de caspase-8 e requer amplificação do sinal apoptótico através da via mitocondrial de apoptose. A ativação deste circuito mitocondrial de amplificação é obtida através de clivagem de BID, um membro pró apoptótico da família Bcl-2. O BID é clivado, ao se ligar e ativar a Bax, ocorrendo a liberação de fatores apoptogênicos que atuam no citocromo-c da mitocôndria. Por sua vez, o citocromo-c ativa caspases efetoras via Apaf-1 e caspase 9 no apoptossomo (LI et al.; LUO et al 1998). Os inibidores de Top1 e Top2 podem ativar a via extrínseca, aumentando a expressão de FAS e FASL (CHATTERJEE et al.; SHAO et al 2001; CIUSANI et al 2002; MENENDEZ et al 2006). Pelo menos em alguns tipos de células esta transcrição é dependente da regulação da p53 (MULLER et al. 1998). A ligação de FASL com a FAS na superfície da célula define uma via autócrina-parácrina semelhante ao observado na ativação induzida por morte celular em linfócitos T. No entanto, o papel da FASL na apoptose induzida por drogas provavelmente não é essencial, pois anticorpos antagonistas ou moléculas que impedem a interação com FAS e FASL não suprimem a apoptose (EISCHEN et al 1997; SHAO et al 2001). Drogas anticâncer podem induzir agregação de FAS na superfície das células tumorais na ausência de FASL (MICHEAU et al. 1997). Inibidores da topoisomerase induzem apoptose principalmente pela via intrínseca, via que pode ser reforçada, pelo menos em alguns tipos de células, pela via extrínseca transmembrana.

Figura 1.3 – Ligação química do Etoposídeo a Topoisomerase II.



Resumo esquemático com a proposta da ligação química das subunidades do Etoposídeo que interagem com a enzima Top2. As Interações entre íons de Hidrogênio (H) e hidroxilas (OH) da enzima foram obscurecidas pela formação de água e não são visualizadas. A região azul no Etoposídeo, incluindo partes A, B, e E (anel cíclico) são propostas para interagir com Top2 no complexo binário “droga-enzima”. O anel “E” e suas subunidades são destacados nas caixas amarelas e são importantes para a função de interação das drogas com a enzima, mas não parecem contribuir significativamente para a ligação química das moléculas. As interações entre o Etoposídeo e o DNA no complexo ternário (em cinza) são impulsionadas principalmente pelo anel-D, com contribuições adicionais do açúcar C4.

Fonte: BENDER et al, 2008; ROGOJINA et al, 2012)

1.3.2 Mecanismos de ação e classificação das drogas antineoplásicas

A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo no mecanismo enzimático das células e suas vias metabólicas, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição clara dos mecanismos de ação da

maioria das drogas. Foi a partir dessa definição que Bruce e colaboradores (1969) classificaram os quimioterápicos conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em:

- Ciclo-inespecíficos - Aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada.
- Ciclo-específico - Os quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida.
- Fase-específica - Aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como, por exemplo, o Metotrexato (fase S), o Etoposídeo (fase G2) e a Vincristina (fase M).

1.3.3 Drogas utilizadas no tratamento do câncer

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. Dentro do atual trabalho, além do inibidor da Top2 (Etoposídeo) vale destacar a classe dos *Inibidores mitóticos*.

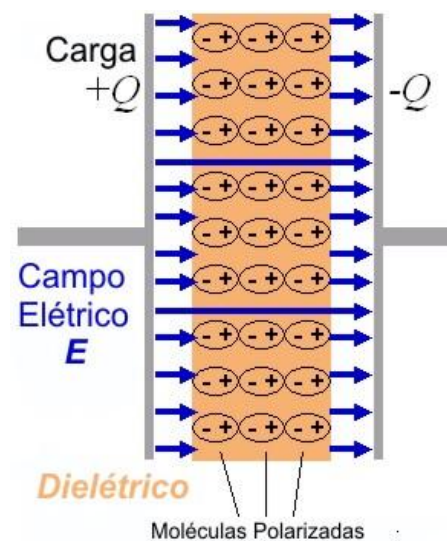
Os inibidores mitóticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar pelo qual migram os cromossomos. Deste modo os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar ocorrendo a interrupção da divisão celular. Essa função tem sido útil na "sincronização" das células quando os inibidores mitóticos são combinados com agentes específicos da fase S do ciclo. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia. Nesse grupo destacamos o *Paclitaxel PCF*, um agente que promove a agregação dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina. O Paclitaxel estabiliza os microtúbulos prevenindo a despolimerização, resultando na inibição da dinâmica normal de reorganização do citoesqueleto. A indução de uma formação anormal no feixe de microtúbulos resulta em múltiplos ásteres durante a mitose, que por sua vez induz a apoptose. (ROWINSKY et al, 1990).

1.4 Campos Elétricos

1.4.1 Caracterização do Campo Elétrico

O Campo Elétrico (CE) é uma perturbação no espaço que envolve uma carga elétrica, Q . Essa perturbação é percebida por outra carga, q , compartilhando esse mesmo espaço, através de uma força F (força de Q em q). Assim, a interação entre Q e q é **mediada** pelo CE cuja intensidade, E , é definida como $E = F/q$, ou seja, é a força exercida por unidade de carga. A unidade de medida de E é N/C (Newton por Coulomb) que é equivalente a V/m (Volt por metro). O campo elétrico criado por Q existe independentemente de haver ou não cargas no seu entorno. Contudo, perceberemos a existência do campo somente quando colocarmos uma carga de prova (q) na região do espaço que envolve Q . O CE é uma grandeza física vetorial conforme exemplificado na Figura 1.4, que mostra os vetores campo elétrico gerados no espaço entre as placas de um capacitor (arranjo experimental utilizado neste trabalho). É interessante observar que um dipolo elétrico colocado na região em que o campo elétrico atua (entre as placas) sofrerá por parte deste uma ação equivalente a de um torque torsional. Esse torque fará o dipolo girar até que fique alinhado com o vetor campo elétrico, compelindo-o a movimentar-se somente na direção do vetor. Muitas moléculas de importância biológica, como água e proteínas constituem dipolos elétricos em seus estados naturais. Os íons são outros elementos de papel fundamental. Por serem cargas de sinal único, são arrastados pelo CE em movimento translacional na direção deste. A intensidade da força produzida pelo campo elétrico, por exemplo, é essencial para determinar se a configuração das proteínas ou estruturas celulares será alterada (REPACHOLI e GREENEBAUM, 1999).

Figura 1.4 – Representação esquemática de um Campo Elétrico



As setas representam os vetores de um campo elétrico. Um material contendo moléculas dipolares alinhadas na direção do CE é pictoricamente representado.

Fonte: Próprio autor.

1.4.2 A Bioeletricidade e a Natureza Elétrica das Células

Em quase todos os sistemas biológicos dos organismos multicelulares, atividades fundamentais tais como: divisão, migração e diferenciação celular, ocorrem dentro de um meio extracelular onde estão presentes gradientes de tensão iônica, e conseqüentemente uma corrente elétrica, com uma atividade de horas ou mesmo dias (LEVIN, 2007; McCAIG et al, 2005; 2009). O gradiente de tensão iônica é formado principalmente por sinais elétricos, com origem nas variações de concentração dos íons no espaço circundante das células (na região extracelular). Essas variações espaciais decorrentes da presença de íons podem se formar: pelo funcionamento de bombas iônicas, vazamentos de íons de células individuais ou mesmo escape de íons através das camadas de membranas celulares (como as que realizam o transporte de íons epiteliais). Esse fluxo variável de íons estabelece os gradientes de tensão que são encontrados no meio extracelular e representam uma atividade sinalizadora para as funções fisiológicas acima citadas (LEVIN, 2007; McCAIG et al, 2005; 2009).

Os CEs fisiológicos superiores a 1 V/cm ocorrem durante a cicatrização de feridas, no processo de morfogênese e crescimento de tumores, e esses mesmos campos foram simulados para induzir o sentido de migração de uma variedade de células (McCAIG, 2006). No entanto, o mecanismo pelo qual os CEs interferem diretamente no movimento de migração e divisão celular não é totalmente conhecido. Foi demonstrado que culturas de células endoteliais migram para a região do catodo de um campo elétrico exógeno aplicado na cultura (McCAIG 2009). O limite de ação do efeito do campo para que ocorra migração celular é de 1-2 V/cm, semelhante às forças do CE endógeno medidas *in vivo*. Além disso, a microscopia de fluorescência mostra que o agrupamento de projeções citoplasmáticas em direção ao catodo são ricas em filamentos de actina. Os estudos usando análise quantitativa de imagem mostram que o CE induz um aumento transitório de 80% na quantidade de filamentos de actina na célula. Comparando a distribuição de F-actina com a distribuição de proteína total, é possível determinar que a F-actina é assimetricamente distribuída no citoplasma, com uma concentração mais rica na região voltada ao catodo. É mais que evidente que os campos elétricos fisiológicos atuam diretamente na migração celular em resposta a um sinal intracelular. Esse sinal determina novas conexões no arranjo da actina no citoplasma, orientados em direção ao catodo (LI e KOLEGA, 2002). Com base nesses estudos e medidas realizadas *in vivo*, podemos afirmar que existem Campos Elétricos Estáticos (CEEs) que ocorrem naturalmente na célula, sendo que há uma grande variedade

de células que respondem com uma migração direcionada em resposta ao efeito desses CEEs, comumente denominada *galvanotaxia*.

De forma similar à membrana celular, a mitocôndria cria um potencial de membrana através da diferença de íons entre a membrana interna e a intermediária, formada pela ação das enzimas da cadeia de transporte de elétrons. Através da cadeia de transporte de elétrons a energia das moléculas de NADH e FADH₂ é transferida para o oxigênio (O₂) em várias etapas através de oxidação (VOET, D; VOET, J; PRATT, 2006). Complexos de proteínas na membrana interna (NADH desidrogenase, citocromo c redutase, citocromo e oxidase c) realizam a transferência e liberação da energia bombeando os íons H⁺ (prótons) para o espaço intermembranar. Com o aumento da concentração de prótons no espaço intermembranar há um forte gradiente eletroquímico, que é estabelecido através da seletividade da membrana interna aos íons. Os prótons podem voltar para a matriz através do complexo ATP sintase, e sua energia potencial é usada para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) (VOET, D; VOET, J; PRATT, 2006).

1.5 Efeitos de Campos Elétricos e Magnéticos em Células Tumorais

O envolvimento de sinais elétricos em células tumorais tem sido investigado de forma esporádica há cerca de 50 anos (AMBRÓSIO, 1956). É possível destacar duas abordagens, uma na ação dos CEs que têm sido recentemente aplicadas na investigação da biologia dos tumores e estudos clínicos, e outra abordagem no uso de campos magnéticos aplicados de forma combinada com outros agentes físicos.

1.5.1 Uso de Corrente Alternada com Campos Elétricos de Alta Frequência

Em CEs com corrente alternada (CA) todas as moléculas polares estão sujeitas a torques que se alternam e, conseqüentemente, os fluxos iônicos fazem os dipolos moleculares oscilarem em torno da direção do torque. Devido à lenta cinética dos eventos bioelétricos, os CE de CA acima de 100 kHz foram utilizados com o propósito de aquecimento, gerados pela agitação de moléculas, sem o propósito de realizar alterações biológicas reais. Esse procedimento se tornou base para o uso da eletroterapia no tratamento de tumores, porém pesquisas recentes estão modificando o propósito e a metodologia dessa abordagem. Estudos revelam que os CEs de CA (1 V/cm; com 100-300 kHz) inibem o crescimento de células tumorais cultivadas *in vitro*, de melanomas sólidos de camundongo e, posteriormente, esse procedimento foi aplicado para tumores malignos

de glioblastoma humano, realizados em aplicações médicas para estudos clínicos (KIRSON et al., 2004; 2007). O mecanismo propõem que o CE cause interferência na polimerização dos microtúbulos, levando a uma perturbação na formação do fuso mitótico que dificulta o processo de clivagem no final do ciclo mitótico (KIRSON et al. 2004).

1.5.2 Campo Elétrico Pulsado de Alta Intensidade

Em um experimento com melanomas sólidos de camundongo, foram utilizadas células cultivadas e expostas a CEs pulsados com pulsos ultracurtos (NUCCITELLI et al, 2006; 2009). Foram aplicados 400 pulsos (40 kV/cm) de 300ns nos núcleos das células tumorais que, como resultado, encolheram 50% em poucos minutos e cerca de 70% em 3 horas. Com esse tratamento obteve-se em muitos tumores a redução de 90% de células de melanoma no período de duas semanas. Um segundo tratamento posterior resultou, em muitos casos, na remissão completa do tumor. Essas respostas são notáveis para um CE com uma duração total de apenas algumas centenas de microssegundos. Devido ao tempo ínfimo seus efeitos não podem ser associados à ação térmica do CE pulsado. O estudo demonstra que estes pulsos ultracurtos atuaram no interior da célula e tiveram um efeito muito breve de permeabilizar as organelas intracelulares. Esse efeito visa causar uma rápida deformação eletromecânica no núcleo, danificando o DNA e conseqüentemente resultando na morte do tumor (NUCCITELLI et al., 2006; 2009).

1.5.3 Campos Magnéticos combinados com Radiação Eletromagnética

Pesquisas envolvendo campos magnéticos apresentam paralelos com a pesquisa envolvendo Campos Elétricos, pois a fonte desses campos são cargas elétricas em movimento (correntes elétricas). Campos magnéticos exercem forças somente em cargas em movimento, e por isso são capazes de exercerem forças sobre íons em movimento em soluções, originando a indução de campos elétricos e correntes (indução magnética) (REPACHOLI e GREENEBAUM, 1999).

Pesquisas com o uso de campos magnéticos merecem ser citadas não somente pela sua associação indireta com Campos Elétricos, como pelo seu uso combinado com outros agentes, químicos e físicos, que induzem dano celular. Sua ação foi demonstrada no uso de campos magnéticos de frequência extremamente baixa, interferindo no processo de reparo em microorganismos. Analisando plasmídeos de *Escherichia coli*, Koyama e outros (2005)

observaram que células de *E. coli* expostas a Campos Magnéticos (com frequência de 5 mT – mili Tesla) imediatamente após irradiação com raios-X, tiveram aumento do número de mutações nos plasmídeos em relação ao controle não irradiado. Em um trabalho similar, Takashima e outros (2003) utilizaram células proficientes e deficientes de reparo de DNA em *Saccharomyces cerevisiae* e com o uso de radiação ultravioleta inibiram o ciclo celular na fase G₁. Após o bloqueio do ciclo o processo foi revertido expondo as células a um Campo Magnético com frequência de 30 mT. Esse tipo de campo também foi utilizado para fins terapêuticos com intensidade de 15 mT e amplitude e 120 Htz de frequência, de forma isolada e combinada com os efeitos da radiação gama. Os experimentos foram realizados *in vivo* em camundongos nude xenoimplantados com células MDA-MB231, uma linhagem celular humana de câncer de mama (CAMERON et al., 2005). A terapia com radiação associada à exposição ao campo eletromagnético suprimiu o crescimento dos vasos sanguíneos e a repopulação do tumor após a irradiação, resultando em uma menor incidência de metástase tumoral.

1.5.4 Campos Elétricos Estáticos de Origem Fisiológica

Os tumores também têm sido investigados e tratados com a aplicação de um CEE que induz corrente semelhante à fisiológica. Os gradientes do potencial elétrico existente entre o espaço extracelular e tecidos cancerígenos podem ser medidos na superfície do tecido; essa medição tem uso clínico para o diagnóstico precoce do câncer de mama (CUZICK et al, 1998). Nessa região existe uma queda de tensão entre o tecido canceroso e o tecido normal, que pode ter sua origem na despolarização do potencial de membrana nas células tumorais (AMBROSE et al, 1956; BINGGELI e WEINSTEIN, 1986; WANG, 2004). A despolarização que ocorre nas regiões transepiteliais que circundam o tecido tumoral favorece a ocorrência de uma rápida metástase, diferente de um tecido sadio em que o epitélio é mais polarizado em relação ao meio. A polarização epitelial é mantida pelos tecidos normais circundantes, pois uma característica das células epiteliais é a de serem hiperpolarizadas em relação ao seu meio (FAUPEL et al, 1997). Considerando essas características McCaig e outros (2006; 2009) têm procurado simular o CEE endógeno que há entre o tumor e o tecido normal, e com isso estudar métodos elétricos de prevenção do crescimento tumoral, dirigindo sua migração e controlando a metástase. Um novo estudo foi realizado na tentativa de explorar e identificar os fatores envolvidos na migração de células neoplásicas de um adenocarcinoma de pulmão. As células cultivadas migraram para a região do catodo dos CEEs de 3 V/cm (McCAIG et al, 2009).

Tanto o ciclo celular quanto o mecanismo mitótico são influenciados por sinais oriundos do CEE fisiológico extracelular (SONG et al, 2002; WANG et al. 2003; 2005). Utilizar um CEE externo artificial pode ter um impacto profundo sobre o controle de tumores. Quando o CEE externo é aplicado sobre uma célula ocorre uma supressão na expressão da ciclina e um aumento da expressão da p27 KIP1 (um inibidor do CDK, do complexo ciclina). A consequência é a de as células não conseguem fazer a transição da fase S para a fase G₁, impedindo a síntese de DNA e forçando o término antecipado do ciclo celular (WANG et al, 2003; 2005).

O efeito dos CEEs e das correntes elétricas no interior das células também afetam macroestruturas celulares. Os filamentos que formam o citoesqueleto são polímeros de actina e microtúbulos que conduzem naturalmente a eletricidade, e por isso atuam como condutores elétricos com aproximadamente a mesma velocidade de condução, 20 m/s, do sinal da actina filamentosa encontrada em neurônios (TUSZYNSKI et al, 2004; PRIEL et al, 2006). Filamentos de actina e microtúbulos estão intimamente associados à estrutura e fixação da membrana plasmática e a receptores sensíveis de tensão aos canais iônicos da célula. A presença de filamentos íntegros de actina e microtúbulos é necessária para direcionar as respostas de correntes elétricas de forma análoga a uma fiação de um circuito elétrico (RAJNICEK et al, 2006). Considerando o sinal de transdução das etapas bioquímicas que acompanham a ativação de um neurotransmissor, ou de um receptor de fator de crescimento, muitos pesquisadores consideram a possibilidade de que haja uma ativação direta de uma corrente elétrica sinalizadora. Essa corrente elétrica é gerada no citoesqueleto e através deste conduzida até o núcleo, gerando eventos de comandos sinalizadores em paralelo às vias bioquímicas (McCAIG et al, 2009). A ligação física direta dos filamentos condutores da membrana plasmática ao núcleo, e seu papel na ativação seletiva dos genes, já foi evidenciada experimentalmente (MANIOTIS et al, 1997; NELSON et al, 2005.). Curiosamente, o DNA também realiza a condução de cargas elétricas em longas distâncias, sendo que as sequências de determinados pares de bases podem interromper o sinal, atuando como uma chave “liga/desliga” (MERINO et al, 2008). Com base nesses dados, não se deve limitar o papel dos CEEs endógenos nas ações de morfogênese ou em fatores de crescimento. A sinalização intracelular de funções metabólicas de natureza elétrica origina-se a partir da matriz extracelular, estendendo-se até o núcleo. Uma corrente é conduzida e modulada por estruturas biológicas que ativam eletricamente os filamentos condutores de actina dos microtúbulos e possivelmente atuando no DNA (McCAIG et al, 2009). McCaig e outros (2009) utilizam essas evidências

para argumentarem que a fisiologia elétrica coexiste e interage com os processos bioquímicos e moleculares de sinalização, advertindo que as áreas de pesquisa que ignoram esse mecanismo também ignoram uma parte integrante fundamental de qualquer sistema biológico.

1.6 A Sinalização Elétrica do DNA na Reparação Celular

O controle de íons e moléculas na célula é mediado por proteínas com cargas polares, que essencialmente sofrem uma mudança conformacional para regular a entrada e saída de substâncias metabólicas, desempenhando um complexo papel nos canais iônicos celulares. A ação celular de polarização e despolarização da membrana nuclear, juntamente com o DNA associado, ativa comandos de moléculas hormonais, que por sua vez são responsáveis pela síntese e transcrição de proteínas. Esse efeito foi bem estudado na membrana nuclear, revelando que esta exibe a maior atividade elétrica da célula. Poros nucleares complexos reagem à despolarização de comandos eletrônicos gerados pelos sinais químicos hormonais e, assim, apresentam um efeito intimamente conectado com os CEE endógenos (MAZZANTI, et. al., 2001).

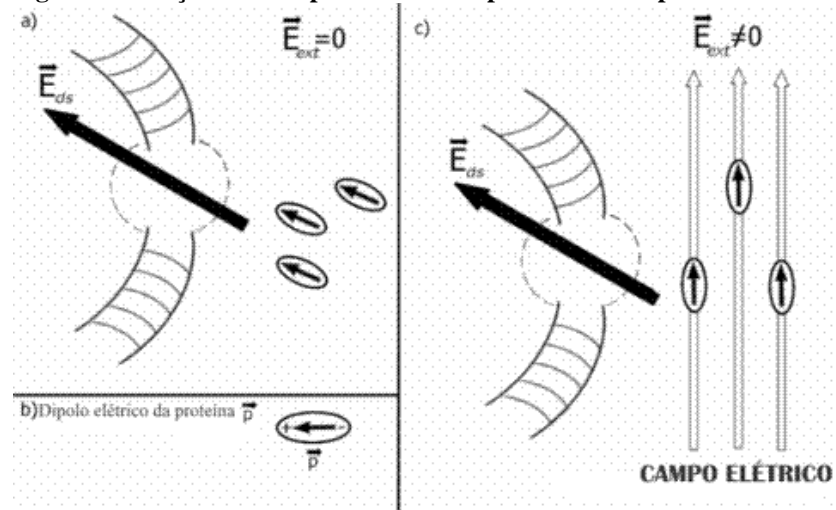
Com base em todas as propriedades ativadas por sinalização elétrica em uma célula eucariótica, podemos especular que há outros mecanismos de sinalização elétrica a serem desvendados e que estejam presentes na célula em suas propriedades mais básicas conservadas ao longo da evolução.

Uma das propriedades fundamentais das células é sua capacidade de reparação do dano do tipo DSB. Células eucariontes apresentam um mecanismo bioquímico complexo que é ativado quando ocorre algum tipo de estresse na molécula de DNA. Uma via de sinalização-transmissão é rapidamente ativada em resposta aos danos estruturais ou conformacionais no DNA, afetando o processo de transcrição de genes e interrompendo e a progressão do ciclo celular (BAKKENIST, e KASTAN, 2003; 2004).

Um dano do tipo DSB (assim como um dano de fita simples) desequilibra a distribuição das cargas em uma pequena região do DNA (de poucos pares de bases). Esse “desequilíbrio de cargas” gera um campo elétrico estático (endógeno). De acordo com um modelo biofísico e resultados experimentais (ARRUDA-NETO, et al., 2009; 2010), esse campo elétrico atua como um sinalizador para que as proteínas de reparo localizem e reconheçam o *site* do dano. Desta forma, grupos de poucos pares de bases poderiam ser localizados num universo de bilhões de pares de base (o genoma). Nesse mesmo cenário, um campo elétrico estático exógeno poderia reorientar as proteínas de reparo para longe

dos danos, impedindo o reparo, conforme pictoricamente mostrado na figura 1.5, levando eventualmente à morte celular. De fato, com essas pesquisas realizadas com o uso de CEEs em procariotos e eucariotos, obtiveram-se evidências quanto à sinalização elétrica ente o DNA e proteínas visando a reparação celular.

Figura 1.5 – Ação do Campo Elétrico nas proteínas de reparo.



Representação pictórica do reconhecimento da dupla quebra (DNA) pelas proteínas de reparo. A) – Proteínas que apresentam seus momentos de dipolo \vec{p} (representado em “b” com mais detalhes) orientados na direção do sítio danificado (dupla-quebra) pelo campo elétrico estático \vec{E}_{ds} . C) – Um CEE (E_{ext}), com maior intensidade que o CE endógeno (E_{ds}), pode reorientar o deslocamento das proteínas de reparo ao longo de sua direção, impedindo que estas alcancem o sítio danificado.
Fonte: ARRUDA-NETO et al., 2009; 2010.

É evidente o papel dos CEs endógenos na regulação de processos vitais essenciais como migração, proliferação e diferenciação em diversos tecidos (epitélios, axônios no cérebro e vários tipos de câncer). A sinalização celular mutuamente dependente de sinais químicos e gradientes elétricos é complexa e extremamente abrangente. É necessário examinar com mais atenção o papel da eletricidade endógena e as propriedades eletromagnéticas das estruturas celulares e suas funções biológicas ou não alcançaremos uma compreensão mais ampla dos processos vitais e da própria evolução. O estudo da sinalização elétrica endógena, em célula e tecidos, permite uma possibilidade de tratamento à formação de células neoplásicas e novas informações sobre o entendimento dos seus processos metabólicos. Pesquisas com a ação de CEs em células tumorais, e sua comparação com células de modelos saudáveis e associadas à formação do tumor, são fundamentais para o desenvolvimento de estudos mais avançados e um possível uso clínico dos efeitos dos CEs.

6.1 Efeitos Isolados do Campo Elétrico Estático

- A aplicação de um Campo Elétrico Estático de 1000 V/cm (CEE) em células de mamífero melanocíticas B16F10 e epitelial de fibroblasto humano FN1, não induzem mortalidade celular ou alterações morfológicas visíveis na microscopia ótica.
- As células estudadas, quando expostas ao CEE de 1000V/cm, sofrem de redução no metabolismo mitocondrial, diminuindo o crescimento celular e o rendimento energético.

6.2 Efeitos Combinados do CEE ao Etoposídeo

- A associação do CEE com o quimioterápico etoposídeo aumenta sinergeticamente os efeitos de morte celular nas linhagens analisadas. Reduzindo drasticamente a concentração necessária de quimioterápico necessária para matar 50% das células (alterando o IC₅₀).
- Todas as ocorrências de morte celular analisadas tiveram aumento intensivo com o tratamento combinado do etoposídeo e do CEE, dobrando os valores de mortalidade.
- A exposição ao CEE nas células promove a inibição do reparo em danos gerados pelo etoposídeo desencadeando a morte celular.
- Há uma indução constante de apoptose e morte celular durante todo o período de exposição ao campo elétrico combinado ao etoposídeo, em contraste com o efeito isolado do etoposídeo.
- O efeito do CEE atua especificamente no mecanismo de reparo associado aos danos na dupla fita do DNA (DSB).
- A ação do CEE no reparo ocorre nos momentos iniciais da geração do dano. Possivelmente o efeito está associado aos mecanismos de sinalização que antecedem o reparo.
- Todos os efeitos da exposição ao CEE atuam de forma indiferente a natureza celular, normal ou tumoral, possivelmente atuando de forma universal em todas as células.

REFERÊNCIAS

ACEITUNO-MADERA. P.; BUENDÍA-EISMAN, A.; OLMO, F. J.; JIMÉNEZ-MOLEÓN, J. J.; SERRANO-ORTEGA, S. Melanoma, altitude, and UV-B radiation. *Actas Dermosifiliogr. English, Spanish*. v. 102, p.199-205, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York and London: Garland Science, 2008. p. 1054 –1055.

AMBROSE, E. J.; JAMES, A. M.; LOWICK, J. H. B. Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature*,v. 77: p. 576–577, 1956.

ARRUDA-NETO, J. D. T.; FRIEDBERG, E. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; CAVALCANTE-SILVA, E.; SCHENBERG, A. C.; RODRIGUES, T.; GARCIA, F.; LOUVISON, M.; PAULA, C.; MESA, J.; MORON, M.; MARIA, D. A. ; GENOFRE, G. Static electric fields interfere in the viability of cells exposed to ionising radiation. *Internat. J. Radiat. Biol.* v. 85, p. 314-321, 2009.

ARRUDA-NETO, J. D. T.; FRIEDBERG; E. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; SEGRETO, H. R. C.; MORON, M. M.; MARIA, D. A.; BATISTA, L. F. Z.; SCHENBERG, A. C. G. The role played by endogenous and exogenous electric fields in DNA signaling and repair. *DNA Repair* v. 9, p. 356–357, 2010.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. Initiating Cellular Stress Responses. *Cell*, v. 118, p. 9–17, 2004.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, v. 421, n. 6922, p. 499–506, 2003.

BALCH, C. M.; BUZAID, A. C.; SOONG, S.J.; ATKINS, M. B.; CASCINELLI, N.; COIT, D. G.; FLEMING, I. D.; GERSHENWALD, J. E.; HOUGHTON, A. JR.; KIRKWOOD, J. M.; McMASTERS, K. M.; MIHM, M. F.; MORTON, D. L.; REINTGEN, D. S.; ROSS, M. I.; SOBER, A.; THOMPSON, J. A.; THOMPSON. J. F. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma, *J Clin Oncol*, v. 19, p. 3635 – 3648, 2001.

BALDWIN, E. L.; OSHEROFF, N. Etoposide, Topoisomerase II, and Cancer. *Curr Med Chem- Anticancer Agents*, v. 5, p. 363–372, 2005.

BALL, P. Physics of life: The dawn of quantum biology. *Nature* v. 474, p. 272-274, 2011. |

BARASH, U.; COHEN-KAPLAN, V.; DOWEK, I.; SANDERSON, R. D.; ILAN, N.; VLODAVSKY, I. Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. *FEBS J.* v. 277, p. 19:3890-903, 2010.

BARDEESY, N.; BASTIAN, B. C.; HEZEL, A.; PINKEL, D.; DEPINHO, R. A.; CHIN, L. Dual Inactivation of RB and p53 Pathways in RAS-Induced Melanomas. *Mol. Cell. Biol.* v. 21 no. 6 2144-2153, 2001.

BARNHOLTZ-SLOAN, J. S.; SLOAN, A. E.; DAVIS, F. G.; VIGNEAU, F. D.; LAI, P.; SAWAYA, R. E. Incidence Proportions of Brain Metastases in Patients Diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol.* v. 22, p. 2865-2872, 2004

BAUER, J.; BÜTTNER, P.; MURALI, R.; OKAMOTO, I; KOLAITIS, N. A.; LANDI, M. T.; SCOLYER, R. A.; BASTIAN, B. C. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res.* v. 2, p. 345-351, 2011.

BENDER, R. P.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerases as targets for the chemotherapeutic treatment of cancer. In: *Checkpoint responses in cancer therapy*, Dai W (ed), Totowa, N. J.: Humana Press, 2008, p. 57–91.

BERGER, M. F.; LEVIN, J. Z.; VIJAYENDRAN, K.; SIVACHENKO, A.; MAGUIRE, X. A. J.; JOHNSON, L.A.; ROBINSON, J. ; VERHAAK, R.G.; SOUGNEZ, C.; RONOFRIO, .C.; ZIAUGRA, L.; CIBULSKIS, K.; LAINE, E.; BARRETINA, J.; WINCKLER, W.; FISHER, D.E.; GETZ, G.; MEYERSON, M.; JAFFE, D. B.; GABRIEL, S.B.; LANDER, E.S.; DUMMER, R.; GNIRKE, A.; NUSBAUM, C.; GARRAWAY, L. A. Integrative analysis of the melanoma transcriptome. *Genome Res.* V. 20, p. 413-427, 2010.

BERGERS G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* v.3, p. 401 –410, 2003.

- BERKOVICH, E.; MONNAT, R. J. JR.; KASTAN, M. B. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* v. 9, p. 683–690, 2007.
- BINGGELI, R.; WEINSTEIN, R. C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J. Theor. Biol.* V. 123, p. 377-401, 1986.
- BJORGE, J. D.; BRUCE, W. R.; MEEKER, B. E.; POWERS, W. E; VALERIOTE, F. A. Comparison of the dose and time-survival curves for normal hematopoietic and lymphoma colony-forming cells exposed to vinblastine, vincristine, arabinosylcytosine, and amethopterin. *J. Natl Cancer Inst.*, 42, 1015, 1969.
- CAMERON, I.L.; SUN, LU-ZHE; SHORT, N.; HARDMAN, W. E.; WILLIAMS, C. D. Therapeutic electromagnetic fields (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Cell Internat*, v. 5, p. 1 - 23, 2005.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A.C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. v.2, p. 563 –572. 2002.
- CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu Rev Biochem.* v.70, p. 369–413, 2001.
- CHAO L. H.; STRATTON M. M.; LEE, I. H.; ROSENBERG, O.S. LEVITZ, J.; MANDELL, D. J.; KORTEMME, T.; GROVES, J. T.; SCHULMAN, H.; KURIYAN J. A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II holoenzyme. *Cell*. v.146, p. 732 – 745, 2011.
- CHATTERJEE, D.; SCHMITZ, I.; KRUEGER, A.; YEUNG, K.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.; WYCHE, J. H.; PANTAZIS, P.. Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short). *Cancer Res*, v. 61, p. 7148–7154, 2001.
- CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M DIXIT, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, v. 81, p. 505–512, 1995.

- CHO, Y. S.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T. D.; GUILDFORD, M.; CHAN, F. K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, v. 137, p.1112 – 1123, 2009.
- CHOI, H. J.; CHO, B. C.; SHIN, S. J.; CHEON, S. H., JUNG, J.Y.; CHANG, J.; KIM, S. K.; SOHN, J. H.; KIM, J. H. Combination of topotecan and etoposide as a salvage treatment for patients with recurrent small cell lung cancer following irinotecan and platinum first-line chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.61, p. 309 – 313, 2008.
- CIUSANI, E.; PEREGO, P.; CARENINI, N.; et al. Fas/CD95-mediated apoptosis in human glioblastoma cells: a target for sensitisation to topoisomerase I inhibitors. *Biochem Pharmacol*, v.63, p.881 – 887, 2002.
- CRUCHTEN, S. V.; W. BROECK, V. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat Histol Embryol*. v. 31, p. 214 – 223, 2002.
- DEGTEREV, A.; HUANG, Z.; BOYCE, M.; LI Y.; JAGTAP, P.; MIZUSHIMA N.; et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, v.1, p.112 – 119, 2005.
- DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. v.7, p. 505 – 512, 2005.
- DOMBERNOWSKY, P., GEHL, J., BOESGAARD, M., PAASKE, T., JENSEN, B. V. Doxorubicin and paclitaxel, a highly active combination in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol*. v. 23, p. 23 – 27, 1996.
- EISCHEN, C. M.; KOTTKE, T. J. MARTINS, L. M.; BASI, G. S.; TUNG, J. S., EARNSHAW, W. C., LEIBSON, P. J., KAUFMANN, S. H. Comparison of apoptosis in wild-type and Fasresistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*, v. 90, p.935 – 943, 1997.
- FAUPEL, M.; VANEL, D.; BARTH, V.; DAVIES, R.; FENTIMAN, I. S.; HOLLAND, R.; LAMARQUE, J. L.; SACCHINI, V. AND SCHREER, I. Electropotential evaluation as a new technique for diagnosing breast lesions. *Eur. J. Radiol*, v.1, p.33 – 38, 1997.
- FORBES, S. A.; BHAMRA, G.; BAMFORD, S.; DAWSON E.; KOK C.; CLEMENTS, J.; MENZIES A.; TEAGUE, J. W.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R. The Catalogue of

Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) *Curr Protoc Hum Genet*, v. 57, p. 10.11.1–10.11.26, 2008.

FROELICH-AMMON, S. .; BURDEN, D. A.; PATCHAN, M. W.; ELSEA, S. H.; THOMPSON, R.B.; OSHEROFF, N. Increased drug affinity as the mechanistic basis for drug hypersensitivity of a mutant type II topoisomerase. *J Biol Chem*, v, 270, p. 28018 – 28021, 1995a.

FROELICH-AMMON, S. J.; PATCHAN, M. W.; OSHEROFF, N.; THOMPSON, R. B. Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA: characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem*, v, 270, p. 14998–15005, 1995b.

GALLUZZI, L.; MAIURI M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL. L.; et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, v.14, p. 1237 – 1243, 2007.

GALLUZZI, L; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O. KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, .; NUNEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY.; B. MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on *Cell Death*, v. 19, p. 107 – 112, 2012.

GIROUARD, S. D.; LAGA, A. C.; MIHM, M. C.; SCOLYER, R. A.; THOMPSON, J. F.; ZHAN, Q.; WIDLUND, H. R.; LEE, C. W.; MURPHY, G. F. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab Invest*, 2011.188, 2011.

GOGAS, H. J.; KIRKWOOD, J. M.; SONDAK, V. K. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*, v. 109, p. 455 – 464, 2007.

GRIFFIN-SOBEL, J. The war on cancer: victory or defeat? *Nurs. Clin. North. Am*, v. 43, p. 277 – 282, 2008.

- GRINDEM, C. B. Blood cell markers. *Vet Clin. North. Am. Small Anim Pract.*, v.26, p. 1043–1064, 1996.
- GRISSOM, C. B. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination. *Chem. Rev.*, v. 95, p. 3 – 24, 1995.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 53, p. 335 – 343, 2007.
- HABER, J. E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.*, v.16 p.259 – 264, 2000.
- HACKBARTH, J. S., MARINA GALVEZ-PERALTA, NGA T. DAI, DAVID A. LOEGERING, KEVIN L. PETERSON. Mitotic Phosphorylation Stimulates DNA Relaxation Activity of Human Topoisomerase I. *J Biol Chem.*, v. 283, p.16711 – 16722, 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, v. 144, p. 646 – 674. 2011.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science*, v. 266, p. 1821 – 1828, 1994.
- HAYNES, R. H. The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. *Radiat. Res.*, v.6, p. 1 – 29, 1966.
- HE, S. WANG, L.; MIAO, L.; WANG, T.; DU, F; ZHAO, L.; WANG, X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell.*, v.137, p. 1100–1111, 2009.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* v.407, p. 770 -776, 2000.
- HITOMI, J.; CHRISTOFFERSON, D.E. N. G. A.; YAO, J.; DEGTEREV, XAVIER, A, RJ.; et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.*, v. 135, p. 1311 – 1323, 2008.
- HSIANG Y.H.; LIHOU, M.G.; LIU, L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.*, v. 49, p. 5077 – 5082, 1989.

INCA - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro:, 2011. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acesso em: 04 mar. 2011.

JACKSON, S.P. BARTEK. J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, v. 461, p. 1071 – 1078, 2009.

JAKYMIW, A.; FUJITA, D. J. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*, v.19, p. 5620 – 5635, 2000.

JOYCE, J. A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cel*, v. 7, p. 513 – 520, 2005.

KANNAN, K.; SHARPLESS, N. E.; XU, J.; O'HAGAN, R. C.; BOSENBERG, M.; CHIN, L. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Nati Acad Sci U S A*, v. 100, p. 1221 – 1225, 2003.

KASTAN, .M. B.; BARTEK, J. Review article Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, v. 432, p. 316 – 323, 2004.

KASTAN, M. B., LIM, D. S. The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 1, p. 179 – 186, 2000.

KERR J. F.; WYLLIE A. H.; CURRIE A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v. 6, p. 239 – 257, 1972.

KIRSON, E. D. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc. Nati. Acad. Sci. U S A*, v. 104, p. 10152 – 10157, 2007.

KIRSON, E.; GURVICH, Z.; SCHNEIDERMAN, R.; DEKEL, E.; ITZHAKI, A.; WASSERMAN, Y.; SCHATZBERGER, R.; PALTI, Y. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res*, v. 64, p. 3288 - 3295, 2004.

KOESTER, S. T. K.; BOLTON, W. E. Intracellular markers, *J Immunol Methods*, v. 243, p. 99 –106, 2000.

KOYAMA, S.; NAKAHARA, T.; SAKURAI, T.; KOMATSUBARA, Y.; ISOZUMI, Y.; MIYAKOSHI, J. Combined exposure of ELF magnetic fields and X-rays increased mutant

yields compared with X-rays alone in pTN89 plasmids. *J Radiat Res*, v. 46, p. 257 – 262, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death, *Physiol Rev*, v. 87, p. 99 – 163, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16: 3–11, 2009.

LAUBICHLER, M. D.; MÜLLER, G. B.; Modeling Biology - Structures, Behavior, Evolution". Massachusetts, USA: *The MIT Pres*, 2007. p. 56-60.

LAVIN, M. F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 759 – 769, 2008.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. J.; YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, v. 94, p. 491 – 501, 1998.

LI, J.; HUANG, S.; ARMSTRONG, E. A.; FOWLER, J. F.; HARARI, P. M. Angiogenesis and Radiation response modulation after vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) blockade. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, v. 62, p. 1477 – 1485, 2005.

LI, X.; KOLEGA, J. Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. *J Vasc Res*, v. 39, p. 391 – 404, 2002.

LIEU, C.; CHOW, L.; PIERSON, A.; ECKHARDT, S.; O'BRYANT, C.; MORROW, M.; TRAN, Z.; WRIGHT, J.; GORE, L. A phase I study of bortezomib, etoposide and carboplatin in patients with advanced solid tumors refractory to standard therapy. *Invest New Drugs*, v. 27, p. 53 – 62, 2009.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*, v. 58, p. 351 – 375, 1989.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*, v. 10, p. 643 – 649, 1964.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death – I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol*, v. 11, p. 123 – 133, 1965.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome-c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* v. 94, p 481 – 490, 1998.

MAHRHOFER, H.; BÜRGER, S.; OPPITZ, U.; FLENTJE, M.; DJUZENOVA C. S. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 64, p. 573 – 580, 2006.

MANIOTIS, A. J.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 849 – 854, 1997.

MAZZANTI, M., BUSTAMANTE, J. O., OBERLEITHNER, H. Electrical Dimension of the Nuclear Envelope. *Physiol Rev*, v. 81, p. 1 – 19, 2001.

McCAIG, C. D.; SONG, B.; RAJNICEK, A. M.; Electrical dimensions in cell science. *J Cell Sci*, v. 122, p. 4267 – 4276, 2009.

McCAIG, C. D.; RAJNICEK, A. M.; SONG, B.; ZHAO, A. M. Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential. *Physiol Rev*, v. 85, p. 943 – 978, 2006.

McGILL M. A.; McGLAD, C. J. Cellular Signaling in: The basic science of oncology, Ian Tannock; book. 2005. p. 142 – 160.

MEDEMA, J. P.; SCAFFIDI, C.; KISCHKEL, F. C.; et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J*, v. 16, p. 2794 – 2804, 1997.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal*, v. 4, mr2, 2011.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000;407:796-801.

MENENDEZ, J.A.; VELLON L.; LUPU, R. DNA topoisomerase II alpha (TOP2A) inhibitors up-regulate fatty acid synthase gene expression in SK-Br3 breast cancer cells: in

vitro evidence for a ‘functional amplicon’ involving FAS, Her-2/neu and TOP2A genes. *Int J Mol Med*, v. 18, p. 1081 – 1087, 2006.

MERINO, E. J.; BOAL, A. K.; BARTON, J. K. Biological contexts for DNA charge transport chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v.12, p. 229 – 237, 2008.

MILLS, K. D.; FERGUSON, D. O.; ESSERS, J.; ECKERSDORFF, M.; KANAAR, R., ALT, F. W. Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev*, v.18, p.1283 – 1292, 2004.

MÜLLER, M.; WILDER, S.; BANNASCH, D.; ISRAELI, D.; LEHLBACH, K.; LIWEBER, M.; FRIEDMAN, S. L.; GALLE, P. R.; STREMMEL, W.; OREN, M.; KRAMMER, P.H.. p53. activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, v. 188, p. 2033 –2045, 1998.

MURAD, F.J.; AUGUST, T.; LIU, L. F. - 1994 - 320 páginas MYCIELSKA, M.E., DJAMGOZ, M.B.A. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci*, v. 117, p. 1631 – 1639, 2004.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Physician Data Query (PDQ). Melanoma Treatment. Accessed at www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional on April 8, 2011.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol*, v. 15, p. 342 – 352, 2005.

NISHI, R.; SUGASAWA, K. Repair mechanism of UV-induced DNA lesions. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, v. 51, p. 2126 – 2133, 2006.

NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, v. 9, p. 327 – 337, 2009a.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, v. 9, p. 338 – 350, 2009b.

NUCCITELLI, R.; CHEN, X.; PAKHOMOV, A. G.; BALDWIN, W. H.; SHEIKH, S.; POMICTER, J. L.; REN, W.; OSGOOD, C.; SWANSON, R. J.; KOLB, J. F.; BEEBE, S. J.; SCHOENBACH, K. H.. A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the

- tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int. J. Cancer*, v. 125, p. 438 – 445, 2009.
- NUCCITELLI, R., PLIQUETT, U., CHEN, X., FORD, W., JAMES SWANSON, R., BEEBE, S. J.; KOLB, J. F.; SCHOENBACH, K. H. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem Biophys Res Com*, v. 343, p. 351 – 360, 2006.
- OHKAWA, H., OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, v. 95, p. 351 – 358, 1979.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, v. 4, p. 592 – 603, 2004.
- OSTMAN, A.; MICKE, P. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, v. 45, p. 163 – 175, 2004.
- PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 282, p. 947 – 970, 2002
- PAWLIK, T. M.; SONDAK, V. K. Malignant melanoma: current state of primary and adjuvant treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 45, p. 245 – 264, 2003.
- POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*, v. 6, p. 789 – 802, 2006.
- POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*, v. 17, p. 421 – 433, 2010.
- PRIEL, A.; RAMOS, A. J.; TUSZYNSKI, J. A.; CANTIELLO, H. F. A biopolymer transistor: Electrical amplification by microtubules. *Biophys. J.* v. 90, p. 4639 – 4643, 2006.
- RAMSAY, J.; BIRRELL, G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 31, p. 339 – 344, 1995.
- RANGANATH R. M.; NAGASHREE N. R. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*, v. 202, p.159 – 242, 2001.

- REPACHOLI, M. H.; GREENEBAUM, B. Interaction of Static and Extremely Low Frequency Electric and Magnetic Fields with Living Systems: Health Effects and Research Needs. *Bioelectromagnetics*, v. 20, p. 133 – 160, 1999.
- RESNICK, M. A.; GAME, J. C.; STASIEWICZ, S. Genetic Effects of UV Irradiation on Excision-Proficient and -Deficient Yeast During Meiosis. *Genetics*, v. 104, p. 603 – 818 Aug. 1983.
- ROBINSON, M. J.; MARTIN, B. A.; GOOTZ, T. D.; McGUIRK, P. R.; NEIL OSHEROFF. Effects of Novel Fluoroquinolones on the Catalytic Activities of Eukaryotic Topoisomerase II: Influence of the C-8 Fluorine Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 751 – 756, 1992.
- ROBINSON, M. J.; OSHEROFF, N. Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry*, v. 30, p. 1807 – 1813, 1991.
- ROGOJINA, A.; GAJEWSKI, S.; BAHMED, K.; OSHEROFF, N.; NITISS, J. L. Topoisomerase II Inhibitors: Chemical Biology. IN: POMMIER, Y. DNA Topoisomerases and Cancer. New York: Human Press, 2011. p. 211 – 224.
- ROITT, I.; BROSTOFF J.; MALE, D. Sistema linfóide. In: ROITT, I. M., BROSTOFF, J. *Imunologia*, 1ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 31 – 41
- ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A.; DONEHOWER, R. C. Taxol: A Novel Investigation. *J Natl Cancer Inst*, v. 82, p. 1247 – 1259, 1990.
- SALEH, A.; SRINIVASULA, S. M.; ACHARYA, S. et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, v. 274, p. 17941 – 17945, 1999.
- SALVESEN, G. S.; DIXIT, V.M. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 10964 – 10967, 1999.
- SAUTÈS-FRIDMAN, C.; CHERFILS-VICINI J.; DAMOTTE, D.; FISSON S.; FRIDMAN W. H.; CREMER, I.; Dieu-Nosjean M.C. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev*, v. 30, p.13 – 25, 2011.

- SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K. J.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, v. 17, p 1675 – 1687, 1998.
- SCHUTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHERT W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 655 – 662, 2008.
- SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, v. 7, p. 253 – 266, 1973.
- SHAO, R. G.; CAO, C. X.; NIEVES-NEIRA, W.; DIMANCHE-BOITREL, M. T.; SOLARY, E.; POMMIER, Y. Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20:1852–1859; 2001.
- SHARPLESS, N. E.; KANNAN, K.; XU, J.; BOSENBERG, M. W.; CHIN, L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene*, v. 22, p. 5055 – 5059, 2003.
- SONG, B.; ZHAO, M.; FORRESTER, J. V.; McCAIG, C. D. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 99, p. 13577 – 13582,
- SPORN, M. B. The war on cancer. *Lancet*, v. 347, p. 1377 – 1381, 1996.
- STARK, M.; HAYWARD, N. Genome-Wide Loss of Heterozygosity and Copy Number Analysis in Melanoma Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res*, v. 67, p. 2632 – 2642, 2007.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature*, 458, 719 – 724, 2009.
- STUART, D.; SELLERS W. R. Linking somatic genetic alterations in cancer to therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*, v. 21, p. 304 – 310, 2009.
- TUSZYNSKI, J. A.; PORTET, S., DIXON, J. M.; LUXFORD, C.; CANTIELLO, H. F. Ionic wave propagation along actin microfilaments. *Biophys J*, v. 86, p. 1890 – 1903, 2004.

- VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN, T. B.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 11, p. 700 – 714, 2010.
- VERBORG, W. A.; CAMPBELL, L. R.; HIGHLEY, M. S.; RANKIN, E. M. *Int J Gynecol Cancer*, v. 18, p. 228 – 234, 2008.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*. 2ed.. New York: John Wiley and Sons, Inc, 2006. P. 547 – 548.
- WAINSTEIN, A. J.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. *Rev Col Bras Cir*, v. 3, p. 204 – 214, 2004.
- WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, v. 296, p. 1635-1636.
- WALKER, J. V.; NITISS, J. L. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest*, v. 20, p. 570 – 589, 2002.
- WANG ,Y.; REVELO, M. P.; SUDILOVSKY, D. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *Prostate*, v. 64, p. 149 – 159. 2005.
- WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 430 – 440, 2002.
- WANG, E.; REID, B.; LOIS, N.; FORRESTER, J. V.; McCAIG, C. D.; ZHAO, M. Electrical inhibition of lens epithelial cell proliferation-An additional factor in secondary cataract? *FASEB J*, v.19, p. 842 – 844, 2005.
- WANG, E., YIN, Y., ZHAO, M., FORRESTER, J. V. AND McCAIG, C. D. Physiological electric fields inhibit proliferation of vascular endothelial cells by block at G1. *FASEB J*. 17, 458-460, 2003.
- WANG, Z. B.; LIU ,Y. Q.; CUI, Y. F. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int*. v. 29, p. 489 – 496, 2005.

WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* v. 200, p. 429 – 447, 2003.

YU, S. P.; CHOI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 9360 – 9362, 2000.

YU, Z. G.; SONG, X. Variable range hopping and electrical conductivity along the DNA double helix. *Physl Rev Lett*, v.86, p. 6018 – 6021, 2001.

ZHANG, D. W.; SHAO, J.; LIN, J.; ZHANG, N. LU, B. J.; LIN, S. C.; et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science.* v. 325, p. 332–336, 2009.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, v. 19, p. 124 – 28, 2004.