

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ELETROQUIMIOTERAPIA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH EM  
CAMUNDONGOS SWISS**

**RÚBIA MONTEIRO DE CASTRO CUNHA**

**Belo Horizonte – MG  
2016**

RÚBIA MONTEIRO DE CASTRO CUNHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ELETROQUIMIOTERAPIA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich EM  
CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo.

Co-orientadora: Dra. Gleidice Eunice Lavalle.

**Belo Horizonte – MG**

**2016**



Dissertação defendida e aprovada em 27 de janeiro, pela Comissão Examinadora constituída por:

---

**Prof. Roberto Baracat de Araújo**  
**Presidente**

---

**Prof. Jaime Arturo Ramírez**

---

**Prof. Giovanni Dantas Cassali**

---

**Dr. Marcelo Monte Mór Rangel**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os animais que de alguma forma passaram pela minha vida; o motivo e a razão da vocação e da necessidade da busca constante por conhecimento.

Um agradecimento em que faltam palavras para expressar a gratidão à Dra. Gleidice. Obrigada pela paciência, pelo carinho, por me defender quando preciso, por puxar minhas orelhas tantas vezes quantas foram necessárias, por acreditar em mim e por me fazer acreditar também.

Ao Prof. Dr. Roberto Baracat, que também acreditou em mim e na eletroquimioterapia, e sempre esteve disponível e disposto a ajudar.

Ao Prof. Dr. Geovanni Cassali, por sua contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez e Eng. Rafael Gomes dos Santos pelo desenvolvimento, construção e cessão do aparelho eletroporador.

Aos doutorandos Diego Carlos dos Reis e Rodrigo dos Santos Horta, pela incomensurável ajuda técnica. Seria impossível sem vocês!

Às colegas da oncologia do Hospital Veterinário da UFMG, Cecília, Stefane, Carla, Miriã e Fernanda. Vocês tornaram os dias mais leves e divertidos.

Aos meus pais, que mesmo sem entender muito bem minhas escolhas, me proporcionaram muito mais que o necessário para me ajudar a vivê-las.

Ao Gustavo pelo carinho, amor e incentivo.

**“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”**

**São Francisco de Assis**



---

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1. Eletroquimioterapia</b> .....	14
<b>3.2. Tumor de Ehrlich</b> .....	18
<b>3.3. Proliferação celular</b> .....	18
<b>3.4. Apoptose e necrose</b> .....	19
<b>3.5. Inflamação</b> .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>4.1. Aparelho eletroporador</b> .....	21
<b>4.2. Animais</b> .....	22
<b>4.3. Tumor Experimental de Ehrlich</b> .....	22
<b>4.4. Preparo e inoculação das células tumorais</b> .....	22
<b>4.5. Formulação da droga</b> .....	23
<b>4.6. Protocolos de tratamento</b> .....	23
<b>4.7. Acompanhamento do crescimento tumoral</b> .....	24
<b>4.8. Estudo histopatológico</b> .....	24
<b>4.9. Imuno-histoquímica</b> .....	24
<b>4.10. Análise estatística</b> .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	33
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>8. ANEXOS</b> .....	38
<b>8.1. Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais</b> .....	38
<b>8.2. Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas de todos os grupos durante todo o experimento</b> .....	39
<b>8.3. Volume do tumor dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas de todos os grupos durante todo o experimento</b> .....	47
<b>8.4. Produtividade no período do mestrado</b> .....	55

8.4.1. Atividades e produção científica relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia.	55
8.4.2. Atividades e produção científica não relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia.....	55

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Médias dos pesos dos camundongos a cada 4 dias por grupo de tratamento, com o dia do tratamento indicado por asterisco.....	28
Tabela 2 -	Média dos pesos e da porcentagem de inibição do tumor sólido de Ehrlich após o tratamento.....	28
Tabela 3 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 1 (grupo controle) a partir da data da inoculação (20/02/2015) .....	39
Tabela 4 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 1 (grupo controle) a partir da data do tratamento (13/03/2015) .....	40
Tabela 5 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 2 (grupo bleomicina) a partir da data da inoculação (20/02/2015) .....	41
Tabela 6 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 2 (grupo bleomicina) a partir da data do tratamento (13/03/2015) .....	42
Tabela 7 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 3 (grupo pulsos elétricos) a partir da data da inoculação (20/02/2015) .....	43
Tabela 8 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 3 (grupo pulsos elétricos) a partir da data do tratamento (13/03/2015) .....	44
Tabela 9 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 4 (grupo eletroquimioterapia) a partir da data da inoculação (20/02/2015) .....	45
Tabela 10 -	Peso dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 4 (grupo eletroquimioterapia) a partir da data do tratamento (13/03/2015) .....	46
Tabela 11 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 1 (controle) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	47
Tabela 12 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 1 (controle) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	48

Tabela 13 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 2 (bleomicina) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	49
Tabela 14 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 2 (bleomicina) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	50
Tabela 15 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 3 (pulsos elétricos) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	51
Tabela 16 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 3 (pulsos elétricos) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	52
Tabela 17 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 4 (eletroquimioterapia) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	53
Tabela 18 -	Volume dos tumores dos camundongos <i>Swiss</i> fêmeas do grupo 4 (eletroquimioterapia) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável .....	54

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Conceito básico da eletroquimioterapia: a) após a administração, o quimioterápico circunda a célula; b) formação de poros após a aplicação dos pulsos, o quimioterápico entra na célula; c) a membrana se fecha, o quimioterápico fica aprisionado dentro da célula; d) o quimioterápico mata a célula (Modificado de Miklavcic et al., 2012) .....	14
Figura 2 -	Eletroporação da membrana plasmática das células de acordo com a intensidade e direção do campo elétrico e de acordo com o formato e orientação das células no espaço (Modificado de Corovic et al., 2009) .....	15
Figura 3 -	Eletrodos em placa e em agulhas usualmente utilizados para a realização da eletroquimioterapia (Esope Newsletter, 2003) .....	16
Figura 4 -	Aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG para uso na técnica da eletroquimioterapia <i>in vivo</i> .....	26
Figura 5 -	Interface humano-máquina. Pulsos de 5 kHz, 650 V, e onda quadrada bipolar visualizados no painel sinótico do software desenvolvido pela Escola de	

	Engenharia da UFMG para ser usado em conjunto com o aparelho eletroporador .....	27
Figura 6 -	Pulsos de onda quadrada bipolar de 100 $\mu$ segundos de duração, frequência de 5 kHz e 650 V de amplitude aplicados durante o tratamento nos grupos pulsos elétricos e eletroquimioterapia. Pulsos gerados pelo aparelho eletroporador desenvolvido pela Escola de Engenharia da UFMG .....	27
Figura 7 -	Representação gráfica contendo média e desvio-padrão obtidos para análise histomorfológica e histomorfométrica (porcentagem de tecido neoplásico, inflamação, necrose e tecido normal) do tumor sólido de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i> para os quatro grupos de tratamento (controle, bleomicina, pulsos elétricos e eletroquimioterapia) .....	29
Figura 8 -	Fotomicrografia do tumor sólido de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i> em (A) grupo controle, (B) grupo bleomicina, (C) grupo pulsos elétricos e (D) grupo eletroquimioterapia. É possível observar maior área de necrose em (B) e maior área de inflamação em (D) (H.E. 20x) .....	30
Figura 9 -	Representação gráfica contendo média e desvio-padrão obtidos para porcentagem média de proliferação avaliada através da imuno-histoquímica com Cdc47 do tumor sólido de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i> para os quatro grupos de tratamento (controle, bleomicina, pulsos elétricos e eletroquimioterapia) .....	31
Figura 10 -	Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica para o anticorpo anti-cdc47 no tumor sólido de Ehrlich em camundongos <i>Swiss</i> nos grupos: (A) controle, (B) bleomicina, (C) pulsos elétricos e (D) eletroquimioterapia. A marcação se caracteriza por ser citoplasmática e mais intensa em (A e C, 40x), e menos intensa em (B e D, 40x) .....	30

## RESUMO

Eletroquimioterapia é uma modalidade de tratamento local contra o câncer em que a administração de quimioterápicos não penetrantes à membrana plasmática é associada à aplicação de pulsos elétricos com parâmetros bem estabelecidos, que abrem poros na membrana plasmática e facilitam a entrada destes fármacos nas células, aumentando sua citotoxicidade e reduzindo efeitos colaterais. A avaliação dos efeitos da eletroquimioterapia sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss* neste trabalho teve como objetivo testar o uso *in vivo* do aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG para, em procedimentos futuros, aplicar a técnica no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. Para tanto, foram utilizados 40 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, nos quais foram inoculadas células de tumor de Ehrlich, para o desenvolvimento do tumor na forma sólida. Após 21 dias, os camundongos foram submetidos ao protocolo de tratamento específico e 17 dias depois foram eutanasiados e seus tumores coletados para análise histopatológica. A eletroquimioterapia induziu perda de peso discreta e uma resposta inflamatória no tumor que não foi observada nos outros grupos. O grupo tratado com bleomicina apenas apresentou maior porcentagem de necrose. Ambos os grupos apresentaram menor índice de proliferação celular. A partir desse estudo pode-se concluir que o tratamento sob anestesia foi bem tolerado pelos animais e que o aparelho eletroporador desenvolvido pela Escola de Engenharia da UFMG é adequado para utilização em um protocolo de eletroquimioterapia.

Palavras-chave: Eletroquimioterapia, tumor experimental, camundongo

## ABSTRACT

Electrochemotherapy is a local anticancer treatment in which non-permeant chemotherapeutic drugs are associated with electric pulses of well-established parameters. The electric pulses cause pores to open on the plasma membrane and facilitate drug transport, enhancing cytotoxicity and reducing side effects. Assessment of electrochemotherapy effects on Ehrlich solid tumor development in this work aims to evaluate *in vivo* usage of the electroporator device developed by Electric Engineering Department of Escola de Engenharia of UFMG, so it can be used on future procedures on Hospital Veterinário of Escola de Veterinária of UFMG. Therefore, 40 *Swiss* mice were inoculated with Ehrlich tumor cells, and developed the tumor in solid form. After 21 days, mice were subjected to specific treatment protocols and 17 days later they were euthanized and the tumors collected for histopathology analysis. Electrochemotherapy induced discrete weight loss and an inflammatory response in the tumor, which was not seen on the other treatment groups. Bleomycin alone induced necrosis. Both groups showed lower cellular proliferation rates. From this study, it was concluded that the animals tolerated well electrochemotherapy treatment under anesthesia and the electroporator device developed by Escola de Engenharia of UFMG was adequate when used in an electrochemotherapy protocol.

Keywords: Electrochemotherapy, experimental tumor, mouse

## 1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida dos animais de companhia está aumentando e, com isso, também a prevalência do câncer nestes animais, já que é uma patologia geralmente de animais idosos. O câncer é a principal causa de mortalidade dos animais de companhia e os proprietários estão buscando, cada vez mais, tratamentos oncológicos adequados para que seus animais tenham maior sobrevida com boa qualidade de vida (Withrow e Vail, 2007).

Os tratamentos para o câncer podem ser divididos em categorias diferentes baseadas nos seus objetivos e modo de ação. Muito frequentemente, diferentes tipos de tratamento são usados em associação, seja simultaneamente ou sequencialmente, incluindo em geral, três modalidades principais, cirurgia e radiação (tratamento local) e quimioterapia (tratamento sistêmico) (Sersa et al., 2006).

A eletroquimioterapia consiste na quimioterapia seguida da eletroporação do tumor para aumentar a entrada do fármaco nas células (Sersa et al., 2003). A eletroporação é o aumento da permeabilidade da membrana plasmática causado pela aplicação de pulsos elétricos externos à célula (Silva, 2011). A eletroporação facilita o transporte do fármaco através da membrana celular apenas para moléculas pobremente ou não penetrantes, portanto, os fármacos candidatos a serem usados na eletroquimioterapia são limitados àqueles que são hidrofílicos ou têm sistemas de transporte na membrana limitados (Sersa et al., 2006; Sersa et al., 2008). Um fármaco não penetrante é uma molécula que não consegue se difundir através da membrana plasmática devido ao seu tamanho e propriedades físico-químicas (Mir, 2006). Assim, as doses dos fármacos podem ser drasticamente reduzidas, já que a eletroporação aumenta a eficácia dos fármacos várias vezes no local da aplicação dos pulsos elétricos, o que reduz os efeitos colaterais (Larkin et al., 2007).

O princípio básico da eletroporação é que os pulsos de campo elétrico promovem uma reorganização da membrana celular mediada eletricamente (os chamados “eletroporos” ou “defeitos permeáveis transientes”). Isto é um evento localizado na superfície da célula, induzido quando a força do campo local excede um limiar crítico. Moléculas polares podem, então, atravessar a membrana (Cemazar et al., 2008).

A eletroporação da membrana plasmática é obtida se a célula for submetida a um campo elétrico suficientemente alto. Isto depende das características dos pulsos elétricos e da sua distribuição no tecido, o que é controlado pela geometria dos eletrodos e tecido (Sersa et al., 2006). A permeabilização ocorre pela formação de poros na estrutura da membrana e possui diversas aplicações na biotecnologia. Uma vez que a eficácia da eletroporação varia, entre outros fatores, com os parâmetros dos pulsos do campo elétrico exógeno, faz-se importante o desenvolvimento de equipamentos que permitam o controle de tais características (Silva, 2011).

Com relação ao procedimento, a eletroquimioterapia é fácil e rápida de realizar. Os requerimentos são uma sala adequada para a preparação e tratamento do paciente e um eletroporador com diferentes tipos de eletrodos que são usados para diferentes tamanhos de nódulos tumorais (Sersa et al., 2003). Nódulos únicos ou múltiplos podem ser tratados usando anestesia sistêmica (Mir et al., 2006). Após o tratamento, os pacientes não precisam de atenção ou medicação especial (Sersa et al., 2003).

Apesar dos estudos já existentes sobre a utilização e eficácia da eletroquimioterapia, há poucas opções de aparelhos eletroporadores para uso *in vivo* disponíveis comercialmente no Brasil.

Assim, foi desenvolvida esta parceria entre a Escola de Veterinária e a Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a construção de tal aparelho. Uma vez confeccionado e comprovada a sua aplicabilidade e eficácia, este aparelho poderá ser utilizado nos pacientes portadores de neoplasias espontâneas, se constituindo em mais uma opção terapêutica para a oncologia veterinária.

## 2. OBJETIVOS

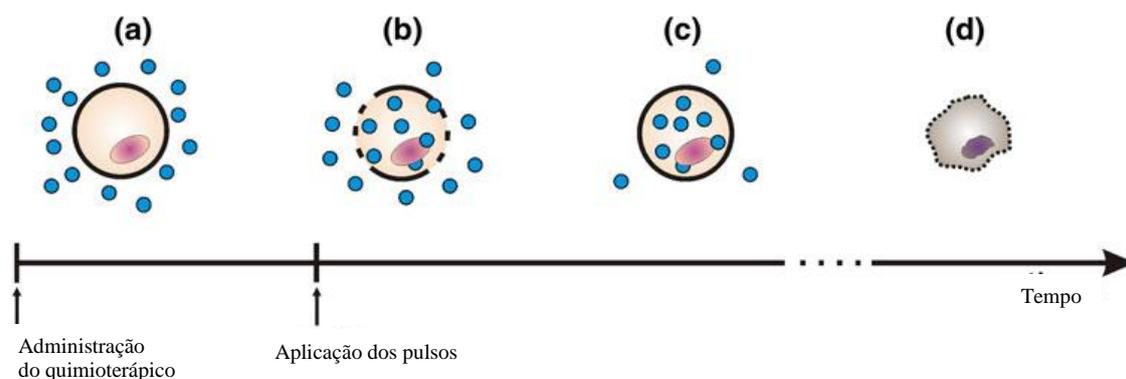
Os objetivos deste trabalho foram:

- Testar o uso *in vivo* do aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG;
- Avaliar a utilização do aparelho em protocolo de eletroquimioterapia no tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss*;
- Avaliar os efeitos do protocolo de eletroquimioterapia no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss*.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Eletroquimioterapia

Eletroquimioterapia é um tratamento local contra o câncer que combina o uso de fármacos a pulsos elétricos gerados por um aparelho eletroporador para se conseguir o controle local de tumores sólidos. O procedimento consiste da aplicação de curtos campos elétricos de alta intensidade nas células, com conseqüente aumento transiente da permeabilidade da membrana plasmática a várias moléculas (Fig. 1) (Miklavcic et al., 2014).

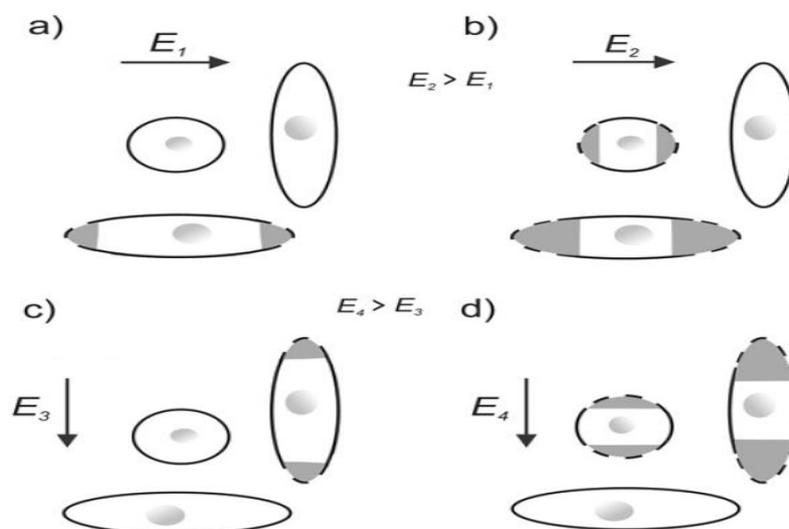


**Figura 1.** Conceito básico da eletroquimioterapia: a) após a administração, o quimioterápico circunda a célula; b) formação de poros após a aplicação dos pulsos, o quimioterápico entra na célula; c) a membrana se fecha, o quimioterápico fica aprisionado dentro da célula; d) o quimioterápico induz a morte celular (Modificado de Miklavcic et al., 2012).

A eletroporação da membrana plasmática é obtida se a célula for submetida a um campo elétrico suficientemente alto. Isto depende das características dos pulsos elétricos e da sua distribuição no tecido, o que é controlado pela geometria dos eletrodos e tecido (Sersa et al., 2006). Os seguintes parâmetros foram estabelecidos para eficácia máxima da eletroporação, sem induzir permeabilização irreversível: oito pulsos elétricos consecutivos, de onda quadrada uni ou bipolar,

com 100  $\mu$ segundos ( $\mu$ s) de duração, frequência de 1 hertz (Hz) ou 5 kHz e tensão de 1000 a 1300 V/cm (Mir, 2006; Sersa et al., 2006; Larkin et al., 2007; Cemazar et al., 2008).

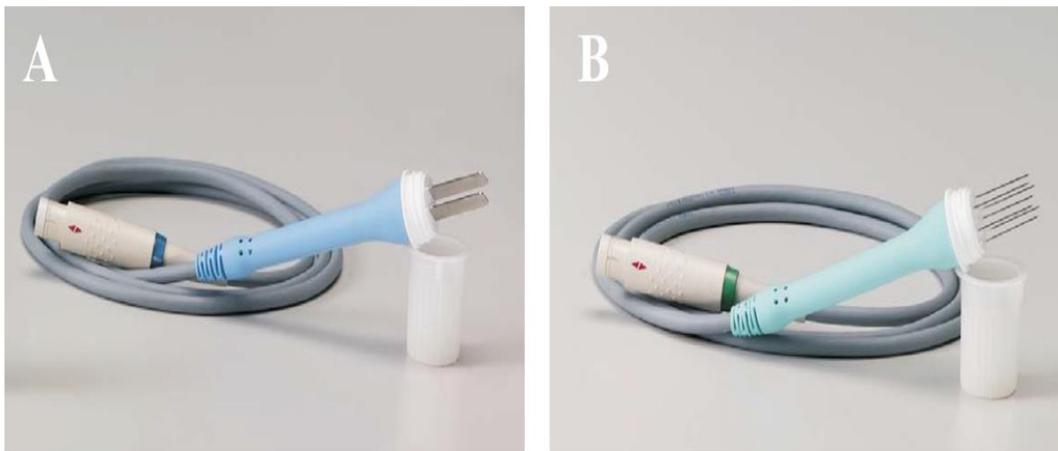
Quando uma célula é exposta a um campo elétrico externo, como usado na eletroquimioterapia, é gerada uma diferença de tensão transmembrana através da membrana celular devido às diferenças entre as propriedades elétricas da membrana celular, citoplasma e meio externo (Cemazar et al., 2008). O campo elétrico distribuído através dos eletrodos gera uma diferença de tensão suficiente que ultrapassa o limiar para a permeabilização da membrana celular. A criação de um campo elétrico homogêneo ao redor de toda a massa tumoral é o elemento mais crítico para o sucesso do tratamento (Larkin et al., 2007). A diferença de tensão transmembrana induzida não é uniforme na superfície da célula e é máxima nas superfícies da célula voltadas para os eletrodos (Cemazar et al., 2008). Portanto, a orientação da célula com relação ao campo elétrico no momento da eletroporação determina seu grau de permeabilização (Fig. 2) (Larkin et al., 2007).



**Figura 2.** Eletroporação da membrana plasmática das células de acordo com a intensidade e direção do campo elétrico e de acordo com o formato e orientação das células no espaço (Modificado de Corovic et al., 2009).

A administração de 4 + 4 pulsos administrados perpendicularmente melhora o efeito da eletroquimioterapia, pois essa mudança na orientação faz com que toda a massa tumoral seja envolvida pelos eletrodos e mais células tumorais são expostas ao campo elétrico acima do valor limiar para a eletroporação efetiva (Cemazar et al., 1995).

A princípio, existem dois tipos diferentes de eletrodos: eletrodos em placa e eletrodos de agulhas (Fig. 3). Os eletrodos em placa são usados para o tratamento de lesões de pele ou superficiais e são compostos por duas placas paralelas de aço inoxidável (Sersa et al., 2008; Kodre et al., 2009).



**Figura 3.** Eletrodos em placa e em agulhas usualmente utilizados para a realização da eletroquimioterapia (Esope Newsletter, 2003).

Os eletrodos de agulhas são de dois tipos: as agulhas são posicionadas em duas filas paralelas ou em um arranjo circular (hexagonal). Em contraste com os eletrodos em placa, os eletrodos de agulhas devem ser inseridos no tecido tumoral até a borda tumoral profunda. Em ambos os casos (placa ou agulha), tumores maiores podem ser tratados reposicionando-se os eletrodos de forma que todo o volume tumoral seja tratado por um campo elétrico suficientemente alto (Sersa et al., 2008).

Os pulsos usados são selecionados para permitir a permeabilização reversível e transiente, e não para a ruptura completa e irreversível da membrana celular. Portanto, no cenário ideal, a maioria das células são eletroporadas, algumas são eletroporadas irreversivelmente (células mais perto dos eletrodos), e uma pequena porcentagem não é eletroporada devido à sua orientação e formato no momento da eletroporação (Larkin et al., 2007).

A aplicação de pulsos elétricos nos tumores induz a contração dos músculos subjacentes. As contrações musculares são dolorosas, mas a dor se dissipa imediatamente após a aplicação dos pulsos elétricos (Sersa et al., 2006). Assim, surgiu o interesse em se usar a frequência de repetição de 5 kHz. Com esta frequência, o segundo pulso (e os pulsos subsequentes) são aplicados durante o período refratário de contração muscular que se segue ao primeiro pulso. Portanto, apenas uma única contração muscular (e a reação desagradável associada a ela) é provocada pelos oito pulsos. Além disso, há uma redução considerável no tempo necessário para tratar um nódulo. O tempo de oito segundos passa para apenas o tempo necessário para apertar o pedal de ativação, já que a cadeia de oito pulsos passa a durar apenas 1,5 milissegundos. Isto pode ser importante no caso de pacientes com um grande número de nódulos (Mir et al., 2003).

A bleomicina é um antibiótico antineoplásico hidrossolúvel que tem sido usado em uma variedade de tumores humanos e caninos. É um agente extremamente tóxico uma vez dentro da célula, mas esta citotoxicidade intrínseca elevada é restringida pela inabilidade da bleomicina de se difundir livremente através da membrana plasmática (Pron et al., 1993; Mir et al., 1996; Gothelf et al., 2003). A eletroquimioterapia aumenta a concentração intracelular de bleomicina em 300 a 700

vezes, com uma conseqüente elevação da citotoxicidade na ordem de milhares de vezes (Larkin et al., 2007).

A ação da bleomicina ocorre através de cortes simples ou duplos na fita de ácido desoxirribonucleico (DNA). As células morrem porque alguns cortes duplos permanecem não reparados. A citotoxicidade é elevada quando as células tentam se dividir porque o seu cromossomo está fragmentado, enquanto as células quiescentes permanecem vivas, metabolicamente estáveis. Isso se deve ao fato de que a probabilidade desses cortes no DNA afetarem a expressão de um gene de manutenção essencial é quase nula. Este processo de morte celular mitótica (pseudoapoptose) resulta na morte seletiva das células em divisão (tumoriais) e poupa as células que não estão em divisão (células normais) ao redor do tumor tratado (Mir, 2006).

A vantagem da eletroquimioterapia é que, pela potenciação local do acúmulo intracelular de fármaco pela aplicação de pulsos elétricos, doses cumulativas menores dos fármacos quimioterápicos são necessários, o que resulta no não aparecimento de efeitos colaterais. Na quimioterapia, um dos maiores problemas é como introduzir uma quantidade suficiente do fármaco quimioterápico dentro das células tumorais para a morte celular eficaz, enquanto se minimiza a concentração nas células normais e, portanto, se poupa os tecidos normais (Tozon et al., 2005).

Na quimioterapia de pequenos animais, a mielossupressão e a toxicidade gastrointestinal são os efeitos colaterais mais comuns para a grande maioria dos fármacos. A bleomicina pode induzir efeitos colaterais agudos ou tardios, especialmente na quimioterapia sistêmica combinada com outros agentes ou com a radioterapia. As toxicidades agudas da bleomicina incluem febre, anorexia, e reações alérgicas, incluindo a anafilaxia (Tozon et al., 2005). A principal toxicidade tardia da bleomicina é a fibrose pulmonar, que pode ocorrer com doses cumulativas superiores a 400.000 UI em humanos (Lanore e Delprat, 2004).

Doses de bleomicina sem nenhuma ou mínima eficácia antitumoral quando usadas isoladamente, produziram aproximadamente 80% de respostas objetivas quando administradas usando a técnica da eletroquimioterapia. As doses usadas do fármaco foram baixas o suficiente para não causar efeitos colaterais. A rota de administração é intravenosa (IV) ou intratumoral (IT) (Cemazar et al., 2008). A bleomicina deve ser administrada em um bolus e não em infusão lenta (quando administrada pela via intravenosa), porque é necessário atingir uma concentração mínima no tecido (Mir, 2006). Para o cão, a dose para a administração IV da bleomicina é de 15000 UI/m<sup>2</sup>, enquanto para a administração IT, a dose da bleomicina é aproximadamente 1000 UI/cm<sup>3</sup> do tumor.

A injeção intratumoral de bleomicina requer, em princípio, menor dose de bleomicina. A quantidade total injetada depende do volume do nódulo e do número de nódulos a serem tratados. Assim, para o tratamento de grandes massas tumorais ou de um grande número de nódulos, a vantagem da redução na dose, com relação à injeção sistêmica pode ser perdida. E ainda, a necessidade de injetar cada nódulo separadamente torna o procedimento mais demorado e menos seguro porque é muito difícil perfundir confiavelmente toda a massa tumoral (Mir, 2006).

O intervalo de tempo entre a administração do fármaco e a aplicação dos pulsos elétricos é importante porque no momento da aplicação, uma quantidade suficiente do fármaco deve estar presente no tumor (Sersa et al., 2006; Cemazar et al., 2008). Quando o fármaco é administrado

sistemicamente (IV), os pulsos elétricos precisam ser aplicados no tumor durante o pico farmacocinético, o que acontece entre 8 a 28 minutos em humanos; para a administração intratumoral, no entanto, os pulsos precisam ser aplicados de 1 a 10 minutos após a injeção do fármaco (Sersa et al., 2008).

Os pacientes são submetidos a anestesia geral para alívio da dor associada à injeção do quimioterápico e aplicação dos pulsos elétricos no tumor. O procedimento tem curta duração e não implica em efeitos colaterais, portanto pode ser realizado em ambulatório ou com internação de um dia. A eletroquimioterapia é um tratamento fácil, seguro e altamente eficaz para nódulos cutâneos e subcutâneos de vários tipos histológicos (Marty et al., 2006).

### 3.2. Tumor de Ehrlich

Os avanços na ciência, na oncologia e na biologia molecular têm contribuído para a melhoria no diagnóstico, pesquisa e nas estratégias terapêuticas dos tumores. O desenvolvimento de modelos experimentais de tumores, têm contribuído para o estudo de seu desenvolvimento, mecanismos envolvidos nas metástases e no teste de substâncias com ação antineoplásica (Ferreira, 2006).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna e corresponde a um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea. Foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906 (Ehrlich, 1906). A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (Stewart et al., 1959; Silva et al., 2006).

O tumor de Ehrlich cresce em várias linhagens de camundongos na forma ascítica, quando é inoculado intra-peritonealmente, e na forma sólida, quando é inoculado no subcutâneo (Ehrlich, 1906). A forma sólida pode ser descrita morfológicamente por células com alto grau de atipia (anaplasia) e pleomorfismo, caracterizadas por nucléolos proeminentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes, índice mitótico alto e relação núcleo-citoplasma elevada. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares (Dagli, 1989; Silva et al., 2006). Observam-se extensas áreas de necrose e hemorragia (Silva et al., 2006). Esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, com proliferação celular acelerada e invasão de tecidos adjacentes (Ferreira, 2006).

Metástases não são comuns no tumor de Ehrlich, exceto metástases para os linfonodos regionais (Dagli, 1992). No estudo de Ribeiro et al. (2012), que avaliou o efeito do extrato de *Arrabidaea chica* no desenvolvimento do tumor de Ehrlich, não foram observadas metástases para o linfonodo regional nem no grupo controle.

O tumor de Ehrlich tem sido escolhido como um modelo de tumor experimental de crescimento rápido em que vários desenhos experimentais para tratamentos oncológicos podem ser testados (Elbially et al., 2010; Elbially e Mady, 2015).

### 3.3. Proliferação celular

A proliferação celular descreve um estado geneticamente distinto em que uma célula é competente para progredir através do ciclo celular, que é o processo físico através do qual o DNA e a célula são replicados, ou seja, processo através do qual as células alternam a síntese de DNA e a mitose

e asseguram que cada um desses processos terminou antes que o outro possa começar. Este controle cuidadoso é articulado nos “checkpoints” – mecanismos que avaliam o progresso de cada fase do ciclo celular e apenas após a conclusão de cada fase permitem a progressão para a próxima (Evan et al., 1995).

Uma das mais importantes características da transformação neoplásica é a perda do controle do ciclo celular, o que possibilita a expansão clonal (Ceccarelli et al., 2000). A determinação da proliferação a partir da avaliação do índice mitótico, citometria de fluxo, marcadores imunohistoquímicos e histoquímicos tem sido amplamente utilizada, apresentando valor diagnóstico e prognóstico na patologia tumoral (Crocker et al., 1989; Pich et al., 2000; Silva et al., 2006).

Não há um consenso para qual o melhor índice de proliferação, ou a melhor metodologia, reagente ou interpretação dos dados. Uma correlação forte normalmente existe ente os métodos, mesmo que eles não mensurem as mesmas entidades biológicas (Syratos et al., 2002).

A proteína Cdc47 é essencial para a iniciação da replicação do DNA e está preservada desde os fungos até os seres humanos. Durante a mitose, Cdc47 entra no núcleo, onde permanece até a iniciação da replicação do DNA e depois é rapidamente exportada de volta para o citoplasma. Os níveis da proteína Cdc47 não variam durante o ciclo celular, mas a expressão do gene CDC47 e a síntese de Cdc47 ocorrem tardiamente no ciclo celular, coincidindo com a mitose (Dalton e Whitbread, 1995). A identificação de núcleos com expressão de Cdc47 é utilizada para a determinação das células que estejam em duplicação e, por isso, é utilizada para determinar a taxa de proliferação celular (Dalton e Whitbread, 1995; Gomes et al., 2008).

### **3.4. Apoptose e necrose**

A morte celular é tipicamente discutida dicotomicamente como necrose ou apoptose. Apoptose é descrita como um processo ativo e programado de desmontagem celular autônomo que evita induzir a inflamação. Necrose tem sido caracterizada como morte celular passiva e acidental resultante de perturbações ambientais com liberação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios (Fink e Cookson, 2005).

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo de suicídio celular geneticamente controlado que tem um papel crucial no desenvolvimento e na defesa da homeostase (Kerr et al., 1972; Cryns e Yuan, 1998; Elmore, 2007). É um processo ativo, no qual a célula sofre contração e condensação de suas estruturas, fragmenta-se, sendo fagocitada por células vizinhas e por macrófagos residentes, não ocorrendo nela o fenômeno de autólise (Brasileiro Filho, 2006). As células respondem a uma variedade de sinais diferentes cometendo suicídio através de uma série de eventos dramáticos, mas extraordinariamente uniformes (Kerr et al., 1972; Cryns e Yuan, 1998, Elmore, 2007).

As células defeituosas são eficientemente removidas pela apoptose: dano físico e genético são dois dos gatilhos mais eficientes para apoptose nas células dos mamíferos (Evan et al., 1995). Morfologicamente, as células em apoptose demonstram condensação nuclear/citoplasmática e protrusões membranares. Estas mudanças iniciais são seguidas pela fragmentação dos conteúdos nucleares e subsequente encapsulamento destes fragmentos em “corpos apoptóticos” que são rapidamente e discretamente consumidos pelas células adjacentes (Kerr et al., 1972; Cryns e Yuan, 1998, Elmore, 2007). Em uma célula individual, o processo de apoptose é muito rápido,

durando entre 30 minutos a algumas horas tipicamente, e os debris apoptóticos resultantes também são rapidamente removidos do estroma por fagocitose (Evan et al., 1995).

Estas manifestações características da apoptose refletem a ativação de um aparato de morte celular intrínseco que foi conservado durante a evolução. No centro deste aparato está uma família de proteases chamadas de caspases (proteases de cisteína com especificidade para o aspartato), que são efetores universais da morte celular apoptótica. Reminiscentes do sistema complemento da defesa do hospedeiro, as caspases são arranjadas em uma cascata proteolítica que serve para transmitir e amplificar os sinais de morte celular. Sob condições normais, as caspases estão presentes no citosol como proenzimas inertes que não apresentam perigo para a célula. Para uma célula sofrer apoptose, as caspases precisam ser ativadas por um processo proteolítico, um evento que leva à auto-amplificação da cascata de proteólise entre as caspases. Um estímulo apoptótico como agentes que causam dano ao DNA disparam a liberação de citocromo c mitocondrial para o citoplasma; uma vez no citoplasma, o citocromo c interage com outros fatores para formar um complexo ativador da caspase-3 (Cryns e Yuan, 1998). A caspase-3 é essencial para algumas das mudanças características na morfologia celular e certos eventos bioquímicos associados com a execução e finalização da apoptose (Porter e Janicke, 1999). Há múltiplas barreiras para prevenir a morte celular inadequada: inibidores endógenos bloqueiam a iniciação da cascata de caspase e/ou interrompem sua progressão. Após sua ativação meticolosamente protegida, as caspases iniciam sua ação na célula clivando seletivamente um número de “substratos da morte” (Cryns e Yuan, 1998).

Necrose é o termo atualmente usado para morte celular acidental não apoptótica (Fink e Cookson, 2005). No entanto, morte celular é um processo que leva ao ponto de não retorno, enquanto necrose está completamente estabelecida após 12 a 24 horas. Em outras palavras, as células morrem muito antes das mudanças necróticas serem vistas na microscopia de luz (Majno e Joris, 1995).

A morte celular patológica não é regulada e é invariavelmente lesiva ao organismo. Pode ser consequente a diferentes danos à integridade da célula (por exemplo isquemia, queimaduras e toxinas). Quando a agressão interfere em uma estrutura ou função vitais de uma organela (membrana plasmática, mitocôndrias, etc.) e não desencadeia a cascata enzimática da apoptose preexistente, o processo é denominado necrose (Rubin e Strayer, 2006).

No nível celular, a necrose caracteriza-se por tumefação celular e de organelas, depleção de trifosfato de adenosina (ATP), aumento da permeabilidade da membrana plasmática, liberação de macromoléculas e, por fim, inflamação (Rubin e Strayer, 2006). É demonstrada por mudanças irreversíveis no núcleo (cariólise, picnose e cariorrexis) e no citoplasma (condensação e eosinofilia intensa, perda de estrutura e fragmentação) (Majno e Joris, 1995). Embora os mecanismos responsáveis pela necrose dependam da natureza da agressão e do órgão envolvido, a maioria dos exemplos de necrose compartilha certas semelhanças quanto ao mecanismo. Qualquer que seja a natureza da agressão letal, a necrose celular é marcada por ruptura de função de barreira à permeabilidade da membrana plasmática. O distúrbio do equilíbrio iônico interno parece representar o “ponto sem volta” para a célula lesada (Rubin e Strayer, 2006).

### **3.5. Inflamação**

A inflamação é uma reação dos tecidos vascularizados, caracterizada morfológicamente pela saída de líquido e de células do sangue para o interstício. O elemento morfológico essencial da inflamação é o exsudato celular. Elas são muito frequentes, pois aparecem após a ação dos mais diferentes agentes agressores físicos, químicos ou biológicos (agente inflamatório ou flogógeno). A ação do agente flogógeno e/ou das células do exsudato pode produzir lesões nos tecidos, inclusive necrose (Pereira, 1994).

Os processos inflamatórios possuem etapas semelhantes: a irritação, alterações vasculares, exsudação plasmática e celular, lesões degenerativas e necróticas, proliferação conjuntiva e vascular reparadora e, nas inflamações crônicas, as modificações das células do exsudato. Tais componentes não são isolados no tempo. Embora tenham seu início em momentos sucessivos, ou seja, um se inicia depois do início do outro, muitas vezes se superpõe durante o desenrolar do processo (Pereira, 1994).

O processo da cascata da inflamação é complexo e é dividido primariamente em duas partes, agudo ou crônico, que pode ser benéfico ou prejudicial. A inflamação aguda é caracterizada pelo início rápido e curta duração. Ocorre exsudação de fluido e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para a área danificada. Acredita-se que esta resposta inflamatória aguda seja um mecanismo de defesa contra bactérias, vírus e parasitas, enquanto facilita o reparo de feridas. A inflamação crônica tem uma duração mais prolongada e se manifesta histologicamente pela presença de linfócitos e macrófagos, resultando em fibrose e necrose tecidual (Iwalewa et al., 2007).

O papel da inflamação na tumorigênese é amplamente aceito e se tornou evidente que um microambiente inflamatório é um componente essencial de todos os tumores, incluindo alguns em que uma relação causal direta com a inflamação ainda não tenha sido provada (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010).

Células e mediadores inflamatórios estão presentes no microambiente da maioria, se não de todos, os tumores, independente do gatilho para o seu desenvolvimento. Um infiltrado de leucócitos, de tamanho, composição e distribuição variados faz parte deste microambiente tumoral. Seus componentes incluem macrófagos associados ao tumor, mastócitos e linfócitos T. O papel preciso destes vários componentes do microambiente inflamatório na progressão dos tumores ainda não foi esclarecida (Mantovani et al., 2008).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aparelho eletroporador**

O aparelho eletroporador foi desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (Santos, 2014).

Foi utilizado um sistema de chaveamento controlado por microcontroladores para entregar pulsos de tensão com amplitude máxima de 1000V à carga biológica. A unidade de chaveamento utilizada foi o MOSFET K119, que suporta tensões de até 1000V e tempos de chaveamento mínimos de 100ns (Santos, 2014).

A apresentação dos dados foi realizada por meio do monitor do microcomputador utilizado para o controle da placa de aquisição. Para a produção de uma fonte de alta tensão compacta, decidiu-se pelo uso de um circuito multiplicador capacitivo de três estágios (Santos, 2014).

O chaveamento bipolar foi obtido pelo uso de um circuito ponte H. A aplicação dos estímulos elétricos foi feita através de ponteiras. As ponteiras são constituídas por três partes: conectores, empunhadura e eletrodos (Santos, 2014).

## **4.2. Animais**

Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG) sob protocolo 206/2014. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* com 45 dias de idade, alojados em caixas plásticas (5 animais/caixa), que receberam a mesma ração comercial e água *ad libitum*. Os camundongos foram submetidos a um regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz. Os animais foram distribuídos em quatro grupos divididos em dois subgrupos de 5 animais, e todos foram inoculados com células de tumor de Ehrlich, no flanco esquerdo. Após 21 dias, quando os tumores atingiram aproximadamente 0,94 cm<sup>3</sup> os camundongos foram submetidos ao protocolo de tratamento específico.

## **4.3. Tumor Experimental de Ehrlich**

Utilizou-se o tumor de Ehrlich, mantido no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na forma ascítica, em camundongos da linhagem *Swiss*. O protocolo para a manutenção desse tumor foi realizado pela obtenção de cerca de 0,2 mL de fluido ascítico, colhido de animais portadores de tumor ascítico e imediatamente inoculados via intraperitoneal em camundongos saudáveis. Esse procedimento foi repetido uma vez por semana.

## **4.4. Preparo e inoculação das células tumorais**

O preparo das células tumorais incluiu a lavagem, a contagem das células e o teste de viabilidade das mesmas. Com o auxílio de seringas e agulhas estéreis e descartáveis, foram retirados 3,0 mL de fluido ascítico de um camundongo pré-inoculado há 7 dias com o tumor de Ehrlich pela via intraperitoneal. Esse fluido foi centrifugado (3000 rpm) durante três minutos, o sobrenadante desprezado, as células ressuspensas em salina fisiológica e novamente centrifugadas. Esse procedimento foi repetido por três vezes para a obtenção de um líquido denso e claro, correspondente a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias.

Seguiu-se então, à contagem e teste de viabilidade das células tumorais. Para isso, foram retirados 20 µL da suspensão celular, adicionando esta fração a um tubo de hemólise, contendo 1980 µL de salina fisiológica. Após homogeneização do mesmo, foram retirados 100 µL dessa suspensão diluída que foi adicionada à 100 µL do corante Azul de Tripán a 0,1 %. A contagem das células foi realizada em hemocítmetro de Neubauer nos quatro quadrantes externos. As células coradas

pelo Azul de Tripán foram consideradas inviáveis, e as células translúcidas consideradas viáveis. A viabilidade das células neoplásicas foi de 93,5%, ou seja, apenas 6,5% das células apresentaram coloração azulada. A fórmula para determinação do número de células viáveis foi deduzida, segundo Dagli (1989):

Número de células por mL = Número de células contadas X Fator de correção

Sendo que:

$$\text{Fator de correção} = \frac{\text{Fator de profundidade} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Área contada}}$$

Onde:

Fator de profundidade = 10

Fator de diluição = 200

Área contada = 4 mm<sup>2</sup>

Conversão de mm<sup>2</sup> para mL =  $\times 10^3$

Assim:

Fator de correção =  $5 \times 10^5$

Com o auxílio de seringa e agulhas estéreis e descartáveis, os camundongos receberam uma injeção subcutânea de 0,05 mL da suspensão celular, contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais, no flanco esquerdo, para obtenção do tumor na forma sólida.

#### 4.5. Formulação da droga

O sulfato de bleomicina<sup>1</sup> foi obtido em pó e diluído com água de injeção (1000 UI em 1,0 mL). A solução de bleomicina foi administrada diretamente nos nódulos, IT.

#### 4.6. Protocolos de tratamento

Os pulsos elétricos foram administrados através de um eletrodo com agulhas (duas fileiras paralelas de agulhas de aço inoxidável de 1 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento e com uma distância interna entre as fileiras de 5 mm) (Esope, 2003). Oito pulsos de onda quadrada (4+4), com duração de 100 µsegundos cada, 1300 V/cm de amplitude e frequência de 5 KHz foram gerados pelo aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG (Fig. 4).

Todos os camundongos foram submetidos a um protocolo anestésico de morfina<sup>2</sup> (2mg/kg), maleato de midazolam<sup>3</sup> (3mg/kg) e cetamina<sup>4</sup> (20mg/kg) na mesma seringa pela via intramuscular, imediatamente antes de serem submetidos aos seus respectivos tratamentos:

**Grupo 1 (Controle)** – Os camundongos no grupo controle receberam 0,2 – 0,6 mL de solução de NaCl 0,9% pela via intratumoral, de acordo com seus respectivos volumes tumorais. O eletrodo de agulhas paralelas foi introduzido nos nódulos, mas os pulsos não foram disparados.

**Grupo 2 (Bleomicina)** – Os camundongos no grupo da bleomicina receberam 0,2 – 0,6 mL da solução de bleomicina (1000UI/mL) pela via intratumoral, de acordo com seus respectivos

<sup>1</sup> Tecnomicina®, Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Dimorf®, Cristália, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Midazolam, Medley Indústria Farmacêutica Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Ketamin®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

volumes tumorais. O eletrodo de agulhas paralelas foi introduzido nos nódulos, mas os pulsos não foram disparados.

**Grupo 3 (Pulsos elétricos)** – Os camundongos no grupo de pulsos elétricos receberam 0,2 – 0,6 mL de solução de NaCl 0,9% pela via intratumoral, de acordo com seus respectivos volumes tumorais. Foram administrados grupos de 8 pulsos de onda quadrada divididos em duas sequências de 4 pulsos. A segunda sequência de 4 pulsos foi administrada perpendicularmente à primeira. Foram administrados tantos grupos de pulsos quantos necessários para realizar a eletroporação completa do nódulo.

**Grupo 4 (Pulsos elétricos + bleomicina)** – Os camundongos no grupo da eletroquimioterapia receberam 0,2 – 0,6 mL da solução de bleomicina (1000UI/mL) pela via intratumoral, de acordo com seus respectivos volumes tumorais. Receberam também grupos de 8 pulsos de onda quadrada divididos em duas sequências de 4 pulsos. A segunda sequência de 4 pulsos foi administrada perpendicularmente à primeira. Foram administrados tantos grupos de pulsos quantos necessários para realizar a eletroporação completa do nódulo. Os pulsos elétricos foram aplicados imediatamente após a administração da bleomicina.

#### 4.7. Acompanhamento do crescimento tumoral

Durante o período experimental foram avaliados o crescimento tumoral e o peso dos grupos estudados. Devido à alta taxa de crescimento do modelo tumoral de Ehrlich, a mudança no volume tumoral ( $\Delta V$ ) foi monitorada por um período de dezessete dias para todos os 4 grupos, após serem submetidos aos seus respectivos tratamentos. A curva de crescimento tumoral foi feita a partir da fórmula  $V = ab^2\pi/6$ , em que  $V$  é o volume tumoral,  $a$  é o maior diâmetro e  $b$  é o diâmetro perpendicular a  $a$  (Elbially et al., 2010; Elbially e Mady, 2015). As mensurações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro a cada dois dias após a inoculação do tumor.

Após o período de acompanhamento, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os tumores foram coletados para análise histopatológica.

#### 4.8. Estudo histopatológico

Fragments do tumor primário foram fixados em formol a 10% tamponado, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 4 $\mu$ m foram coradas em hematoxilina-eosina (H.E.) e utilizadas para a análise histomorfológica e histomorfométrica do tumor primário. Na análise histomorfométrica, foram realizados os procedimentos descritos por Pereira et al. (2013). Para a análise histomorfométrica, foi calculada a porcentagem das áreas de neoplasia, necrose, inflamação (angiogênese, hemorragia e edema) e tecido normal em 15 campos histológicos, com identificação de 25 pontos equidistantes por campo histológico capturado. As imagens histológicas foram obtidas a partir do sistema de captura com microcâmera SPOT Basic® 3.4.5 adaptada em um microscópio Olympus (BX-40). As imagens foram analisadas com utilização do software Corel Draw® versão 7.468.

#### 4.9. Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, foram obtidos cortes seriados de 4  $\mu$ m a partir dos blocos de parafina, transferidos para lâminas gelatinizadas e posteriormente desparafinizados e reidratados. Todas as fases de preparação das lâminas foram acompanhadas por um controle positivo definido no folder do anticorpo para o anticorpo testado e um controle negativo (sem o anticorpo primário).

Foi utilizado o anticorpo primário anti-cdc47 (clone 47DC141, Neomarkers, 1:300) para identificação de células neoplásicas em proliferação. O anticorpo foi diluído em solução própria – IHC diluent solution (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) e incubado por 1 hora em câmara úmida. A amplificação de sinal na reação imuno-histoquímica foi realizada empregando-se o sistema baseado em polímero Advance™ HRP (Dako, Carpinteria, EUA) e a revelação com solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Dako, Carpinteria, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O índice para este marcador foi obtido pela estimativa da porcentagem de células positivas em 500 células tumorais. A contagem foi realizada em campos com 40x de objetiva e 10x de ocular, segundo o protocolo de Souza et al. (2011.)

A apoptose foi avaliada com a utilização do anticorpo anti-caspase-3 (Clone RB-1197-P, NeoMarkers, 1:300). O anticorpo foi diluído em solução própria – IHC diluent solution (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) e incubado por 1 hora em câmara úmida. A amplificação de sinal na reação imuno-histoquímica foi realizada empregando-se o sistema baseado em polímero Advance™ HRP (Dako, Carpinteria, EUA) e a revelação com solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Dako, Carpinteria, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O índice apoptótico foi determinado pela porcentagem de células com características de apoptose em relação ao número total de células em cada campo analisado, segundo o protocolo de Gomes et al. (2008).

#### **4.10. Análise estatística**

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, no qual os tratamentos constituíram as parcelas, os momentos de avaliação representaram as subparcelas e cada animal, uma unidade experimental ou repetição. Para as análises histológicas e imuno-histoquímicas considerou-se um único momento de avaliação. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

Antes da aplicação dos testes de comparação, os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade.

A porcentagem de redução do peso do tamanho tumoral e o peso tumoral não apresentaram distribuição normal e foram analisados, de forma não paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis. O peso dos camundongos e peso do tumor foram submetidos a análise de variância, teste de Fisher e post-hoc Tukey. Com relação às características histológicas e imuno-histoquímicas, a porcentagem de necrose foi analisada pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis, enquanto a porcentagem de tecido neoplásico, tecido normal, inflamação e a porcentagem de expressão do marcador Cdc47 foram submetidos à análise de variância, teste de Fisher e post-hoc Tukey.

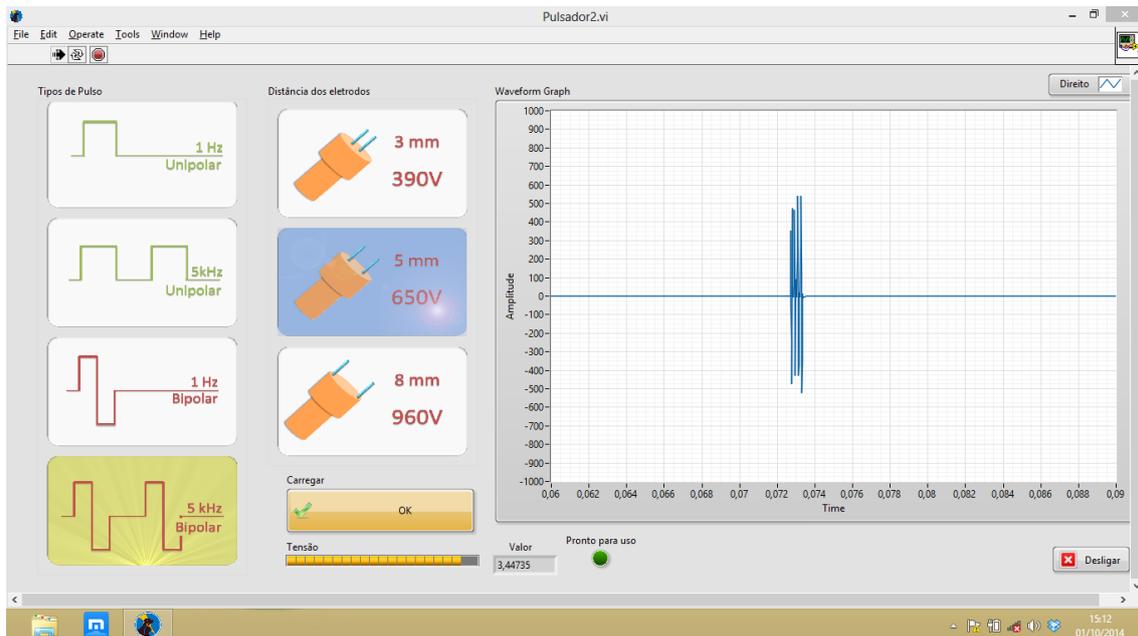
Para testar e medir a associação entre os dados obtidos na morfometria e expressão de Cdc47, foi utilizada a correlação de Pearson. As correlações significativas foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ( $r > 0,07$ ), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ( $0,3 < r < 0,07$ ), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ( $r < 0,3$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (Fig. 4) permite a programação individual de alguns parâmetros dos pulsos retangulares de campo elétrico, isto é, amplitude, frequência e polaridade da onda. O aparelho permite a realização de eletroporação *in vivo* com uma interface humano-máquina simples e de fácil manuseio (Fig. 5). O eletrodo de agulhas em arranjo paralelo foi selecionado por se tratarem de nódulos subcutâneos pequenos, como descrito por Marty et al. (2006).

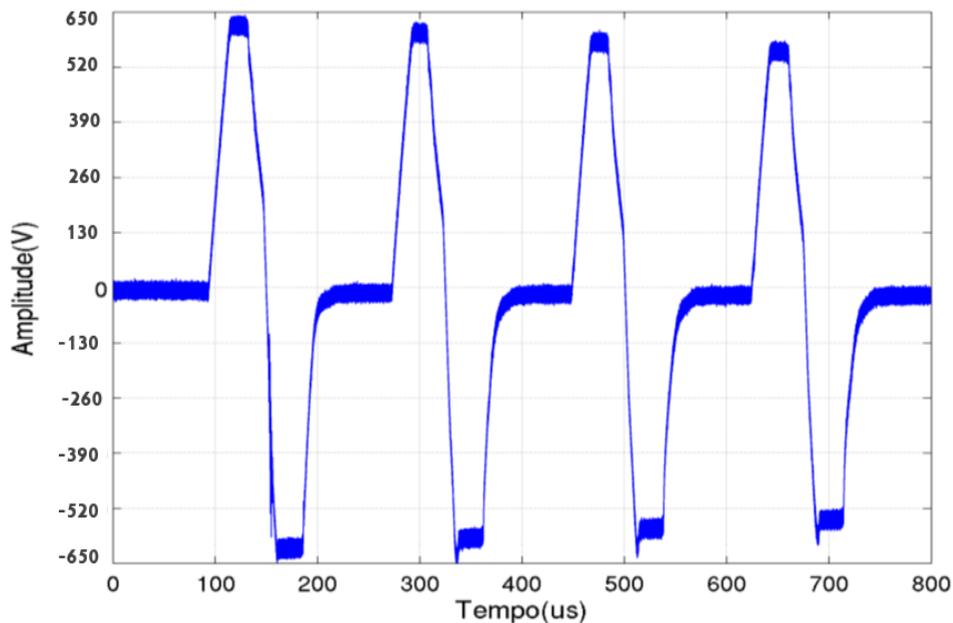


**Figura 4.** Aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG para uso na técnica da eletroquimioterapia *in vivo*.



**Figura 5.** Interface humano-máquina. Pulsos de 5 kHz, 650 V, e onda quadrada bipolar visualizados no painel sinótico do software desenvolvido pela Escola de Engenharia da UFMG para ser usado em conjunto com o aparelho eletroporador.

Os pulsos produzidos pelo aparelho desenvolvido pela Escola de Engenharia da UFMG foram testados em laboratório próprio e corresponderam aos pré-requisitos temporais e de amplitude desejados, conforme mostrado na Fig. 6.



**Figura 6.** Pulsos de onda quadrada bipolar de 100  $\mu$ segundos de duração, frequência de 5 kHz e 650 V de amplitude aplicados durante o tratamento nos grupos pulsos elétricos e

eletroquimioterapia. Pulsos gerados pelo aparelho eletroporador desenvolvido pela Escola de Engenharia da UFMG.

O peso dos camundongos foi estatisticamente menor para o grupo da eletroquimioterapia (média de perda de peso de 5% do peso corporal) quando comparado com os outros grupos (Tabela 1). Esta média de perda de peso foi menor do que a observada no estudo de Sersa et al. (1994), e no presente estudo não houve morte de nenhum animal tratado. Assim, o tratamento foi bem tolerado e com efeitos colaterais mínimos.

Tabela 1: Médias dos pesos dos camundongos a cada 4 dias por grupo de tratamento, em que o dia do tratamento está indicado por asterisco.

<b>Grupos</b>	<b>Dias</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>20*</b>	<b>24</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>38</b>
<b>Controle</b>		24,8	26,2	27,4	29,0	30,0	29,9	30,9	32,0	31,9	33,0	33,5
<b>Bleomicina</b>		24,9	25,4	27,8	29,8	30,1	30,7	30,9	31,2	32,2	32,7	32,5
<b>Pulsos elétricos</b>		24,4	26,5	27,7	29,0	29,0	30,3	30,7	31,4	32,4	32,9	33,3
<b>Eletroquimioterapia</b>		24,6	26,4	27,0	28,9	28,9	29,5	29,3	29,9	30,6	31,0	31,8

O peso dos tumores foi estatisticamente maior para o grupo dos pulsos elétricos em relação a todos os outros grupos. O grupo de pulsos elétricos foi estimulado a crescer pelo tratamento, mas foi estatisticamente diferente apenas do grupo da eletroquimioterapia (Tabela 2). O crescimento tumoral do grupo dos pulsos elétricos não foi observado em outros estudos semelhantes em que não houve efeito ou houve uma discreta redução no tamanho dos tumores submetidos apenas a pulsos elétricos com os mesmos parâmetros (Sersa et al., 1994; Sersa et al., 2006; Sersa et al., 2008). Portanto, maiores estudos tornam-se necessários para verificar possíveis interações entre pulso elétrico e neoplasia.

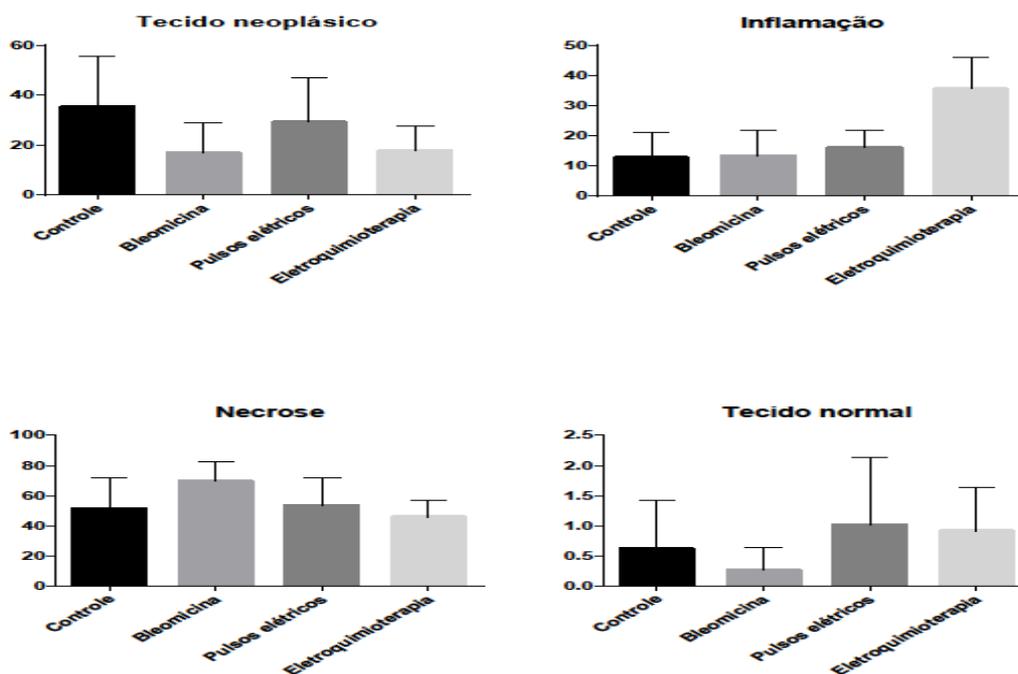
Tabela 2: Média dos pesos e da porcentagem de inibição do tumor sólido de Ehrlich após o tratamento.

<b>Grupo</b>	<b>Média final do peso dos tumores (mg)</b>	<b>Porcentagem de inibição do crescimento do tumor.</b>
Controle	1764	0%
Bleomicina	1485	15,8%
Pulsos elétricos	3657,2	-107,3%
Eletroquimioterapia	1070,3	39,3%

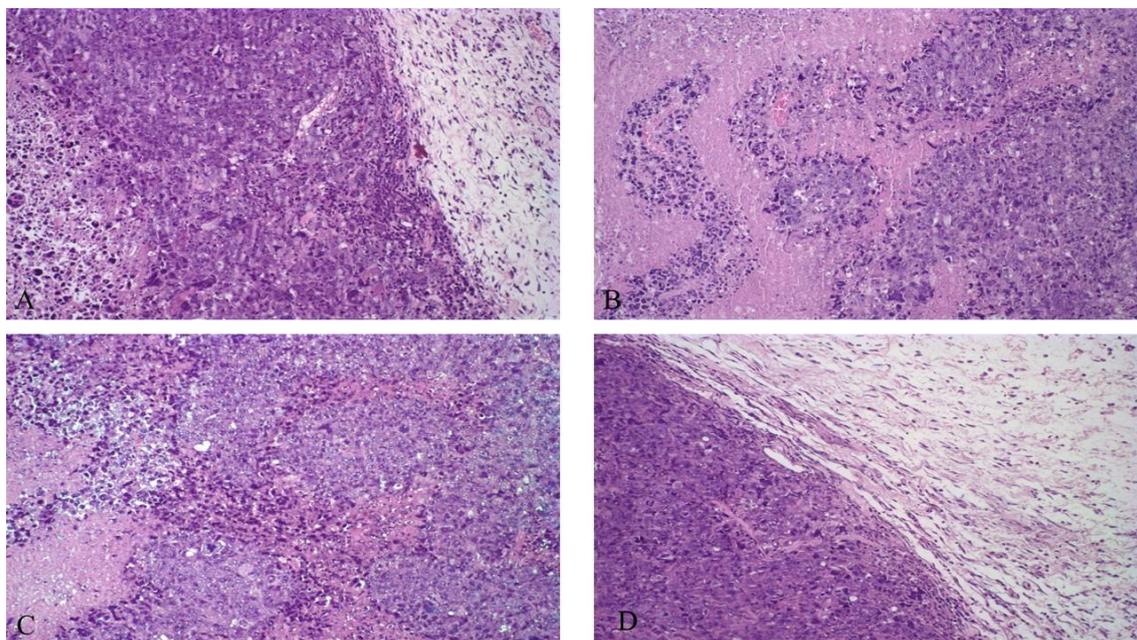
Quando os tumores foram analisados pela técnica histomorfológica e histomorfométrica, houve maior porcentagem de inflamação no grupo da eletroquimioterapia e maior porcentagem de necrose no grupo da bleomicina. Para os outros resultados e entre os outros grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas. Apesar disso, é possível visualizar uma tendência para a menor porcentagem de tecido neoplásico nos grupos da bleomicina e eletroquimioterapia (Fig. 7 e Fig. 8).

A administração da bleomicina foi realizada pela via intratumoral e não pela via intravenosa utilizando a veia da cauda como previamente relatado (Sersa et al., 1994). Esta modificação do procedimento pode ter interferido a resposta anti-tumoral, porque o tumor é sólido e difícil de perfundir adequadamente, com extravasamento do fármaco. A dificuldade técnica de se realizar um acesso venoso em camundongos *Swiss* devido ao seu pequeno tamanho influenciou na escolha da forma de administração do fármaco.

A infusão de bleomicina no pulmão é o modelo experimental mais frequentemente utilizado para investigar os mecanismos celulares e bioquímicos relevantes para a patogênese da fibrose pulmonar. Uma única dose de 25  $\mu$ L com 0,125 U de bleomicina diluída em PBS pode ser instilada intratraquealmente para causar a fibrose pulmonar segundo Russo et al. (2009). No estudo de Russo et al. (2011), a instilação intratraqueal de bleomicina foi associada com doença clínica significativa, vista como mudanças no peso e taxas de letalidade que alcançaram 60% no Dia 16. A dose de bleomicina selecionada para o experimento foi de 200 a 600 UI (0,2 a 0,6 U) por animal, de acordo com o volume tumoral. Esta dose de bleomicina não induziu mortalidade dos animais e não afetou o peso corporal dos animais do grupo bleomicina, quando comparados com os animais do grupo controle, assim como observado por Sersa et al. (1994; 2008).



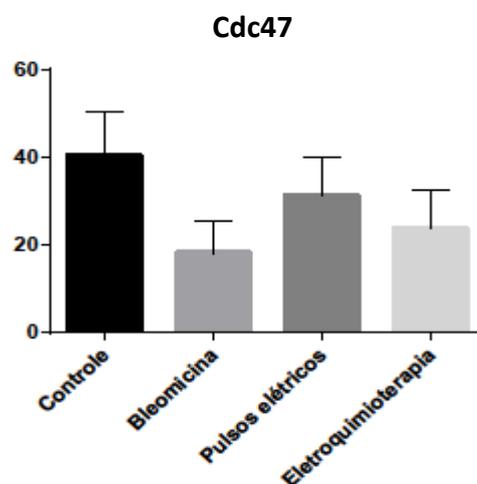
**Figura 7.** Representação gráfica contendo média e desvio-padrão obtidos para análise histomorfológica e histomorfométrica (porcentagem de tecido neoplásico, inflamação, necrose e tecido normal) do tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss* para os quatro grupos de tratamento (controle, bleomicina, pulsos elétricos e eletroquimioterapia).



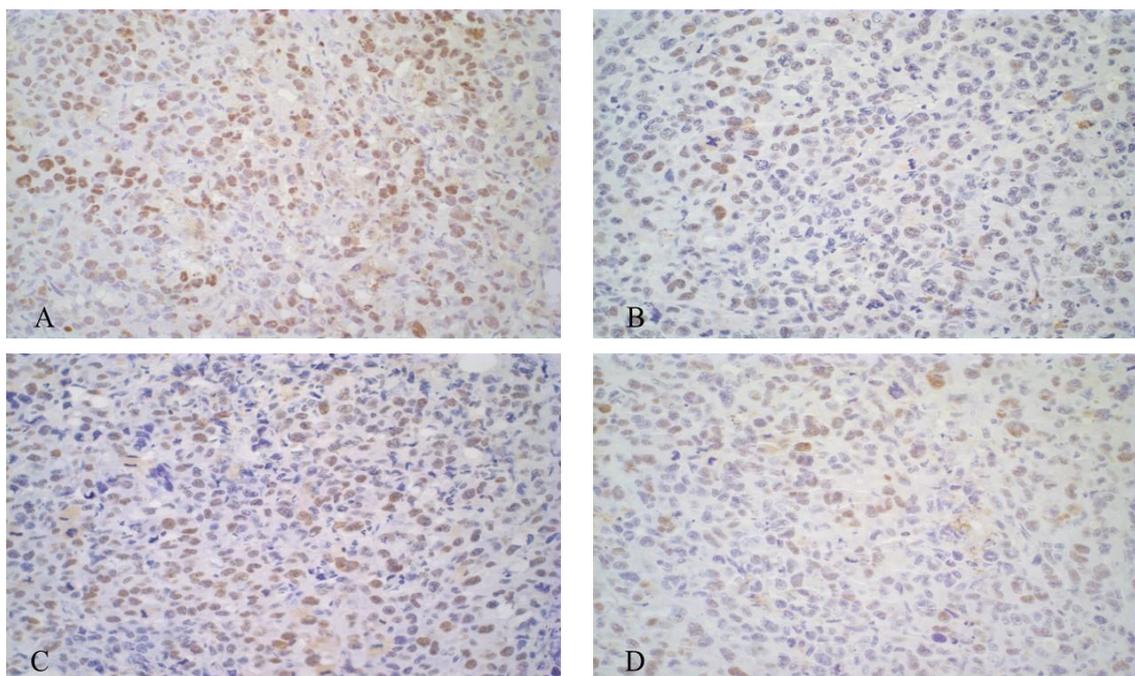
**Figura 8.** Fotomicrografia do tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss* em (A) grupo controle, (B) grupo bleomicina, (C) grupo pulsos elétricos e (D) grupo eletroquimioterapia. É possível observar maior área de necrose em (B) e maior área de inflamação em (D) (H.E. 20x).

Sabe-se que o sistema imune do organismo está envolvido na defesa contra o tumor e, portanto, contribui para a eficácia de terapias citotóxicas erradicando células tumorais viáveis remanescentes como descrito por Sersa et al. (1997). No entanto, as células do tumor de Ehrlich perderam os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (do Inglês Major Histocompatibility Complex) de classe II durante o processo de transformação maligna, sendo considerado um tumor pouco imunogênico (Carry et al., 1979; Ferreira, 2006). O estudo de Sersa et al. (1997) mostrou que a resposta imune é essencial para os efeitos da eletroquimioterapia na erradicação completa das células tumorais ao estudar camundongos imunocompetentes e imunocomprometidos. Em animais imunodeficientes, a taxa de cura dos tumores foi significativamente menor do que nos animais imunocompetentes. Acredita-se que isto esteja relacionado à liberação de antígenos das células destruídas após a eletroquimioterapia, o que ativaria as células imunes dentro dos tumores (Miklavcic et al., 2014). No presente trabalho, a resposta antitumoral no grupo dos animais tratados com eletroquimioterapia pode ter sido inferior ao observado em outros estudos devido à via de administração da bleomicina e à baixa imunogenicidade desta linhagem celular. No entanto, foi possível observar que a eletroquimioterapia induziu uma resposta inflamatória no tumor que não foi observada nos outros grupos, o que pode ter contribuído para a maior porcentagem de inibição de crescimento tumoral e menor porcentagem de tecido neoplásico, mesmo que o resultado não tenha alcançado significância estatística.

Na análise da imuno-histoquímica para Cdc47, todos os grupos apresentaram uma porcentagem de proliferação menor do que o grupo controle, mas este resultado foi estatisticamente significativo apenas para o grupo da bleomicina e da eletroquimioterapia (Fig. 9 e Fig. 10). Houve correlação moderada entre a porcentagem de proliferação tumoral avaliada pelo Cdc47 e a porcentagem de tecido neoplásico ( $P = 0,08$  e  $rp = 0,443$ ). Este resultado era esperado já que quanto menor a porcentagem de tecido neoplásico, menor a taxa de proliferação de um tumor.



**Figura 9.** Representação gráfica contendo média e desvio-padrão obtidos para porcentagem média de proliferação avaliada através da imuno-histoquímica com Cdc47 do tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss* para os quatro grupos de tratamento (controle, bleomicina, pulsos elétricos e eletroquimioterapia).



**Figura 10.** Fotomicrografia da expressão imuno-histoquímica para o anticorpo anti-cdc47 no tumor sólido de Ehrlich em camundongos *Swiss* nos grupos: (A) controle, (B) bleomicina, (C) pulsos elétricos e (D) eletroquimioterapia. A marcação se caracteriza por ser nuclear e mais intensa em (A e C, 40x), e menos intensa em (B e D, 40x).

O efeito anti-tumoral da bleomicina é limitado devido à sua baixa entrada nas células tumorais, por se tratar de um quimioterápico hidrossolúvel que não atravessa a membrana plasmática por difusão (Pron et al., 1993; Sersa et al., 1994). Usando células DC-3F, Pron et al. (1993) estudaram

uma proteína de membrana plasmática que se liga à bleomicina e que explica e limita o seu mecanismo de internalização. Estes autores observaram que o número de moléculas de bleomicina que aderem à célula depende do número de proteínas presentes na membrana plasmática, e que este número variou com o número de passagens in vitro das células. Segundo Mir et al. (1996), fibroblastos DC-3F mutantes de hamster com diferentes quantidades desta proteína na sua superfície mostraram uma sensibilidade celular à bleomicina que estava correlacionada com a abundância desta proteína na superfície celular. Isto indica que o número de locais de ligação para bleomicina na superfície da célula tem um papel importante na sensibilidade celular a este quimioterápico.

É possível que as células do tumor de Ehrlich utilizadas neste experimento apresentem um número maior de proteínas de membrana que se ligam à bleomicina. Isto explicaria a porcentagem de inibição do crescimento do tumor, a tendência a menor porcentagem de tecido neoplásico, a maior porcentagem de necrose e a menor porcentagem média de proliferação do grupo tratado apenas com bleomicina. Além disso, poderia justificar porque a resposta entre o grupo bleomicina e o grupo eletroquimioterapia foi similar, apesar de uma maior porcentagem de inibição do crescimento do tumor no grupo eletroquimioterapia. Se as células já apresentam um elevado número de proteínas transportadoras, a abertura de poros na membrana não teria um efeito tão significativo, como é observado para outros fármacos como doxorubicina, vincristina e carboplatina (Sersa et al., 2008). São necessários mais estudos para comprovar esta teoria de maior número de proteínas da membrana nas células de Ehrlich utilizadas neste estudo.

Em toda a revisão de literatura realizada para este estudo, não foi possível encontrar nenhum protocolo de imuno-histoquímica com caspase-3 em tumor de Ehrlich. A avaliação imuno-histoquímica de apoptose ficou comprometida porque o tumor de Ehrlich apresenta grande quantidade de necrose, que se manifesta através de fundo nas lâminas, o que impossibilitou uma análise segura das marcações positivas. Foram tentados diversos protocolos para tentar padronizar a técnica, sem apresentar resultados satisfatórios, provavelmente devido às extensas áreas de necrose e hemorragia que o tumor de Ehrlich apresenta na sua forma sólida (Krajewski et al., 1994; Silva et al., 2006; Terzian et al., 2007). Assim, optou-se por não incluir este marcador na análise dos resultados.

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que:

- O objetivo de se construir um eletroporador que permite a programação individual dos parâmetros dos pulsos retangulares de campo elétrico, isto é, amplitude, frequência e polaridade da onda, dentro de uma certa faixa de operação foi atingido. Apesar de se ter obtido sucesso no desenvolvimento de um eletroporador programável, o equipamento ainda pode ser aprimorado, a fim de adequá-lo plenamente ao proposto neste estudo.
- O desenvolvimento desta pesquisa permite sugerir, para projetos futuros, modificações que permitam descarregar o aparelho para maior segurança, a redução dos atrasos entre o acionamento do pedal e a aplicação dos pulsos e o ajuste do tempo do gráfico do painel sinótico. Há ainda a necessidade de construir mais ponteiras compatíveis com os conectores utilizados, para serem usadas juntamente com o eletroporador, nos tratamentos de eletroquimioterapia.

- O tratamento sob anestesia foi bem tolerado pelos animais, sem mortalidade e com uma perda de peso mínima. Os animais do grupo eletroquimioterapia apresentaram redução do tumor e da porcentagem do tecido tumoral, apesar da via de administração da bleomicina e da utilização de um modelo tumoral que não se mostrou ideal para avaliação da técnica devido à baixa imunogenicidade e extensas áreas de necrose. Além disso, são necessários mais estudos para se avaliar a variação da quantidade da proteína transportadora de bleomicina na membrana plasmática das células do tumor de Ehrlich utilizadas.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eletroquimioterapia é um procedimento simples, rápido, com poucos efeitos colaterais e muito eficiente para o controle local de tumores. Todas essas características são muito desejáveis para o tratamento oncológico, em que os pacientes são, em sua maioria, idosos e apresentam comorbidades. Sua utilização na oncologia já é bem estabelecida na medicina humana, mas novas aplicações são desenvolvidas continuamente, como o uso em tumores ósseos, em órgãos abdominais e até mesmo no sistema nervoso central.

Para a medicina veterinária, as características da eletroquimioterapia são ainda mais vantajosas. O paciente não é levado ao seu limite, objetivando a cura, como na medicina humana e, portanto, um tratamento com poucos efeitos colaterais e que pode proporcionar uma melhora significativa na qualidade de vida pode ser a diferença entre a opção pela eutanásia ou pelo tratamento. Além disso, nem todas as modalidades de tratamento estão disponíveis (i. é. radioterapia), principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, a eletroquimioterapia pode tornar protocolos de tratamentos mais acessíveis.

Assim, a eletroquimioterapia deve ser considerada como uma opção de tratamento único ou para associação à cirurgia e quimioterapia, com o objetivo de se obter maior controle da doença e maior sobrevida, preservando a qualidade de vida dos pacientes oncológicos veterinários. Como aplicação prática na rotina oncológica, o aparelho eletroporador desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da UFMG pode ser recomendado para realização da eletroquimioterapia nos pacientes atendidos no setor de oncologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG como uma modalidade terapêutica nova e com poucos efeitos colaterais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: Patologia*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CARRY, P. J.; PRESCOTT, D. M.; OGILVIE, G. K. Resistance to Ehrlich Ascites Tumor in a Strain of Dystrophic Mice. *Cancer Research*, v. 39, p. 2139-2140, 1979

CECCARELLI, C.; TRERÈ, D.; SANTINE, D. et al. AgNORs in breast tumours. *Micron*, v. 31, p. 143-149, 2000.

CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; VODOVNIK, L. et al. Improved therapeutic effect of electrochemotherapy with cisplatin by intratumoral drug administration and changing of electrode

orientation for electropermeabilization on EAT tumor model in mice. *Radiology and Oncology*, v. 29, p. 121-127, 1995.

CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G. et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p. 826–831, 2008.

COROVIC, S.; BESTER, J.; MIKLAVCIC, D. An e-learning application on electrochemotherapy. *BioMedical Engineering OnLine*, v. 8, n. 26, p. 1-15, 2009.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. *Genes & Development*, v. 12, p. 1551-1570, 1998.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *Journal of Pathology*, v. 158, p. 185-188, 1989.

DAGLI, M. L. Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental (dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 1-148, 1989.

DAGLI, M. L. Z.; SOMA, M.; GUERRA, J. L. et al. Lymphatic dissemination in neoplasia: determination of nuclear volume and DNA content of primitive and regional lymph node Ehrlich tumor cells. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, p. 267-271, 1992.

DALTON, S.; WHITBREAD, L. Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast. *Cell Biology*, v. 92, p. 2514-2518, 1995.

EHRlich, P. Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen. *Zeitschrift fuer aertzliche Fortbildung*, v. 3, p. 205-213, 1906.

ELBIALY, N.; ABDELHAMID, M.; YOUSSEF, T. Low power argon laser-induced thermal therapy for subcutaneous Ehrlich carcinoma in mice using spherical gold nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6, p. 1–7, 2010.

ELBIALY, N. S.; MADY, M. M. Ehrlich tumor inhibition using doxorubicin containing liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, p. 182-187, 2015.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

Esope Newsletter n°3. Disponível em <[www.cliniporator.com](http://www.cliniporator.com)>. Acessado em 24 setembro 2014. 2003.

EVAN, G. I.; BROWN, L.; WHYTE, M. et al. Apoptosis and the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 7, p. 825-834, 1995.

FERREIRA, M. A. N. D. Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO) (tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, p. 1-162, 2006.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic. *Infection and Immunity*, v. 73, n.4, p. 1907-1916, 2005.

GOMES, M. G.; SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. F. C. et al. Apoptose, proliferação e histomorfometria do baço de ratas Adultas com hipofunção tireoidiana e ovariana. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, v. 52, n.6, p. 1031-1038, 2008.

GOTHELF, A.; MIR, L. M; GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Reviews*, v. 29, n. 5, p. 371-387, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, v. 140, p. 883–899, 2010.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V. et al. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

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

KODRE, V.; CEMAZAR, M.; PECAR, J., et al. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo*, v. 23, p. 55-62, 2009.

KRAJEWSKI, S.; BODRUG, S.; GASCOYNE, R. et al. Immunohistochemical Analysis of Mcl-1 and Bcl-2 Proteins in Normal and Neoplastic Lymph Nodes. *American Journal of Pathology*, v. 145, n. 3, p. 515-525, 1994

LANORE, D.; DELPRAT, C. (Ed). *Quimioterapia anticancerígena*. Rio de Janeiro: Roca, 2004, 179 p.

LARKIN, J. O.; COLLINS, C. G.; AARONS, S., et al. Electrochemotherapy – Aspects of preclinical development and early clinical experience. *Annals of Surgery*, v. 245, p. 469-479, 2007.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, v. 146, n. 1, p. 3-15, 1995.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. et al. Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, p. 436-444, 2008.

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

MIKLAVCIC, D.; SERSA, G.; BRECELJ, E. et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 50, p. 1213–1225, 2012.

- MIKLAVCIC, D.; MALI, B.; KOS, B. et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomedical Engineering OnLine*, v. 13, p. 1-20, 2014.
- MIR, L. M.; TOUNEKTI, O.; ORLOWSKI, S. Bleomycin: Revival of an Old Drug. *General Pharmacology*, v. 27, n. 5, p. 745-748, 1996.
- MIR, L.M.; MORSLI, N.; GARBAY, J. R. et al. Electrochemotherapy: a New Treatment of Solid Tumors. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research*, v. 22, n.4, p. 145-148, 2003.
- MIR, L. M.; GEHL, J.; SERSA, G. et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements*, v. 4, p. 14-25, 2006.
- MIR, L.M. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer Supplements*, v. 4, p. 38-44, 2006.
- PEREIRA, B. G.; FIALHO, S. L.; SOUZA, C. M. et al. Evaluation of the effects of thalidomide-loaded biodegradable devices in solid Ehrlich tumor. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 67, p. 129-132, 2013.
- PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: Patologia*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNOR in tumor pathology. *Micron*, v. 31, p. 133-141, 2000.
- PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, v. 6, p. 99-104, 1999.
- PRON, G.; BELEHRADEK, J.; MIR, L. M. Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 194, p. 333-337, 1993.
- RIBEIRO, A. F. C.; TELLES, T. C.; FERRAZ, V. P. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 2, p. 364-373, 2012.
- RUBIN, E.; STRAYER, D. S. Lesão celular. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. *Patologia – Bases clinicopatológicas da medicina*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- SANTOS, R. G. Projeto e Construção de geradores portáteis de pulsos elétricos bipolares de alta tensão para tratamentos de eletroquimioterapia (monografia). Universidade Federal de Minas Gerais, p 1-55, 2014.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; DAMIJAN, M., et al. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 35, p. 23-27, 1994.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M. et al. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 43, p. 279-283, 1997.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Therapy*, v. 1, p. 133-142, 2003.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D. et al. Electrochemotherapy of tumours. *Radiology and Oncology*, v. 40, n. 3, p. 163-174, 2006.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M., et al. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 34, p. 232-240, 2008.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SILVA, M. D. Desenvolvimento e avaliação de um gerador programável de pulsos monofásicos de campo elétrico para eletroporação. Rio de Janeiro: UFRJ, 2011. 86p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, C. M.; FERREIRA, E.; FERREIRA, M. A. N. D. et al. Kint3-4 protein from human plasminogen delays Ehrlich tumor growth in mice. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, p. 465-472, 2011.

SPYRATOS, F.; FERRERO-POUS, M.; TRASSARD, M. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*, v. 94, n. 8, p. 2151-2159, 2002.

STEWART, H. L. *Transplantable and transmissible tumors of animals*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1959. 378p.

TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A. P. C.; PEREIRA, R. S. et al. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 2, p. 96-102, 2007.

TOZON, N.; KODRE, V.; SERSA, G. et al. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Research*, v. 25, p. 839-846, 2005.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 4 ed. Elsevier: Saunders, 2007. 846p.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>
<b>UFMG</b>	CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<b>CERTIFICADO</b>	
Certificamos que o Protocolo nº. 206 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da eletroquimioterapia sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich", que tem como responsável Roberto Baracat de Araújo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/10/2014. Este certificado espira-se em 23/10/2019.	
<b>CERTIFICATE</b>	
We hereby certify that the Protocol nº. 206 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of electrochemotherapy on Ehrlich solid tumor development", under the supervision of Roberto Baracat de Araújo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/10/2014. This certificate expires in 23/10/2019.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 23/10/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	

## 8.2. Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas de todos os grupos durante todo o experimento

Tabela 3: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 1 (grupo controle) a partir da data da inoculação (20/02/2015).

Grupo	Marcação	20/02/2015 – inoculação (1)	22/02/ 2015	24/02/ 2015 (4)	26/02/ 2015	28/02/ 2015 (8)	02/03/ 2015	04/03/ 2015 (12)	06/03/ 2015	08/03/ 2015 (16)	10/03/ 2015	12/03/ 2015 (20)
		peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)
<b>grupo 1a água de injeção</b>	branco	24,2	25,2	26,6	26,2	26,6	28,8	28,6	29,2	29,8	30,2	30,4
	cabeça	26,0	26,4	26,6	28,2	28,0	28,8	29,6	30,2	30,4	31,4	31,8
	cauda	23,0	23,2	24,0	24,4	24,8	25,4	26,6	26,4	26,6	27,6	27,2
	cabeça/c auda	24,8	25,6	26,4	27,2	27,0	28,0	27,8	29,2	28,4	28,4	27,6
	pata	26,0	27,0	27,6	28,6	28,6	29,4	30,8	32,4	31,6	31,2	31,2
<b>grupo 1b água de injeção</b>	branco	24,6	25,2	25,8	26,6	28,0	28,2	29,0	30,2	30,4	30,2	30,4
	cabeça	25,4	27,0	26,6	28,6	28,4	29,2	30,6	31,6	31,4	30,0	32,0
	cauda	26,4	27,6	28,4	29,2	29,6	30,6	32,4	34,2	34,0	32,8	31,8
	cabeça/c auda	24,2	24,2	24,4	25,2	25,8	25,6	27,0	27,6	27,8	26,8	27,2
	pata	23,2	24,2	26,0	25,8	27,0	28,6	27,4	28,8	29,4	29,8	29,4

Tabela 4: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 1 (grupo controle) a partir da data do tratamento (13/03/2015).

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>14/03/20 15</b>	<b>16/03/20 15 (24)</b>	<b>18/03/20 15</b>	<b>20/03/20 15 (28)</b>	<b>22/03/20 15</b>	<b>24/03/20 15 (32)</b>	<b>26/03/20 15</b>	<b>28/03/20 15 (36)</b>	<b>30/03/20 15 (38)</b>
		peso (g)	peso (g)	peso (g)						
<b>grupo 1a água de injeção</b>	branco	29,2	29,8	32,2	33,0	32,6	31,2	31,0	32,4	33,8
	cabeça	30,0	31,4	33,0	34,6	33,2	32,8	33,0	33,8	34,4
	cauda	27,4	28,6	29,8	29,8	28,8	29,2	30,0	31,4	31,2
	cabeça/cau da	27,6	28,4	29,2	28,6	29,2	29,8	29,8	29,6	30,0
	pata	32,2	33,0	33,8	33,0	32,2	33,8	35,2	36,2	35,0
<b>grupo 1b água de injeção</b>	branco	30,0	30,8	32,6	33,6	32,6	32,0	32,4	34,2	35,6
	cabeça	33,0	34,0	34,0	32,2	33,6	34,0	35,8	34,6	33,8
	cauda	33,6	35,0	38,0	35,8	33,8	34,8	36,4	37,4	38,0
	cabeça/cau da	27,8	28,0	29,4	28,6	28,0	29,0	29,2	30,4	30,8
	pata	29,4	30,4	30,8	31,2	32,4	32,6	30,6	30,4	32,2

Tabela 5: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 2 (grupo bleomicina) a partir da data da inoculação (20/02/2015).

<b>Grupo</b>	<b>Marca- ção</b>	<b>20/02/2015 – inoculação (1)</b>	<b>22/02/2 015</b>	<b>24/02/2 015 (4)</b>	<b>26/02/2 015</b>	<b>28/02/2 015 (8)</b>	<b>02/03/2 015</b>	<b>04/03/2 015 (12)</b>	<b>06/03/2 015</b>	<b>08/03/2 015 (16)</b>	<b>10/03/2 015</b>	<b>12/03/2 015 (20)</b>
		peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)
<b>grupo 2a bleomicina</b>	branco	21,2	22,0	23,2	24,6	25,6	25,2	27,6	27,6	27,4	27,2	28,6
	cabeça	25,2	26,0	27,4	28,4	28,2	27,0	30,4	29,6	30,2	29,0	28,2
	cauda	28,4	30,6	30,2	31,0	33,8	34,4	35,4	33,8	33,6	35,2	37,0
	cabeça /cauda	23,8	25,0	25,6	26,4	27,2	27,8	29,8	29,6	30,0	29,6	29,8
	pata	25,2	26,0	26,0	26,6	28,4	30,0	30,2	29,4	29,4	30,4	31,4
<b>grupo 2b bleomicina</b>	branco	24,4	21,0	23,4	25,0	26,6	28,4	28,2	29,6	30,6	30,8	30,2
	cabeça	24,0	21,0	24,4	26,0	26,2	27,6	29,0	30,4	30,2	29,2	31,0
	cauda	28,6	23,4	26,6	27,8	29,2	30,8	31,6	32,4	31,4	31,8	32,4
	cabeça/c auda	24,8	20,8	24,6	25,4	28,0	28,0	28,8	30,2	30,4	30,0	29,8
	pata	23,0	19,6	22,2	23,4	24,6	25,8	26,6	26,4	27,4	28,0	28,4

Tabela 6: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 2 (grupo bleomicina) a partir da data do tratamento (13/03/2015).

Grupo	Marcação	14/03/201	16/03/201	18/03/201	20/03/201	22/03/201	24/03/201	26/03/201	28/03/201	30/03/201
		5 peso (g)	5 (24) peso (g)	5 peso (g)	5 (28) peso (g)	5 peso (g)	5 (32) peso (g)	5 peso (g)	5 (36) peso (g)	5 (38) peso (g)
<b>grupo 2a bleomicina</b>	branco	29,0	29,6	28,2	28,8	29,2	30,0	29,6	28,8	29,2
	cabeça	29,6	30,2	32,0	30,8	29,6	30,4	30,8	31,8	31,6
	cauda	35,8	34,8	36,2	36,0	36,8	37,0	35,6	37,6	38,2
	cabeça /cauda	30,8	30,2	31,2	31,6	31,6	32,8	33,4	33,0	32,6
	pata	32,6	32,2	32,4	32,6	32,4	34,2	35,2	35,6	34,2
<b>grupo 2b bleomicina</b>	branco	31,0	30,4	31,2	30,8	31,8	32,4	33,8	32,6	32,6
	cabeça	32,6	32,4	32,8	31,8	31,8	34,2	35,2	35,0	34,2
	cauda	33,4	31,8	32,0	31,4	32,0	32,2	33,4	34,6	33,8
	cabeça/caud a	31,0	30,0	30,2	30,0	31,4	30,4	31,0	29,8	30,4
	pata	28,2	27,8	27,6	28,4	28,0	28,6	28,8	28,2	28,2

Tabela 7: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 3 (grupo pulsos elétricos) a partir da data da inoculação (20/02/2015).

Grupo	Marcação	20/02/2015 – inoculação (1)	22/02/ 2015	24/02/ 2015 (4)	26/02/ 2015	28/02/ 2015 (8)	02/03/ 2015	04/03/ 2015 (12)	06/03/ 2015	08/03/ 2015 (16)	10/03/ 2015	12/03/ 2015 (20)
		peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)
<b>grupo 3a pulsos elétricos</b>	branco	23,4	24,8	25,8	25,4	26,8	26,6	27,8	28,0	28,4	28,4	29,4
	cabeça	22,4	22,8	24,8	25,0	25,8	27,8	28,2	29,2	27,6	29,4	30,2
	cauda	28,6	29,6	30,4	30,8	32,0	32,6	33,4	33,4	32,4	33,6	34,6
	cabeça /cauda	23,0	24,4	25,6	26,4	27,8	28,0	29,2	30,2	29,2	30,0	29,6
	pata	25,0	26,2	28,2	27,8	29,2	29,4	29,8	30,6	29,8	31,2	31,2
<b>grupo 3b pulsos elétricos</b>	branco	24,2	25,2	26,0	26,6	27,4	29,0	29,2	29,2	29,8	31,2	30,8
	cabeça	23,6	24,6	25,0	25,0	26,2	28,0	27,0	28,0	28,2	28,8	29,4
	cauda	27,2	27,6	28,0	28,6	28,6	29,4	30,2	29,8	30,4	32,4	32,2
	cabeça/c auda	20,8	21,4	22,6	23,0	24,2	26,0	26,0	25,4	26,0	27,4	27,2
	pata	25,8	26,8	28,2	28,6	28,6	29,6	29,2	28,6	28,4	28,8	28,6

Tabela 8: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 3 (grupo pulsos elétricos) a partir da data do tratamento (13/03/2015).

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>14/03/20 15</b>	<b>16/03/20 15 (24)</b>	<b>18/03/20 15</b>	<b>20/03/20 15 (28)</b>	<b>22/03/20 15</b>	<b>24/03/20 15 (32)</b>	<b>26/03/20 15</b>	<b>28/03/20 15 (36)</b>	<b>30/03/20 15 (38)</b>
		peso (g)	peso (g)	peso (g)						
<b>grupo 3a pulsos elétricos</b>	branco	29,6	30,0	29,8	31,0	31,8	32,2	31,2	31,6	32,4
	cabeça	30,6	29,8	31,0	30,6	32,2	32,6	31,6	33,2	33,6
	cauda	34,0	34,2	34,8	35,0	36,2	35,4	36,0	36,0	36,8
	cabeça /cauda	31,0	32,8	31,8	31,0	31,4	32,4	33,6	33,4	32,8
	pata	32,6	32,4	32,8	32,4	32,4	33,8	33,8	32,8	33,8
<b>grupo 3b pulsos elétricos</b>	branco	30,0	30,6	32,4	33,0	32,8	32,4	32,8	34,0	35,6
	cabeça	28,6	30,0	30,0	31,0	31,8	31,2	30,2	31,6	31,6
	cauda	31,0	30,8	32,0	32,8	33,6	34,6	33,6	34,4	34,2
	cabeça/caud a	27,2	27,6	27,6	27,6	28,0	28,6	29,2	30,2	30,6
	pata	28,6	28,6	29,8	29,2	29,4	30,6	31,8	32,2	31,6

Tabela 9: Peso dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 4 (grupo eletroquimioterapia) a partir da data da inoculação (20/02/2015).

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>20/02/2015 – inoculação (1)</b>	<b>22/02/ 2015</b>	<b>24/02/ 2015 (4)</b>	<b>26/02/ 2015</b>	<b>28/02/ 2015 (8)</b>	<b>02/03/ 2015</b>	<b>04/03/ 2015 (12)</b>	<b>06/03/ 2015</b>	<b>08/03/ 2015 (16)</b>	<b>10/03/ 2015</b>	<b>12/03/ 2015 (20)</b>
		peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)	peso (g)
<b>grupo 4a eletroquimioterapia</b>	branco	23,0	24,2	25,4	27,0	24,4	27,0	28,2	29,0	28,0	29,0	29,8
	cabeça	24,4	25,0	26,2	26,6	24,2	28,2	29,0	28,8	27,6	28,0	29,0
	cauda	22,2	23,6	23,4	24,2	22,4	25,2	26,0	27,2	26,8	25,2	25,4
	pata	27,2	27,6	28,6	28,2	26,0	30,4	31,0	31,6	30,0	30,4	30,4
<b>grupo 4b eletroquimioterapia</b>	branco	24,0	25,8	25,8	26,8	28,4	29,6	28,6	28,8	29,8	31,0	30,8
	cabeça	25,2	25,2	26,4	27,0	28,0	29,2	29,6	30,0	29,8	31,0	31,4
	cauda	26,0	27,4	29,0	27,4	29,4	29,8	30,6	29,8	30,4	31,4	31,6
	cabeça/ cauda	23,2	23,4	24,8	24,4	26,0	26,6	27,2	27,4	28,0	28,4	27,2
	pata	27,4	27,6	30,0	30,4	31,8	30,4	31,4	32,4	33,0	33,4	32,6
	pata/cau da	23,4	23,4	24,2	24,8	25,6	26,2	27,6	25,6	25,4	26,6	27,0

Tabela 10: Peso dos camundongos Swiss fêmeas do grupo 4 (grupo eletroquimioterapia) a partir da data do tratamento (13/03/2015).

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>14/03/2015</b>	<b>16/03/2015</b>	<b>18/03/2015</b>	<b>20/03/2015</b>	<b>22/03/2015</b>	<b>24/03/2015</b>	<b>26/03/2015</b>	<b>28/03/2015</b>	<b>30/03/2015</b>
		<b>5</b>	<b>5 (24)</b>	<b>5</b>	<b>5 (28)</b>	<b>5</b>	<b>5 (32)</b>	<b>5</b>	<b>5 (36)</b>	<b>5 (38)</b>
		peso (g)								
<b>grupo 4a</b> <b>eletroquimioterapia</b>	branco	30,0	29,8	31,2	30,8	31,6	31,2	32,4	32,2	32,8
	cabeça	29,4	29,2	29,4	29,6	29,4	30,8	30,4	30,2	30,6
	cauda	26,4	26,4	26,8	27,0	27,8	27,6	27,8	29,0	30,8
	pata	30,8	30,2	30,4	31,4	32,0	31,6	30,6	31,2	33,6
<b>grupo 4b</b> <b>eletroquimioterapia</b>	branco	31,2	30,2	30,4	30,4	30,8	31,8	32,0	31,2	31,4
	cabeça	31,8	30,2	30,8	30,6	32,6	32,6	33,6	33,2	33,0
	cauda	30,2	29,6	29,6	30,4	31,4	31,8	32,4	32,0	31,6
	cabeça/cauda	27,8	27,6	27,4	27,6	28,4	29,0	28,0	28,0	28,8
	pata	33,4	33,2	34,2	34,4	33,0	32,0	33,6	34,0	35,6
	pata/cauda	26,4	25,8	26,6	26,8	28,0	27,6	28,4	29,2	30,0

### 8.3. Volume do tumor dos camundongos *Swiss* fêmeas de todos os grupos durante todo o experimento

Tabela 11: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 1 (controle) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

Grupo	Marcação	20/02/2015 – inoculação (1)	22/02/2015	24/02/2015 (4)	26/02/2015	28/02/2015 (8)	02/03/2015	04/03/2015 (12)	06/03/2015	08/03/2015 (16)	10/03/2015	12/03/2015 (20)
		Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )
<b>grupo 1a água de injeção</b>	branco	*	*	0,05	0,30	0,52	0,63	0,63	0,73	0,82	1,01	0,68
	cabeça	*	*	*	0,50	0,70	0,37	0,37	0,63	0,68	0,68	0,89
	cauda	*	*	*	0,18	0,23	0,33	0,58	0,63	0,82	0,63	0,76
	cabeça/ cauda	*	*	0,05	0,21	0,37	0,37	0,51	0,63	0,73	0,63	0,68
	pata	*	*	0,05	0,10	0,23	0,68	0,73	0,73	0,89	0,89	1,06
<b>grupo 1b água de injeção</b>	branco	*	*	*	0,08	0,37	0,55	0,51	0,68	0,68	0,63	0,82
	cabeça	*	*	0,08	0,17	0,33	0,37	0,51	0,76	0,63	0,73	0,73
	cauda	*	*	0,13	0,42	0,70	0,73	0,89	0,89	1,01	0,95	1,06
	cabeça/ cauda	*	*	*	0,23	0,23	0,63	0,63	0,76	0,82	0,73	0,89
	pata	*	*	*	0,15	0,42	0,42	0,82	0,82	0,82	0,63	1,06

Tabela 12: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 1 (controle) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

Grupo	Marcação	14/03/2015	16/03/2015 (24)	18/03/2015	20/03/2015 (28)	22/03/2015	24/03/2015 (32)	26/03/2015	28/03/2015 (36)	30/03/2015 (38)
		Volume (cm <sup>3</sup> )								
<b>grupo 1a água de injeção</b>	branco	0,47	*	*	*	*	*	*	*	*
	cabeça	0,47	0,55	0,82	0,55	1,13	0,95	1,36	1,85	1,68
	cauda	0,98	0,68	0,63	0,76	0,98	0,68	1,13	1,01	1,21
	cabeça/cauda	0,82	0,63	0,82	0,82	0,82	0,63	0,98	1,21	0,89
	pata	1,13	1,06	1,13	1,13	1,5	1,74	2,28	3,02	2,81
<b>grupo 1b água de injeção</b>	branco	0,58	0,51	0,63	0,58	0,63	0,51	0,76	0,51	0,82
	cabeça	0,69	0,89	0,63	0,63	0,55	0,51	0,89	0,89	0,95
	cauda	1,06	2,14	2,14	2,14	2,28	3,59	3,78	4,4	5,08
	cabeça/cauda	1,06	0,98	0,51	0,82	0,95	1,64	1,28	1,88	3,02
	pata	1,06	0,33	0,63	0,89	0,63	1,33	1,21	1,88	2,00

Tabela 13: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 2 (bleomicina) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>20/02/2015 – inoculação (1)</b>	<b>22/02/2015</b>	<b>24/02/2015 (4)</b>	<b>26/02/2015</b>	<b>28/02/2015 (8)</b>	<b>02/03/2015</b>	<b>04/03/2015 (12)</b>	<b>06/03/2015</b>	<b>08/03/2015 (16)</b>	<b>10/03/2015</b>	<b>12/03/2015 (20)</b>
		Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )
<b>grupo 2a bleomicina</b>	branco	*	*	*	0,23	0,38	0,38	0,68	0,68	0,82	0,76	0,58
	cabeça	*	*	0,10	0,30	0,51	0,51	0,55	0,68	0,82	0,84	0,95
	cauda	*	*	*	0,50	0,23	0,23	0,31	0,73	1,13	0,82	0,82
	cabeça /cauda	*	*	0,06	0,23	0,28	0,28	1,13	1,13	1,13	1,33	1,50
	pata	*	*	*	0,15	0,15	0,15	1,13	1,33	1,54	1,88	1,74
<b>grupo 2b bleomicina</b>	branco	*	*	*	0,09	0,26	0,26	0,63	0,47	0,55	0,58	0,60
	cabeça	*	*	0,05	0,10	0,33	0,33	0,63	0,89	0,98	1,41	1,13
	cauda	*	*	*	*	0,01	0,01	0,37	0,98	0,82	0,89	1,06
	cabeça/cauda	*	*	*	0,13	0,42	0,42	0,47	0,58	0,63	0,63	0,76
	pata	*	*	0,09	0,17	0,33	0,33	0,51	0,76	0,68	0,68	0,68

Tabela 14: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 2 (bleomicina) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

Grupo	Marcação	14/03/2015	16/03/2015 5 (24)	18/03/2015 5	20/03/2015 5 (28)	22/03/2015 5	24/03/2015 5 (32)	26/03/2015 5	28/03/2015 5 (36)	30/03/2015 5 (38)
		Volume (cm <sup>3</sup> )								
<b>grupo 2a bleomicina</b>	branco	0,69	0,89	0,63	0,63	0,63	0,58	0,55	0,63	0,89
	cabeça	0,82	1,33	1,21	1,24	0,89	1,21	1,13	1,21	1,74
	cauda	1,06	1,33	1,33	2,87	1,33	1,54	1,36	1,88	1,01
	cabeça /cauda	1,88	1,64	2,12	2,55	1,85	2,72	2,41	2,41	2,24
	pata	2,41	2,00	2,55	2,55	2,41	3,02	3,56	3,56	3,48
<b>grupo 2b bleomicina</b>	branco	1,06	0,63	*	*	*	*	*	*	*
	cabeça	1,06	1,64	1,06	1,88	1,33	2,00	2,12	2,00	2,00
	cauda	0,76	1,54	1,42	1,77	1,88	2,68	2,24	3,05	2,55
	cabeça/cauda	1,15	0,82	0,76	0,63	0,51	0,63	0,33	0,23	0,27
	pata	0,51	1,13	1,42	1,21	1,06	0,98	1,06	0,63	1,33

Tabela 15: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 3 (pulsos elétricos) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>20/02/2015 – inoculação (1)</b>	<b>22/02/2015</b>	<b>24/02/2015 (4)</b>	<b>26/02/2015</b>	<b>28/02/2015 (8)</b>	<b>02/03/2015</b>	<b>04/03/2015 (12)</b>	<b>06/03/2015</b>	<b>08/03/2015 (16)</b>	<b>10/03/2015</b>	<b>12/03/2015 (20)</b>
		Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )
<b>grupo 3a pulsos elétricos</b>	branco	*	*	*	0,05	0,05	0,26	0,33	0,82	1,24	1,01	1,24
	cabeça	*	*	*	0,10	0,26	0,47	0,90	1,13	1,54	2,55	2,57
	cauda	*	*	0,05	0,17	0,23	0,51	0,63	0,68	0,79	0,95	0,95
	cabeça/cauda	*	*	*	0,10	0,28	0,76	0,63	0,90	1,42	1,50	1,42
	pata	*	*	*	0,17	0,28	0,37	0,63	0,68	0,89	0,89	0,82
<b>grupo 3b pulsos elétricos</b>	branco	*	*	*	0,15	0,38	0,33	0,58	0,47	0,63	0,89	0,76
	cabeça	*	*	0,05	0,21	0,26	0,23	0,47	0,47	0,51	0,89	0,82
	cauda	*	*	0,06	0,15	0,31	0,51	0,51	0,59	0,82	0,73	0,71
	cabeça/cauda	*	*	*	0,04	0,33	0,51	0,68	0,63	0,68	0,98	1,06
	pata	*	*	0,08	0,15	0,26	0,68	0,68	0,55	0,82	0,89	1,33

Tabela 16: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 3 (pulsos elétricos) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>14/03/2015</b>	<b>16/03/2015 (24)</b>	<b>18/03/2015</b>	<b>20/03/2015 (28)</b>	<b>22/03/2015</b>	<b>24/03/2015 (32)</b>	<b>26/03/2015</b>	<b>28/03/2015 (36)</b>	<b>30/03/2015 (38)</b>
		Volume (cm <sup>3</sup> )								
<b>grupo 3a pulsos elétricos</b>	branco	1,24	2,14	1,33	1,77	2,24	3,02	4,61	4,16	6,08
	cabeça	2,41	3,02	3,97	3,56	3,97	3,78	6,33	6,59	7,84
	cauda	0,89	1,13	1,28	1,13	1,21	1,01	1,74	1,85	1,95
	cabeça /cauda	2,28	1,59	2,24	2,24	2,00	2,68	3,56	3,18	4,16
	pata	1,54	1,13	1,01	1,42	1,85	1,74	2,12	2,00	2,36
<b>grupo 3b pulsos elétricos</b>	branco	1,24	1,24	1,13	1,06	2,12	1,88	2,00	2,41	3,39
	cabeça	1,06	0,82	0,76	0,82	1,24	1,64	1,74	2,28	1,85
	cauda	1,13	0,69	0,82	1,42	1,64	1,85	2,87	3,02	3,56
	cabeça/cauda	1,21	1,36	1,21	1,74	1,50	2,36	2,81	3,73	4,16
	pata	1,13	1,28	1,64	1,68	1,74	1,85	1,95	3,08	2,95

Tabela 17: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 4 (eletroquimioterapia) a partir da data da inoculação (20/02/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

Grupo	Marcação	20/02/2015 – inoculação (1)	22/02/ 2015	24/02/ 2015 (4)	26/02/ 2015	28/02/ 2015 (8)	02/03/ 2015	04/03/ 2015 (12)	06/03/ 2015	08/03/ 2015 (16)	10/03/ 2015	12/03/ 2015 (20)
		Volume (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )	Volum e (cm <sup>3</sup> )
<b>grupo 4a</b> <b>eletroquimioterapia</b>	branco	*	*	*	0,15	0,26	0,33	0,68	0,89	0,95	1,33	1,13
	cabeça	*	*	*	0,13	0,30	0,42	0,33	0,55	0,55	0,68	0,82
	cauda	*	*	*	0,05	0,05	0,05	0,17	0,31	0,40	0,47	0,55
	pata	*	*	*	0,23	0,23	0,28	0,40	0,40	0,68	0,68	0,63
<b>grupo 4b</b> <b>eletroquimioterapia</b>	branco	*	*	*	0,15	0,17	0,37	0,37	0,40	0,37	0,40	0,47
	cabeça	*	*	*	0,05	0,05	0,05	0,05	0,31	0,37	0,55	0,55
	cauda	*	*	0,06	0,30	0,33	0,63	0,89	1,10	0,82	1,10	1,06
	cabeça/ cauda	*	*	*	0,17	0,28	0,55	0,79	0,73	0,84	0,79	1,21
	pata	*	*	*	0,05	0,05	0,05	0,31	0,63	0,63	0,68	0,95
	pata/cau da	*	*	*	0,13	0,21	0,23	0,37	0,47	0,37	0,63	0,17

Tabela 18: Volume dos tumores dos camundongos *Swiss* fêmeas do grupo 4 (eletroquimioterapia) a partir da data do tratamento (13/03/2015). O asterisco representa tumor não mensurável.

<b>Grupo</b>	<b>Marcação</b>	<b>14/03/2015</b>	<b>16/03/2015 5 (24)</b>	<b>18/03/2015 5</b>	<b>20/03/2015 5 (28)</b>	<b>22/03/2015 5</b>	<b>24/03/2015 5 (32)</b>	<b>26/03/2015 5</b>	<b>28/03/2015 5 (36)</b>	<b>30/03/2015 5 (38)</b>
		Volume (cm <sup>3</sup> )								
<b>grupo 4a eletroquimioterapia</b>	branco	1,64	1,54	1,64	1,54	1,21	2,12	2,41	2,87	3,02
	cabeça	0,73	0,82	0,89	0,89	0,69	0,95	0,98	0,68	1,13
	cauda	1,24	1,64	1,06	0,63	0,38	0,21	*	*	*
	pata	0,68	1,64	1,42	0,89	0,68	0,76	0,58	0,30	*
<b>grupo 4b eletroquimioterapia</b>	branco	1,33	1,64	1,33	1,13	1,06	1,33	0,76	0,76	0,89
	cabeça	0,40	0,63	0,89	0,68	0,73	1,01	1,01	0,95	1,13
	cauda	0,89	1,33	1,21	1,33	1,42	1,24	1,44	0,82	0,76
	cabeça/cauda	0,95	1,85	2,12	2,24	2,12	2,47	2,59	2,81	3,02
	pata	0,82	1,13	1,24	1,13	1,33	1,06	0,95	1,06	1,06
	pata/cauda	0,63	0,51	0,42	0,82	0,52	0,33	0,27	*	0,27

## 8.4. Produtividade no período do mestrado

### 8.4.1. Atividades e produção científica relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia

- Aluna no Curso de Eletroquimioterapia promovido pela Vet Câncer – Oncologia e Patologia Animal, São Paulo, concluído em 15 de março de 2014, totalizando 80 horas.
- Coautoria do trabalho intitulado “Eletroquimioterapia e cirurgia no tratamento de carcinoma de células escamosas em cão: Relato de caso” apresentado na forma de pôster no 41° CONBRAVET, Gramado, no período de 7 a 10 de agosto de 2014.
- Palestrante no III Curso de atualização em oncologia de cães e gatos, com palestra de tema “Carcinoma de células escamosas e eletroquimioterapia em cães e gatos”, Belo Horizonte, 29 de outubro de 2014, totalizando 1 hora.
- Ouvinte no I Encontro Brasileiro de Eletroquimioterapia Veterinária, São Paulo, em 14 de dezembro de 2014.
- Palestrante no Programa de Extensão da Faculdade Pitágoras, com palestra de tema “Eletroquimioterapia”, Betim, 21 de outubro de 2015, totalizando 2 horas.

### 8.4.2. Atividades e produção científica não relacionadas à pesquisa com eletroquimioterapia

- Coautoria do artigo intitulado “Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors” publicado na revista *Advances in Breast Cancer Research*, 2014.
- Ouvinte no 1° Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, Botucatu, no período de 21 a 23 de março de 2014, totalizando 17 horas.
- Coautoria e apresentação do trabalho intitulado “Diagnosis, treatment, and overall survival of a canine gastrointestinal stromal tumor” na forma de pôster no 1° Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, Botucatu, no período de 21 a 23 de março de 2014.
- Coautoria do trabalho intitulado “Neuropatia periférica do nervo trigêmeo paraneoplásica ao linfoma canino – Relato de caso” apresentado na forma de pôster no 35° Congresso Brasileiro da Anclivepa, Belo Horizonte, 2 de maio de 2014.
- Coautoria do trabalho intitulado “Neuropatia periférica facial associada ao linfoma canino multicêntrico – Relato de caso” apresentado na forma de pôster no 41° CONBRAVET, Gramado, no período de 7 a 10 de agosto de 2014.
- Coautoria do artigo intitulado “Surgical stress and postoperative complications related to regional and radical mastectomy in dogs” publicado na revista *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2015.
- Coautoria do trabalho intitulado “Quimioterapia metronômica associada ao mavacoxibe em cães” apresentado na forma de pôster no 36° Congresso Brasileiro da Anclivepa, Porto Seguro, no período de 20 a 22 de maio de 2015.
- Ouvinte no 3° Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, Belo Horizonte, no período de 20 a 23 de julho de 2015.
- Coautoria do trabalho intitulado “Heterogeneidade do exon 11 do gene C-KIT durante a progressão de mastocitoma canino – Relato de caso” apresentado na forma de pôster no 3° Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, Belo Horizonte, no período de 20 a 23 de julho de 2015.