

Interferências do Campo Elétrico Alternado Externo em Células Tumorais e Normais

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**

**São Paulo
2010**

RESUMO

Terra, A.C. Interferências do Campo Elétrico Alternado Externo em células tumorais e normais. 138 f. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2010.

Os campos elétricos alternados de frequência intermediária (10KHz a 1MHz) e baixa intensidade têm efeitos inibitórios sobre o crescimento de várias linhagens celulares de tumores humanos e murinos. O objetivo geral do presente trabalho é conhecer os efeitos biológicos da aplicação externa de Campos Elétricos Alternados de intensidades de 10V e 5V nas frequências de 200kHz, 1Mhz e 2Mhz; em culturas de células de melanoma murino (B16F10) e fibroblastos humanos normais (FN1), durante 24 horas. Foram estudados os efeitos biológicos antiproliferativos e pró-apoptóticos através das seguintes análises: Citometria de Fluxo para identificar a distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular, Colorimétrico MTT para avaliar a viabilidade celular e Peroxidação Lipídica para avaliar a produção de radicais livres lipídicos poliinsaturados. Os resultados mostraram que em fibroblastos humanos normais o campo elétrico alternado induziu efeito antiproliferativo, indutor de necrose e apoptose, porém em menor efeito tóxico quando comparado às células de melanoma (B16F10), principalmente na frequência de 200kHz. Por outro lado, na frequência de 2MHz e intensidade 10V, as células de melanoma presentes no sobrenadante e aderentes expressaram diferencialmente número de células mortas por apoptose (Anexina-V) e caspase-3 fosforilada. Os diferentes efeitos produzidos entre as duas linhagens estudadas atentam para o fato de que a compreensão dos mecanismos biofísicos da regulação do reparo e da proliferação celular envolve fenômenos celulares e vias de sinalização altamente complexas.

Palavras-chave: Campo elétrico alternado. Melanoma. Atividade proliferativa. Ciclo celular. Apoptose. Citotoxicidade. Caspase-3.

ABSTRACT

Terra, A.C. **Effects of External Alternated Electric Field on tumor and normal cells.** 2010. 138 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Electric fields of alternating intermediate frequency and low intensity have inhibitory effects on the growth of various tumor cell lines. The objective of this study was to evaluate the biological effects of external application of external alternating electric field (CEAE) intensities of 10V and 5V in the frequency 200kHz, 1MHz and 2MHz; in cultured murine melanoma cells (B16F10) and human fibroblasts normal (FN1). We studied the antiproliferative and pro-apoptotic by flow cytometry to identify the distribution of cell populations in the phases of the cell cycle, Colorimetric MTT to evaluate cell viability and lipid peroxidation to evaluate the production of free radicals lipid acids. The results showed that in fibroblasts (FN1) the normal CEAE induced antiproliferative effect, inducing apoptosis and necrosis, but at a lower cytotoxic potential when applied to melanoma cells (B16F10), mainly in the frequency of 200 kHz. Moreover, the frequency of 2MHz and intensity 10V, the melanoma cells in supernatant and the members expressed differentially number of dead cells by apoptosis and caspase-3 phosphorylated. The different effects between the two strains studied to undermine the fact that understanding the biophysical mechanisms of regulation of repair and cell proliferation involves cellular phenomena and signaling pathways highly specific and complex.

Key-words: Alternated electric field. Melanoma. Proliferative activity. Cell cycle. Apoptosis. Cytotoxicity. Caspase-3.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pele melanoma

O melanoma é um câncer de pele potencialmente letal, capaz de produzir metástases; podendo se originar na derme normal, porém, na maioria das vezes origina-se de uma pinta já existente. Algumas características destas pintas que aumentam as chances de se transformarem em melanoma podem ser avaliadas pela chamada regra do ABCD, onde: □

A – Assimetria; B - Bordas ou limites que se tornam irregulares, mal definidas em relação à pele adjacente; C - Cor que se altera de marrom para negro, por variação de tonalidade ou aparecimento de áreas negras, brancas, azuis ou vermelhas; e D - Diâmetro - igual ou maior que 0,6 cm (Figura 1).



Figura 1 - Melanoma maligno.

Fonte: WHO - World Health Organization.

Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html.

O melanoma origina-se a partir dos melanócitos (produtores de melanina), encontrados na camada basal da epiderme e responsáveis pela pigmentação da pele, dos pêlos e cabelos e da íris dos olhos.²

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (Inca), embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. A letalidade do câncer de pele melanoma é elevada, porém sua incidência é baixa. São cerca de 6 mil novos casos por ano no país, segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil.

Normalmente os melanócitos produzem melanina lentamente por diversas reações bioquímicas. Estas etapas podem ser alteradas por influências externas

como luz solar (UV-A, UV-B), aquecimento, exposição a ambientes com metais pesados e radiação ionizante fazendo com que as células transformem-se em células malignas. Desta maneira, os melanócitos têm papel fundamental na proteção da pele aos efeitos prejudiciais da radiação UV. Pessoas sem melanócitos funcionais e com distúrbios pigmentares, como vitiligo e albinismo são hipersensíveis à radiação UV.³

A pigmentação da pele ocorre através da síntese de melanina, que resulta de sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina. Existem dois tipos de melanina, a eumelanina (preta e marrom) e a feomelanina (amarela e vermelha), produzidas a partir da tirosina pela enzima tirosinase. A tirosinase é sintetizada nos ribossomos e transportada, via retículo endoplasmático, para o complexo de Golgi, de onde se originam vesículas que contém a enzima. Estas vesículas são chamadas pré-melanossomos. No interior destes pré-melanossomos, a tirosinase produz a melanina a partir da tirosina. Quando a vesícula está completamente repleta de melanina, ela passa a ser chamada de melanossomo. A tirosinase está envolvida nos dois primeiros passos da síntese de pigmentos, a partir da dopaquinona a melanina formada pode ser a eumelanina ou a feomelanina. Embora a oxidação da tirosina pela tirosinase seja requerida para a síntese de ambos os tipos de pigmentos, a ativação do receptor 1 da melanocortina (MC1R) promove a síntese da eumelanina às expensas da feomelanina.³ Durante este processo são geradas substâncias altamente reativas, podendo levar ao estresse oxidativo e às alterações no DNA, podendo desencadear um processo de carcinogênese.⁴

O melanoma cutâneo é uma neoplasia potencialmente letal, com grande possibilidade de cura se diagnosticado precocemente. No estágio inicial, o melanoma pode ser extirpado por incisão da lesão primária, e a cirurgia também pode remover as metástases em linfonodos regionais.⁵ Porém, pacientes com melanoma metastático, em locais distantes do tumor primário, têm um prognóstico desfavorável, com sobrevida de seis a dez meses, em média.⁶

O melanoma é uma doença extremamente agressiva, com potencial metastático e resistência a agentes quimioterápicos e à morte celular por apoptose.^{6,7} Uma alternativa promissora no tratamento do melanoma maligno pode ser a manipulação da via apoptótica como tentativa de impedir o desenvolvimento

de metástases, através do desenvolvimento de novas terapias antitumorais que tenham este mecanismo como alvo terapêutico.

1.2 Linhagens celulares

As pesquisas na área de Oncologia buscam terapias adjuvantes que sejam cada vez mais eficientes no controle do crescimento do tumor gerando o mínimo dano possível ao tecido normal.

O presente trabalho avaliou os efeitos biológicos resultantes da aplicação de campos elétricos alternados externos (CEAE), em células normais não transformadas ou não imortalizadas, e em células tumorais, a fim de compará-los; abrindo novas possibilidades para terapias adjuvantes antitumorais que provoquem o menor dano possível ao tecido normal. Foram utilizadas duas linhagens celulares, uma linhagem na qual se pretende causar um mínimo dano durante o tratamento, a linhagem de fibroblastos humanos normais (FN1) não imortalizada, estável e com número definido de divisões celulares; e a segunda linhagem, de células tumorais de melanoma murino (B16F10). A linhagem FN1 foi escolhida por ser uma linhagem de células normais e estáveis durante o seu cultivo, e foram estabelecidas no laboratório, o que facilitou a análise dos resultados. Além deste fato, no tratamento in vivo de melanomas humanos ou murinos utilizando a metodologia proposta neste trabalho, os fibroblastos normais estariam expostos, o que torna imprescindível conhecer os efeitos sobre este tipo celular. Pesquisas médicas utilizam animais como cobaias, pois as células de camundongos reagem a tratamentos de forma muito semelhante às células humanas, permitindo uma gama maior de linhagens estudadas e conseqüentemente um amplo espectro de resultados. A linhagem B16F10 foi escolhida por seu cultivo em laboratório apresentar rápido crescimento, facilitando a rotina da pesquisa, e também porque in vivo ela é altamente metastática, sendo uma linhagem com grande variedade de estudos nas áreas de biologia celular e molecular⁸; além de ser uma linhagem radioresistente^{6, 7}; portanto de grande interesse para o estudo de novas terapias de tratamento.

1.3 Campos Elétricos

Uma carga elétrica provoca a formação de uma região de ação de um campo elétrico que exerce uma força capaz de ser sentida por outra carga⁹.

Campos elétricos também são gerados por indução eletromagnética que é o surgimento de um campo elétrico resultante de um campo magnético variável. Os campos elétricos utilizados neste trabalho *não foram* gerados por indução eletromagnética, mas foram gerados através de um capacitor plano de chapas paralelas alimentado por um gerador de funções.

Capacitores são utilizados para armazenar carga elétrica e energia; e são constituídos por dois condutores isolados (placas ou chapas) entre si, mas próximos um do outro e carregados com cargas elétricas de sinais opostos através de uma bateria ou gerador⁹. A figura 2 mostra um capacitor plano de placas paralelas semelhante ao utilizado neste trabalho¹⁰.

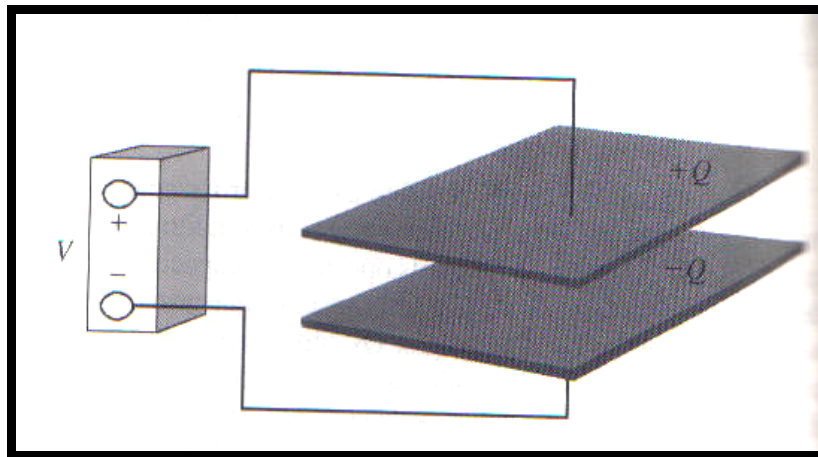


Figura 2- O Capacitor plano de chapas paralelas carregado com cargas de sinais opostos através de uma bateria ou gerador.
Fonte: TIPLER, P. **Eletricidade e Magnetismo**. 3ª Edição, 1995.

Entre os condutores estabelece-se um campo elétrico **E** cujo valor dependerá da diferença de potencial **V** (ddp) e da distância **d** que as separa segundo a fórmula:

$$\boxed{V = E \cdot d} \quad (1)$$

As linhas do campo se direcionam no sentido das cargas positivas para as cargas negativas¹⁰, conforme a figura 3.

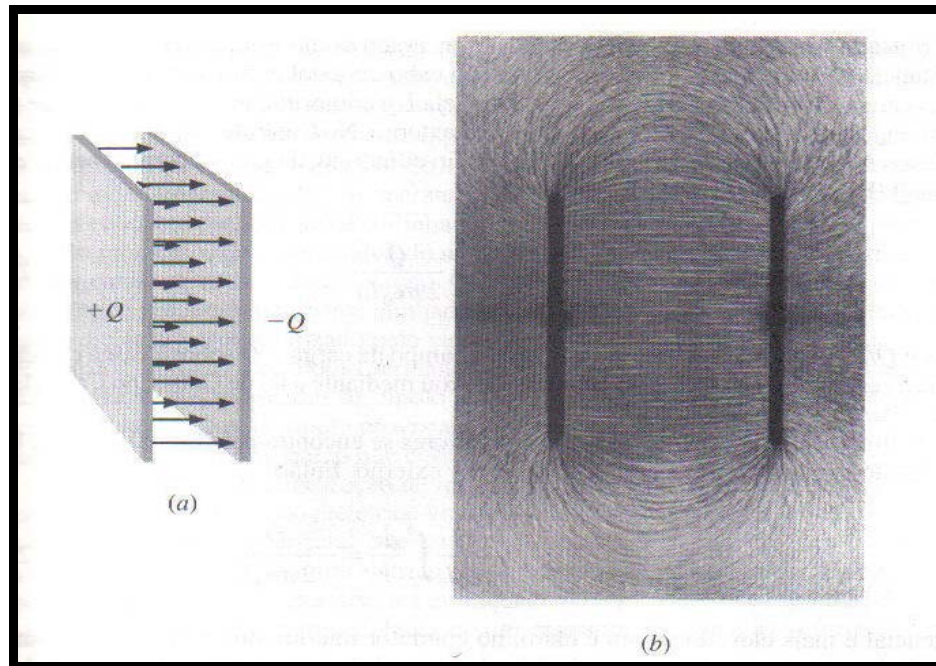


Figura 3 - Direcionamento do campo elétrico entre um capacitor de chapas planas paralelas.

Fonte: TIPLER, P. **Eletricidade e Magnetismo**. 3º Edição.

A corrente elétrica no circuito é denominada **corrente contínua** quando as cargas elétricas se deslocam sempre no mesmo sentido, do pólo positivo da fonte de tensão para o seu pólo negativo - chamado sentido convencional. As correntes contínuas são fornecidas pelas pilhas (também chamadas baterias), lanternas ou pelas baterias usadas em no-breaks para suprir a energia elétrica na falta da energia de corrente alternada, ou em automóveis, onde se utiliza a energia elétrica apenas para dar partida no motor^{11, 12}.

Entretanto as correntes elétricas distribuídas pelas grandes companhias elétricas, em quase todas as cidades do mundo, *não são corrente contínuas*. Quando ligamos um aparelho elétrico em uma tomada, o campo elétrico estabelecido no fio condutor muda periodicamente de sentido. Conseqüentemente as cargas elétricas no fio oscilarão, deslocando-se ora em um sentido, ora em sentido contrário. Então a corrente elétrica (assim como o campo elétrico) muda periodicamente de sentido, sendo por este motivo denominada **corrente alternada**^{11,12}.

A frequência (f) da rede elétrica no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá é de 60 hertz, isto quer dizer que nestas correntes as cargas elétricas no condutor executam 60 vibrações completas em cada segundo (60 ciclos por segundo). Nos países da Europa e da América Latina a frequência da rede elétrica é de 50 hertz (cinquenta ciclos por segundo)^{11,12}.

Os campos elétricos alternados (CEA) são gerados por uma tensão alternada senoidal, isto é, por uma tensão que varia com o tempo segundo a função seno, da seguinte maneira:

$$V(t) = V_m \cdot \text{sen}(w \cdot t) \quad (2)$$

Onde:

t é o tempo em segundos

V_m é a tensão máxima, também chamada tensão de pico

w é a frequência angular relacionada à frequência f pela relação:

$$w = 2 \cdot \pi \cdot f \quad (3)$$

A figura 4 mostra um gráfico da variação harmônica (descreve uma função seno) da tensão V em função do tempo¹¹:

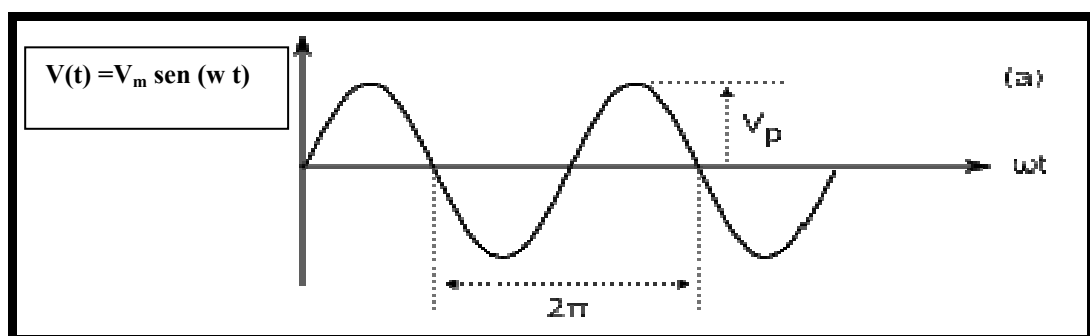


Figura 4 - A variação do potencial elétrico em função do tempo e da frequência,

descrevendo uma função seno.

Fonte: Adaptado de VUOLO, J.H. **Complemento de Física Experimental – 1ª Parte.**

1.4 Efeitos Biológicos dos Fenômenos Elétricos e Eletromagnéticos

As células vivas são compostas por íons, moléculas carregadas ou polarizadas e organelas que geram correntes elétricas e campos elétricos em torno de 0-10 kV/cm, e membranas celulares cujos campos elétricos podem chegar à ordem de 10^5 V/cm.¹³

O bioeletromagnetismo surgiu após a descoberta da indução eletromagnética por Michael Faraday, no final de 1700. Logo após vieram os famosos experimentos do físico e médico italiano Luigi Galvani, que mostrou em patas de sapo a conexão entre eletricidade e contração muscular. Depois veio Alessandro Volta, físico italiano que interpretou os experimentos de Galvani de maneira diferente. São os eletrodos metálicos e não o tecido muscular o gerador de energia elétrica. Polêmica vigorosa e ferrenha entre os dois, para sabermos hoje em dia que ambos tinham sua parcela de razão: o músculo gera eletricidade (Galvani) e o metal também (pilha de Volta).

A partir da invenção da pilha de Volta, em 1800, desenvolveram-se inúmeras aplicações médicas utilizando corrente contínua. D'Arsonval, provavelmente, foi o primeiro a estudar os efeitos fisiológicos da corrente alternada e dos campos elétricos e magnéticos variáveis.¹⁴

A utilização dos campos eletromagnéticos na fisioterapia e na reabilitação (como o ultra-som) apresenta efeitos térmicos e não-térmicos, com efeitos dependentes dos parâmetros frequência e intensidade.¹⁴

A inibição ou estimulação de processos celulares por processos eletromagnéticos é de grande interesse na biologia molecular e na biotecnologia, não apenas para estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas por suas aplicações em diferentes alvos como proliferação celular, reações enzimáticas, vias de morte celular e transporte de membrana.

Envolvidas por dupla camada lipídica, as moléculas de proteína intermediam a maioria das funções da membrana, inclusive as funções de transporte de moléculas específicas para dentro ou para fora da célula. A membrana celular atua como sensor na recepção dos estímulos externos.

Os organismos vivos respondem aos estímulos ambientais e stress (incluindo os campos eletromagnéticos) promovendo mudanças celulares e moleculares

dependentes da duração da exposição, da penetração no tecido e do aquecimento, que se relaciona à frequência e intensidade do estímulo. Além destes fatores, as repostas celulares também dependem do tipo de campo (estático ou alternado), tipo de onda (senoidal, quadrada, etc) e das condições biológicas e do tipo de células expostas.¹⁵

Em 1976 já era possível a análise de uma diversidade de técnicas para osteogênese eletricamente estimulada.¹⁶

Além das correntes contínuas, com valores entre pico e miliampères, foram utilizadas correntes contínuas variáveis¹⁷, correntes pulsadas^{18, 20} e correntes alternadas com formas de onda semelhante às aquelas desenvolvidas no osso por deformação.^{19, 20}

Dúvidas ainda existem sobre os mecanismos pelos quais altas e extremas frequências dos campos eletromagnéticos na faixa de 900MHz a 1800MHz, incluindo a telefonia móvel celular, agem em nível biológico celular e molecular.²¹

1.4.1 Efeitos Biológicos dos Campos Elétricos Estáticos Externos

Campos elétricos estáticos na média de 22kV/m podem arrepiar os cabelos e serem percebidos por pessoas situadas sobre uma superfície isolante. Em ambientes secos a percepção ocorre por volta de 30kV/m.^{22,23}

Embora eletricamente neutros, os átomos e moléculas submetidos a um campo elétrico externo são afetados por este. Quando um átomo ou molécula apolar (o centro da carga elétrica está no centro do átomo ou molécula) é submetido a um campo elétrico externo, as cargas positivas e negativas se separam até que a força atrativa entre ambas equilibra as forças provocadas pelo campo elétrico externo, surgindo um momento de dipolo induzido na mesma direção do campo elétrico. As moléculas polares (o centro das cargas positivas não coincidem com o centro das negativas), como as moléculas da água e do HCl, possuem um momento de dipolo permanente. Ao serem submetidas por um campo elétrico uniforme (CEU) surge um torque que gira a molécula alinhando-a na direção do campo¹⁰, conforme ilustrado na figura 5.

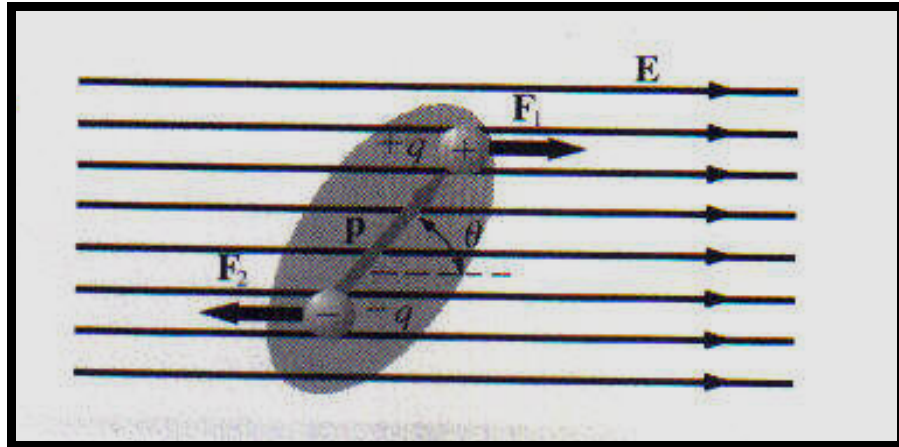


Figura 5: Molécula polar (dipolo) que sob ação do CEU efetua movimento giratório, tendo seu momento de dipolo alinhado na direção do campo elétrico.

Fonte: TIPLER, P. **Eletricidade e Magnetismo. 3ª Edição.**

Dentre as alterações moleculares causadas pela aplicação do campo elétrico estático externo, ressaltam-se^{24,25} :

- orientação de dipolos permanentes gerando mudanças topográficas nas moléculas;
- mobilidade e difusão de cargas de condução (prótons, elétrons e íons) que se orientam na direção do campo elétrico aplicado, originando uma corrente elétrica que produz um novo campo elétrico intrínseco;
- íons podem ser ligados ou desligados de proteínas;
- polarização das cargas elétricas intracelulares. Normalmente estas cargas permanecem espalhadas nas células e atraem-se pela oposição das polaridades, anulando-se. Após a aplicação de um campo elétrico estático externo, as cargas se alinham formando dipolos permanentes que geram um novo campo elétrico.

Campos elétricos estáticos aplicados externamente às culturas celulares tendem a alinhá-las perpendicularmente às linhas de campo ou modificar a sua forma, alongando-as.²¹ (Figura 6).

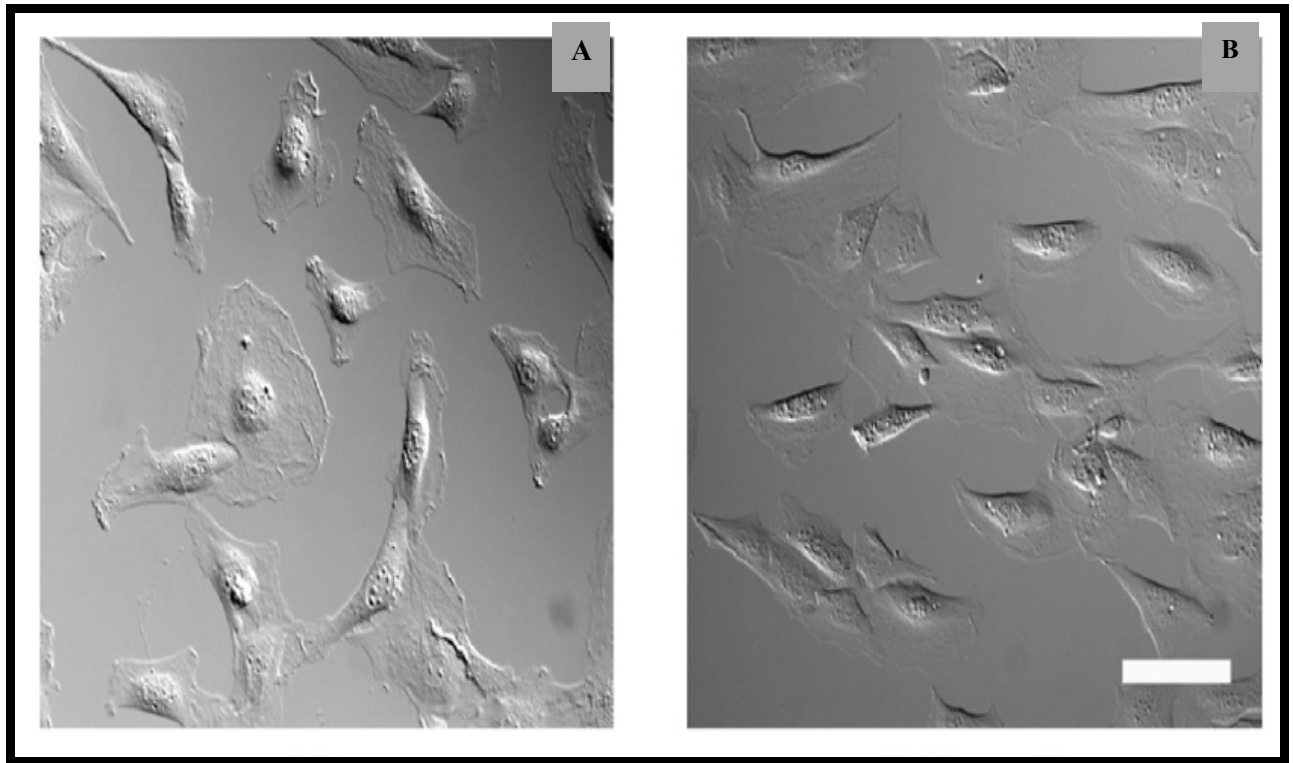


Figura 6 – (A) Morfologia celular de fibroblastos humanos normais e (B) Alinhamento e alongamento após a aplicação de Campo Elétrico Estático de 5V/cm após 3 horas.

Fonte: Adaptado de Funk, R. H. W et al, 2008.

1.4.2 Efeitos biológicos dos Campos Elétricos Alternados (CEA)

O CEA tem uma gama de efeitos em tecidos vivos.

A frequências muito baixas (<1kHz) estimulam tecidos através da despolarização de membrana²⁶, o crescimento ósseo e a cura de fraturas.²⁷

Contudo, enquanto a frequência dos campos elétricos aumenta, o efeito estimulatório diminui e a partir da ordem de MHz o efeito biológico dominante se torna o aquecimento.^{28, 29,30}

Kirson et al³¹ mostrou que CEAs de baixa intensidade, frequência intermediária (100kHz – 1Mhz), transmitidos por eletrodos implantados (aplicados internamente conforme a figura 7) não provocam o aquecimento como efeito biológico, mas possuem efeitos específicos nas células em divisão, interferindo na orientação do fuso mitótico e destruindo as células durante a clivagem; efeitos dependentes da orientação do eixo da mitose versus o eixo do vetor campo elétrico.³¹

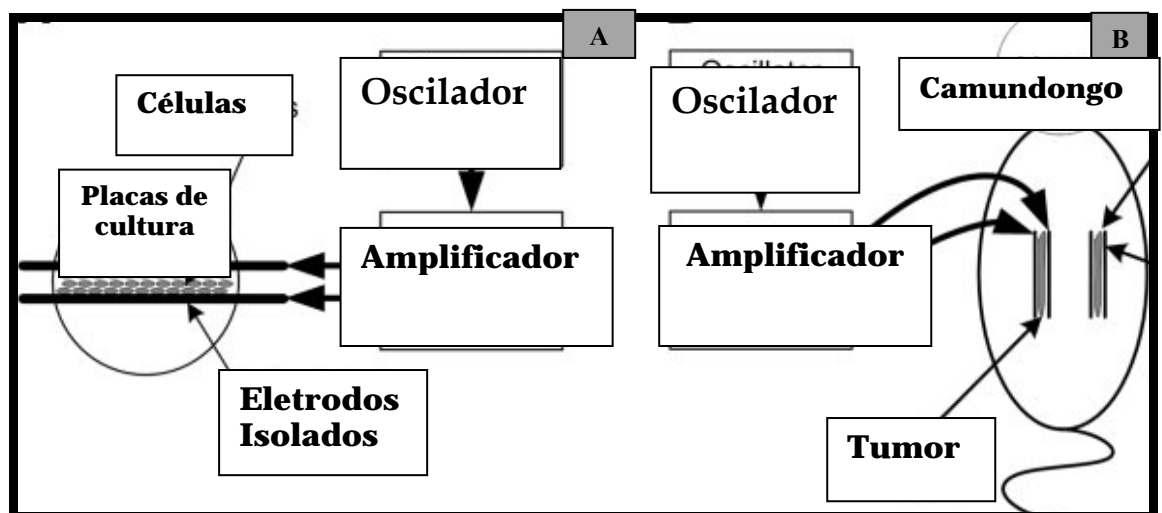


Figura 7: Esquema Experimental da aplicação do CEA por eletrodos internos em (A) cultura celular e (B) em camundongos.
 Fonte: Modificado de Kirson et al, 2009.

Foram verificados efeitos inibitórios sobre a razão de crescimento de várias linhagens celulares dos seguintes tumores humanos: melanoma Patrícia C, os gliomas U-118 e U-87, pulmão H-1299, mama MDA 231, próstata PC3; e murinos: melanoma B16F1 e os gliomas F-98, C-6 e RG2.³¹

O efeito não-térmico afeta as células em divisão, enquanto as quiescentes são deixadas intactas, agindo de duas maneiras:

1. Atrasando as células durante o processo mitótico.
2. Destruindo as células durante a citocinese.

A figura 8 mostra células de B16F1 expostas aos CEA. Na figura 8-A é visível o atraso na divisão celular, pois um processo de mitose leva menos do que uma hora, esta célula é vista estacionada por 3 horas. Em B e C ocorrem dois exemplos de desintegração durante a citocinese. Nas fotos centrais (30 minutos) forma-se a clivagem e nas do lado direito (50 minutos e 60 minutos), a desintegração celular.

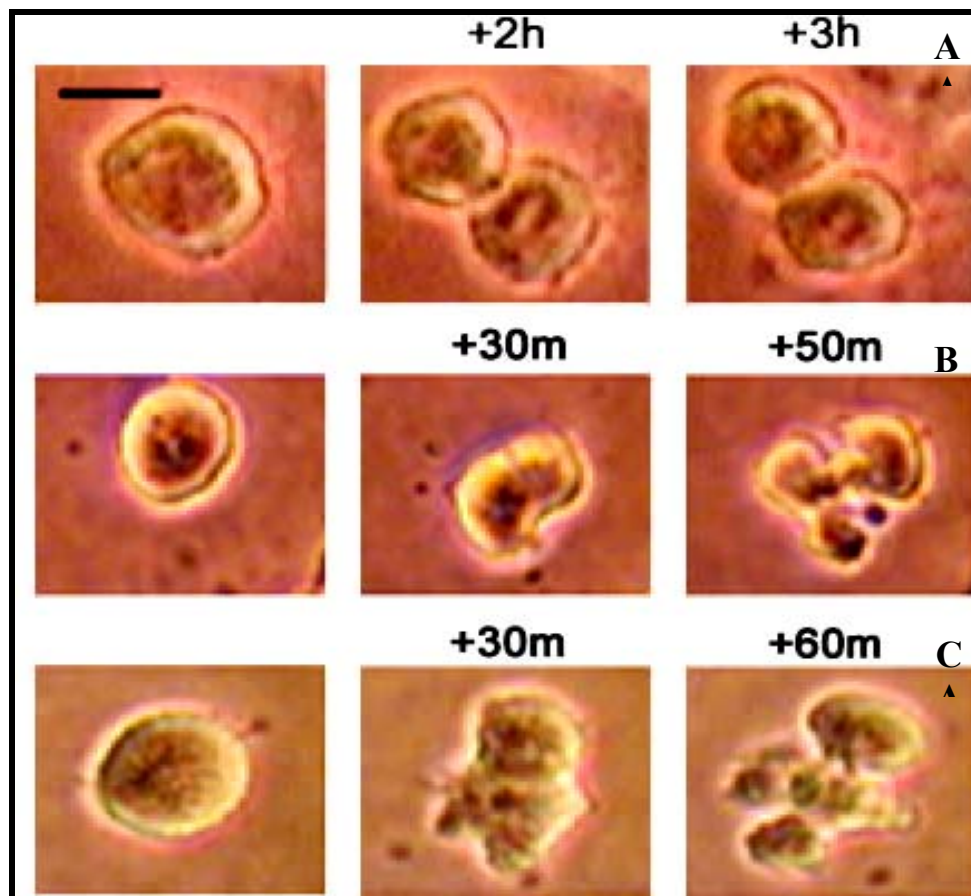


Figura 8 - Efeitos dos Campos Elétricos Alternados em células de melanoma B16F1.

Na figura A, a divisão celular em 2 horas e 3 horas.

Fonte: Kirson et al, 2004.

Os resultados mostraram que a frequência que causa maior efeito antiproliferativo depende do tipo de célula.³¹

Em recente trabalho, Kirson (2009)³² aplicou eletrodos externos em tumores metastáticos pulmonares de melanoma B16F10 em ratos e tumores VX-2 em

coelhos conforme ilustra a figura 9. Os eletrodos encapados com leucoplast® foram presos às peles depiladas dos coelhos por hidrogel, na direção perpendicular um do outro.

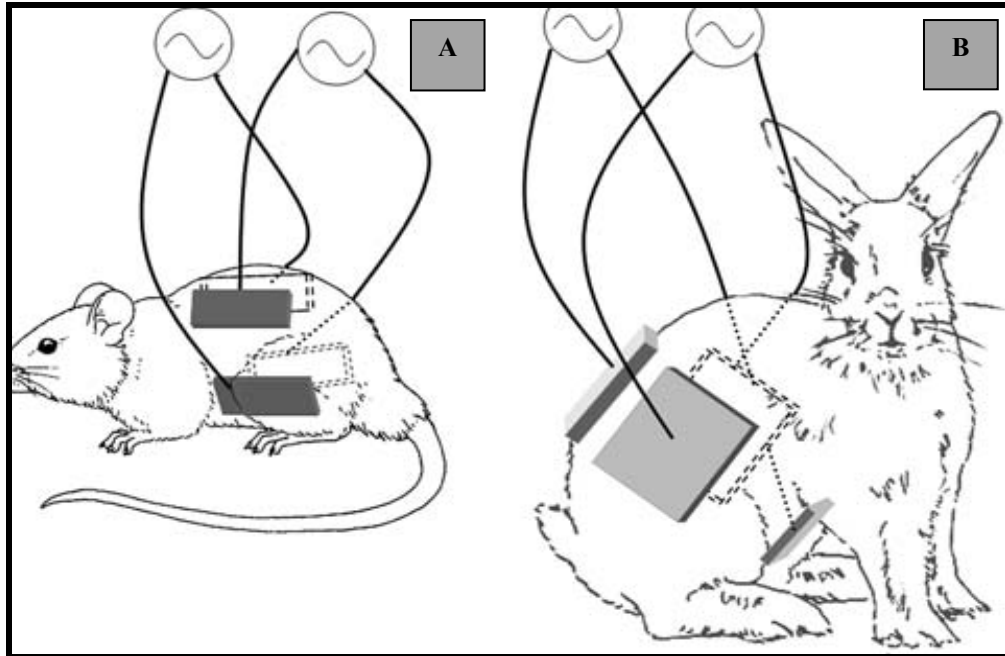


Figura 9 – Localização dos eletrodos em a) ratos e b) coelhos.

Fonte : Adpatado de Kirson et al,2009.

O tratamento contínuo durante sete dias reduziu significativamente o tamanho e o número das metástases comparativamente ao grupo controle, como mostra a figura 10.³²

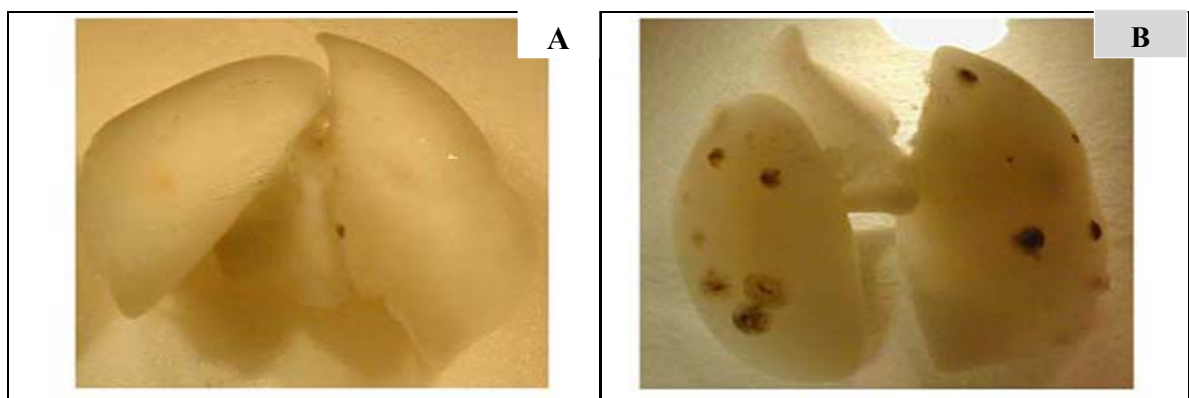


Figura 10 – Metástase do melanoma maligno em pulmões de ratos a) tratados e b) do grupo controle. Fonte: Modificado de Kirson et al, 2009.

1.5 Ciclo Celular

O processo que envolve a formação de novas células a partir de divisões de uma única célula é denominado Ciclo Celular.

Resumidamente, o Ciclo Celular é composto por uma série ordenada de fases sequenciais: Intérfase (fases G1, S, G2) e Mitose (fase M).³³

- **G1** (gap1) é o intervalo entre a mitose que originou a célula e a fase S; durante a fase G1 a célula cresce e sintetiza as enzimas necessárias à síntese do DNA.
- **S** é a fase de síntese do DNA.
- **G2** (gap 2) é o intervalo entre a fase S e a mitose que dará origem a duas células filhas; durante a fase G2 a célula está se preparando para a divisão mitótica em duas células-filhas.
- **M** é a fase mitótica, um processo contínuo formado por cariogênese (divisão do núcleo) e citocinese (divisão do citoplasma).³⁴

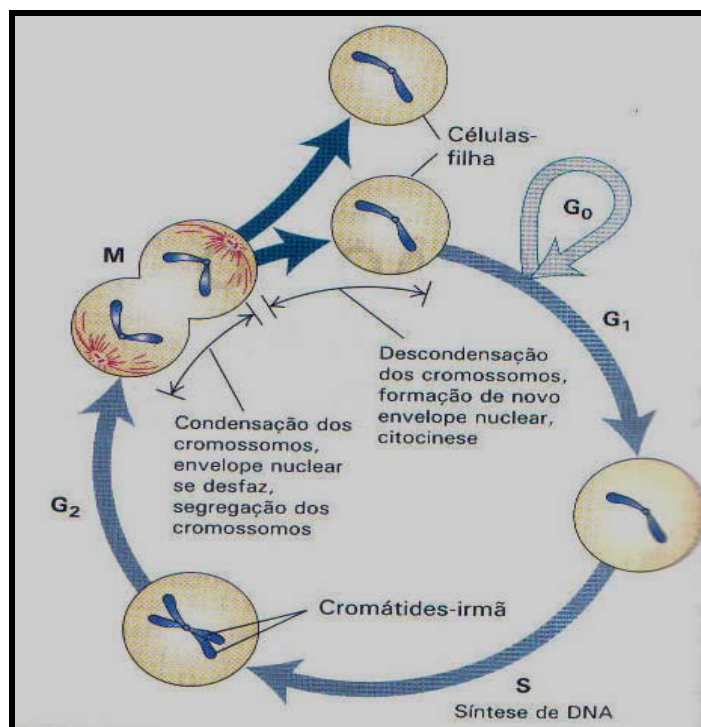


Figura 11: Eventos principais do ciclo celular dos eucariotos.

Fonte : Lodish, H. **Biologia Celular e Molecular** – 5° Ed.

1.5.1 Regulação do ciclo celular

É absolutamente impossível que uma célula entre em mitose ou divida o seu DNA, se o mesmo não tiver sido previamente duplicado, sendo também preciso garantir que uma vez duplicado ele não venha ser reduplicado. Por isto existem os pontos de controle ou “checkpoints”, que permitem verificar a reparação de DNA danificado e a captação de sinais extracelulares que regulam a proliferação celular.³⁵

As fases do ciclo celular são controladas por enzimas denominadas ciclinas.

O princípio básico da regulação do ciclo celular é a cascata de fosforilação, desfosforilação, síntese e degradação das CDKs (quinases dependentes de ciclina) cuja subunidade regulatória são as ciclinas, e as concentrações destas aumentam ou diminuem de acordo com a progressão das células ao longo do ciclo celular.

A fase G1 é a fase em que se dá a preparação para a duplicação do DNA, e a fase mais longa do ciclo celular (demora em média 10 horas). Nesta fase existe o *ponto de restrição* que só é ultrapassado se houver sinais ambientais favoráveis, é um ponto de controle que detecta danos no DNA. Este ponto é regulado por complexos de CDK4 e CDK6 e pelas ciclinas do tipo D (D1, D2, D3). Mais tarde em G1 se expressa a ciclina E ligando-se à CDK2, levando à duplicação do DNA. Não havendo o ponto de restrição, a célula duplicaria o seu DNA mesmo na ausência de condições extra e intracelulares, duplicando o seu DNA continuamente danificado e levando a uma descontrolada entrada na fase S e à proliferação celular.³⁶

Durante a fase G1 há também a possibilidade da célula entrar num período designado por G0, uma pequena ramificação da fase G1, na qual a célula sai do ciclo celular num estado especializado e de não-divisão. Durante esta fase as células são altamente móveis, sintetizam proteínas e curiosamente as células em G0 podem voltar a entrar em G1, caso existam estímulos favoráveis para que isso aconteça.

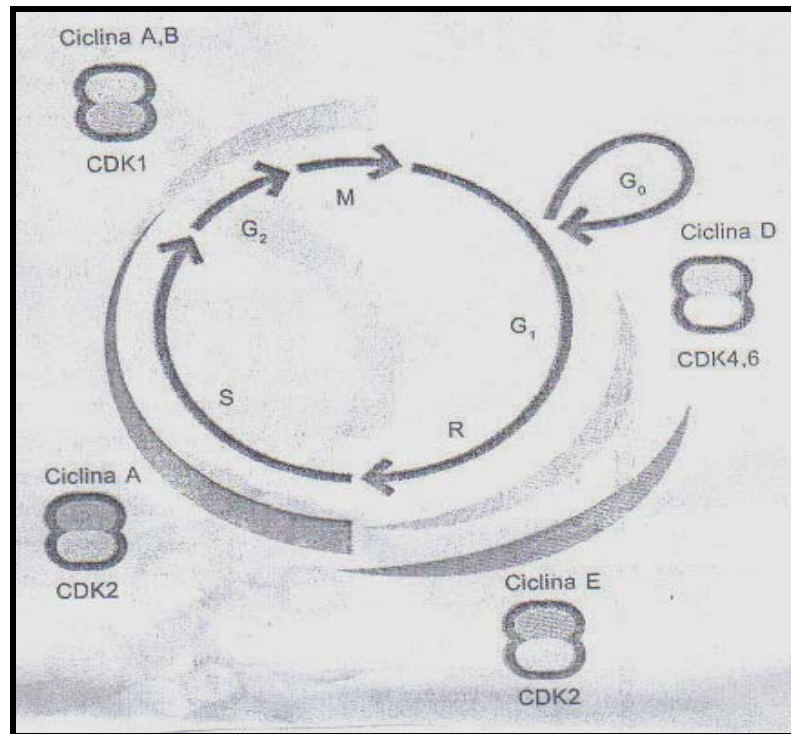


Figura 12 – Regulação do Ciclo Celular pelas Ciclinas e CDK's
 Fonte: Alberts et al, **Fundamentos da Biologia Celular**.

Na fase S ocorre a duplicação do DNA, pois para ocorrer a mitose a célula deve ter o dobro da quantidade de DNA para a fim de distribuir equitativamente o seu material genético para as duas células filhas. A replicação do DNA ocorre com a ajuda de proteínas, à medida que essas proteínas vão replicando o DNA, elas vão sendo inativadas de forma a impedir que o DNA que está sendo replicado volte a ser replicado. A progressão da replicação do DNA durante a fase S é mediada pelos complexos CDK2-ciclina A.

Depois da fase S temos a fase G₂ ou Gap 2, na qual a célula se prepara para a mitose. É a última oportunidade para corrigir os erros que provêm da replicação de DNA e evitar que a exposição a um determinado ambiente possa influenciar a qualidade e a fidelidade da mitose. Por isso existe o segundo checkpoint evitando assim que a célula duplique o seu DNA quando danificado. Nesta fase o controle é realizado pelo complexo CDK1/ciclina B.

Este checkpoint atua de forma a dar tempo à célula para corrigir esses danos, e há duas possibilidades de ocorrência:

- suicídio celular designado por apoptose;
- ou a célula terá de regular o DNA danificado, e impedir que este entre em mitose.

A ausência deste checkpoint pode também levar ao aparecimento de câncer. Se antes da mitose houver danos no DNA, como uma mutação que induza a célula a entrar em ciclo e a dividir-se, a célula é induzida a dividir-se muito mais rapidamente que as células vizinhas, invadindo outros tecidos, levando à metastatização.

Além do ponto de restrição, falamos do ponto de controle que detecta erros no DNA. Neste caso os danos no DNA levam à ativação dos genes reguladores da proteína p53. A p53 é chamada de supressor tumoral, já que quando está presente de alguma forma, protege e regula a entrada em ciclo e a sua divisão, daí a sua importância na diminuição do acúmulo de mutações no DNA em G1.

Outra transição chave é a Transição G2-M, ou seja, a entrada em Mitose.

A entrada em mitose pode ser vista como o ponto alto do ciclo celular. A mitose inicia-se através da condensação do DNA da cromatina, que leva à formação de cromossomos que têm uma única missão: se organizarem no núcleo e alinharem-se formando a chamada placa metafásica. A placa metafásica vai determinar a entrada da célula em Anáfase, o momento crítico da mitose, quando a célula distribuirá o conteúdo genético.

Quando os cromossomos são duplicados na fase S, as duas cópias de cada cromossomo replicado permanecem firmemente ligadas como cromátides-irmãs idênticas. Os primeiros sinais visíveis de que uma célula está para entrar na fase M é a progressiva compactação dos cromossomos replicados, os quais são visualizados como estruturas filamentosas – num processo denominado condensação cromossômica. A segregação dos cromossomas replicados é desencadeada por uma complexa maquinaria do citoesqueleto com muitas partes em movimento – o fuso mitótico. Este é constituído por microtúbulos e proteínas associadas, que puxam os cromossomos-filhos para os pólos do fuso mitótico e distanciam os pólos.³⁷

As quatro divisões didáticas da mitose são fases que descrevem as alterações morfológicas e a movimentação dos cromossomos durante o processo.

- Prófase - Duplicação dos cromossomos
- Metáfase - Os cromossomos alinham-se no equador da célula
- Anáfase - O aparelho mitótico captura os cromossomos e os conduz para os pólos opostos da célula em divisão através dos microtúbulos de tubulina
- Telófase - Forma-se uma membrana nuclear em torno de cada grupo de cromossomos

Durante a prófase os cromossomos iniciam o processo de condensação e formam o fuso mitótico. Esta fase termina com a ruptura do envoltório nuclear.

Na metáfase os cromossomos dispõem-se na zona equatorial da célula, atingindo o grau máximo de condensação. A seguir, na anáfase, os cromossomos-filhos migram para os pólos opostos, deslocamento que depende dos microtúbulos de tubulina, porque sua não polimerização faz com que as mitoses estacionem nesta fase.³⁸

Na telófase os cromossomos-filhos chegam aos pólos e ocorre a reconstituição dos núcleos e a divisão do citoplasma (citocinese), originando enfim, duas células-filhas.

1.5.2 Mecanismos de morte celular

As células frequentemente praticam o suicídio, num processo conhecido como apoptose, marcado por uma sequência bem definida de alterações morfológicas. Esta capacidade é essencial para o próprio funcionamento do organismo. Uma falha neste mecanismo pode estar por trás de muitas doenças.

O girino elimina a cauda durante a sua metamorfose em sapo; mamíferos eliminam incontáveis neurônios enquanto o seu sistema nervoso se desenvolve. Os microscopistas têm identificado os principais sinais que distinguem esta morte fisiológica de uma destruição acidental como é a necrose.³⁹

A morte de células por necrose ocorre quando são severamente danificadas, por desastre físico ou privação de oxigênio, por exemplo. O inchaço das células é um diagnóstico decisivo. Assim as organelas internas e as células como um todo incham e se rompem. Esses efeitos ocorrem porque injúrias impedem as células de controlar seus fluidos e o seu equilíbrio iônico; a água e as partículas pesadas (especialmente íons de sódio e cálcio) que são normalmente bombeados para fora da célula agora ficam circulando dentro da mesma. Outro diagnóstico é a inflamação: macrófagos circulantes e outros glóbulos brancos do sistema imunológico vão em direção às células necrosadas e as digerem. A inflamação auxilia na limitação da propagação da infecção e na remoção dos restos de tecidos, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem danificar os tecidos saudáveis vizinhos, algumas vezes de maneira extensiva.

Diferentemente da necrose, no processo de apoptose não ocorre inchaço ou aumento do tamanho das células. As células moribundas se retraem causando a perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. As organelas internas retêm as suas estruturas, mas o núcleo (que na necrose sofre pouca alteração) muda drasticamente. A cromatina (o DNA cromossômico com suas respectivas proteínas) sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os blebs se rompem originando estruturas contendo o conteúdo celular, chamadas corpos apoptóticos, que são ingeridos pelas células vizinhas incluindo os macrófagos, presentes em todos os tecidos sem incitar uma resposta inflamatória. Na pele, os queratinócitos são gerados pelos seus precursores numa camada deste tecido: tais precursores migram então para a superfície, formando camadas de células mortas que substituem seus conteúdos por queratina e adquirem impermeabilidade à água. Tais células mortas formam a camada protetora da pele e frequentemente sofrem descamação, sendo substituídas por outras.³⁹

A maioria das células manufatura um conjunto de proteínas que pode servir como armas de autodestruição. Desde que a célula seja útil ao organismo, ela reprime sua maquinaria de autodestruição (o desencadeamento dessas proteínas). Se, entretanto, a célula se torna infectada ou maligna ou se ela compromete a

saúde do organismo, as proteínas letais começam a ser desencadeadas para dar início ao processo de suicídio.⁴⁰

São descritos dois mecanismos distintos de efetivação da apoptose : a via extrínseca e a via intrínseca, conforme ilustra a figura 13.

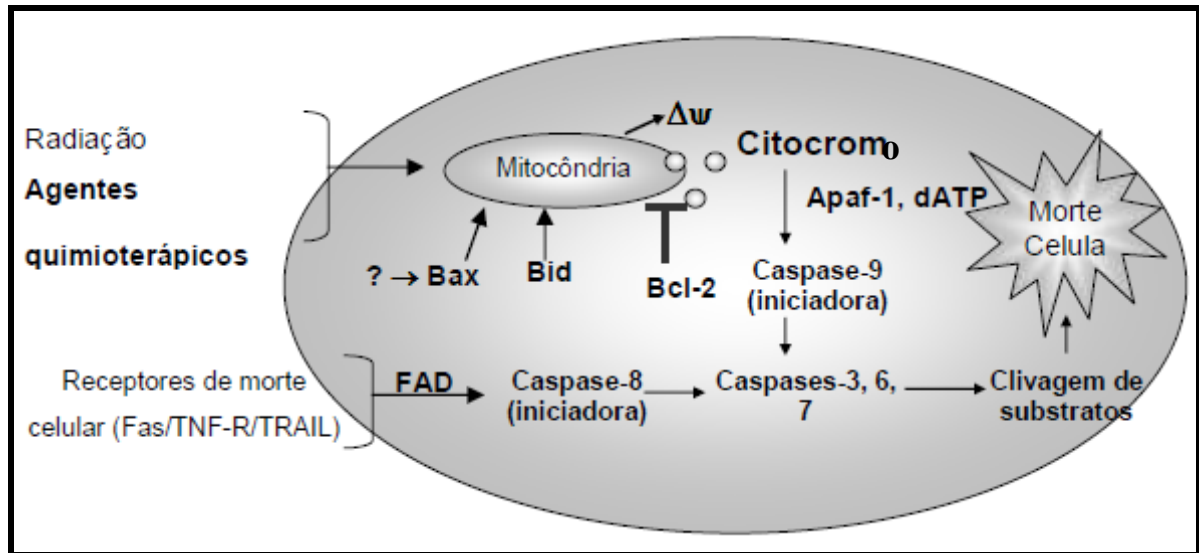


Figura 13: Mecanismo de apoptose através da via extrínseca (FAS, TNF) e intrínseca (mitocondrial).

Fonte: Anazetti e Melo, 2007.

Via extrínseca é iniciada via receptores de morte da superfamília rTNF (receptores do fator de necrose tumoral) que incluem FAS/CD95, rTNFR-1 e TRAIL; caracterizados por um domínio extracelular rico em cisteína, possibilitando o reconhecimento de seus ligantes. Estes ligantes específicos sinalizam a formação de um complexo indutor de morte, que recruta a caspases-8, que irá ativar a caspase-3, iniciando o processo apoptótico.

A via intrínseca é ativada por fatores extra ou intracelulares como a privação de fatores de crescimento, hipóxia ou danos no DNA. Estes fatores convergem para a mitocôndria, causando alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (2, 3, 6, 7, 8, 9, e 10).^{41, 42}

Portanto, a ativação da caspase-9 mediada pelo citocromo c serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico.^{43,44}

A via mitocondrial também envolve a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a morte celular por apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, e conseqüentemente inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol.⁴⁵ Níveis elevados de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência da apoptose.^{46,47}

A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como os epitélios capazes de proliferação e morfogênese. Dentre as suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação das caspases.⁴⁸

A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax), desta forma, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax; por outro lado, o homodímero Bax/Bax promove apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular.^{45,47}

A proteína p53 participa da regulação do ponto de checagem de G1. Danos no DNA promovem a ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que as células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões ou impedindo o mecanismo de apoptose.^{48,49} Em mais da metade de todos os tumores sólidos, incluindo o pulmonar, do colo e de mama, houve perda da proteína p53, ou então ocorreu a formação de uma proteína semelhante porém ineficaz.⁴⁹

Os melanócitos produzem o pigmento melanina, o qual escurece outras células da pele protegendo-as contra a ação dos raios solares. Se os melanócitos perecem facilmente, as outras células correm perigo. Por esta razão os melanócitos devem produzir grandes quantidades de Bcl-2. Mesmo quando os melanócitos se

tornam geneticamente danificados, eles são menos propensos a cometer suicídio do que outras células da pele, e são mais propensos, quando malignos, a formar tumores agressivos que se espalham rapidamente.^{6,7}

Muitos tumores são resistentes aos efeitos da quimioterapia e da radioterapia, doravante consideradas terapias capazes de destruir os tumores diretamente, matando as células malignas por necrose. As células que morrem por apoptose o fazem frequentemente pela ativação da p53. Células em que faltam a p53, ou que produzem altos níveis da proteína inibidora Bcl-2, podem se tornar “acostumadas” aos efeitos dos tratamentos contra o câncer e prosperar em metástase.⁶

6.CONCLUSÃO

Para os fibroblastos humanos normais:

- O CEAE não alterou a capacidade de adesão, formação de prolongamentos, formação de agregados multicelulares e vacuolização;
- As células FN1 são sensíveis a produção lipídeos peroxidados em condições basais (controle) em relação à linhagem de melanoma B16F10; após a aplicação do CEAE ocorreu efeito inibitório na produção de LPO pelas células FN1;
- Nenhuma das frequências e intensidades mostraram-se citotóxicas;
- A porcentagem de células com DNA fragmentado (apoptóticas) aumentou na frequência de 1MHz e em maiores proporções na frequência de 200kHz;
- O tratamento mostrou-se como um efeito antiproliferativo, reduzindo as populações celulares das fases quiescente, mitótica e de síntese;
- As células aderidas submetidas à 2MHz – 10V mostraram redução na apoptose com elevação da expressão da caspase 3 e grande aumento na expressão de PI (Necrose). As células do sobrenadante apresentaram aumento da expressão da Anexina V e grande expressão da caspase 3, sugerindo anoikis.
- À frequência de 200kHz houve redução da morte celular por apoptose e necrose no sobrenadante, mas as células aderentes mostraram um pequeno aumento de ambas as populações celulares, que associadas à redução da expressão da caspase 3 sugerem outras vias de morte celular.

Para as células de melanoma B16F10:

- Na frequência de 200kHz – 5 V foram observados efeitos tóxicos, como o desprendimento das células, a formação de agregados multicelulares no sobrenadante e a inibição da capacidade proliferativa;
- Funcionalmente, houve indução da formação e liberação de radicais livres peroxidados (MDA), a partir dos lipídeos de membrana celular.
- O CEAE mostrou efeito indutor da produção de LPO nas frequências de 200kHz e 2MHz 5V.
- Houve elevação da proporção de células apoptóticas na frequência de 200 kHz - 5V e mais significativamente na frequência de 2MHz - 10V;
- Efeitos diversos nas populações do ciclo celular foram encontrados, exceto para a frequência de 200kHz – 5V, os resultados mostraram resposta inibitória sobre as células em divisão celular (G2/M);
- A expressão da AnexinaV e da caspase-3 aumentaram significativamente nas frequências de 2MHz e 200kHz, sugerindo possíveis relações entre os efeitos da produção de LPO, a provável desorganização do citoesqueleto e a morte celular por anoikis.

Conclusão Geral:

- As células de FN1 foram menos prejudicadas pelos efeitos do CEAE do que as células de melanoma B16F10, sugerindo uma nova possibilidade terapêutica no tratamento do melanoma, que dependerá de novos estudos utilizando os CEAE, com mais detalhamento sobre a cinética celular e as vias de morte associadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION.
Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html.
acesso em : 15 dez.2009.
- 2 IBRAHIM, N.; HALUSKA, F. G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annu Rev Pathol.**, v. 4, p. 551-79, 2009.
- 3 DE AZEVEDO MOREIRA, L. M. Perfil do albinismo oculocutâneo no estado da Bahia. **R. Ci. méd. biol.**, v. 6, n. 1, p. 69-75, 2007.
- 4 SANDER, C. S.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **Br J Dermatol.** , v. 148, n. 5, p.913-22, 2003.
- 5 ANDTBACKA, R. H.; GERSHENWALD, J. E. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. **J Natl Compr Canc Netw.**, v. 7, n. 3, p. 308-17, 2009.
- 6 SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.
- 7 GRAY-SHOPFER, V.; WELLBROCK, C. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851-857, 2007.

- 8 JUNIOR, J. et al. Modelo experimental de melanoma em camundongos. **An. bras. Dermatol.**, v. 72, n. 5, p. 487-9,1997.
- 9 NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de Física Básica:** eletromagnetismo. 1ed. São Paulo : Editora Edgard Blücher, 1997. 323p.
- 10 TIPLER, P. A. **Física para cientistas e engenheiros 3:** eletricidade e magnetismo. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995. p.340.
- 11 HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; MERRILL, J. **Fundamentos de Física vol 3 :** eletromagnetismo. 3 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1991. [s.p.]
- 12 JACKSON, J. D. **Classical Electrodynamics.** 3 ed. New York, EUA : Hamilton Printing Company,1998. [s.p.]
- 13 KIRSON, E. D. et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. **PNAS.**, v104, n. 24, p.10152-10157, jun. 2007. Disponível em:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas0702916104>
acesso em : 10 dez. 2009.
- 14 BREN, S. P. A. Historical Introduction to EMF Health Effects. **IEEE Eng. Med. Biol. Maga.** , v. 15, n. 4, 1996.
- 15 DINI, L.; ABBRO L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron.**, v. 36, n. 3, p.195-217, 2005.
- 16 MARINO, A. A.; BECKER R. O. Electrical osteogenesis: an analysis. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 123, p. 280, 1977.

- 17 FRIEDENBERG, Z. B. et al. Surg Bone reaction to varying amounts of direct current. **Gynecol. Obstet.**, v. 131, n. 5, p. 894, 1970.
- 18 LEVY, D. D. A pulsed electrical stimulation technique for inducing bone growth. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 238, p. 478, 1974.
- 19 TREHARNE, R. W. et al. An in vitro study of electrical osteogenesis using direct and pulsating currents. **Clin. Orthop. Relat. Res.**,v. 145, p. 300, 1979.
- 20 TSAI, M.T. et al. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. **Bioelectromagnetics.**, v. 28, n. 7, p. 519, 2007.
- 21 FUNK, R. H. W.; MONSEES, T.; O'ZKUCUR , N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. **Prog. Histochem. Cytochem.**, v. 43, n. 4, p. 177-264, 2008.
- 22 TENFORDE, T.S.; KAUNE, W. T. Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans. **Health. Phys.**, v. 53, n. 6, p. 585-606, 1987.
- 23 BRACKEN, T.D.; SENIOR, R.; TUOMINEN, M. Evaluating occupational 60-hertz electric-field exposures for guideline compliance. **J. Occup. Environ. Hyg.**, v. 1, n. 10, p. 672, 2004.
- 24 STAVROULAKIS, P. **Biological effects of electromagnetic fields: mechanisms, modeling, biological effects, therapeutic effects, international standards,**

exposure criteria. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003. p. 781.

- 25 HINKLE, L.; MCCAIG C. D.; ROBINSON, K. R. The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field. **J. Physiol.**, v. 14, p. 121, 1981.

- 26 POLK C. Biologic effects of nonionizing eletromagnetics fields - Introduction. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. [s.p.].

- 27 BASSET C. A. The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. **Clin. Plast. Surg.**, v. 12, p. 259, 1985.

- 28 ELSON E. Biologic effects of nonionizing eletromagnetics fields. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. p. 1417–1423.

- 29 CHOU, C. K. Biologic effects of nonionizing eletromagnetics fields. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. p. 1424–1430.

- 30 POLK, C.; POSTOW, E. Biological effects of electromagnetic fields handbooks, manuals, etc. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. p. 618.

- 31 KIRSON, E. D. et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3288–3295, 2004.

- 32 KIRSON, E. D. et al. Alternating Electric Fields (TTFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. **Clini. Exp. Met.**, v. 26, n. 7, p. 633-640, 2009.
- 33 PARDEE, A.B et al. Animal cell cycle. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 47, p. 715, 1978.
- 34 VIALARD, J. F. et al. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. **Cancer Radiother.**, v. 2, p. 109, 2001.
- 35 HARTWELL L. E.; WEINERT, T. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.
- 36 LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054 p.
- 37 BERKALOFF, A.; BOURGUET, J. ; FAVARD, P. **Biologia e Fisiologia Celular**. São Paulo: Edgar Blücher, 2002. p. 1975 - 287.
- 38 PANCHAL, J. S.; LI, D.; GAN, Y. **Apoptosis**: a new pharmacodynamic endpoint, Pharmaceutical. Arizona: Research, 1997. v. 14. p.1659 – 1671.
- 39 ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. **Morte Celular por Apoptose**: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007. Disponível em: www.metrocamp.com.br/pesquisa
Acesso em: 15 dez. 2009.

- 40 GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. **Curr. Opin. Immunol.**, n. 7, p. 694-703, 1995.
- 41 GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, n. 281, p. 1309-1312, 1998.
- 42 SLEE, E. A. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J. Cell. Biol.**, v. 144, p. 281-292, 1999.
- 43 KUIDA, K. Caspase-9. **Intern. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 32, p. 121-124, 2000.
- 44 GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. **Crit. Rev. Eukaryot Gen. Expr.**, v. 10, p. 231-239, 2000.
- 45 ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondrial is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL60 cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, p. 367-373, 2001.
- 46 VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell. Prolif.**, v. 36, p. 165-175, 2003.
- 47 YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. **Mol. Cell. Biol.**, n. 19, p. 8469-8478, 1999.
- 48 BENNETT, M. R. Mechanisms of p53-induced apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p.1089-1095, 1999.

- 49 HAUPT, Y. et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. **Genes Dev.**, v.9, p. 2170-2183, 1995.
- 50 BENZIE I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 47, n. 3, p. 233-61,1996.
- 51 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.
- 52 AL MEHDI, A. B.; DODIA, C.; JAIN, M. K.; FISHER, A. B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biophys. Biochim. Acta.** v.1166, p. 56-62, 1993.
- 53 PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4, p.277-290, 1995.
- 54 JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med.**, v. 9, n. 6, p. 515,1990.
- 55 COLE, K. S. **Membranes, Ions and Impulses:** a chapter of classical biophysics. Berkeley: Univ of Calif Press, 1968.
- 56 KELLER, F. J.; GETTYS, W. E.; SKOVE, M. J. **Physics: Classical and Modern.**, New York : McGraw-Hill, 1993. [s.p.]
- 57 CLAGUE, D. S.; WHEELER, E.K. Dielectrophoretic manipulation of macromolecules: The electric field. **Phys. Rev.**,ed. 64, p. 26605, 2001.

- 58 GONZALEZ, C. F.; REMCHO, V.T. Harnessing dielectric forces for separations of cells, fine particles and macromolecules. **J. Chromatogr.**, v.1079, p. 59–68, 2005.
- 59 POLK C. Biologic effects of nonionizing eletromagnetics fields - Introduction. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The Biomedical Engineering Handbook**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. p. 1404–1416.
- 60 FITZSIMMONS, R. J.; GORDON, S. L.; KRONBERG, J.; GANEY, T.; PILLA A. A. A pulsing electric field (PEF) increases human chondrocyte proliferation through a transduction pathway involving nitric oxide signaling. **J. Orthop. Res.**, v. 26, p. 854, 2008.
- 61 BRIGHTON, C.T.; UNGER, A. S.; STAMBOUGH, J. L. In vitro growth of bovine articular cartilage chondrocytes in various capacitively coupled electrical fields. **J. Orthop. Res.**, v. 2, p. 15-22, 1984.
- 62 YEN-PATTON, G. A. Endothelial cell response to pulsed electromagnet fields : stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 143, p. 37 – 46, 1998.
- 63 SMITH, T.L.;WONG-GIBBONS, D.; MAULTSBY, J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. **J. Orthop. Res.**, v. 22, p. 80, 2004.
- 64 BRIGHTON, C. T. et al. Signal Transduction in Electrically Stimulated Bone Cells. **The Jounal of Bone and Joint Surgery**, p. 1514-1523, 2001.

- 65 BERG, H.; ZHANG, L. Electrostimulation in cell biology by low frequency electromagnetic fields. **Electro. Magnetobiol.**, v. 12, p. 147- 163,1993.
- 66 COSSARIZZA, A. et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase interleukin-2 (IL-2) utilization and IL-2 receptor expression in mitogen-stimulated human lymphocytes from old subjects. **FEBS. Lett.**, v. 8 , n. 248, p. 141, 1989.
- 67 COSSARIZZA, A.; MONTI, D.; BERSANI, F.; CANTINI. M.; CADOSSO, R.; SACCHI, A. et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 160, n. 2, p. 692, 1989.
- 68 SALE, A.J.H.; HAMILTON, W.A. Effects of high electric fields on microorganisms killing of bacteria and yeasts. **Biochim. Biophys. Acta.**,v. 148, p. 781, 1967.
- 69 TAKASHIMA, S.; SCHWAN, H. P. Alignment of microscopic particles in electric fields and its biological implications. **Biophys. J.**, v. 47, p. 513–518, 1985.
- 70 KIRSON, E. D.; SCHNEIDERMAN, R. S.; DBALY, V. Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields. (TTFfields). **BMC. Med. Phys.**, v. 9, 2009.
- 71 WONG, E.T.; HESS, K.R.; GLEASON, M.J.; JAECKLE, K. A.; KYRITSIS, A.P.; PRADOS, M. D. et al. Response and progression in recurrent malignant glioma. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 2572–2578,1999.
- 72 PETICLERC, E.; STROMBLAD, S.; VON SCHALSCHA, T.; MITJANS, F.; PIULATS, J.; MONTGOMERY, A. et al. Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ promotes M21 melanoma

- growth in human skin by regulating tumor growth survival. **Cancer Res.**, v. 59, p. 2724-2730, 1999.
- 73 H.,U Z, SANCHEZ-SWEATMAN O, HUANG X, WILTROUT R, KHOKHA R, ZHAO Q, GORELIK, E: Anoikis and metastatic potential of Cloudman S91melanoma cells. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1707-1716, 2001.
- 74 BONFOCO, E.; CHEN, W.; PAUL, R. ; CHERESH, D. A.; COOPER, N. R. β 1 integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. **Neuroscience**, v. 101, p. 1145-1152, 2000.
- 75 PAWLAK, G.; HELFMAN, D. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 11, p. 41-47, 1999.
- 76 MARTI, A.; LUO, Z.; CUNNINGHAM, C.; OHTA, Y.; HARTWIG, J.; STOSSEL, T. P. et al. Actin-binding protein-280 binds the stress activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 2620-2628, 1997.
- 77 BROWNE, K. A.; JOHNSTONE, R. W.; JANS, D. A.; TRAPANI, J. A. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 39262-39266, 2000.
- 78 HIRATA, L. L.; OTSUKA SATO, M. E.; DE MORAES SANTOS, C. A. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.
- 79 DEVITA, V. T.; ROSENBERG, S. A.; HELLMAN, S. **Cancer, Principles and Practice of Oncology**. 6 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

- 80 PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resis. Updates**, v. 7, p. 97-110, 2004.
- 81 SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, p. 415-418, 2000.
- 82 BRESCHIA, R. et al. The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary. **Cancer**, v. 65, p. 141-147, 1990.
- 83 KIMBAL, R. E. et al. Flow cytometric analysis of lymph node metastases in advanced ovarian cancer: clinical and biologic significance. **Am. J. Obst. and Gynecol.** v. 176, p. 1319-1327, 1996.
- 84 LAGE, J. M. et al. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors: association of ploidy with tumor type, histologic grade and clinical stage. **Cancer**, v. 69, p. 2668-2675, 1992.
- 85 NGUYEN, V. Q. H. et al. Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. **Cell. Oncol.**, v. 26, p. 143-150, 2004.
- 86 BOCKING, A.; NGUYEN, V. Q. H. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. **Cancer Cytopath.**, v. 102, n. 1, p. 41-54, 2004.
- 87 KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

- 88 MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Tox. - Letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.
- 89 MELO, P. S. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.
- 90 CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, v. 265, p. 49-72, 2002.
- 91 MARIA, S. S. **Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado.** 1998. f. 75. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Campinas (Brasil): Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 1998.
- 92 KERR, J. F. Neglected opportunities in apoptosis research. **Trends Cell. Biol.**, v. 5, p 55-57, 1995.
- 93 _____. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, n. 182, p. 471-474, 2002.
- 94 SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell. Death. Differ.**, n. 6, p. 1067-1074, 1999.
- 95 _____. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J. Cell. Biol.**, n. 144, p. 281-292, 1999.

- 96 HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, n. 407, p. 770-776, 2000.
- 97 MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. M. Role of active oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, n. 32, p. 157-170, 2000.
- 98 PIWOCKA, K. et al. Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in jurkat cells. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 31, p. 670-678, 2001.
- 99 HENSLEY, K. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 28, p. 1456-1462, 2000.
- 100 IKEDA, K. et al. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL60 cells. **Biochem. Pharm.**, n. 57, p. 1361-1365, 1999.
- 101 MATSURA, T. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL60 cells requires caspase-3 activation. **Free Rad. Res.**, n. 30, p. 73-83, 1999.
- 102 SLATER, A. F. G. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol. Letters**, n. 82/83, p. 149-153, 1995.
- 103 MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. - Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.

- 104 FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.**, n. 48, p. 675-681, 1994.
- 105 ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 28, p. 463-499, 2000.
- 106 Lai, H.; Sigh, N. P. DNA single- and double- strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to low-level radiofrequency electromagnetic radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 69, p. 513-521, 1996.
- 107 Lai, H. Biological effects of radiofrequency electromagnetic fields. In G. E. Wnek and G. L. Bowlin, eds. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Marcel Decker:New York, 2005. [s.p.]
- 108 CERUTTI P. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, n. 344, p. 862-863, 1994.
- 109 ZWART, L. L et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 26, p. 202-226, 1999.
- 110 TOYOKUMI, S. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Lett.**, n. 358, p. 1-3, 1995.