

GABRIELA RODRIGUES

**Eletroquimioterapia para tratamento de câncer –
desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos
portadores de melanoma B16F10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: João Dias de Toledo Arruda Neto

Colaboradores: Elizabeth Cristina Pérez
Hurtado

São Paulo
2014

RESUMO

RODRIGUES, G. **Eletroquimioterapia para tratamento de câncer – desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10 2014.** 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neoplasias são proliferações anormais, excessivas e autônomas do tecido. O melanoma é uma neoplasia maligna de grande pleomorfismo, com variações nos padrões de crescimento e taxa de resposta à quimioterapia relativamente baixa. A aplicação de pulsos elétricos aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando a passagem de drogas quimioterápicas, aumentando assim sua eficácia no tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do melanoma ao tratamento com eletroquimioterapia. No Instituto de Física da Universidade de São Paulo foi desenvolvido um aparelho eletroporador, possibilitando a aplicação de 8 pulsos elétricos de 1000V/cm com duração de 100 μ s e frequência de 1 Hz e 5 kHz.

Foi realizado um estudo experimental com 80 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 separados em 16 grupos com 5 animais cada, divididos em grupo tratado com uma aplicação de Bleomicina intratumoral, tratado com uma aplicação de eletroporação, tratado com uma aplicação de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia), tratado com duas aplicações de eletroporação com intervalo de três dias entre as aplicações, tratado com duas aplicações de Bleomicina, tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia e seus respectivos controles. As células de melanoma B16 foram inoculadas no dorso de camundongos e o crescimento da massa tumoral foi medido diariamente. Avaliou-se a histologia tumoral, o número de mitoses, a contagem de microvasos pelo marcador 1A4 e o número de mastócitos através da marcação com anticorpo Triptase. Os animais do grupo tratado com uma aplicação de eletroquimioterapia apresentaram média de sobrevida cerca de 2,3 vezes maior que os animais do grupo controle. Nos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia observou-se remissão total do tumor em 60% dos casos e remissão parcial nos demais, com retorno do crescimento após 12 dias de tratamento. Esse grupo apresentou sobrevida 4,5 vezes maior que o controle. Não foi observada diferença na sobrevida dos grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroporação e Bleomicina com os respectivos controles. Observou-se diminuição do número de mitoses nos grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia e redução do número de mastócitos nos grupos tratados com duas aplicações de eletroporação e eletroquimioterapia. Esses resultados indicam a eficácia do aparelho (desenvolvido pelo grupo) e do tratamento estudado.

Palavras-chave: Câncer. Quimioterapia. Eletroporação. Bleomicina.

ABSTRACT

RODRIGUES, G. **Electrochemotherapy for cancer treatment - Development and Evaluation Case Study in Mice with melanoma B16F10**. 110 p. Thesis (PhD in biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neoplasms represent abnormal, excessive, intentional and autonomous proliferations of tissue. Melanoma is a malignant neoplasm with huge pleomorphism with variations in the standards of growth, as well as in the relatively low response rate to chemotherapy. The use of electric pulses increases the permeability of cell membrane, which facilitates the access of chemotherapy drugs and improves the efficiency of the treatment. The goal of the present research was to evaluate the response of murine melanoma to electro-chemotherapy. The electro-pulse device was developed in the Physics Institute of the University of São Paulo, being able to deliver eight 1000 V/cm electric pulses (width of 100 μ s) with frequencies of 1 Hz and 5 kHz. The experiment was carried out using a population of 80 female C57BL/6 mice, which was split into 16 groups of five animals each. The groups were separated between treated and control groups with the former being differentiated by the following procedures: (1) a single intra-tumor bleomycin application, (2) a single electroporation application, (3) a single electroporation application associated with the use of bleomycin chemotherapy (electro-chemotherapy), (4) two consecutive electroporation applications separated by a three day time interval, (5) two consecutive bleomycin applications, (6) two consecutive electro-chemotherapy applications, and (7) the respective control groups.

The B16 melanoma cells were inoculated on the dorsum of mice with the growth of the respective tumors being measured in a daily basis. The analysis included the evaluation of: (1) tumor histology, (2) number of mitoses, (3) counting of micro vessels by the 1A4 marker, and (4) the number of mast cells using the tryptase antibody marker. The average survival of the animals treated with a single electro-chemotherapy was approximately 2.3 times higher than the one observed for the control group.

For the animals treated with two electro-chemotherapy applications it was observed a total (partial) remission of the tumor in 60 (40)% of the cases up to the twelfth day of treatment when the tumors resume their growth. This specific group presented a survival 4.5 times higher than the control. No significant difference was observed between the survival of the groups treated with one and two electroporation application and one and two bleomycin application with their respective controls.

A decrease in the number of mitoses in the groups treated with one and two electro-chemotherapy and a reduction in the number of mast cells in the groups treated with two electroporation and electro-chemotherapy applications were observed. These results indicate the efficiency of the device (developed by the group), as well as in the proposed method developed for murine melanoma treatment.

Key words: Cancer. Chemotherapy. Electroporation. Bleomycin.

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia é uma doença frequente na saúde dos indivíduos. Tem-se verificado nos últimos anos inúmeros avanços no conhecimento do mecanismo de sua formação, sua prevenção e tratamento (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

A industrialização e a progressiva mudança do homem dos campos para as cidades têm sido acompanhadas do aumento da exposição do homem a uma crescente lista de agentes com potencial mutagênico e carcinogênico. Esses fatores explicam a crescente incidência de câncer no mundo e no Brasil. Os cânceres representam a segunda causa isolada de mortalidade (CHAMMAS, 2013).

O termo neoplasia significa “novo crescimento” e resulta de uma alteração no crescimento celular. Dessa alteração, ocorre proliferação celular anormal excessiva, intencional e autônoma, que continua indefinidamente apesar dos estímulos ou efeitos desse crescimento nos tecidos adjacentes. Essas células que se proliferam desordenadamente e sem controle se assemelham, em grau variado, às células normais das quais se originaram, tanto morfológica quanto funcionalmente. Qualquer neoplasia, benigna ou maligna, é denominada tumor, enquanto que para neoplasias malignas o termo câncer é comumente empregado (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

As diversas neoplasias têm propriedades comuns que as distinguem das demais classes de lesão. Entretanto, diferenças de comportamento biológico, morfológico e clínico tornam muito úteis sua divisão em neoplasias benignas ou malignas, sendo importante reconhecer que tais diferenças são, por vezes, muito tênues, daí o conceito de lesões limítrofes que abriga uma série de alterações morfológicas em diferentes tecidos, cujos fenótipos não são suficientemente explícitos para a categorização da neoplasia (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias malignas são, genericamente, conhecidas como câncer, apresentando capacidade de crescimento invasivo e de disseminação por vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivendo e crescendo como novas lesões em linfonodos ou órgãos distantes, caracterizando as metástases (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias benignas tendem a se apresentar como massas teciduais de crescimento lento e expansivo, comprimindo e não propriamente infiltrando o tecido vizinho. Assumem, assim, aspecto circunscrito, capsulado ou pseudocapsulado, com limites claramente identificados. Por outro lado, as neoplasias malignas tendem a evoluir com crescimento

rápido, com marcação potencial para infiltrar o tecido vizinho e mesmo os vasos linfáticos, sendo as metástases uma de suas características mais marcantes (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias benignas não estão, geralmente, associadas à necrose ou hemorragia, devido às suas características de crescimento expansivo, habitualmente lento. Já as neoplasias malignas apresentam crescimento infiltrativo muitas vezes destrutivo. Tais aspectos, adicionados ao rápido crescimento nem sempre acompanhados por suprimento sanguíneo equivalente, induzem a formação de zonas de necrose intratumoral (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

Cânceres são doenças da expressão descontrolada de genes. O aumento da incidência da doença pode ser explicado, em parte, pela exposição crescente do homem a agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos. Alterações físicas do genoma, eventualmente em razão do acaso ou estimuladas por infecções de patógenos específicos ou condições inflamatórias persistentes, ressaltam a importância da estabilidade do genoma como chave para o desenvolvimento dos tumores (CHAMMAS, 2013).

O câncer decorre da indução de mutações no genoma celular que controla a divisão mitótica, a diferenciação e a apoptose celular. Essas mutações podem ser devido a erros espontâneos na replicação do DNA (indicando translocações cromossômicas), radiações, carcinógenos químicos e vírus oncogênicos. Essas alterações genéticas podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente em consequência de processos endógenos ou da exposição aos vários fatores ambientais (WITHROW; VAIL, 2007).

Normalmente há um equilíbrio entre proliferação celular, diferenciação e apoptose. As células normais têm capacidade proliferativa limitada; após inúmeras divisões o processo de decodificação interrompe e controla a multiplicação. As células neoplásicas não respondem aos mecanismos que inibem o crescimento e a divisão celular. São caracterizados mais de 2000 genes envolvidos no controle da proliferação celular, sendo eles os proto-oncogenes (oncogenes), os genes supressores de tumor e os de reparo do DNA (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

Existem características comuns em cânceres que podem ser divididas didaticamente em capacidades intrínsecas à célula tumoral e extrínsecas à célula tumoral. As intrínsecas incluem a capacidade de autorrenovação ilimitada, proliferação autônoma, resistência a fatores anti-proliferativos, evasão à morte celular, evasão de mecanismos de defesa imune, alterações metabólicas adaptativas e instabilidade genômica. As capacidades extrínsecas à

célula tumoral incluem a indução persistente de angiogênese, modificação do microambiente tecidual, evasão da resposta imune específica aos tumores, modulação da resposta inflamatória e de reparo tecidual e cooptação de células desse microambiente nos processos de invasão e metástase (CHAMMAS, 2013).

As neoplasias malignas variam em sua velocidade de crescimento, ao contrário dos tumores benignos. Quase todas as neoplasias malignas são invasivas e, progressivamente, substituem o parênquima normal circunjacente ao órgão afetado. Seguem um padrão aleatório e incoordenado, em que pequenos ninhos de células tumorais irrompem da massa principal podendo invadir tecidos circunjacentes, como vênulas e vasos linfáticos. No lúmen vascular, a célula tumoral pode sofrer interação com as plaquetas, transformando-se em microêmbolos de células tumorais. Estes podem ser transportados pelo sangue ou linfa para outros órgãos. Essa disseminação é denominada metástase (JONES; HUNT; KING, 2000).

Para que ocorra a metástase são necessárias alterações genéticas cumulativas nas células que desencadeiam um processo microinvasivo, caracterizado pela capacidade de migração disfuncional e pelo poder de sobrevivência dessas células em microambientes diferentes do original (WITHROW; VAIL, 2007).

A expansão do tecido tumoral ocorre por angiogênese sustentada, sendo possível o aporte de O₂ e nutrientes. A neovascularização garante a nutrição tumoral e permite o efluxo de células neoplásicas do tumor primário para a circulação (CHAMMAS, 2013).

O câncer é uma doença genética que decorre de múltiplas mutações que se acumulam no genoma. As células neoplásicas adquirem capacidades que interferem na fisiologia celular normal, como auto-suficiência para fatores de crescimento, insensibilidade para elementos inibitórios de proliferação, evasão de apoptose, potencial replicativo infinito, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

O melanoma é um tumor maligno das células produtoras de melanina. Os melanócitos (células produtoras de melanina) têm origem embriológica na crista neural. No início da vida embrionária, essas células migram para outras posições no corpo, particularmente a pele, onde irão produzir melanina. Esse pigmento penetra em células de outros tecidos adjacentes ao melanócito; devido a isso, os tumores dessas células são comuns em pele, mas podem originar-se em qualquer outro lugar (JONES; HUNT; KING, 2000).

Os melanomas ocorrem com frequência variável na maioria das espécies e a característica fundamental dos melanomas é o grande pleomorfismo e variação dos padrões de crescimento e grau de pigmentação das células neoplásicas (JONES; HUNT; KING, 2000).

O melanoma é uma doença agressiva. Frequentemente ocorre acometimento local e distante nos casos em que não há abordagem terapêutica eficaz. Para estágios iniciais da doença, o prognóstico é favorável, sendo que com tratamento cirúrgico (excisão agressiva) observa-se uma boa probabilidade de cura. Mas, para estágios avançados, apesar de cirurgia, radioterapia ou tratamentos sistêmicos, o prognóstico é desfavorável. Em alguns casos em que ocorrem metástases, a cirurgia não pode ser realizada e o tratamento de escolha é a radioterapia. A toxicidade deste tratamento varia de leve (eritema, descamação) a severa (ulceração, atrofia), produzindo sequelas cosméticas ou funcionais (MENÉNDEZ et al., 2009). A vulnerabilidade dos tecidos normais a esse método limita sua eficácia, tendo em vista que esse tumor tem sido considerado relativamente radiorresistente, e dessa forma a radioterapia é comumente usada de forma paliativa nos tumores inoperáveis (TESTORI et al., 2009).

A quimioterapia é amplamente utilizada no tratamento de diversos tumores malignos, porém a taxa de resposta é baixa; para melanoma, a resposta parcial é de 20% a 45%, enquanto que para remissão completa é menor que 5%. (BUZAID; MURREN, 1992). Uma das possíveis razões para essa baixa resposta deve-se à dificuldade de algumas drogas em atravessar a membrana celular e atingir o sítio de ação intracelular. A membrana celular oferece uma barreira que reduz a eficiência delas (SATKAUSKAS et al., 2005)

Pulsos elétricos podem ser usados para aumentar a permeabilidade celular de maneira temporária e reversível. Essa forma de eletropermeabilização é chamada de eletroporação. Essa técnica é atualmente utilizada para a inserção de marcadores moleculares nos tecidos, fusão de células nos tecidos, aumentar a taxa de absorção celular a certas drogas e facilitar a inserção de genes e anticorpos monoclonais nas células (SATKAUSKAS et al., 2005).

O uso de pulsos elétricos para aumentar a exposição das células aos agentes quimioterápicos é denominado de eletroquimioterapia. Atualmente esse método é usado para aumentar a efetividade de drogas não permeáveis como a bleomicina (HELLER et al., 1996a).

A bleomicina é uma potente molécula citotóxica quando no interior das células. Entretanto, ela não é livremente difundida pela membrana plasmática, tendo limitado acesso ao citoplasma. Normalmente ela entra nas células através da interação com as proteínas de membrana, e sua ação citotóxica depende da presença ou ausência dessas proteínas de membrana; devido a isso, a bleomicina é um agente anti-tumoral limitado. A eletroporação das células, bem como dos tecidos, permite a entrada direta da bleomicina no citoplasma; com isso, essa droga é um excelente agente citotóxico quando combinado com eletroporação.

Devido à sua dificuldade em penetrar nas células, seu efeito tóxico no organismo sadio é menor (DOMENGE et al., 1998; MIR; ORLOWSKI, 1999).

Um resultado efetivo do tratamento depende da concentração da droga no local do tumor no momento da administração do pulso elétrico. Quando a bleomicina é administrada pela via endovenosa, uma pobre vascularização tumoral ou circulação sanguínea deficiente pode prejudicar o transporte da droga para o local (HELLER et al., 1998). Entretanto, a concentração de bleomicina no local pode ser aumentada utilizando aplicação da droga intratumoral ou peri-tumoral, dessa forma eliminando a influência negativa dos problemas de vascularização e diminuindo os efeitos colaterais toxicológicos da droga (MIR et al., 1998). Quando não ocorre distribuição homogênea da droga, por via intratumoral, a resposta ao tratamento pode ser prejudicada (RANGEL, 2011).

Este estudo visa utilizar a eletroporação associada à quimioterapia para o tratamento de melanoma induzido em camundongos. Com isso, espera-se que ocorra aumento do efeito deletério da bleomicina nas células tumorais. De fato, sabe-se que a eletroporação facilita a passagem da bleomicina pela membrana celular.

Utilizando essas técnicas de tratamento associadas acredita-se que os efeitos deletérios às células tumorais sejam aumentados, enquanto que os efeitos colaterais sejam minimizados devido ao fato de que a bleomicina precisa estar dentro das células para causar efeitos tóxicos e é uma droga pouco permeável à membrana, o que dificulta sua passagem para o interior das células; quando combinada com pulsos elétricos, penetra nas células, sendo efetiva contra uma variedade de tumores (HELLER et al., 1998).

A hipótese desse estudo de minimizar os efeitos colaterais, observados em quimioterapia, e controlar ou diminuir a evolução tumoral do melanoma, sugere a oportunidade de um tratamento efetivo e com **menores danos colaterais** quando comparado aos tratamentos convencionais já utilizados.

6 CONCLUSÕES

O aparelho eletroporador desenvolvido pelo grupo apresentou as características necessárias ao objetivo proposto. Facilitou a entrada da bleomicina nas células, o que resultou em uma excelente resposta no controle do desenvolvimento tumoral.

A eficiência de aplicações seriadas de eletroquimioterapia observada em melanoma revela uma ótima proposta de terapia em tumores sólidos com alto grau de malignidade.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; DeMELLO, E. S.; LONGATO FILHO, A. Noções Básicas de Patologia e Imunoistoquímica. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 9 – 20.
- BELFORT, F. A.; SCHMERLING, R. A. Melanoma Cutâneo. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 2367 – 2383.
- BICEK, A. et al. Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. **Bioelectrochem.**, v. 71, n. 2, p. 113-117, 2007.
- BUZAID, A. Z.; MURREN, J. Chemotherapy for advanced malignant melanoma. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 21, p. 205-209, 1992.
- BYRNE, C. M. et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). **Melanoma Res.**, v. 15, n. 1, p. 45 – 51, 2005.
- CAMPOS, V. E. B. Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- CEMAZAR, M. et al. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 826 – 831, 2008.
- CHAMMAS, R. Biologia do cancer: uma breve introdução. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 3 – 7.
- CHIN, L.; MERLINO, G.; DEPINHO, R. A. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. **Gene. Dev.**, v. 12, p. 3467-3481, 1998.
- CH'NG, S. et al. Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern Pathol.**, v. 19, p. 149–159, 2006.
- COR, A. et al. Comparison between hypoxic markers pimonidazole and glucose transporter 1 (Glut-1) in murine fibrosarcoma tumours after electrochemotherapy. **Radiol. Oncol.**, v. 43, n. 3, p. 195-202, 2009.
- COROVIC, S.; ZUPANIC, A.; MIKLAVCIC, D. Numerical modeling and optimization of electric field distribution in subcutaneous tumor treated with electrochemotherapy using needle electrodes. **Ieee T. Plasma Sci.**, v. 36, n. 4, p. 1665 – 1672, 2008.

COUSSENS, L. M. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1382-1397, 1999.

DALECK, C. R.; DeNARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Rocca, 2008. 612 p.

DAVAR, D.; TARHINI, A.; KIRKWOOD, J. M. Adjuvant therapy: melanoma. **Cancer J.**, v. 18, n. 2, p. 192–202, 2012.

DIAS, S. J. R.; CAIADO, F. Vasculogênese na Angiogênese. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 395 – 402.

DOMENGE, C. et al. Antitumor Electrochemotherapy: New Advances in the Clinical Protocol. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 956 – 963, 1996.

DOSS, L. L.; MEMULA, N. The radioresponsiveness of melanoma. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 8, p. 1131-1134, 1982.

ENTIN, I. et al. Tumor Growth Retardation, Cure, and Induction of Antitumor Immunity in B16 Melanoma-bearing Mice by Low Electric Field-enhanced Chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 3190-3197, 2003.

GARBE, C. et al. Treatment of Melanoma. **Dtsch Arztebl.**, v. 105, n. 49, p. 845–851, 2008.

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

GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supra-electroporation. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 349, n. 2, p. 643 – 653, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

GUZOVSKY, E. M. Análise de alterações histopatológicas e celulares em tecidos de camundongos C57BL/6J inoculados com células de melanoma experimental B16F10 por via subcutânea e tratados com o imunomodulador Imiquimod 5%. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646 – 674, 2011.

HELLER, R. et al. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 964-971, 1996a.

HELLER, R. et al. In vivo gene electro- injection and expression in rat liver. **FEBS Lett.**, v. 389, n.3, 225-228, 1996b.

HELLER, R. et al. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. **Cancer**, v. 83, n. 1, p. 148-157, 1998.

HENRY, C. J.; HIGGINBOTHAM, M. L. **Cancer management in small animal practice**. Missouri: Saunders Elsevier, 2010, 403 p.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Pele Melanoma. São Paulo. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>. Acesso em: 10 set 2014.

JAROSZESKI, M. J. *et al.* Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. **Anti-cancer Drug**, v. 11, n. 3, p. 201-208, 2000.

JONES, T.C ; HUNT, R.D. ; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415 p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

JUNQUEIRA JUNIOR, G. Tamoxifeno no tratamento do melanoma murinho B16F10 em camundongos C57BL/6N. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

JUNQUEIRA JUNIOR, G. et al. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 72, p. 487-489, 1997.

KANDUSER, M.; SENTJURC, M.; MIKLAVCIC, D. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. **Eur. Biophys. J.**, v. 35, p. 196 – 204, 2006.

KRAMAR, P.; MIKLAVCIC, D.; MACEK LEBAR, A. Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 23 – 27, 2007.

LANORE, D.; DULPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 228 p.

LEBOIT, P. E.; BURG, G.; WEEDON, D.; SARASAIN, A. (Eds.). **World Health Organization Classification of Tumours**. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC, 2006.

LODISH, H. *et al.* **Molecular cell biology**. 6. ed. Nova York: Palgrave Macmillan, 2008, 970 p.

MENÉNDEZ, P. R. *et al.* BNCT for skin melanoma in extremities: Updated Argentine clinical results. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 67, n. 7, p. S50-S53, 2009.

MIKLAVCIC, D. *et al.* The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. **Biophys. J.**, v. 74, n. 5, p. 2152-2158, 1998.

MIR, L. M. *et al.* First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. **Br. J. Cancer.**, v. 76, n. 12, p. 1617–1622, 1997.

MIR, L. M. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **Br. J. Cancer**, v. 77, n.12, p. 2336-2342, 1998.

MIR, L. M.; ORLOWSKI, S. Mechanisms of electrochemotherapy. **Adv. Drug Deliver Ver.**, v. 35, n. 1, p. 107 – 118, 1999.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2007, 300 p.

OKUNO, E. *et al.* **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982, 490 p.

ORLOWSKI, S.; MIR, L. M. Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1154, n. 1, p. 51-63, 1993.

PUC, M. *et al.* Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 113 – 124, 2004.

RANGEL, M. M. M. Interferência da eletroporação sobre a expressão de conexinas. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Departamento de Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

RIBATTI, D. *et al.* Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 33, p. 420–425, 2003.

SALDIVA, P. H. N. Câncer e Meio Ambiente. In: HOFF, P. M. G. *et al.* **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 111 – 118.

SATKAUSKAS, S. et al. Effectiveness of tumor electrochemotherapy as a function of electric pulse strength and duration. **Bioelectrochemistry**, v. 65, n. 2, p. 105-111, 2005.

SERSA, G. et al. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. **Bioelectroch. Bioener.**, v. 35, p. 23-27, 1994.

SERSA, G. et al. Tumour Blood Flow Changes Induced by Application of Electric Pulses. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 4, p. 672-677, 1999.

SERSA, G. et al. Electrochemotherapy in treatment of tumours. **EJSO-Eur. J. Surg. Onc.**, v. 34, p. 232-240, 2008a.

SERSA, G. et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. **Br. J. Cancer.**, v. 98, p. 388-98, 2008b.

SNOJ, M. et al. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy. **Croat. Med. J.**, v. 48, n. 3, p. 391-395, 2007.

SOLTYS, D. T. et al. Instabilidade Genômica, Reparos de DNA e Câncer. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 2 v. p. 169 – 184.

SOUSA, R. B.; CUNHA, F. Q. Inflamação e Câncer. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 2 v. p. 431 – 446.

SPATZ, A. et al. The biology of melanoma prognostic factors. **Discov. Med.**, v. 10, n. 50, p. 87-93, 2010.

STAQUICINI, F. I. et al. Enzyme and integrin expression by high and low metastatic melanoma cell lines. **Melanoma Res.**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2003.

STEEL, G. G. **Growth kinetics of tumor** – cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Oxford: Claredon, 1977, 351 p.

TAKANO, D. M.; ABREU E LIMA, M. C. Estudo de distribuição e morfologia dos melanócitos em pele com e sem exposição solar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.46, n.1, p. 29-36, 2010.

TESTORI, A. et al. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. **Ann. Oncol.**, v. 20, n. 6, p. vi22–vi29, 2009.

TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. **Biophys. J.**, v. 60, p. 297-306, 1991.

VONGTAMA, R. et al. Efficacy of radiation therapy in the local control of desmoplastic malignant melanoma. **Head Neck.**, v. 25, n. 6, p. 423-428, 2003.

VRIES, E.; COEBERGH, J.W. Cutaneous malignant melanoma in Europe. **Eur. J. Cancer**, v. 40 n.16, p. 2355-2366, 2004.

WERLING, R. W. et al. Immunohistochemical distinction of invasive from non-invasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 27, n.1, p. 82-90, 2003.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2007, 846 p.