



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Faculdade de Medicina da Bahia

Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

A Utilização da Corrente Elétrica Alternada no Tratamento do Câncer

Ernesto Manoel Reis dos Santos

**Salvador (Bahia),
Março, 2013**

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Santos, Ernesto Manoel Reis dos

S237 A utilização da corrente elétrica alternada no tratamento do câncer/ Ernesto Manoel Reis dos Santos. Salvador: 2013.

vi; 30 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Fontes Baptista.

Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.

1. Câncer - tratamento. 2. Eletroterapia. I. Baptista, Abrahão Fontes. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU - 616-006.6-089



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

A Utilização da Corrente Elétrica Alternada no Tratamento do Câncer

Ernesto Manoel Reis dos Santos

Professor orientador: **Abrahão Fontes Baptista**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60, e como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

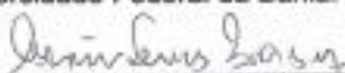
**Salvador (Bahia),
Março, 2013**

Monografia: *A Utilização da Corrente Elétrica Alternada no Tratamento do Câncer*, de **Ernesto Manoel Reis dos Santos**.

Professor orientador: **Abrahão Fontes Baptista**

COMISSÃO REVISORA

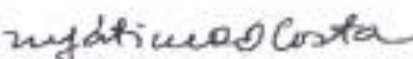
- **Abrahão Fontes Baptista** (Presidente), Professor Orientador. Professor Adjunto II do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

- **Songeli Menezes Freire**, Prof. Adjunto de Bioética e de Biossegurança, do Depto. de Ciências da Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde.

Assinatura: 

- **Maria de Fátima Dias Costa**, Professora Titular do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

- **Angela Gomes de Vasconcellos**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pósgraduação em Medicina e Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

Membro suplente

Jose Marcos Ponde Fraga Lima, Professor Assistente Nível 1 do Departamento de Neurociências e Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no IV Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2013.

“Se vai tentar, vá até o fim.
Caso contrário, sequer comece.”
Charles Bukowski

EQUIPE

❖ **ERNESTO MANOEL REIS DOS SANTOS**, Acadêmico de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Informações para contato: Rua Praia da Cananéia, QE08, LT01, Vilas do Atlântico, Lauro de Freitas (Bahia), Brasil. Correio-e: emrsantos90@yahoo.com.

❖ **ABRAHÃO FONTES BAPTISTA**, Professor orientador. Professor Adjunto II do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Recursos próprios do Professor orientador;
- Recursos próprios do Graduando.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço aos meus pais, Maria e Pedro, que, pelo amor e carinho, me forneceram instrumentos para eu chegar até aqui;
- Agradeço aos meus tios, Marlene e Gerson, que, pelo apoio e carinho, me forneceram oportunidades para eu chegar até aqui;
- Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Abrahão Fontes Baptista , pelo fundamental apoio e inestimável prestatividade;
- À comissão revisora, pelas críticas e sugestões que possibilitaram o aprimoramento do trabalho.
- Ao Professor Doutor José Tavares Neto pelo empenho como coordenador da monografia, sempre nos orientando, incentivando e cobrando empenho quando necessário e a todos os amigos e familiares, pelo apoio, compreensão e carinho dedicados

ÍNDICE

Lista de Ilustrações e Quadros	2
Lista de Abreviaturas e Siglas	
I – Resumo	4
II – Objetivo	5
III – Introdução	6
IV – Metodologia	9
V – Resultados	12
VI – Discussão	14
VII.1 – Mecanismos e evidências <i>in vitro</i> dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada	14
VII.2 - Resistência a múltiplas drogas e a utilização da corrente alternada	
VII.3 - Evidências em modelos animais dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada	20
VII.4 - Evidências em humanos dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada	21
VII.5 - Método de utilização, toxicidade e segurança de TTF	24
VII – Conclusão	26
VIII - Summary	27
IX – Referências	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

ILUSTRAÇÃO/QUADRO	PÁGINA
Quadro 1. Descritores e Palavras Utilizados na Busca Textual	9
Figura 1. Fluxograma sintético da estratégia da seleção dos estudos disponíveis nas bases de dados	17
Figura 2. Microfotografias, em intervalos de tempo diferentes, de melanomas malignos expostos a TTFields	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Sistema de designação de apoproteínas
AC	Corrente alternada
B16F10	Linhagem tumoral de melanoma
CE	Comissão Europeia
CT-26	Linhagem tumoral de adenocarcinoma colorectal de origem murina
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma multiforme
GBMR	Glioblastoma multiforme recorrente
K_{ir3.2}	Canais de potássio de retificação interna, do inglês “inward rectifying K channels 3.2”

KPS	Escore de desempenho de Karnofsky, da língua inglesa “Karnofsky Performance Score”
Novo TTF-100A	Dispositivo que emite corrente alternada
RMD	Resistência a múltiplas drogas
TTFields	Campos de tratamento de tumor , de origem da língua inglesa “Tumor Treating Fields”

I. RESUMO

A utilização da corrente elétrica alternada no tratamento do câncer.

Introdução: Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem em comum a proliferação desordenada das células que invadem tecidos e órgãos. É uma doença com elevadas taxas de morbi-mortalidade no Brasil e no mundo. O tratamento pode ser feito através de diversas modalidades: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, transplante de medula óssea dentre outros. Contudo, as limitações das terapêuticas atuais são bem conhecidas e ainda longe de serem resolvidas, a exemplo da resistência a múltiplas drogas associada a quimioterapia. Nesta conjuntura é eminente a necessidade de buscar alternativas que complementem ou substituam terapêuticas ineficazes. A utilização da corrente elétrica alternada de baixa intensidade(1-3V/cm) e frequência intermediária(100-300kHz) no tratamento do câncer entra nesse novo grupo de estratégias. **Objetivo:** Fazer uma análise sobre o potencial da terapia com corrente alternada no tratamento do câncer, com base em relatos descritos e disponíveis nos bancos de dados científicos **Metodologia:** Revisão de literatura nas bases de dados existentes, através da utilização de descritores e palavras relacionadas ao tema, com seleção de trabalhos a partir da leitura do título e abstract. Ampliou-se a pesquisa através das referências bibliográficas destes. **Resultados:** Dentre os 429 artigos encontrados, foram selecionados 16 artigos que preenchem os critérios de inclusão. **Discussão:** A utilização da corrente elétrica alternada de baixa intensidade, frequência intermediária, no tratamento do câncer é uma nova e promissora estratégia terapêutica para o câncer. Os mecanismos envolvidos, eficácia, segurança e toxicidade vem sendo pesquisados sendo descritos em estudos pilotos, com resultados promissores. A utilização de Tumor Treating Fields (TTFields) em humanos é uma modalidade terapêutica em fase de testes para dois tipos de câncer em estágio avançado. **Conclusão:** A utilização da corrente elétrica alternada é uma nova e promissora modalidade de tratamento para o câncer, sendo que os estudos existentes, relatam eficácia igual ou superior as modalidades padrões existentes, com a vantagem de não possuir efeitos adversos sistêmicos. Contudo, novos estudos devem ser realizados para comparação com as modalidades existentes e definição da dosimetria, tempo de terapia, dentre outros parâmetros.

Palavras Chaves: Câncer-tratamento, Eletroterapia

II. OBJETIVO

Objetivo Geral: Analisar relatos na literatura sobre a interação entre campos elétricos alternados, de baixa intensidade e frequência intermediária, e o controle da proliferação das células tumorais.

III. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (1). Células tumorais possuem uma proliferação estimulada por fatores intrínsecos e contínuos de crescimento, o que não acontece com as células normais, as quais dependem de fatores estimulantes sazonais. Fatores como: níveis de cálcio (Ca^{++}) intracelular, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), potencial de hidrogênio (pH), fosforilação proteica, transcrição gênica, processamento e degradação do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) na síntese proteica e citoesqueleto celular estão alterados em células tumorais (2).

Células tumorais crescem independentemente da existência de uma superfície de contato, já as normais só crescem em presença desta superfície (3). Uma característica notória observada, *in vitro*, em cultura de células tumorais é a ausência de inibição por contato, crescendo umas sobre as outras. Nas células normais o contato exerce uma inibição e estas formam apenas uma monocamada (3).

O câncer é responsável por alto índice de morbi-mortalidade e no Brasil as neoplasias malignas representam a segunda maior causa de morte na população (1). Nos últimos 30 anos dobrou o número de casos de câncer no âmbito mundial, de fundamental importância pode-se citar a evolução das técnicas diagnósticas, nesse fenômeno. Só em 2008 a *World Cancer Report (WCR)*, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, estimou o aparecimento de 12 milhões de novos casos de câncer e sete milhões de óbitos no âmbito mundial, (4).

Atualmente, os mecanismos de resistência a drogas configuram um dos principais obstáculos para o sucesso do tratamento do câncer através da quimioterapia (5). Normalmente os tumores são constituídos de populações mistas de células malignas, algumas sensíveis à droga e outras resistentes. Ao utilizar a quimioterapia, a droga irá agir apenas sobre as células sensíveis, as células

resistentes irão persistir. Se o tumor começa a crescer novamente, a quimioterapia pode falhar, pois o tumor remanescente é composto apenas das células que são resistentes e, assim, as populações não responsivas são selecionadas (6).

Um dos mecanismos mais bem estudados de resistência é conhecido como resistência a múltiplas drogas (RMD), que é caracterizada pela ausência de resposta a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (6). A RMD está associada à mutação ou superexpressão gênica de algumas proteínas transmembrana pertencentes a família ABC (sistema de designação das apoproteínas) que funcionam transportando compostos de forma ativa, fazendo assim a extrusão das drogas. O principal gene envolvido com o fenômeno da resistência é o *mdr 1* (*multiple drug resistance 1*) que codifica um tipo de proteína de membrana com alto peso molecular, a P-Glicoproteína (Pgp) (5)(7). Esta é uma proteína transmembrana, que funciona dependente de adenosina trifosfato (ATP), transportando ativamente compostos de diferentes naturezas para fora das células, impedindo assim que o quimioterápico atinja uma concentração intracelular terapêutica (8).

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é cada vez mais observado na prática clínica, no tratamento de tumores (9). Diante do exposto, é eminente a necessidade de identificar novas abordagens para a terapêutica do câncer.

As correntes elétricas de baixa intensidade têm se mostrado uma alternativa no tratamento do câncer, por sua capacidade de inibir o crescimento das células tumorais, aumentar sua permeabilidade (eletroporação) aos agentes quimioterápicos e/ou carregá-los para o local do tumor (eletroquimioterapia) (10).

Em relação as propriedades bioelétricas das células, existem duas diferenças estruturais principais entre células em repouso e aquelas que estão se dividindo . A primeira é que células em mitose contém microtúbulos altamente polares durante a divisão, e a segunda é que estes microtúbulos são espacialmente orientados com um direcionamento, em morfologia de ampulheta, para organizar a divisão da célula durante a fase de citocinese. (11)

Kirson et al. (2004), demonstrou que o uso de correntes elétricas alternadas produz diferentes efeitos celulares como prolongamento da mitose, perturbação da polimerização-despolimerização dos microtubulos e formação de configurações mitóticas anormais com posterior apoptose destas células. Tais mecanismos decorrem das propriedades bioelétricas das células, que promovem alterações na polimerização dos microtúbulos, no qual tal dipolo alinha-se com a direção do campo elétrico impedindo o início da formação do fuso mitótico, no início da mitose (prolongamento da mitose). Nos casos das células que chegam a fase de formação do fuso mitótico, durante a formação de ampulheta, ocorre uma distribuição do campo não-uniforme, puxando para o gargalo da ampulheta todos componentes polares, causando rompimento das estruturas celulares e fragmentação celular.

Além disso, outra questão fundamental deste tratamento é que células e tecidos que não estão em divisão, não são afetados por tal corrente. Janigro et al. (2006), evidenciou que a utilização da corrente elétrica alternada em baixas frequências e baixas intensidades reduz drasticamente o mecanismo de resistência a múltiplas drogas com melhoramento dos resultados de quimioterápicos já existentes, como a doxorrubicina, no presente estudo.

Estes resultados apontam para o uso da eletroterapia com corrente alternada como uma estratégia promissora para a terapêutica do câncer. Entretanto, a gama de combinações possíveis para se obter um efeito biológico é muito grande, já que estes efeitos são resultantes do tipo de corrente utilizada, de sua amplitude, frequência, duração de pulso, tempo, dos produtos da eletrólise, da polaridade dos eletrodos e da forma de administração, assim como das características relacionadas as células e o meio em que elas estão inseridas. Portanto, este estudo, através de uma revisão de literatura busca analisar os principais aspectos que envolvem a utilização da corrente elétrica alternada no tratamento do câncer.

IV. METODOLOGIA

Revisão de Literatura

Título : A utilização da Corrente Elétrica Alternada no Tratamento do Câncer

A. DESENHO DO ESTUDO: : O estudo foi feito nos moldes de uma revisão da literatura, buscando trabalhos que abordem a utilização da corrente elétrica alternada no tratamento do câncer..

B. BASES DE DADOS: A busca pelos trabalhos foi realizada nas bases de dados BIREME, MEDLINE, SciELO, LILACS, IBECs e Biblioteca Cochrane

C. TIPOS DE ESTUDO PROCURADOS: Todos os tipos de estudos publicados e disponíveis nas bases de dados pesquisadas.

D. INTERVENÇÃO PROCURADA: Utilização de corrente elétrica alternada no tratamento do câncer.

E. DESFECHOS PROCURADOS: Cura, redução na proliferação celular, remissão, tratamento do câncer

F. ESTRATÉGIA DE BUSCA: Representaram o problema, o preditor(Intervenção) e o resultado:

Quadro 1: Descritores e palavras utilizados na busca textual

	Problem	Predictor	Result
Item	Cancer	Treatment with Alternating Current Electrotherapy	Cure
Research them	Cancer, Tumor, Neoplasm,	Alternating Current, Alternating Electric Fields, Electrotherapy, Electric Stimulation, AC, Electrical Stimulation Therapy, Therapeutic Electric Stimulation, Electrochemotherapy, Tumor Treating Fields, TTF	Cure, Remission, Relapse, Tumor growth inhibition, In vitro Tumor Cell Inhibition, Cancer treatment, treatment, Apoptosis

G - CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE ESTUDOS:

Inclusão: Foram incluídos os estudos que apresentaram a intervenção procurada, para o problema em questão, com algum resultado relacionado a tratamento, mesmo que não pertencente aos pré-estabelecidos. Além disso, deveriam adotar a metodologia exigida estar disponíveis nas bases de dados citadas. Dentre os estudos encontrados, os que não foram de acesso gratuito, os que não estiveram disponíveis nas bases de dados pesquisadas, ou ainda os artigos grafados em outros idiomas além do inglês, espanhol ou português, foram extraídos dados contidos apenas no *Abstract*.

Exclusão: Foram excluídos aqueles estudos que não apresentaram ao menos *Abstract*, bem como aqueles que não tinham relação com o problema, intervenção ou resultado procurado.

V. RESULTADOS

Foram encontrados 429 artigos na base de dados MEDLINE utilizando os termos descritos na metodologia. A partir da análise do título e resumo, foram selecionados dez artigos, com a busca complementar nas outras bases de dados, assim como pela busca na referência dos artigos previamente selecionados, o número de artigos encontrados passou para 16. Destes artigos, 7 abordavam exclusivamente o tratamento do câncer com corrente elétrica alternada, (três não estavam disponíveis na íntegra, possuíam apenas Abstract) e os outros 9 versavam sobre o tratamento do câncer com corrente elétrica alternada associado a quimioterapia, comparando as terapias em questão ou avaliando outros desfechos relacionados.

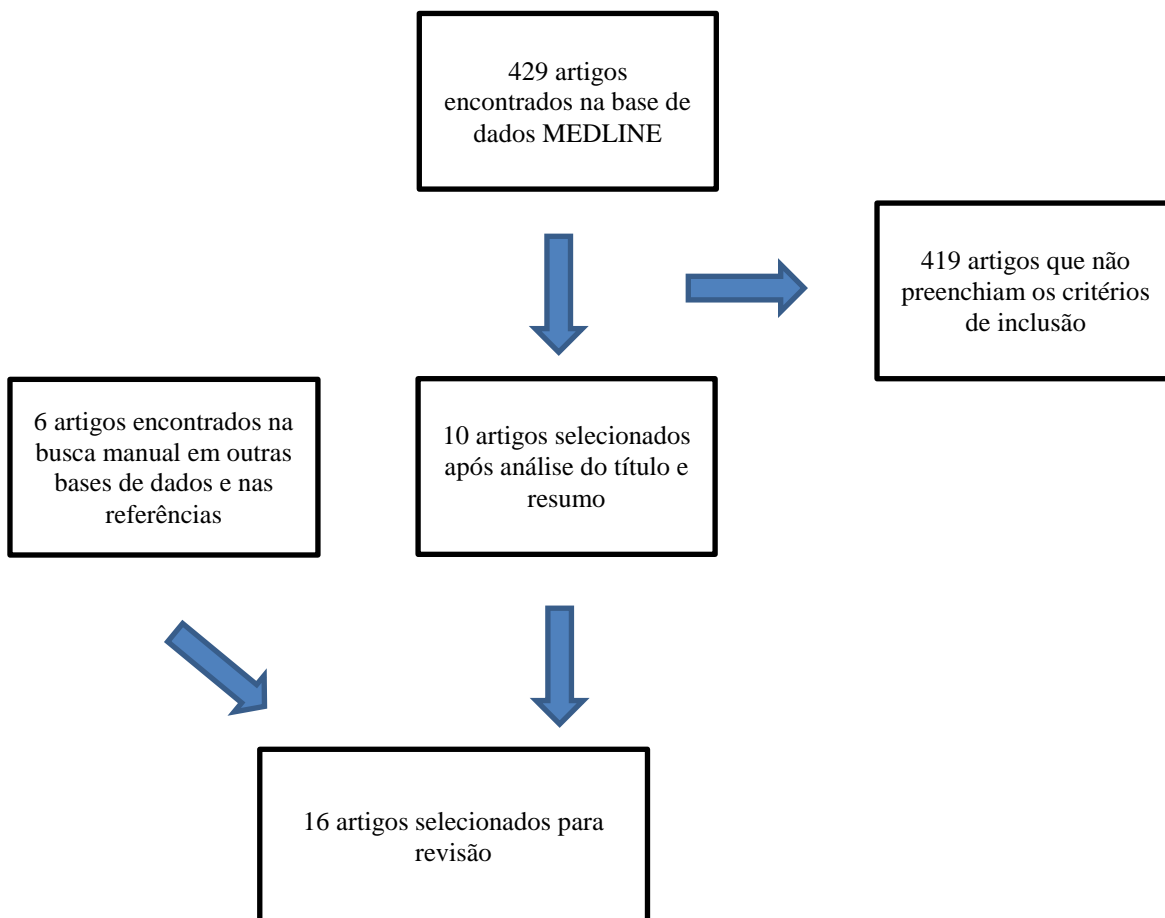


Fig. 1 – Fluxograma sintético da estratégia da seleção dos estudos disponíveis nas bases de dados

Com base nestes estudos, foi possível estabelecer a divisão temática da nossa discussão, que englobou: Mecanismos e evidências *in vitro* dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada, Resistência a múltiplas drogas e a utilização da corrente alternada, Evidências em modelos animais dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada, Evidências em humanos dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada, Método de utilização, toxicidade e segurança de TTF.

VI. DISCUSSÃO

Mecanismos e evidências *in vitro* dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada

Recentemente, uma nova modalidade para o tratamento do câncer vem sendo pesquisada, esta técnica envolve a utilização de campos elétricos alternados de baixa intensidade(1-3 V/cm) e frequência intermediária (100-300kHz), que são aplicados através de eletrodos de superfície isolados, conectados a um dispositivo portátil, que contém uma bateria que gera os campos elétricos. Tal experimento foi nomeado pelos pesquisadores como tumor treating fields (TTFields).(12)

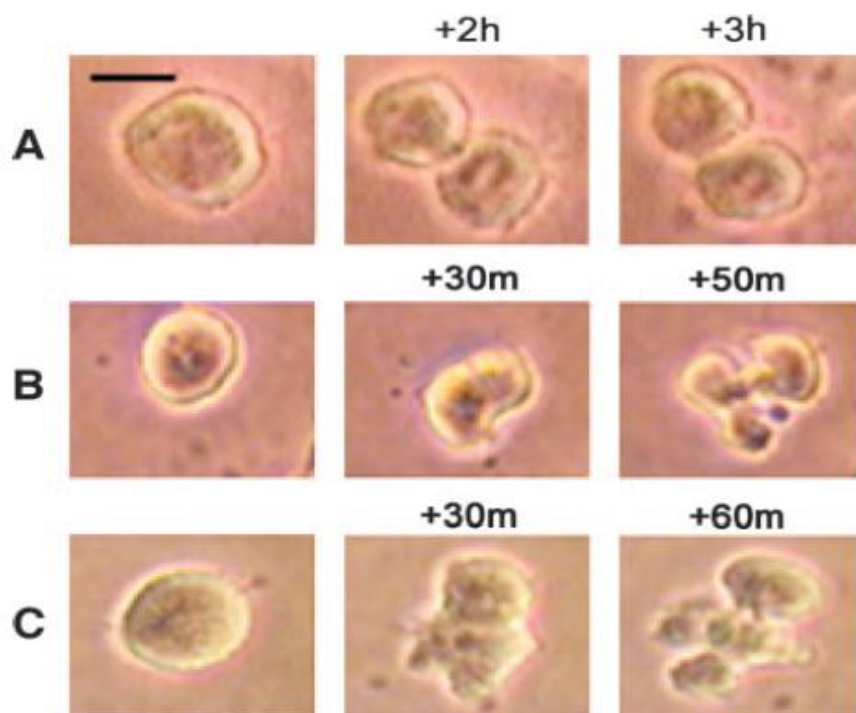
Kirson et al.(2004), demonstrou, pela primeira vez, os efeitos antitumorais desta terapia em 2004, em um trabalho no qual ele comprova que a utilização de TTFields tem efeitos inibitórios tanto sobre a divisão de células em cultura , como sobre o crescimento de tumores de ratos, independentes da temperatura e sem efeitos secundários/colaterais significativos .

Em relação as propriedades bioelétricas das células, existem duas diferenças estruturais principais entre células em repouso e aquelas que estão se dividindo . A primeira é que células em mitose contém microtúbulos altamente polares durante a divisão, e a segunda é que estes microtúbulos são espacialmente orientados com um direcionamento, em morfologia de ampulheta, para organizar a divisão da célula durante a fase de citocinese. (11)

Uma característica fundamental dos campos elétricos é que, em qualquer ponto do espaço, eles têm uma orientação definida, correspondente à direção da força que exercem sobre as cargas e elementos polares. Com base nestes preceitos, identificou-se dois mecanismos principais, por meio dos quais os campos elétricos afetam as células em divisão. O primeiro diz respeito ao efeito do campo na orientação e polimerização da macromolécula polar (microtúbulo) e o segundo mecanismo, o mais importante, se refere a interferência do campo na divisão celular,

durante a clivagem, contribuindo com a destruição das células. Tais achados explicam efeitos dos TTFields, como prolongamento da mitose e formação de mitoses com sulcos anômalos, que levam posteriormente a apoptose.(13). Tais alterações são semelhantes às alterações morfológicas observadas nas células tratadas com agentes que interferem diretamente (14) ou indiretamente (15) com a polimerização de microtúbulos (por exemplo, Taxol).

Figura.2 Microfotografias ,em intervalos de tempo diferentes, de melanomas malignos expostos a TTFields



Kirson et al, 2004

A, um exemplo de prolongamento de mitose. Contrariamente a mitose normal, cuja duração é menos de 1 h, a célula representada é vista como estando estacionada no meio da citocinese durante 3h. B e C, dois exemplos de desintegração de células tratadas com TTFields durante a citocinese. Três etapas consecutivas são mostradas: arredondamento celular (à esquerda), formação de sulco de clivagem (meio), e célula em desintegração (direita)

Kirson et al. (2007), demonstrou que o tratamento com TTFields retarda o crescimento de linhagens tumorais, ademais, que a frequência ideal para tratamento das linhagens tumorais varia dentre as diversas culturas de células, contudo os

valores encontrados nos diversos experimentos ficaram próximos de 200kHz, o mesmo ocorreu com a intensidade que manteve valores próximos a 2V/cm. Foi demonstrado também que o mecanismo de ação de TFields, tem eficácia relacionada a uma função do ângulo entre o eixo do campo e o de divisão das células: quando os dois são paralelos a eficácia é máxima, e quando um é perpendicular ao outro, deve ser mínimo. Para ultrapassar este problema, campos múltiplos foram aplicadas sequencialmente a cada 0,25-1seg.

Outro ponto fundamental do TFields, é que esta terapia é altamente seletiva.(16) Essa especificidade é relatada devido a experiências que comprovam que tais campos não alteram a constituição fisiológica das células normais, como: fluxo de íons, moléculas polares, membranas e organelas. Isso ocorre porque a cinética bioelétrica dessas células é lenta, relacionando-se a campos de baixa frequência, <10kHz, como TFields utiliza campos com mais de100kHz, torna-se desprezível seus efeitos nessas células.(12)

Outras terapias sabidamente conhecidas como menos invasivas (Ablação por Radiofrequencia, Ultrassom de Alta Frequência, Terapia Fotodinâmica) não são consideradas altamente seletivas, haja visto ocorrerem alterações consideráveis nas células vizinhas . Tal especificidade tem boas repercussões na prática clínica, haja visto o grande número de efeitos colaterais associados as atuais terapias antitumorais. (16).

A utilização da corrente elétrica alternada de baixa frequência e muito baixa intensidade

Cucullo et al. (2005), demonstrou que a utilização da corrente elétrica alternada de muito baixa intensidade tem efeitos anti-proliferativos dependentes de um mecanismo que envolve canais de potássio. Os experimentos envolveram estimulação com correntes de 50Hz com corrente alternada (AC) (intensidade da corrente = 7,5 uA, 32 ciclos/pulso, 10-s de intervalo entre os ciclos). Valores de frequência que foram <10Hz, não tiveram diferença estatística significativa em relação ao controle e valores a partir de 75Hz ou 8,5 mA, provocaram intensa morte

celular da cultura (controle feito por medida de caspase-3 e adenilato ciclase) , o que é negativo, pois ocorrem efeitos tóxicos deletérios as células vizinhas (17)

Ocorre uma expressão aumentada(2 vezes) de canais de potássio de retificação interna (inward rectifying K channels – $K_{ir3.2}$), nas linhagens celulares que sofreram inibição pela corrente alternada, este efeito é comprovado pela ausência de aumento da expressão de $K_{ir3.2}$ em linhagens que passaram pela estimulação elétrica e não foi detectado o efeito anti-proliferativo . Além disso, uma provável explicação, para tal efeito inibitório na proliferação, é o aumento da concentração intra-celular de potássio(K) na linhagem de astrócitos estudada, este aumento não permite a despolarização das células, o que contribui para inibição da proliferação. Este efeito, no ciclo celular, era até então desconhecido. (17)

A utilização da AC, associada a outras terapias, no tratamento do câncer, também vem sendo pesquisada. Um trabalho publicado por Traitcheva&Berg (2010) provou que a reordenação da membrana, ocasionada pela corrente alternada, associado a drogas citostáticas, que sofrem efeito fotodinâmico, tem maior potencial anti-proliferativo, quando comparado com a mesma associação, substituindo a AC por corrente elétrica pulsada. Neste trabalho, os parâmetros de tratamento da AC também variaram, utilizando as seguintes condições: 16 kHz, 55mA em 20 min de tratamento.

O sinergismo da AC com drogas citostáticas actinomicina-C e daunomicina, associada a irradiação de luz com comprimento de onda maior que 600nm, teve efeito superior do que a utilização dessas drogas associadas apenas a irradiação, isto deve-se, provavelmente, ao aumento da atividade oxidativa, resultante da ação fotodinâmica com os mecanismos conhecidos da corrente alternada. Além do mais, a atividade elétrica da AC teve um mínimo de reação no eletrodo, o que não ocorre com a eletroporação (18).

Resistência a múltiplas drogas e a utilização da corrente alternada

A resistência a múltiplas drogas (RMD), é caracterizada pela ausência de resposta a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (6). A RMD está associada à mutação ou superexpressão gênica de algumas proteínas transmembrana pertencentes a família ABC (sistema de designação das apoproteínas) que funcionam como bombas de efluxo, fazendo assim a extrusão das drogas. (5). Uma das formas de superar este mecanismo é a utilização de métodos físicos, pois estes não dependem de transportadores celulares para sua eficácia. TTFields também mostrou resultados positivos quando utilizado em linhagens celulares RMD (19).

Diversas linhagens celulares de câncer humano, que apresentam o mecanismo RMD, foram expostas a TTFields isoladamente, a agentes quimioterápicos (doxorrubicina e paclitaxel) isoladamente e a associação entre ambos, para comparação de eficácia. TTFields isoladamente mostrou resultados positivos na inibição da proliferação, além disso, quando em associação com quimioterápicos não alterou a concentração intracelular dos mesmos, portanto parece não haver alterações na expulsão ou absorção destas drogas. Todavia, quando a associação existe, uma concentração menor de droga é necessária para que se atinga o mesmo potencial anti-proliferativo. (19)

Quando associou-se TTFields a doxorrubicina e paclitaxel, foi observado um efeito sinérgico, em relação a utilização destes quimioterápicos isolados, pois a viabilidade celular foi reduzida de 2 a 3 vezes, quando à associação foi utilizada. Tais resultados apontam que a utilização de TTFields não alteram o mecanismo RMD, mas exercem um efeito independente que aumenta a eficácia dos quimioterápicos. Como a ação decorre do seu efeito físico, que é independente da interação com receptores celulares, esta terapia apresenta a vantagem de ser aplicável a uma ampla gama de neoplasias sensíveis ou RMD. (19)

Janigro et al. (2006) descreve inibição tumoral em diversas linhagens RMD, por meio da redução da expressão de proteínas RMD, através da aplicação de AC de baixa intensidade e baixa frequência. Foram selecionadas linhagens tumorais que apresentassem o mecanismo RMD, caracterizado pela super-expressão de P-Glicoproteína (Pgp), proteína codificada pelo gene *mdr 1* (*multiple drug resistance 1*) que tem função de extrusora de quimioterápicos (5)(7). As células foram submetidas a estimulação com correntes de 50Hz com corrente alternada (AC) (intensidade da corrente = 7,5 uA, 32 ciclos/pulso, 10-s de intervalo entre os ciclos) associado a fornecimento de concentrações crescentes de doxorubicina. Os efeitos da estimulação por AC na viabilidade celular foram evidentes a doses baixas de doxorubicina, além disso, ocorreu acúmulo intracelular da droga. A estimulação também promoveu reorientação da distribuição de proteínas *mdr1*, com acúmulo destas proteínas no citossol das células, e redução na membrana plasmática, impedindo sua atividade extrusora. Este efeito pode ser decorrente de alterações na movimentação de organelas pelos microtúbulos. Ademais, o efeito desta terapia em células normais é praticamente inexistente e seu efeito em células tumorais é reversível, indicando a necessidade de uso prolongado.(20)

Evidências em modelos animais dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada

O efeito antiproliferativo da utilização da corrente alternada não se restringe a experiências *in vitro*, em seu primeiro trabalho, em 2004, Kirson e colaboradores já haviam demonstrado que TTFIELDS tem efeitos positivos *in vivo*. Foram introduzidos, em modelos animais (ratos), linhagens celulares de melanoma (B16F10) e adenocarcinoma (CT-26) com posterior estimulação com TTFIELDS e comparação com grupo controle, detectando-se resultados promissores, a média de tamanho nos tumores tratados foi de 47% e 73%, quando comparado com a média dos tumores no grupo controle, melanoma e adenocarcinoma, respectivamente. (13)

Com a evidência de resultados promissores, conseguidos *in vivo*, estendeu-se essa terapia para novas linhagens tumorais em modelos animais e para um ensaio clínico piloto em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente (GBMR). O modelo de tumor animal foi realizado com a introdução do glioblastoma intracraniano, e foi constatado que a utilização de TTFIELDS em uma única direção não apresentou diferença estatisticamente significativa, enquanto que diversos posicionamentos provocou redução significativa no tamanho do tumor (42.6% e 56.3% para duas e três direções, respectivamente). (12)

TTFIELDS também teve efeito na inibição de metástases de tumores sólidos para pulmão. Dois modelos animais foram utilizados: ratos injectados com células de melanoma maligno (B16F10) na veia da cauda e coelhos brancos Nova Zelândia tiveram implantação de tumor VX-2 na cápsula renal. Após passarem por protocolos de estimulação, foi detectado menor número de metástases no grupo tratado com TTFIELD do que no grupo controle, que não recebeu nenhuma terapia. Os achados foram atribuídos tanto a ação do campo elétrico no pulmão, quanto a ação na redução do tumor primário, dificultando assim a ocorrência de disseminação metastática. Outro achado importante foi encontrado na imunofluorescência, na qual foram detectadas infiltração e aumento do número de células CD4, CD8 e CD45 positivas, indicando uma possível resposta imune sistêmica. (21)

Evidências em humanos dos efeitos antitumorais da corrente elétrica alternada

Após evidências encorajadoras, em modelos animais experimentais, iniciou-se um ensaio clínico com 10 pacientes portadores de GBMR. Os pacientes foram submetidos a TTFields durante 18h por dia, utilizando o dispositivo NovoTTF-100A (Novo-Cure Ltd., Haifa, Israel), com eletrodos posicionados em couro cabeludo raspado, no sentido antero-posterior e latero-lateral, com o intuito de aumentar a eficácia anti-proliferativa, haja visto a eficácia da estimulação também variar de acordo com a direção do campo em função da direção das mitoses. (12)

Os pacientes foram devidamente seguidos e os resultados foram acompanhados com realização de ressonância magnética e avaliação clínica no início do tratamento, uma semana após e depois mensalmente. A sobrevida global média da progressão da doença natural é de 26,1 semanas, enquanto a sobrevida global dos doentes tratados com TTFields foi de 62,2 semanas. Ocorreu regressão total da doença em um caso, mantendo-se, após interrupção do tratamento, até os 10 meses do acompanhamento. Ocorreu regressão parcial em um caso, que se manteve até os 7 meses do acompanhamento. Um paciente teve resposta mínima e outros quatro tiveram a doença estabilizada, por no mínimo 4 meses. (12)

A eficácia e a sensibilidade dos quimioterápicos são aumentados quando existe a associação desta terapia com TTFields. Em um ensaio clínico piloto com 20 pacientes com diagnóstico de GBM, dois grupos foram separados: o primeiro grupo era constituído de pacientes com GBMR não responsivo a temozolomide e recebeu estimulação com TTFields isoladamente o segundo grupo recebeu quimioterapia com temozolomide associada a TTFields. Ambos os resultados evidenciaram a eficácia de TTFields, ao comparar com o tratamento padrão, porém a associação de TTFields com temozolomide foi cerca de 300% superior em relação ao tempo livre de progressão e sobrevida global quando comparado a TTFields isolado, tal fato pode ser atribuído as diferenças nos grupos, o primeiro apresentava recorrência e

era resistente a quimioterapia padrão, enquanto o segundo grupo estava iniciando o tratamento quimioterápico e ainda recebeu a adjuvância de TTFields. (22)

Com a evidência de resultados promissores, a Comunidade Européia (CE) e a Food and Drugs Administration (FDA) aprovaram recentemente a utilização de TTFields para o tratamento de glioblastoma multiforme recorrente (GBMR). Rulseh e colaboradores(2012), descreveram, em um estudo piloto, a sobrevivência a longo prazo de um grupo de pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) e GBMR, que foram tratados com TTFields. Neste estudo foram acompanhados 20 pacientes (10 portadores de GBM e 10 portadores de GBMR), que foram tratados entre 2004 e 2005, em um período de um ano a ano meio a depender das características clínicas do paciente. O estudo relata que, até o momento da sua realização, 7 anos após o tratamento, quatro pacientes (dois portadores de GBM e dois portadores de GBMR, no início do estudo) são acompanhados com RNM e avaliação clínica e não apresentam nenhum indício de recorrência da doença. O que representa um resultado promissor, tendo em vista que a sobrevivência a longo prazo (mais de três anos) para estas neoplasias é de cerca de 3-5% e menos de 0,5%, para GBM e GBMR, respectivamente. No relato dos casos, deste estudo, esses valores alcançaram 20%(4 em 20). Ademais a utilização de TTFields aumentou a sobrevida global, como citado anteriormente. Dentre os parâmetros de prognóstico associado a esta terapia, idade mais jovem e KPS (Karnofsky Performance Score) elevado, foram propostos como indicativos de maior sobrevida.(23)

A partir das observações promissoras, encontradas nos resultados dos estudos pilotos descritos, e a aprovação concomitante da FDA e CE, foi conduzido um ensaio clínico randomizado, prospectivo, multicêntrico, de fase 3, para comparação de TTFields isolado com a quimioterapia padrão em GBMR. Os resultados encontrados mostraram uma diferença positiva para TTFields, em todos parâmetros avaliados: sobrevida global, sobrevida livre de progressão em 6 meses, taxa de resposta total e parcial e risco de morte. Contudo, tais valores não foram estatisticamente significante. Ademais, os resultados indicaram que pacientes tratados com esta terapia não apresentaram efeitos colaterais sistêmicos observados na quimioterapia, apresentando apenas dermatite de contato, no local de inserção dos eletrodos. Em relação a qualidade de vida, a utilização de TTFields

foi considerada superior, excetuando-se o parâmetro do funcionamento físico, devido ao incômodo, provável, que é o de carregar o dispositivo. (24)

A discordância entre os pacientes do estudo clínico de fase 3 e o estudo de Rulseh e colaboradores(2012), em relação a taxa de sobrevida a longo prazo(8% versus20%) foram atribuídas a menor idade, estavam em primeira recorrência e o tratamento com TTF continuou mesmo na presença de crescimento inicial do tumor no início do tratamento.(23)

Outra neoplasia, bastante agressiva e com pouco tempo de sobrevida quando detectada, também vem sendo tratada com TTF, o carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Um estudo piloto inicial foi realizado com 14 pacientes em estágio 3b/4 de CPCNP, que tinham recebido terapia prévia. Os resultados foram encorajadores, mostrando que TTF associado a pemetrexed (Pem), tem eficácia estatisticamente significativa superior a utilização de TTF isolado e não foram relatados efeitos adversos associados a TTF, excetuando-se a dermatite de contato. (25)

Com base em tais resultados foi realizado um estudo clínico de fase 2, com 41 pacientes com CPNCP em estágio 3b/4. Este estudo utilizou a associação de TTF com o quimioterápico padrão (Pem), e demonstrou que além de ser bem tolerado, apresenta eficácia muito superior ao uso do Pem isolado. Essa combinação resultou em uma sobrevida global média de 13,8 meses, considerada excelente. Curiosamente, a sobrevivência livre de progressão (SLP) da terapia associada com TTFields foi de 28 semanas, enquanto, na ausência de TTFields , teve-se uma SLP de apenas 22 semanas. Tais achados indicam que TTFields poderá, no futuro, ser utilizado como tratamento em pacientes com CPNCP avançado, em combinação com a quimioterapia. (26)

Método de utilização, toxicidade e segurança de TTF

Método de utilização de TTF

Terapia TTF é utilizada através de matrizes de transdutor isolados, não invasivos, que são colocadas diretamente sobre a pele, na região que circunda o tumor. Terapia TTF é diferente de outras terapias que envolvem eletricidade na medicina, pois não estimulam os nervos, músculos e outros tecidos, além de que, não promovem aumento da temperatura. (27)

Terapia TTF é projetada para uso contínuo durante todo o dia pelo paciente. Os sistemas de distribuição são projetados para permitir que os pacientes mantenham sua rotina diária normal durante o tratamento de sua doença. Existe, disponível para pesquisa, dois sistemas de TTF: um para pacientes com glioblastoma e outro para pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas. Pacientes submetidos à terapia TTF geralmente relatam uma sensação de leve aquecimento no local da matriz do transdutor. Irritação da pele no local da matriz do transdutor foi o único evento adverso claramente relacionado ao dispositivo e notificado durante ensaios clínicos. (27)

Toxicidade e segurança de TTF

Dois tipos de toxicidade podem ser esperados de um tratamento baseado em campo elétrico. Em primeiro lugar, os campos teoricamente podem afetar os tecidos excitáveis causando arritmias cardíacas ou convulsões, por exemplo. No entanto, não é esperado a ocorrência destes efeitos com esta terapia, uma vez que a frequência de TTF é ajustada para afetar apenas um tipo de célula, além disso, em campos alternados maiores que 10 kHz, ocorre uma redução drástica na excitação dos nervos e músculos. (12)

Em segundo lugar, seria esperado que TTF danificassem as células normais que se dividem rapidamente dentro do corpo, ou seja, células da medula óssea e da mucosa do intestino delgado. No entanto, não houve nenhuma toxicidade relacionada ao tratamento. No que diz respeito à hematopoese, a razão para isto é a de que estas células, que residem principalmente na medula óssea, são protegidas contra os TTFs pela elevada impedância dos ossos e da medula. A ausência de danos na mucosa intestinal, provavelmente reflete que as células da mucosa do intestino delgado, têm um ciclo de replicação mais lenta do que as células neoplásicas e que o intestino muda a sua orientação, relativamente ao campo aplicado, muitas vezes, reduzindo a eficácia da interrupção mitótica. Reforçando tais achados, não há nenhuma evidência de danos cumulativos em tecidos normais do corpo, quando expostas a terapia de TTF. Uma vez que os campos alternam-se tão rapidamente, que não têm nenhum efeito sobre as células normais quiescentes. (12)

TTF é uma terapia por via física, entregue localmente, isto permite que esta terapia sirva para tratar tumores do sistema nervoso central (SNC), ao passo que outros tratamentos por via química, como inibidores mitóticos, tais como taxanos e alcalóides de vinca possuem pobre difusão através da barreira hemato-encefálica e são raramente utilizadas para o tratamento de tumores cerebrais. (27)

Tomadas em conjunto, estas propriedades potencialmente permitem que os pacientes recebam tratamento TTF por tanto tempo, quanto seja necessário, com efeitos colaterais mínimos, concomitante a uma elevada qualidade de vida. (27)

VII. Conclusão

A utilização de campos elétricos alternados no tratamento de tumores sólidos é uma nova e promissora estratégia terapêutica para o câncer. Os mecanismos que geram este efeito anti-proliferativo são conhecidos e altamente específicos, pois envolvem prolongamento da mitose e perturbação da divisão das células, levando a apoptose. TTFields passou por uma série de estudos pilotos que demonstraram alta eficácia e ausência de efeitos adversos sistêmicos.

Em estudos clínicos obteve-se uma resposta satisfatória de TTFields, visto que, quando comparado com o padrão-ouro para tratamento de GBMR, obteve resultados superior, porém não foi estatisticamente significativa. Contudo, TTFields apresenta a vantagem de não possuir efeitos adversos sistêmicos e ter sido avaliado superiormente no quesito qualidade de vida. Em todos estudos que comparam os efeitos de quimioterápicos isolados com a associação destes com TTFields, obteve-se um efeito sinérgico desta terapia, promovendo melhores resultados em todos os parâmetros avaliados.

Diversos desafios ainda precisam ser superados e demonstrados para que TTFields possa ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outras terapias, dentre eles podemos citar a necessidade de estudos que abordem a dosimetria da corrente, sua frequência e intensidade ótima, em diversas regiões do corpo e em diversos tumores, provando sua eficácia. Além disso, estudos comparativos e que associem esta terapia a outras já existentes serão bem vindos e servirão para orientar a utilização, ou não, de TTFields como cura para o câncer.

VIII. SUMMARY

The Use of Alternating Electric Current in Cancer Treatment. Introduction: Cancer is the name given to a group of diseases that have in common a proliferation of cells that invade tissues and organs. It is a disease with high rates of morbidity and mortality in Brazil and worldwide. The treatment may be done through several methods: surgery, chemotherapy, radiotherapy, bone marrow transplantation, and others. Nevertheless, the limitations of current treatments are well known and still far from being resolved, such as the multidrug resistance associated with chemotherapy. At this fortuity it is imminent the need to seek alternatives to supplement or replace the ineffective treatments. The use of alternating electrical current of low intensity (1-3V/cm) and intermediate frequency (100-300kHz) for cancer treatment enters this new strategy group **Objective:** Making an analysis of the potential to evaluate the potential of AC therapy in cancer treatment, based on available reports and described in scientific databases. **Methodology:** Literature review on existing databases through the use of descriptors and words related to the theme, with a selection of works from reading the title and abstract and expanded research using these references. **Results:** Among the 429 articles found, were found 16 articles that met the inclusion criteria. **Discussion:** The use of alternating electrical current of low intensity and intermediate frequency in cancer treatment is a promising new strategy for cancer therapy. The mechanisms involved, efficacy, safety and toxicity has been researched and described in pilot studies, with promising results. The use of Tumor Treating Fields (TTFields) in humans is a therapeutic procedure in testing for two types of advanced cancer. **Conclusion:** The use of alternating electric current is a promising new treatment modality for cancer, and the existing studies report efficacy equal to or exceeding the standards existing arrangements, with the advantage of having no adverse systemic effects related. However, further studies should be carried out for comparison with existing modalities and definition of dosimetry, duration of therapy, among other parameters

Key Words: Cancer-treatment, Electrotherapy

IX. REFERÊNCIAS

- 1- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010/Incidência de câncer no Brasil. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>. Acesso em 17/11/2010
- 2- Abbas A K, Kumar V, Fausto N, Aster J C. Robbins & Cottrán – Patologia: Bases Patológicas das doenças. 8ª edição. Brasil, Elsevier, 1480p, 2010
- 3- Macdonald F, Ford C H J, Casson A G. Molecular Biology of Cancer. Second edition. New York, BIOS Scientific Publisher, 277p, 2004
- 4- Boyle P, Levin B. World Health Organization. International Agency of Cancer. World Cancer Report 2008. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codc ol=76&codcch=26>. Acesso em 18/03/2011
- 5- Reichel V, Burghard S, John I, Huber O. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and function at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (choroid plexus) in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Brain Res* 1370:238-45, 2010.
- 6- Wagner-souza K, Echevarria-Lima J, Rodrigues LA, Reis M, Rumjanek VM. Resistance to thapsigargin-induced intracellular calcium mobilization in a multidrug resistant tumour cell line. *Mol Cell Biochem* 252(1-2):109-16, 2003.
- 7- Ginn PE. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol* 33:533-41, 1996
- 8- Di pietro A, et al . P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res* 32: 8, 1999.
- 9- Cragg GM, Newman DJ, Weiss RB. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Semin Oncol* 24(2) :156-63, 1997.
- 10- Mie LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 35(1):107-18, 1999.
- 11- Meggs WJ. Electric fields determine the spatial organization of microtubules and actin filaments. *Med Hypotheses* 26:165–70, 1988

- 12- Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(24):10152–57, 2007
- 13- Kirson ED, Gurvich Z, Scheneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer research* 64: 3288–95, 2004
- 14- Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med* 332: 1004-14, 1995
- 15- Kline-Smith SL, Walczak CE. The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol Biol Cell* 13:2718 –31, 2002
- 16- Koreckij TD, Hill C, Azure L et al. Low dose, alternating electric current inhibits growth of prostate cancer. *The Prostate* 70: 529-39, 2010.
- 17- Cucullo L, Dini G, Hallene KL, et al. Very low intensity alternating current decreases cell proliferation. *Glia* 51: 65-72, 2005.
- 18- Traitcheva N, Berg H. Electroporation and alternating current cause membrane permeation of photodynamic cytotoxins yielding necrosis and apoptosis of cancer cells. *Bioelectrochemistry* 79: 257-60, 2010
- 19- Scheneiderman RS, Shmueli E, Kirson ED, Palti Y. TTFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters. *BMC Cancer* 10: 229, 2010
- 20- Janigro D, Perju C, Fazio V, Hallene K, Dini G, Agarwal MK, Cucullo L. Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. *BMC Cancer* 6.:72, 2006
- 21- Kirson ED, Giladi M, Gurvich Z, et al. Alternating electric fields (TTFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Clin Exp Metastasis* 26: 633-40, 2009.
- 22- Kirson ED, Scheneiderman RS, Dbaly V et al. Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields (TTFields). *BMC medical physics* 9: 1, 2009.

- 23- Rulseh AM, Keller J, Klener J, et al. Long-term survival of patients suffering from glioblastoma multiforme treated with tumor-treating fields. *World Journal of Surgical Oncology* 10: 220-26, 2012
- 24- Stupp R, Wong ET, Kanner AA, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *European Journal of Cancer* 48: 2192-202, 2012.
- 25- Weinberg U, Fresard I, Kueng M, et al. An open label pilot study of tumor treating fields (TTFields) in combination with pemetrexed (Pem) for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Poster presented at European Respiratory Society Annual Congress, 18-22, setembro, 2010.
- 26- Pless M, Betticher DC, Buess M, et al. A phase II study of tumor treating fields (TTFields) in combination with pemetrexed for advanced non small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* (2010) 21 (suppl 8): viii122-viii161.
- 27- NovoCure. Novel therapy for solid tumors. Delivery Method. Disponível em: http://www.novocure.com/ttf_therapy.php?ID=17, Acesso em 03/02/2013.