

## AÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO ALTERNADO EXTERNO EM CÉLULAS TUMORAIS DE MELANOMA E EM FIBROBLASTOS NORMAIS

Data de aceite: 05/02/2020

Data de submissão: 12/11/2019

### **Adriana Cristina Terra**

Programa de Pós-graduação em Interunidades em Biotecnologia, ICB- Universidade de São Paulo

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/8142560889614282>

### **Monique Gonçalves Alves**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/5064541647940418>

### **Laerty Garcia de Sousa Cabral**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/7923575344808069>

### **Manuela Garcia Laveli**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/6104089055258182>

### **Rosely Cabette Barbosa Alves**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/7913875200467700>

### **Rosa Andrea Nogueira Laiso**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/7393245735602396>

### **Maria Carla Petrellis**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/5789268025857312>

### **Sérgio Mestieri Chammas**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/8960232878604694>

### **Thais de Oliveira Conceição**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/5866318279550816>

### **Durvanei Augusto Maria**

Laboratório de Biologia Molecular- DDI, Instituto Butantan, São Paulo, SP  
<http://lattes.cnpq.br/8472079174657098>

**RESUMO:** O melanoma é uma neoplasia melanocítica maligna, que surge de melanócitos encontrados na pele, olhos e, em menor grau, em outros tecidos do corpo. Grandes avanços em duas classes distintas de terapia mudaram completamente as estratégias no tratamento do melanoma. No entanto, apesar dos avanços nas últimas décadas, os pacientes tratados com inibidores BRAF apresentam progressão da doença durante os primeiros 1 a 2 anos de terapia. Assim, novas abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento do

melanoma. A partir desta problemática, o atual trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos biológicos da aplicação externa de intensidades de campos elétricos alternados externos (CEAE) de 10V e 5V nas frequências 200kHz, 1MHz e 2MHz em células de melanoma murino (B16F10) e fibroblastos humanos normais (FN1). Para isso foram realizados testes *in vitro* buscando verificar a avaliação do efeito citotóxico dos CEAE em testes colorimétricos para a determinação da viabilidade celular e ensaio de LPO baseado na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). 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.

**PALAVRA- CHAVE:** Câncer; Melanoma; CEAE.

## ACTION OF EXTERNAL ALTERNATE ELECTRIC FIELD IN MELANOMA TUMOR CELLS AND NORMAL FIBROBLAST

**ABSTRACT:** Melanoma is a malignant melanocytic neoplasm that arises from melanocytes found in the skin, eyes and, to a lesser extent, other body tissues. Major advances in two classes of therapy have completely changed as strategies in the treatment of melanoma. However, despite advances in recent decades, patients with BRAF inhibition show disease progression during the first 1 to 2 years of therapy. Thus, new therapeutic approaches are required for the treatment of melanoma. From this problematic, the present work aims to evaluate the biological effects of the external application of 10V and 5V alternating electric field intensities (CEAE) at 200kHz, 1MHz and 2MHz in murine melanoma cells (B16F10) and normal human fibroblasts (FN1). For this purpose, *in vitro* tests were performed to verify the evaluation of the cytotoxic effect of CEAE in colorimetric tests for the determination of cell viability and LPO assay based on the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBA). The FN1 cells were less harmed by the effects of CEAE than B16F10 melanoma cells, suggesting a new therapeutic possibility for melanoma treatment, which will depend on further studies using CEAE, with more detail on cell kinetics and pathways death associated.

**KEYWORDS:** Cancer; Melanoma; CEAE.

## 1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer cresceu significativamente nas últimas quatro décadas, aumentando as possibilidades de cura e sobrevida. Apesar destes avanços, hoje, o câncer é responsável pelo maior índice de mortes em todo o mundo (DONEY, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (2019), o câncer é a principal

causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo, portanto, responsável por cerca de uma em cada seis mortes a nível global.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de neoplasia para cada ano. À exceção de câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil novos casos de câncer. Os cânceres mais frequentes serão de próstata (68mil) em homens e mama (60mil) em mulheres. Dessa maneira, um diagnóstico correto é primordial para um tratamento adequado e eficiente.

O melanoma é uma neoplasia melanocítica maligna, que surge de melanócitos encontrados na pele, olhos e, em menor grau, em outros tecidos do corpo. Sendo o melanoma cutâneo a forma mais agressiva de câncer de pele, com menos de um ano de sobrevida média global (FINN ET AL., 2012; SHAIN E BASTIAN, 2016; SCHVARTSMAN et al, 2019)

Grandes avanços em duas classes distintas de terapia mudaram completamente as estratégias no tratamento do melanoma. Uma dessas classe corresponde às terapias-alvo, representadas pelo inibidor da mutação BRAF-V600, ou das proteínas envolvidas na via de sinalização MAPKs (MEK-ERK), que são opções de tratamento para cerca de 40-50% dos tipos de melanoma que contêm uma mutação no gene BRAF (JOHNSON E SOSMAN, 2015).

No entanto, apesar dos avanços nas últimas décadas, os pacientes tratados com inibidores BRAF apresentam progressão da doença durante os primeiros 1 a 2 anos de terapia (JOHNSON E SOSMAN, 2015). Além disso, a duração da resposta é relativamente curta ou a taxa de resposta é baixa. (FINN ET AL., 2012) Assim, novas abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento do melanoma.

A cerca disso, estudos mostram que as células, mais especificamente suas membranas envoltórias, possuem a capacidade de alterar seu estado de equilíbrio eletrostático (potencial de repouso) para um estado dinâmico (potencial de ação) de passagem de íons, que gera e propaga um impulso elétrico. De acordo com o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, tal dinâmica é importante pois permite a célula, através da membrana plasmática, ter um equilíbrio, funcionando a membrana como uma barreira semipermeável entre os meios intra e extracelular que atua seletivamente, permitindo que moléculas e íons essenciais, tais como glicose, aminoácidos, lipídios,  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ , penetrem na célula, que compostos metabólicos permaneçam no seu interior e, também, que o produto tóxico do metabolismo seja eliminado.

Partindo desse princípio, Kirson, E. D., et al. (2004) mostrou que Campo Elétrico Alternado (CEA) de baixa intensidade, frequência intermediária (100 KHz – 1Mhz), transmitidos por eletrodos implantados 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.

Assim sendo, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos biológicos da aplicação externa de intensidades de campos elétricos alternados externos (CEAE) de 10V e 5V nas frequências 200kHz, 1MHz e 2MHz; em células de melanoma murino cultivadas (B16F10) e fibroblastos humanos normais (FN1).

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Cultura celular

As células das linhagens do melanoma (B16F10) e fibroblasto humano normal (FN1) utilizadas neste estudo pertencem ao banco de células do Laboratório de Biologia molecular do Instituto Butantan, sob responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (FN1 e B16F10), pH 7.2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina). Os frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> estiveram contidos em estufa para incubação de células incluindo uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Ao atingirem confluência aproximada de 90%, as células foram subcultivadas para que ocorresse a ampliação celular, realização de experimentos ou congelamento. Antes da execução dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de tripan (1%).

### 2.2 Delineamento experimental

Foi utilizado um capacitor para aplicar o CEAE composto por duas chapas de alumínio de 30,0 cm x 30,0 cm com 2,0 cm de espessura, esterilizadas, paralelas e separadas entre si por uma distância de 2,0 cm. Desta maneira o capacitor foi instalado dentro de uma das prateleiras da estufa de tal modo que, sobre um suporte de material esterilizado isolante, não eletrizasse a estufa.

O gerador de funções utilizado foi o MINIPA MFG-4202 FUNCION SIGNAL GENERATOR. Como parâmetros foi selecionado onda senoidal, uma frequência e uma DDP para cada experimento. Desta forma cada experimento utilizou frequências de 2MHz, 1 MHz e 200kHz, com diferenciais de potencial de 10V e 5 V

As células foram plaqueadas em duas placas de 96 poços por experimento, sendo um grupo controle e a outro grupo tratado, de acordo com as frequências ditas acima, a uma concentração de 5x10<sup>5</sup> células / poço. Em 96 poços foram utilizadas 60 posições, das quais 30 foram utilizadas na citometria de fluxo e as outras 30

foram projetadas para ensaios de MTT e LPO, de modo que os sobrenadantes foram removidos e congelados para posterior avaliação da produção de peróxidos e células celulares. Os testes de MTT, LPO e citometria de fluxo foram realizados após 24 horas de tratamento.

### 2.3 Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT

A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste colorimétrico de redução do MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-1) 2,5-difeniltetrazólio brometo]. As células foram cultivadas em densidade de  $5 \times 10^5$ , durante 24 horas em uma estufa a  $37^\circ\text{C}$ , contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Durante 24 horas as células foram tratadas com os diversos tratamentos. Após o período de tratamento, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de reagente de MTT (5 mg/mL), por um período de 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido (guardado para o teste de LPO) e acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para que ocorresse a dissolução dos cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate), no comprimento de onda de 540 nm, para a determinação da concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}\%$ ).

### 2.4 Ensaio de determinação de lipoperoxidos (LPO)

Foi utilizada a técnica descrita por Ohkawa et al. (1979) baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Após o tratamento experimental com CEAE, houve remoção do sobrenadante das culturas celulares e seu armazenamento nos seguintes eppendorfs da série:

- Série A: a uma taxa de 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante da cultura em 1 ml de TCA a 20% (ácido tricloroacético a 20%).
- Série B: a uma taxa de 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante da cultura contendo 0,86% de TBA em TCA20%.

Os eppendorfs foram incubados em banho-maria a  $100^\circ\text{C}$  por 20 minutos e depois em gelo por mais 20 minutos. Eles foram então centrifugados a 8000 rpm por 4 minutos e as leituras foram feitas em absorvância a 535 nm das diferentes séries A e B. A concentração de malonaldeído (MDA) produzida foi expressa em nmol / mL.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24h da aplicação do campo elétrico, independente das diferentes condições experimentais que as placas de células de fibroblastos FN1 foram submetidas, não foi observado nas células alterações de toxicidade, como desprendimento, agregação formação de vacúolos ou debris (Figura 1C), quando comparado ao grupo controle.

Por sua vez, as células tumorais de melanoma B16F10 submetidas ao CEAE

demonstraram alterações em sua capacidade de proliferação quando comparados ao grupo controle (Figura 1D). Após a aplicação do CEAE de 2MHz-10V (Figura 1E), foram observadas discretas alterações nas células tumorais, como a diminuição do volume citoplasmático e a formação de alguns vacúolos, por sua vez no tratamento de 200kHz-5V (Figura 1F) tais alterações foram observadas de maneira significativa, apresentando também células arredondadas, perda da capacidade proliferativa e da adesividade com diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos.

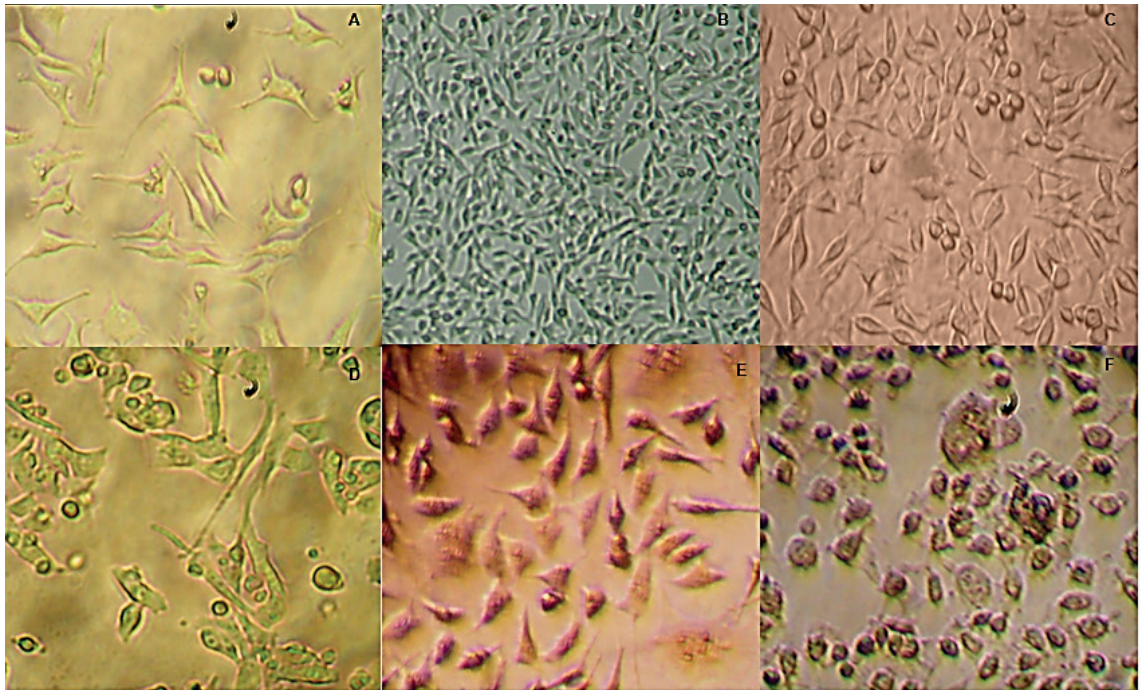


Figura1:**A)**FibroblastosFN1: Aspecto da cultura de fibroblastos humanos normais em microscópio invertido após 6 horas de cultivo; **B)** FN1: Grupo Controle, em microscópio invertido após 24 horas de cultivo; **C)** FN1: 24 horas após aplicação do CEAE de 2MHz-10V; **D)** B16F10: Aspecto citológico da cultura de células de melanoma após 6 horas do início da cultura (controle); **D)** B16F10: 24 horas após a aplicação do CEAE de 2MHz-10V.**E)** B16F10: 24 horas após a aplicação do CEAE de 200KHz-5V. (Aumento 400X)

Kirson (2004) mostra que os efeitos da exposição ao CE por 24 horas nas linhagens tumorais de melanoma maligno B16F1, glioma, carcinoma da mama, e carcinoma de nãopequenas células de pulmão, mostraram diferencialmente respostas inibitórias para cada tipo celular à frequência de 100 kHz para o melanoma (B16F1), 150 kHz para carcinoma mamário humano (linhagem MDA-MB-231), e 200 kHz para o glioma (F98).

O ensaio de MTT realizado, foi possível observar coerência entre o que é possível ver através das imagens, não havendo indução de efeitos citotóxicos em células FN1 (Figura 2). Em contrapartida em células B16F10 há a indução de efeitos citotóxicos. A citotoxicidade média foi de 19,9%, 21,7% e 27,5% respectivamente para os tratamentos 2MHz-10V, 1MHz-5V e 200 kHz- 5V (Figura 3 A, B e C).

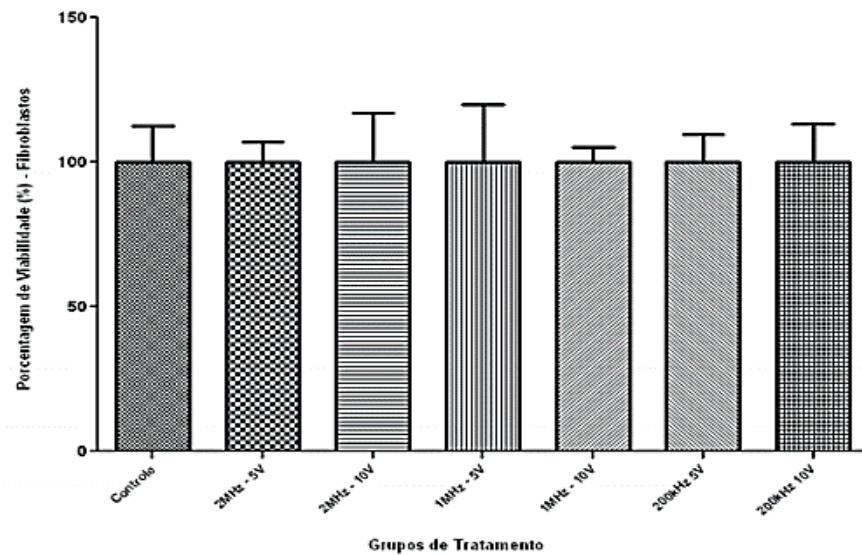
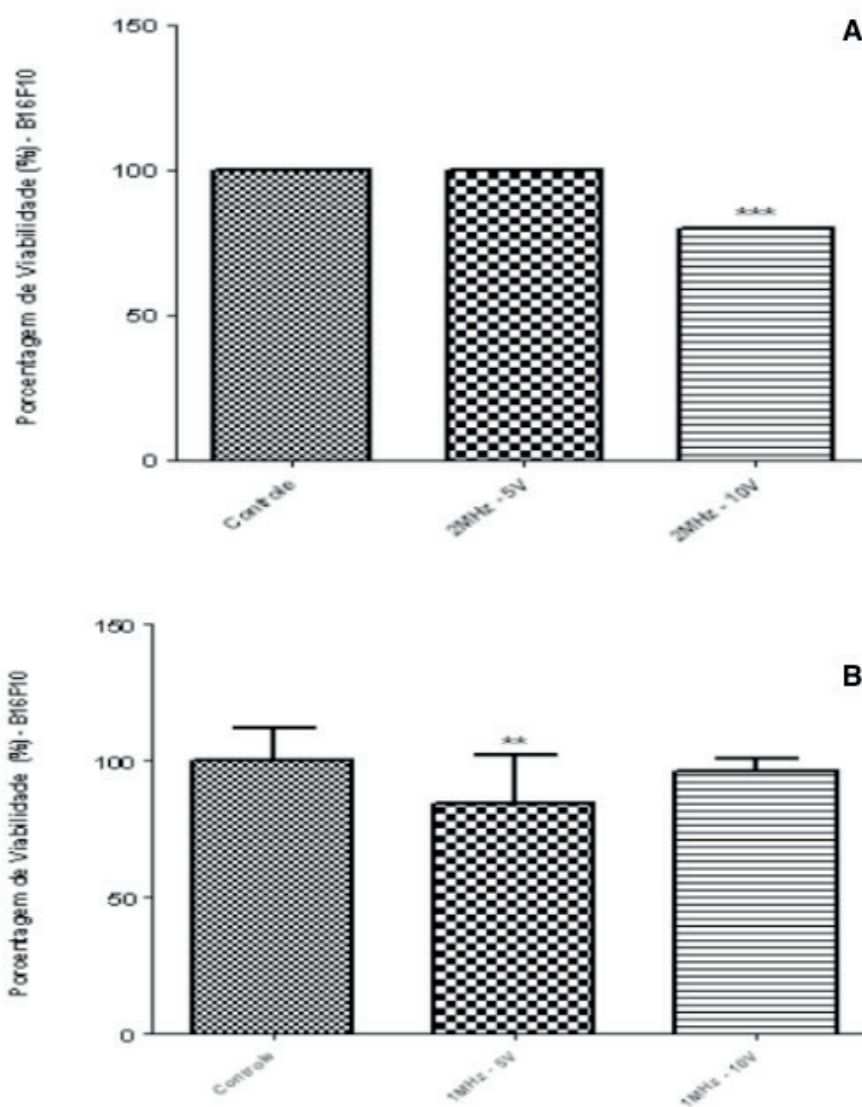


Figura 2: Gráfico das médias e desvio padrão da porcentagem de viabilidade de fibroblastos FN1, avaliado pelo método colorimétrico MTT, após a aplicação do CEAE.



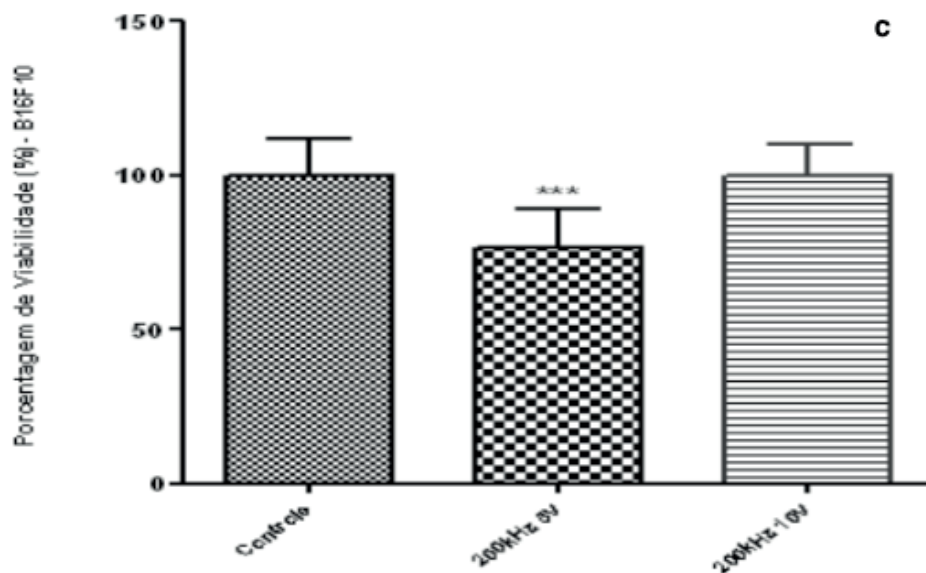


Figura 3: Gráfico das médias e desvio padrão da porcentagem de viabilidade de células de melanoma B16F10, avaliado pelo método colorimétrico MTT, após a aplicação do CEAE DE 2MHz (A); 1MHz (B); 200kHz (C).

\* Diferenças estatísticas obtidas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para  $\alpha < 0,05$ .

Por sua vez, a lipoperoxidação é uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, desencadeando a destruição de sua estrutura e, numa condição extrema, a morte celular (BENZIE, 1996; OHKAWA, 1979).

As células de melanoma B16F10 na aplicação de campo elétrico por 24 horas mostraram diferenças quantitativas na produção de oxidação dependente de radicais livres de peróxido de ácido graxo poliinsaturado. A produção de MDA/nmol no sobrenadante de B16F10 sujeito a CEAE em ambas as frequências de 2MHz-10V e 200kHz-5V mostraram efeito indutor de 4,7 vezes a produção de peróxido de radicais livres, efeito de lesão produzida pela CEAE, quando comparado ao grupo controle (Figura 4).

Estudos anteriores demonstraram que a estimulação elétrica eleva o potencial de membrana da célula, o que resulta na elevação da condutividade da membrana celular afetando as funções das proteínas e lipídeos da membrana celular (BRIGHTON, 2001). Por outro lado, o tratamento reduziu significativamente a formação de oxidação dependente de radicais livres do peróxido de ácido graxo poliinsaturado, como o MDA. As condições basais (controle) das células FN1 produzem significativamente mais MDA do que as células B16F10, sugerindo que nos fibroblastos o tratamento teve um efeito protetor. (Figura 5)

Em concordância com os resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade MTT, o CEAE não prejudicou a capacidade funcional da cadeia respiratória e não demonstrou ser tóxico. Vale salientar que, as organelas citoplasmáticas são as



principais fontes de radicais livres, já que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando assim grande quantidade de metabólitos.

As células tumorais por sua vez, apresentam um descontrole na proliferação celular e disfunção da regulação metabólica, no qual radicais livres reativos de oxigênio ou lipídicos afetam as vias de transdução de sinais e podem induzir a morte celular, também alterando a comunicação e adesão célula-célula, promovendo, portanto, mutações no DNA ou falhas no seu mecanismo de reparo ( DEVITA et. al, 2001; PELICANO et al, 2004; SIMON et. al, 2000).

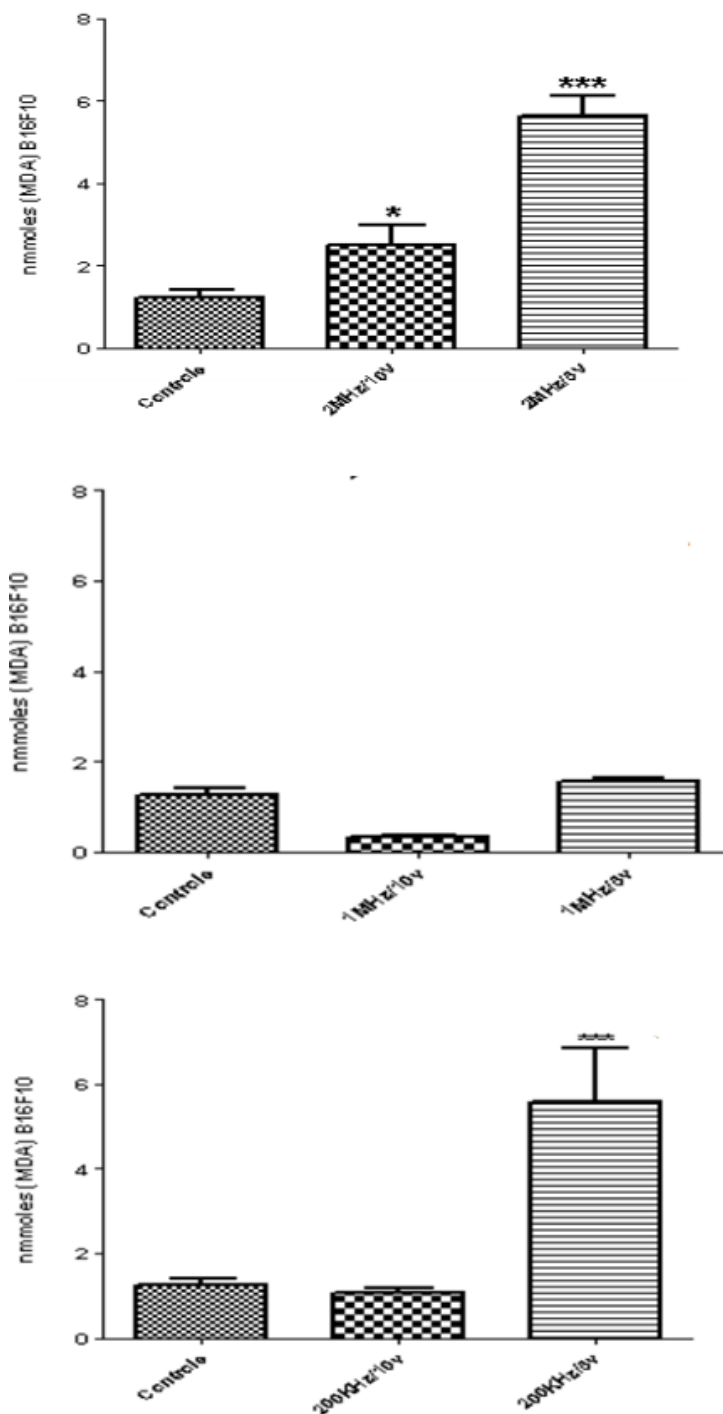


Figura 4: Lipoperoxidação em células melanoma B16F10 dos grupos controle e tratados com diferentes frequências e intensidades.

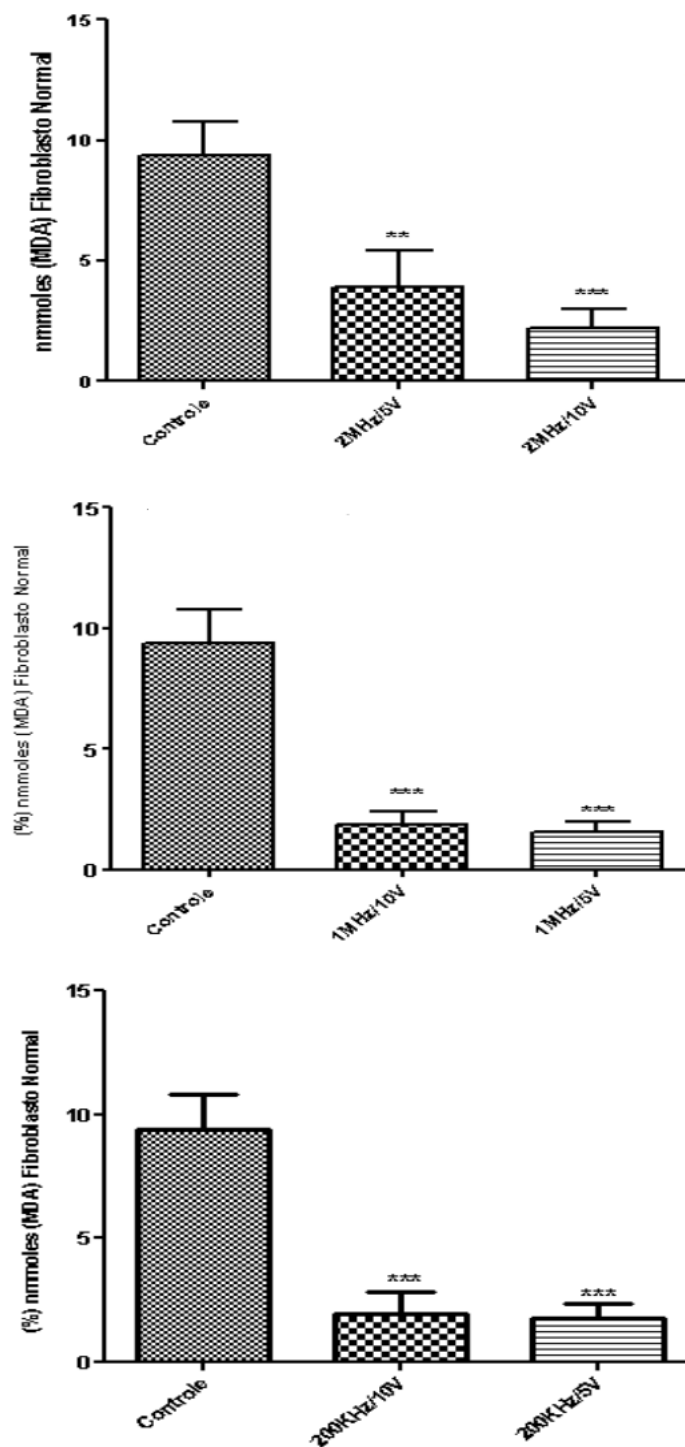


Figura 5: Lipoperoxidação em células de fibroblastos FN1 dos grupos controle e tratados com diferentes frequências e intensidades.

#### 4 | CONCLUSÃO

O CEAE não apresentou alteração na capacidade de adesão, formação de prolongamentos ou formação de vacúolos. Por sua vez, após a aplicação do CEAE foi possível observar um efeito inibitório na produção de LPO pelas células normais fibroblastos FN1. No qual, nenhuma das frequências e intensidades mostraram-se citotóxicas.

Toda via, para as células tumorais de melanoma B16F10 o CEAE mostrou

efeito indutor da produção de LPO nas frequências de 200kHz e 2MHz 5V. De modo funcional houve a indução da formação e liberação de radicais livre peroxidados (MDA), a partir dos lipídeos de membrana celular. Por fim, na frequência de 200kHz-5V foi observado maiores efeitos citotóxicos, com desprendimento das células, formação de agregados multicelulares no sobrenadante, apresentando inibição da capacidade proliferativa.

## REFERENCIAS

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.

BRIGHTON, C. T. et al. **Signal Transduction in Electrically Stimulated Bone Cells.** The Journal of Bone and Joint Surgery, p. 1514-1523, 2001.

DEVITA, V. T.; ROSENBERG, S. A.; HELLMAN, S. **Cancer, Principles and Practice of Oncology.** 6 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins,2001.

DONEPUDI, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., & Venkanteshan, P. **Breast cancer statistics and markers.** Journal of cancer research and therapeutics, 10(3), 506, 2014.

FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH, R. W. **Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future.** BMC Med, v. 10, p. 23. ISSN 1741-7015, 2012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385436> >.

G. Weissmuller, N.M.A. Costa, P.M. Bich, **Físico-química de Biomembranas: Equilíbrio Eletroquímico e Transporte**, Fundamentos de Biofísica II – Notas de Aula, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, Rio de Janeiro: [http://www.biof.ufrj.br/fisbio/bmw128/fisicoquimica\\_biomembranas.pdf](http://www.biof.ufrj.br/fisbio/bmw128/fisicoquimica_biomembranas.pdf) (consultada em 2019).

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva INCA - **Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018-2019.** <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.

JOHNSON, D. B.; SOSMAN, J. A. **Therapeutic Advances and Treatment Options in Metastatic Melanoma.** JAMA Oncol, v. 1, n. 3, p. 380-6, 2015. ISSN 2374-2445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181188> >.

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

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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Ministério da Saúde. **Folha informativa – câncer**, 2018. [https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839](https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839)

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. **ROS stress in cancer cells and therapeutic implications.** Drug Resis. Updates, v. 7, p. 97-110, 2004.

SCHVARTSMAN, Gustavo; TARANTO, Patricia; GLITZA, Isabella C.; AGARWALA, Sanjiv S.; ATKINS, Michael B. e BUZAID C, Antonio. **Management of metastatic cutaneous melanoma:**

**updates in clinical practice.** Therapeutic advances in medical oncology, v. 11: 1–16, 2019, , DOI: 10.1177/1758835919851663

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. **From melanocytes to melanomas.** Nat Rev Cancer, v. 16, n. 6, p. 345-58, 2016. ISSN 1474-1768. Available at:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125352> >.

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.