

UnB - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FGA - FACULDADE DO GAMA

**Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da
ablação térmica utilizando um eletrodo de níquel-titânio em
modelo de carcinossarcoma hepático**

Melissa Silva Monteiro

ORIENTADOR(A): Dr^a. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa
COORIENTADOR(A): Dr^a. Marcella Lemos Brettas Carneiro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

BRASÍLIA, Março de 2018



Melissa Silva Monteiro

**Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da
ablação térmica utilizando um eletrodo de níquel-titânio
em modelo de carcinossarcoma hepático**

UnB - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FGA - FACULDADE DO GAMA

Orientador: Dr^a. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa

Coorientador: Dr^a. Marcella Lemos Brettas Carneiro

BRASÍLIA

2018

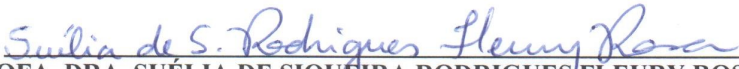
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE UNB GAMA
ENGENHARIA BIOMÉDICA

"AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DA ABLAÇÃO TÉRMICA UTILIZANDO UM
ELETRODO DE NÍQUEL-TITÂNIO EM MODELO DE
CARCINOSSARCOMA HEPÁTICO"

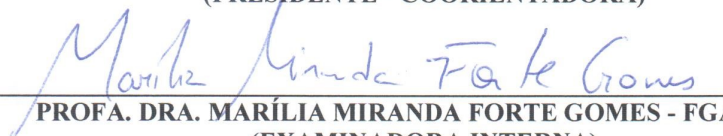
MELISSA SILVA MONTEIRO


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE UNB GAMA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:


PROFA. DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA – FGA / UNB
(ORIENTADORA)


PROFA. DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO – FUP / UNB
(PRESIDENTE - COORIENTADORA)


PROFA. DRA. MARÍLIA MIRANDA FORTE GOMES - FGA / UNB
(EXAMINADORA INTERNA)


PROFA. DRA. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI – FCE / UNB
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA, 20 DE MARÇO DE 2018

Melissa Silva Monteiro

Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da ablação térmica utilizando um eletrodo de níquel-titânio em modelo de carcinossarcoma hepático/

Melissa Silva Monteiro. – BRASÍLIA, 2018-

88 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Dr^a. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa

– UnB - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FGA - FACULDADE DO GAMA, 2018.

1. Ablação por radiofrequência. 2. Eletrodo de NiTi. I. Dr^a. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa. II. Universidade de Brasília. III. Faculdade UnB Gama. IV. Avaliação da biocompatibilidade e eficácia terapêutica da ablação térmica utilizando um eletrodo de níquel-titânio em modelo de carcinossarcoma hepático

CDU 084A/2018

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Melissa Silva Monteiro

TÍTULO: Mestrado em Engenharia Biomédica

GRAU / ANO: Bacharel / 2000

A Universidade de Brasília é permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte deste trabalho de conclusão de curso pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

*Esse trabalho é dedicado a você, Gabriel Williams! Você será sempre a minha melhor
produção!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de retornar à pesquisa,

Agradeço ao meu filho Gabriel Williams pelo apoio incondicional e incentivo constante,

À Professora Dr^a Suélia e Professor Dr. Mário Fabrício por nos tornar cada dia mais empoderados na pesquisa científica com suas lideranças e melhores como seres humanos com seus conselhos e exemplos a serem seguidos. Pelas oportunidades de crescimento constante dentro do projeto SOFIA, serei sempre grata.

À Professora Dr^a Marcella por me conduzir de forma magistral para que esse estudo obtivesse sucesso nos caminhos biológicos, foi um privilégio para mim, muito obrigada.

Ao Dr. Rafael Andrade, médico veterinário que tornou o andamento desse estudo possível e com a sua paciência me orientou em cada detalhe da experimentação animal, foi uma honra tê-lo em meu projeto.

Aos amigos e parceiros de trabalho da Equipe Sofia e Rapha que tornam o dia-a-dia na pesquisa suave e agradável, Ronei, amigo de todo sempre, Marina, florzinha, obrigada aos dois por me auxiliarem a concretizar esse trabalho escrito, Guilherme e Bruno Pitt, gratidão pelo apoio e a parceria fundamental, Paulo, gratidão pela intervenção imprescindível e todos aqueles do LaB que em algum momento contribuíram para a realização dessa produção: Oscar, Yasmin, Diana, muito obrigada.

Gratidão a todos os pesquisadores admiráveis do Laboratório de Microscopia Eletrônica/IB/UnB: Bruna, Nabyla, Yasmin, Eloísio, Prof^a Dr^a. Sônia Bão. Ao Prof. Dr. Marcelo do Hospital de Pequenos Animais da UnB e técnicos do biotério local e ao técnico Hércules do biotério da FS/UnB, ao Dr. Luiz Sérgio pelo apoio nas publicações, a todos muito obrigada, seria impossível alcançar resultados sem a competência de cada um!

À Denise, nossa secretária na pós-graduação em Engenharia Biomédica por tornar os caminhos administrativos tão fáceis! Muita gratidão!

Ao meu amigo William, por ser o pontapé inicial dessa empreitada e incentivador constante, que Deus te dê em dobro :)

Às minhas "criancinhas", minhas ratinhas, que o Universo retorne com a melhor energia positiva a doação de suas vidas que irá nos fornecer tantos benefícios.

A todos, obrigada pelo carinho!

RESUMO

A epidemiologia mundial do carcinoma hepatocelular (CHC) o posiciona como a quinta malignidade mais comum globalmente e a terceira causa de morte relacionada ao câncer e alta morbimortalidade no Brasil suficiente para onerar de forma elevada o Sistema Único de Saúde (SUS). O uso de ablação por radiofrequência já é consolidado como a melhor opção terapêutica em estágios precoce e iniciais, em casos irresssecáveis e para redução do estadiamento ou aumento de sobrevida para aguardar transplante. Por ser de custo elevado, o Ministério da Saúde e o LaB-Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília inovaram com a produção de um equipamento de ablação por radiofrequência de tecnologia nacional de baixo custo denominado SOFIA (*Software of intensive ablation*). Este estudo propõe a validação do equipamento SOFIA na sua fase pré-clínica investigando os efeitos biológicos produzidos pelo uso do eletrodo guarda-chuva de NiTi, dispositivo acoplado ao equipamento. Para isso, foram realizados ensaios de ablação por radiofrequência *ex vivo* em fígado bovino para análise dos parâmetros do equipamento em potências abaixo de 50W, em suínos *in vivo* para análise dos mesmos parâmetros sob perfusão sanguínea e em rato *Wistar (Rattus norvegicus)* para compreensão dos ajustes necessários à animal de pequeno porte. Utilizou-se um modelo tumoral, o carcinossarcoma (tumor *Walker 256*) para análise de citotoxicidade *in vitro* por técnica colorimétrica de viabilidade celular por espectrofotometria com o eletrodo Marina 5H de NiTi (níquel-titânio). Esse modelo tumoral foi implantado de forma direta em ratos *Wistar* para construção de um modelo experimental para o estudo pré-clínico do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H. As definições dos parâmetros do equipamento e eletrodo efetivaram-se para ratos e suínos, assim como o modelo experimental de pré-clínico. Considerou-se a liga de níquel-titânio (NiTi) do eletrodo MARINA 5H sem citotoxicidade não havendo formação de resíduos danosos em nível celular e biocompatível para o uso nos testes de fase clínica I.

Palavras-chaves: ablação por radiofrequência. carcinoma hepatocelular. pré-clínico. carcinossarcoma Walker 256. citotoxicidade

ABSTRACT

The worldwide epidemiology of hepatocellular carcinoma (CHC) positions it as the fifth most common malignancy globally and the third cause of cancer-related death and high morbidity and mortality in Brazil sufficient to seriously burden the Unified Health System (SUS). The use of radiofrequency ablation is already consolidated as the best therapeutic option in the early and early stages, in unresectable cases and to reduce the staging or increase of survival to wait for transplantation. Due to its high cost, the Ministry of Health and the LaB-Laboratory of Biomedical Engineering of the University of Brasilia have innovated with the production of a low cost national radiofrequency ablation equipment called SOFIA (Software of intensive ablation). This study proposes the validation of the SOFIA equipment in its preclinical phase investigating the biological effects produced by the use of the umbrella electrode of NiTi, device coupled to the equipment. For this, *ex vivo* radiofrequency ablation assays were performed in bovine liver for analysis of the parameters of the equipment in potencies below 50W, *in vivo* pigs for analysis of the same parameters under blood perfusion and in Wistar rat (*Rattus norvegicus*) for understanding the necessary adjustments to the small animal. A tumor model, carcinosarcoma (Walker 256 tumor) was used for analysis of *in vitro* cytotoxicity by colorimetric cell viability spectrophotometry with the NiTi (Níquel-titânio) MARINA 5H electrode. This tumor model was implanted directly in Wistar rats to construct an experimental model for the preclinical study of the SOFIA and MARINA 5H electrode. definitions of the parameters of the equipment and electrode were made for rats and pigs, as well as the pre-clinical experimental model. The nickel-titanium (NiTi) alloy of the MARINA 5H electrode was considered to be non-cytotoxic and no harmful residues were formed at the cellular levels, biocompatible for use in clinical phase I tests.

Key-words: radiofrequency ablation. hepatocellular carcinoma. preclinical. carcinosarcoma Walker 256. cytotoxicity

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Contextualização e Formulação do Problema | 17 |
| 1.1.1 | A ablação por radiofrequência e o carcinoma hepatocelular | 19 |
| 1.1.2 | Problematização e Justificativa | 21 |
| 1.1.3 | Organização do documento | 22 |
| 1.2 | Objetivos | 24 |
| 1.2.1 | Objetivo Geral | 24 |
| 1.2.2 | Objetivos Específicos | 24 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 25 |
| 2.1 | O CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC) | 25 |
| 2.1.1 | Evolução da doença | 25 |
| 2.1.2 | Formas de tratamento | 29 |
| 2.1.3 | Prognóstico e causas de recidiva ou recorrência | 31 |
| 2.2 | A ABLAÇÃO POR RADIOFREQUÊNCIA | 32 |
| 2.2.1 | Procedimento de ablação por ARF | 32 |
| 2.3 | O PROJETO SOFIA | 34 |
| 2.3.1 | O equipamento de ablação por radiofrequência SOFIA | 35 |
| 2.3.2 | Eletrodo MARINA 5H | 38 |
| 2.4 | PROCESSO DE NECROSE E APOPTOSE DURANTE A ABLAÇÃO POR RADIOFREQUÊNCIA | 40 |
| 2.5 | TESTES PRÉ-CLÍNICOS | 42 |
| 2.5.1 | Importância, normas e protocolos associados | 42 |
| 2.5.2 | Validação do equipamento | 43 |
| 2.5.3 | O carcinossarcoma Walker 256 | 45 |
| 3 | METODOLOGIA | 47 |
| 3.1 | Desenho experimental e modelo experimental | 48 |
| 3.2 | Testes <i>ex vivo</i> em fígado bovino | 49 |
| 3.3 | Testes <i>in vivo</i> em suínos | 49 |
| 3.4 | Modelo animal - rato <i>Wistar</i> | 50 |
| 3.4.1 | Rotina de manejo e manipulação dos animais | 50 |
| 3.5 | Avaliação dos parâmetros clínicos e comportamentais | 51 |
| 3.6 | Análise de toxicidade <i>in vitro</i> por avaliação de viabilidade celular | 51 |
| 3.6.1 | Modelo de células normais - Fibroblastos | 51 |
| 3.6.2 | Procedimento da análise de viabilidade celular | 52 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.7 | Modelo tumoral | 53 |
| 3.7.1 | Implante tumoral do carcinossarcoma <i>Walker</i> em ratos <i>Wistar</i> | 53 |
| 3.7.2 | Ablação | 57 |
| 3.8 | Revisão sistemática com metanálise | 58 |
| 3.9 | Análise estatística | 59 |
| 4 | RESULTADOS | 61 |
| 4.1 | Teste pré-clínico inovador na saúde pública | 61 |
| 4.1.1 | Testes <i>ex vivo</i> em bovinos e testes <i>in vivo</i> em suínos e ratos <i>Wistar</i> | 62 |
| 4.1.2 | Estudo sistemático com metanálise de área de necrose <i>versus</i> recorrência | 67 |
| 4.1.3 | Análise da toxicidade <i>in vitro</i> do eletrodo MARINA 5H | 69 |
| 4.1.4 | Validação do modelo animal para pré-clínico | 70 |
| 4.1.5 | Validação do modelo tumoral <i>Walker</i> 256 para pré-clínico | 71 |
| 5 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO | 73 |
| 5.1 | Discussão | 73 |
| 5.2 | Conclusão | 74 |
| 6 | TRABALHOS FUTUROS | 76 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |
| | ANEXO A – PUBLICAÇÕES | 82 |
| | ANEXO B – GLOSSÁRIO | 84 |
| | ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA | 88 |

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Comparando-se os dois mapas pode-se observar a semelhança na distribuição regional mundial e apesar de não haver um mapa com distribuição mundial regionalizada de CHC atual emitida pelos órgãos de saúde mundiais, é possível verificar o mesmo padrão de distribuição no mapa (b) com os indicadores de câncer de fígado. 26
- Figura 2 – Fatores etiológicos (externos) do carcinoma hepatocelular (Adaptado de (PIMENTA; MASSABKI, 2010; SHIMIZU *et al.*, 2015)) 27
- Figura 3 – Modelo molecular para hepatocarcinogênese com as múltiplas etapas de formação tumoral a partir dos fatores etiológicos externos desencadeantes até o processo de metástase. Retirado de (GOMES *et al.*, 2013) 28
- Figura 4 – Sistema de classificação BCLC. Nesse sistema estão previstas as relações entre os estágios do CHC e as indicações de tratamento e prognóstico – *Barcelona Clinic Liver Cancer/Clínica de Câncer de Fígado Barcelona* Retirado de (CARRILHO *et al.*, 2015). Legenda: BSC - *Best Supportive Care/Melhores Cuidados de Suporte*, PS - *Performance Status/Status de Performance* 30
- Figura 5 – Esquema com indicação das três áreas típicas que ocorrem na região da ablação com detalhamento dos eventos celulares em cada uma delas. 32
- Figura 6 – Esquema da produção do circuito fechado no procedimento de ablação no fígado com uso de equipamento gerador de radiofrequência e eletrodo expansível. (Retirado do Google Imagens e adaptado pela autora) . . . 33
- Figura 7 – Teoria da agitação dos íons no mecanismo de ablação proposta por Haemmerich (2010).(Adaptado de Haemmerich (2010)) 34
- Figura 8 – Esquema da estrutura externa do equipamento SOFIA. (Retirado do manual do SOFIA) 35

| | |
|---|----|
| Figura 9 – O Ministério da Saúde (MS) através de parcerias com Universidades incentivam a produção pública de tecnologias estratégicas para o SUS. A Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), pelo seu Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (DECIIS) e Coordenação Geral de Equipamentos e Materiais de Uso em Saúde (CGEMS) em parceria com a Universidade de Brasília (UnB) tem orientado o desenvolvimento de tecnologias em saúde. O Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília desenvolveu o SOFIA para pacientes elegíveis à aplicação da radiofrequência. . . . | 36 |
| Figura 10 – Diagrama do funcionamento geral do equipamento SOFIA. As linhas azuis correspondem ao sinal digital utilizado para controle e as linhas vermelhas correspondem ao sinal analógico que é utilizado para realizar a ablação. Além do diagrama de blocos, pode-se observar os fatores do <i>hardware</i> que influenciam a produção da área de ablação e interferem nos resultados das variáveis biológicas obtidas. (MARQUES, 2016) . . | 37 |
| Figura 11 – (A) Protótipo final do equipamento SOFIA com o eletrodo Marina 5H apoiado na lateral esquerda (B) Detalhe da tela interface do <i>software</i> do SOFIA que interagirá com o clínico. Nessa tela estão três botões disponíveis para o protocolo de tratamento escolhido: Automático, Manual ou Pré-clínico (Arquivo pessoal). | 38 |
| Figura 12 – (A) Foto do protótipo do eletrodo MARINA 5H produzido no Laboratório de Engenharia Biomédica (LAB/UnB). Nos contornos em vermelho tem-se as partes do eletrodo: o suporte para manipulação manual - o <i>handle</i> -, a cânula, que permite a inserção e saída das hastes e as hastes de níquel-titânio (NiTi). (B) Detalhe das hastes de níquel-titânio (Arquivo pessoal). | 39 |
| Figura 13 – Esquema comparativo do processo de necrose e apoptose a partir de uma célula normal mostrando algumas alterações mais representativas como o extravasamento celular na necrose e o processo de encolhimento celular da apoptose. (Disponível em < http://nutricaoinformacao.blogspot.com.br/2012/ acesso em 9 de fev 2018). | 40 |
| Figura 14 – Esquema explicativo do modelo experimental proposto como etapa para estudo não-clínico do SOFIA permitindo a validação de parâmetros de funcionamento do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H envolvendo testes <i>ex vivo</i> (em fígado bovino), <i>in vivo</i> (em ratos <i>Wistar</i> e suínos). Inclui o teste <i>in vitro</i> (em cultivo de células <i>Walker</i>) para verificação de toxicidade e biocompatibilidade da composição de níquel-titânio das hastes do eletrodo. | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 – Esquema explicativo do protocolo experimental com as análises a serem realizadas para os testes <i>ex vivo</i> (a), os testes <i>in vivo</i> (b) e (d), os testes <i>in vitro</i> (c) e a rotina experimental para os grupos de animais com tumor. | 49 |
| Figura 16 – Reação de redução do MTT em formazan por ação de desidrogenases mitocondriais. (Disponível em < cursobioquimica.iq.usp.br > acesso em 15 fev 2018, imagem adaptada pela autora) | 52 |
| Figura 17 – Criotubo com <i>pellet</i> de células <i>Walker</i> 256 obtido da Sigma-Aldrich. (Arquivo pessoal) | 54 |
| Figura 18 – Etapas do cultivo de células <i>in vitro</i> até o implante direto realizado no lobo esquerdo do fígado do rato. (Autoria própria) | 55 |
| Figura 19 – Imagem da incisão no rato <i>Wistar</i> e implante do tumor de <i>Walker</i> por inoculação no lóbulo esquerdo do fígado (ZARUR <i>et al.</i> , 2004, adaptado pela autora.) | 56 |
| Figura 20 – Procedimento de ablação no rato utilizando o modo manual do SOFIA e suporte para o eletrodo MARINA 5H realizado em ambiente estéril na Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. (Arquivo pessoal) | 57 |
| Figura 21 – Plano de terra do eletrodo de retorno. Esta figura mostra o isolante acrílico (material de cor preta), o material condutor (suporte metálico) e o corte retangular nas dimensões 6 x 6 cm que permitia a condução somente nessa região aonde o animal foi posicionado deitado com o dorso para baixo, com as patas afixadas e já com a incisão realizada. O animal estava anestesiado. (Arquivo pessoal) | 58 |
| Figura 22 – Região de ablação a 15 W de potência em 1 minuto de ablação realizada em fígado bovino <i>ex vivo</i> escolhida como a melhor relação de potência e tempo para uma ablação com potências abaixo de 50W. (a) área total de ablação comparada com a (b) área de carbonização ou área menor próxima à região de inserção do eletrodo aonde macroscopicamente gera uma área de cor castanho-escuro. | 62 |
| Figura 23 – Gráfico de temperatura com a indicação do momento do <i>roll-off</i> quando a temperatura alcança 100°C (temperatura máxima) e a indicação da temperatura mínima para haver ablação que são 50°C (temperatura mínima) para a potência de 10W. O tempo antes de alcançar 50 °C foi de 18 segundos e o intervalo de tempo entre 50°C e 100°C foi de 136 segundos. | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 24 – Histograma com os três tempos definidos: 1, 3 e 5 minutos com a indicação da escolha do melhor tempo para a potência de 10 W devido à maior proximidade dos pontos da área concêntrica menor e a área concêntrica maior. O indicador de dispersão de áreas obtidas considera o desvio padrão do diâmetro de $9,86 \pm 1,58$ e desvio padrão do diâmetro da área menor $4,82 \pm 0,21$ | 64 |
| Figura 25 – Gráfico de temperatura com a indicação do momento do <i>roll-off</i> quando a temperatura alcança 100°C (temperatura máxima) e a indicação da temperatura mínima para haver ablação que são 50°C (temperatura mínima) para a potência de 15W. O tempo antes de alcançar 50°C foi de 12 segundos e o intervalo de tempo entre 50°C e 100°C foi de 47 segundos. | 64 |
| Figura 26 – Histograma com os três tempos definidos: 1, 3 e 5 minutos com a indicação da escolha do melhor tempo para a potência de 10 W devido à maior proximidade dos pontos da área concêntrica menor e a área concêntrica maior. O indicador de dispersão de áreas obtidas considera o desvio padrão do diâmetro de $6,17 \pm 0,88$ e desvio padrão do diâmetro da área menor $3,57 \pm 0,50$ | 65 |
| Figura 27 – (a) Procedimento de ablação em fígado exposto em suíno fêmea perfundido ocorrido na PUC/GO. No detalhe (b) observa-se a secção de parte de um lobo do fígado aonde a região foi ablada mostrando a espessura do lobo. (Arquivo pessoal). | 66 |
| Figura 28 – (a) Procedimento de ablação em fígado de rato <i>Wistar</i> fêmea sob efeito de anestesia e realizada diretamente no lobo direito do fígado em incisão de 5 cm realizada próxima ao processo xifóide. Resultado obtido sob potência de 2,5 W por 3 minutos. Observa-se a área de ablação obtida pelo uso do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H, a região central próxima ao eletrodo não tem uma área típica de carbonização e o restante da área de ablação ocorre uma queima com pouca evidência de ablação real. (Arquivo pessoal) | 67 |
| Figura 29 – Etapas desde o início do procedimento de ablação por radiofrequência até o <i>follow up</i> do paciente com identificação dos momentos em que uma intervenção é possível e permite reduzir a recorrência tumoral. (Arquivo pessoal) | 69 |

- Figura 30 – Gráfico *boxplot* para a viabilidade celular. Este gráfico indica a dispersão das duas linhagens de células e seus grupos controle correspondentes. PodeDe acordo com a dispersão e teste *t student*- não houve variação significativa entre os grupos. A dispersão dos dados indica para o grupo NiTi Walker uma pequena diminuição na média. Tal diminuição se deve a morte das células em uma das triplicatas devido a superpopulação, mas ainda assim o intervalo de confiança dos dados são equivalentes. 70
- Figura 31 – Foto obtida em microscópio invertido da marca Zeiss com câmera acoplada para obtenção de imagem com o aplicativo Jimage da cultura em garrafa de células *Walker 256*. É nítida a característica de aderência da população celular e as dimensões celulares (Arquivo pessoal). 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|--|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| ARF | Ablação por Radiofrequência |
| BCLC | <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CGEMS | Coordenação Geral de Equipamentos e Materiais de Uso em Saúde |
| CHC | Carcinoma Hepatocelular ou hepatocarcinoma |
| CISPR | <i>Comité International Spécial des Perturbations Radioélectriques</i> |
| DECIIS | Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde |
| EMA | Equipamentos Médico-Assistenciais |
| gama-GT | gamaglutamiltranspeptidase ou gamaglutamiltransferase |
| HC | Ressecção cirúrgica |
| IEC | Comissão Eletrotécnica Internacional |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| LaB | Laboratório de Engenharia Biomédica |
| LEI | Laboratório de Engenharia de Inovação |
| LEMF | Liga de Efeito de Memória de Forma |
| MARINA 5H | eletrodo de configuração guarda-chuva com 5 hastes |
| MS | Ministério da Saúde |
| NBR | Norma Brasileira |
| NiTi | Liga de níquel-titânio |
| PEI | Injeção percutânea de etanol |
| PUC | Pontifícia Universidade Católica |
| SCTIE | Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos |
| SOFIA | <i>Software of intensive ablation</i> |

| | |
|------|--|
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TACE | Quimioembolização Transcateter Arterial |
| TGO | Transaminase Glutâmico Oxalacética |
| TGP | Transaminase Glutâmica Pirúvica |
| TNM | Sistema de Classificação dos Tumores Malignos. |
| UnB | Universidade de Brasília |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

O carcinoma hepatocelular (CHC) na saúde pública

As políticas públicas cada vez mais se especializam em buscar respostas às necessidades vinculadas a setores estratégicos como o da saúde. O desenvolvimento e uso de tecnologia em saúde é fundamental para a manutenção e equilíbrio do setor de saúde pública no país. Historicamente o Governo Federal brasileiro buscou através de vários tipos de políticas públicas em saúde incentivar e fomentar centros de pesquisas a desenvolverem tecnologias que garantam qualidade de vida à sociedade em geral.

O Ministério da Saúde (MS) através de parcerias com Universidades incentivam a produção pública de tecnologias estratégicas para o SUS (Sistema Único de Saúde). A Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), pelo seu Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (DECIIS) e Coordenação Geral de Equipamentos e Materiais de Uso em Saúde (CGEMS) em parceria com a Universidade de Brasília (UnB) tem orientado o desenvolvimento de tecnologias em saúde. Diante desta abertura institucional, o Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília desenvolveu um equipamento de radiofrequência controlada para ablação de tumores hepáticos, com o objetivo inicial de disponibilizar uma tecnologia nacional e de baixo custo para promoção de tratamento a pacientes elegíveis à aplicação da radiofrequência.

Isto implica em um Brasil mais competitivo, sanando deficiências na produção tecnológica nacional e agregando conhecimento científico inovador, interdisciplinar e tecnológico. O papel da Engenharia Biomédica é o amadurecimento e a autoria decisiva nessa ação de desenvolvimento. As revisões sistemáticas em engenharia biomédica devem conter traços para nortear o desenvolvimento de projetos, indicando novos rumos para futuras investigações e identificando as tecnologias e inovações a serem geradas.

Nesse contexto de interação da pesquisa tecnológica e apoio do poder público, incluem-se as ações necessárias para prevenção, recuperação da malignidade conhecida como o carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (CHC). As ações de abrangência pública para o CHC estão descritas na Portaria nº 602 de 2012 (PORTARIA, 2012), Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Fígado no Adulto permitem ao clínico o diagnóstico, estadiamento e escolha das opções terapêuticas que incluem cirurgia, transplante e procedimentos acessórios aonde está inserida a ablação por radiofrequência, objeto desse estudo de avaliação. Como enuncia a mesma Portaria, o CHC é a neoplasia epitelial maligna primária do fígado derivada dos hepatócitos, portanto um carcinoma de células hepáticas. Essa neoplasia não é prevalente no país, mas tem morbimortalidade

suficiente para onerar de forma elevada o SUS (PIMENTA; MASSABKI, 2010).

A epidemiologia mundial do carcinoma hepatocelular (CHC) o posiciona como a quinta malignidade mais comum globalmente e a terceira causa de morte relacionada ao câncer (MAGISTRÍ *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos nos últimos 30 anos triplicou a quantidade de casos apresentando-se como a causa crescente de morte relacionada ao câncer. Na Ásia encontra-se a maior quantidade de casos a cada 100.000 habitantes contabilizando mais de 20 e na Europa e América do Norte, menos de 5 casos a cada 100.000 habitantes (MAGISTRÍ *et al.*, 2017). Considera-se como fatores desencadeantes da proliferação primária do carcinoma as infecções crônicas por vírus das hepatites B e C, intoxicação por aflatoxina B1 presente em dietas típicas de algumas populações, cirrose hepática que pode ser causada por hábitos etílicos ou não, fatores genéticos e epigenéticos, diabetes tipo II quando associada à obesidade, esteato-hepatite não alcoólica e síndrome metabólica (MAZZANTI; ARENA; TASSI, 2016).

Ações sistematizadas na prevenção e controle do CHC incluem a vacinação contra hepatite B para doadores de sangue e triagem sorológica incluindo aqueles adultos ainda não vacinados além de novas terapias para o tratamento da hepatite, fato que já tem permitido reduzir sua incidência nas próximas décadas (PASCUAL; HERRERA; IRURZUN, 2016). Outras ações como o incentivo à população à uma restrição no consumo de álcool e fumo somado ao controle do paciente com adicção ao álcool. No caso das aflatoxinas, o controle de contaminação e ingestão dos alimentos, e por fim, o controle da obesidade e diabetes em pacientes com doenças hepáticas não relacionadas ao álcool (CARRILHO *et al.*, 2015).

No caso específico do Brasil, a Portaria nº 602 de 2012 indica que 98% dos casos de CHC está relacionado à cirrose hepática e pode estar associado à hepatite crônica secundária à infecção pelo vírus da hepatite C (54%) ou da hepatite B (16%) e ao consumo de álcool (14%), fatores de risco com diferenças regionais de prevalência relevantes. O Ministério da Saúde propõe que ações para prevenção e controle do CHC devem estar na pauta da gestão de saúde pública local, incluindo a pesquisa clínica de novos equipamentos que forneçam opções seguras de terapia favorecendo novas perspectivas para redução dessas estatísticas.

Os dados do DATASUS (Departamento de Informática do SUS) sobre a incidência dos tipos de cânceres são originários do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) que não considera o CHC uma malignidade de importância estatística não havendo, portanto, dados sobre a incidência do CHC na população brasileira. Um estudo de coorte a longo prazo (60 meses pelo menos) de 884 pacientes com cirrose no Brasil foi realizado por (PARANAGUÁ-VEZOZZO *et al.*, 2014) aonde informa que os dados de incidência de CHC no Brasil são desconhecidos e a prevalência de hepatites associadas a ela como a HBV (hepatite B) e HCV (hepatite C) são baixas. Nesse estudo observou-se

que a incidência anual é de 2,9% e que a maioria era do sexo masculino e 50% dos pacientes tinham ascendência do leste da Ásia. Como fatores preditivos verificou-se que o nível baixo de soroalbumina e níveis abaixo de 20 ng/mL de alfafetoproteína foram observados nos pacientes afetados nos anos anteriores ao diagnóstico de CHC (CARRILHO *et al.*, 2015).

Após o diagnóstico positivo de CHC é o estadiamento do paciente que permitirá a escolha do tratamento e envolverá a análise das condições clínicas do paciente, função do fígado e extensão tumoral para a decisão. Preferencialmente, a ressecção cirúrgica é considerada a opção com melhor sobrevida - entre 40 a 50% - mas, somente, 10 a 15% dos pacientes são compatíveis com essa possibilidade. Também em paciente na fila de espera para o transplante, os procedimentos acessórios (não-invasivos) são a opção ideal por garantir a sua sobrevida, assim como a redução do estadiamento para tumores com até 3 cm.

Conforme a PORTARIA, No. 602, DE 26 DE JUNHO DE 2012, o CHC é classificado como C22.0 - carcinoma de células hepáticas (carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma) de acordo com a CLASSIFICAÇÃO ESTATÍSTICA INTERNACIONAL DE DOENÇAS E PROBLEMAS RELACIONADOS À SAÚDE (CID). Também fornece orientações para o seu estadiamento que pode ser conforme o sistema TNM (Tumor-Nódulo-Metástase) para casos após ressecção cirúrgica ou transplante hepático e baseia-se nos resultados da análise anatomopatológica, já para pacientes não-cirúrgicos o sistema de classificação de Barcelona (*Barcelona Clinic Liver Cancer - BCLC*) que incorpora parâmetros clínicos e radiológicos está bem consolidado no país (PORTARIA, 2012).

Atualmente dentre as estratégias de tratamentos acessórios consolidadas para tratamento do CHC podem-se citar além da ablação por radiofrequência (ARF), as outras formas de ablação como a química por injeção percutânea de etanol (PEI) e ácido acético, ablação por micro-ondas, por laser, crioablação, ultrassom focalizado de alta intensidade, eletroporação irreversível, quimioembolização transarterial (TACE), radioembolização transarterial, embolização transarterial (TAE) e ablação somada à hipertermia induzida por radiofrequência mediada por nanopartículas. O tratamento sistêmico geralmente ocorre com quimioterápicos sendo o Sorafenib que atua com melhores resultados. (MAJUMDAR *et al.*, 2017; BALOGH *et al.*, 2016; CARRILHO *et al.*, 2015).

1.1.1 A ablação por radiofrequência e o carcinoma hepatocelular

A Ablação por Radiofrequência (ARF) consiste em recurso terapêutico destinado a provocar lesão tecidual programada por meio do aquecimento local. Por meio da aplicação de ondas de radiofrequência, o aquecimento tecidual tornou-se uma alternativa terapêutica para disfunções cujo princípio de tratamento inclui a promoção da lesão por ocasionar necrose tecidual. A ARF tem sido utilizada em substituição a procedimentos invasivos como a ressecção e traz como vantagens principais o dano mínimo ao tecido periférico normal

pela pequena invasividade e a dispensa de anestesia geral no procedimento (ZHANG *et al.*, 2016).

A taxa de recidiva (retorno da lesão tumoral após tratamento) no procedimento de ARF aumenta à medida que tumores maiores que 3 cm são tratados por essa técnica e se apresenta como uma limitação para o uso da ARF devido ablação incompleta (NISHIKAWA *et al.*, 2013). Zhang (2016) afirma que quando comparada a sobrevida do paciente pós-ressecção e pós-ablação percebe-se que no caso de tumores acima de 3 cm tratados com ARF a sobrevida alcança 5 anos, já em pacientes submetidos à ressecção de tumores, sua sobrevida é maior. Em contrapartida, no caso de tumores menores que 3 cm, não houve diferença significativa entre pacientes submetidos à ARF e à ressecção. Portanto, o uso de ARF em tumores menores de 3 cm torna-se melhor escolha terapêutica (ZHANG *et al.*, 2016). Acrescenta-se no caso da ressecção que a recidiva após a cirurgia ocorre em 50% dos casos e a sobrevida em 5 anos pós-cirurgia alcança a margem de 35 a 50% segundo (HERMAN *et al.*, 2016)

A disponibilidade para a população dessa técnica é limitada por ser um equipamento de origem importada com alto custo e eletrodo não reutilizável tornando sua aquisição e disponibilidade da técnica restrita ao setor hospitalar privado. os equipamentos disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) são importados e possuem um custo elevado de aquisição, chegando a custar em torno de R\$ 110.000,00 (dado obtido do portal de compras do Governo). É fundamental o investimento público para disponibilizá-la no SUS garantindo o acesso a todas as classes sociais a esse recurso eficaz e menos invasivo. No Brasil, os dados de incidência são poucos, mas sabe-se que no SUS do Estado de São Paulo tem-se registrado 2,07/100.000 habitantes e poucos pacientes se beneficiam do uso de novos tratamentos e terapias mais eficazes e menos invasivas (GOMES *et al.*, 2013).

É necessário avançar nas etapas de uma pesquisa clínica para validação do um equipamento de ablação por radiofrequência, as quais estão citadas a seguir: (1) fase pré-clínica ou não clínica: ocorrem antes dos testes em seres humanos e envolvem testes *in vitro* no laboratório e em modelos animais para observação do uso daquele equipamento em um organismo; (2) fase clínica: após resultado positivo na fase pré-clínica, as pesquisas avançam para testes em humanos e essa etapa é dividida em quatro - fases clínica I, II, III e IV. (2a) A fase clínica I envolve os primeiros testes em grupo pequeno de humanos com o objetivo de testar a segurança do equipamento, duração do efeito do procedimento e efeitos colaterais. Após a aprovação nesses testes, passa-se para a fase II com um grupo amostral maior para avaliar a efetividade terapêutica potencial do equipamento, é um estudo terapêutico piloto. Na fase III, apresenta-se um estudo em larga escala em mais de um centro médico com diferentes populações de pacientes para demonstrar eficácia e segurança, é um estudo terapêutico ampliado. A fase IV ocorre após aprovação do produto para avaliação comparativa com outros equipamentos e novas reações adversas, essa fase

permite um estudo de vigilância pós-comercialização para avaliar o potencial terapêutico (FAGUNDES; TAHA, 2004; FARIS; SHUREN, 2017; ANDRADE *et al.*, 2016).

1.1.2 Problematização e Justificativa

Considera-se que pesquisas nesse campo de tratamentos que vão além do procedimento cirúrgico e fornecem benefícios aos pacientes, reduzem um prognóstico negativo, especialmente naqueles que realizam tratamento pelo SUS. Conforme o Protocolo Clínico do Ministério da Saúde de 2014 para oncologia (TERAPÊUTICAS, 2014), os dispositivos atuais são utilizados como forma terapêutica para casos de tumor hepático com diâmetro de até 3 cm e estão disponíveis, especialmente, no mercado privado de saúde.

Esse paradigma cria espaço para linhas de pesquisa em novos equipamentos médicos com tecnologia nacional como o SOFIA - abreviação de *Software of Intense Ablation* -, projeto financiado pelo Ministério da Saúde em parceria com a Universidade de Brasília sendo uma das frentes de pesquisa do LaB - Laboratório de Engenharia Biomédica, vinculado ao LEI (Laboratório de Engenharia e Inovação) da FGA (Faculdade do Gama), cuja proposta desde sua criação foi o desenvolvimento de um equipamento de ablação por radiofrequência constituindo-se de um gerador de radiofrequência, eletrodo monopolar ativo e software de controle.

A equipe SOFIA tem trabalhado desde janeiro de 2015 em diversas frentes para o desenvolvimento de tecnologias para ablação. Com o intuito em desenvolver um produto funcional e compatível à comercialização, a equipe do LaB tem trabalhado nos últimos meses no levantamento de requisitos, normas e na literatura e execução de tarefas para atingir a meta de obtenção de um produto final. O projeto já passou por várias fases de protótipos, com evoluções técnicas a cada versão.

Atualmente, está em fase final com a confecção do produto e da realização de seus respectivos testes, correção de falhas e normas de segurança. Ressalta-se que o projeto SOFIA é denominado como nova tecnologia em saúde e classificado como um produto estratégico para o SUS (tecnologia para a saúde), conforme (MARGOTTI *et al.*, 2013).

O protótipo que será utilizado na Fase I da etapa clínica está finalizado e esse estudo de avaliação de biocompatibilidade, toxicidade configura-se como a última etapa da fase pré-clínica. Com isso, este trabalho apresenta expressiva relevância para emprego clínico e será essencial para determinação da segurança, eficácia e validação do equipamento criado com tecnologia totalmente nacional e, principalmente, por conter materiais de baixo custo, favorecerá seu emprego clínico para que mais pacientes sejam atendidos e com maior agilidade na rede pública do SUS.

Os protótipos que evoluíram até o atual passaram por uma rotina de testes de *hardware* e calibração das medidas. A equipe do projeto também realizou testes do equi-

pamento e eletrodo em suínos vivos perfundidos e sob efeito anestésico sob orientação da Dra. Fátima Mrué na Pontifícia Universidade Católica do Goiás (PUC/GO). Esses testes ocorreram como uma imersão e permitiu que todos os participantes das várias áreas do projeto visualizassem as alterações e dificuldades de uma ablação em condição semelhante ao procedimento no ser humano.

Hoje os quatro módulos operacionais do equipamento estão finalizados: gerador de radiofrequência de 500 khz com capacidade de potência de 50 W, placa de controle de potência e de aquisição de medidas e controle digital. O eletrodo de MARINA 5H está finalizado com seu modelo de cinco hastes após testes de tração, condutividade das fitas e propagação térmica.

Para alcançar essas metas, o grupo de pesquisa do projeto SOFIA, trabalhou em uma estrutura de gestão multidisciplinar com alunos de iniciação científica, em trabalho de conclusão de curso (TCC), mestrados, doutorandos de vários programas da Universidade de Brasília e parcerias com pesquisadores da Pontifícia Universidade Católica (PUC/GO), Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN) e o Instituto de Tecnologia Aeronáutica (ITA). A estrutura de atuação como Laboratório Aberto permitiu parcerias com o uso integrado de insumos e partilha de acesso a tecnologias próprias e de outros laboratórios. Essa forma de gestão de projetos favoreceu um fluxo de informações com vários outros projetos de pesquisa, além da manutenção de equipamentos próprios e acesso a equipamentos de outros laboratórios sempre com metas de produção em conjunto favorecendo o projeto SOFIA e outros projetos parceiros.

Ao longo das etapas de construção dos protótipos do SOFIA, novas tecnologias foram implantadas na parte de *software*, *hardware* e eletrônica do equipamento impactando em melhorias do processo de ablação somados a ajustes no eletrodo MARINA 5H com objetivo de torná-lo reutilizável. Atualmente, o SOFIA alcança etapas de melhorias específicas como o adiamento do evento de *roll-off* que envolve o ponto crítico na ablação onde ocorre um aumento abrupto da curva de impedância e impede a expansão da energia da radiofrequência tornando-se uma área de isolamento elétrico. Outras melhorias que estão em andamento incluem a expansão da área de ablação e redução da recorrência pós-procedimento e flexibilização do seu uso para outras doenças como o câncer de pulmão e fibrilação atrial. Essa evolução ocorre sempre alinhada com o conceito de baixo custo e nacionalização da técnica para o usuário final do SUS.

1.1.3 Organização do documento

A organização desse documento busca direcionar o leitor na compreensão da relevância do CHC na saúde pública e o impacto positivo do equipamento SOFIA para o acesso do paciente do SUS às terapêuticas inovadoras antes não acessíveis para todas as classes sociais da população brasileira. Cada capítulo é iniciado pelos conceitos básicos

fundamentados pelos estudos mais relevantes e atuais na área, a importância desses conceitos para o equipamento SOFIA e seus desdobramentos em um estudo não clínico. O documento está organizado em 6 (seis) capítulos, sendo o último, as publicações produzidas a partir desse estudo.

O primeiro capítulo é a Introdução que descreve o impacto do Carcinoma hepatocelular na saúde pública, suas características, a epidemiologia global e local, o perfil do prognóstico da doença, as formas de tratamento existentes, os benefícios da ablação por radiofrequência para essa enfermidade, suas implicações, assim como os avanços em termos de terapêutica para pacientes. No capítulo também são descritas as implicações para uma recidiva do CHC e a necessidade da pesquisa nacional tecnológica nessa área apresentando o projeto SOFIA por ser uma inovação nesse ramo e a importância dos ensaios não clínicos e clínicos. Na problematização e justificativa é relatado o histórico do projeto SOFIA até o momento presente, além de todas as etapas envolvidas na evolução dos protótipos do equipamento.

O capítulo 2 (dois) apresenta os objetivos gerais e específicos. A Fundamentação Teórica está organizada no capítulo 3 (três) abordando os tópicos fundamentais do carcinoma hepatocelular, há um relato sobre a evolução da doença, seus fatores etiológicos e moleculares para seu desenvolvimento no paciente. Há uma descrição das formas de tratamento existentes para os estadiamentos iniciais de CHC, o prognóstico da doença e as possibilidades de recidiva, esclarecimentos sobre o procedimento de ablação hepática por radiofrequência e um tópico específico quanto à construção do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H incluindo suas especificações. Explicita o conceito de Testes pré-clínicos ou não clínicos permeando as normas envolvidas, o conceito de validação do equipamento e os modelos biológicos utilizados para obtenção dos parâmetros de toxicidade e biocompatibilidade. No fechamento há a conceituação e caracterização do carcinosarcoma de Walker.

Em Materiais e Métodos, capítulo 4 (quatro) são delineados o desenho e modelo experimental do estudo, incluída uma descrição da metodologia utilizada e as técnicas envolvidas.

No capítulo 5 (cinco) são descritos os resultados e uma discussão argumentativa acerca dos dados, incluindo a análise estatística.

O capítulo 6 (seis) apresenta as publicações produzidas pelo estudo.

No Glossário são relacionados os termos específicos das áreas envolvidas no estudo com seus significados para melhor compreensão do texto apresentado. O documento denota a multidisciplinariedade do projeto com palavras das áreas de saúde, biológicas e engenharia eletrônica garantindo um aporte de conhecimento ao leitor para uma leitura esclarecida.

Nos Anexos, estão relacionados o documento do CEUA aprovado para este estudo e as publicações reproduzidas na íntegra.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliação de um eletrodo de níquel-titânio formato guarda-chuva de cinco hastes (MARINA 5H) acoplado a um equipamento de ablação hepática de radiofrequência (SOFIA) em modelo animal para investigação dos efeitos biológicos.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Validar o modelo experimental de protocolo pré-clínico definido como a integração do modelo animal *Wistar* e modelo tumoral *Walker 256*.
2. Identificar as variáveis de funcionamento do equipamento SOFIA : tensão, corrente e potência somado aos ajustes necessários para cada modelo animal e variáveis do funcionamento do eletrodo MARINA 5H, sua estrutura de 5 hastes expansíveis, semi-curvatura e micro-soldagem a laser, a partir de testes em bovinos *ex vivo* e em suínos e ratos *Wistar in vivo* .
3. Verificar a citotoxicidade do eletrodo de níquel-titânio *in vitro* por meio do teste MTT para viabilidade celular.
4. Realizar uma revisão sistemática com metanálise para avaliação da área de ablação *versus* o índice de recorrência.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

2.1.1 Evolução da doença

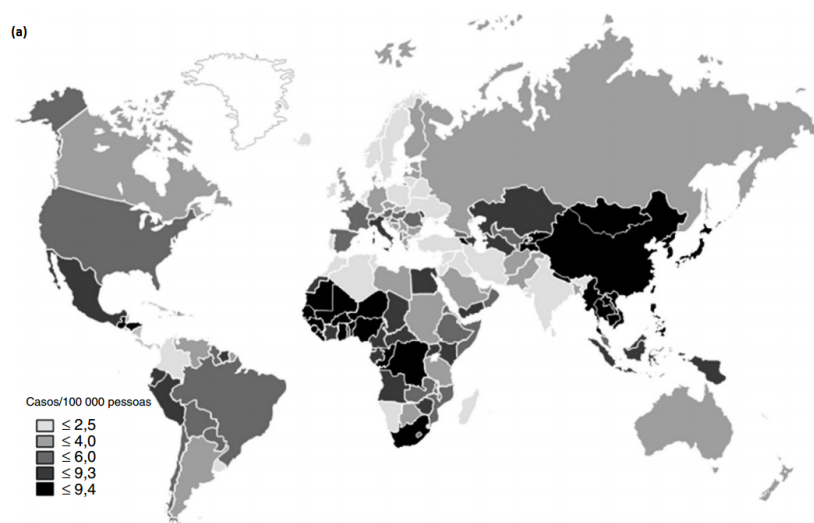
Os fatores que envolvem a causa para o início do processo neoplásico do CHC são geograficamente distribuídos por estarem relacionados à distribuição de algumas doenças típicas de algumas regiões no planeta. O mapa da Figura 1 mostra essa setorização da doença e perfil de sua gênese relacionada a fatores ambientais (PAPAIORDANOU; RIBEIRO-JUNIOR; SAAD, 2009).

O processo de carcinogênese para o carcinoma hepatocelular (CHC) está associado a fatores externos típicos como mostrado no esquema da Figura 2 que alteram diversos genes como a adicção ao álcool e infecções como a hepatite B e C. Esses fatores externos podem induzir a uma lesão pré-neoplásica como o nódulo displásico de baixo e alto grau a hiperplasia adenomatosa tornando-se uma proliferação primária em estágios iniciais até se tornar o carcinoma. Atualmente, o conhecimento desses processos moleculares são mais conhecidos - sabe-se que mutações pontuais e deleções ou alterações epigenéticas são causadoras de genes aberrantes (genes alterados ou danificados) que induzirão à formação maligna (NITA *et al.*, 2002).

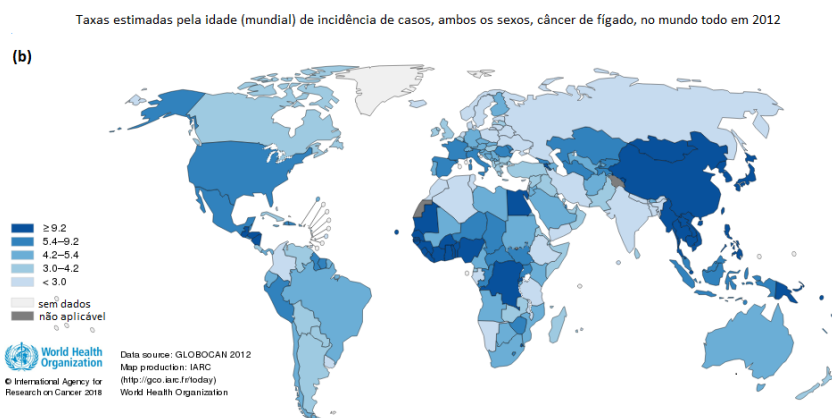
Geralmente, modificações em oncogenes e genes supressores de tumores estão envolvidos nesse processo, além de alterações gênicas somatórias ao longo de várias gerações celulares naquele tecido acrescidos de processos secundários envolvidos nessas modificações. Grande parte dessas alterações são causadas por outras doenças primárias que geram essa cascata de processos carcinogênicos. Os avanços dos estudos sobre os processos moleculares envolvidos na formação do CHC estão reunidos no esquema da Figura 3 (NITA *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2013).

Um dos fatores mais importantes que geram esse conjunto de alterações moleculares é a cirrose hepática. A taxa anual de surgimento de CHC em pacientes cirróticos é de 7% conforme Shimizu *et al.* (2015) e a cirrose geralmente estão associadas com infecções de hepatites virais (GRETEN *et al.*, 2009; SHIMIZU *et al.*, 2015). Esses fatores associam-se a características de um processo carcinogênico multicêntrico da doença. A cirrose hepática é causada inicialmente por uma inflamação crônica predispondo o órgão a um ambiente favorável à formação de diversos clones de células pré-malignas. Esse fato influenciará a recorrência da condição de malignidade por favorecer a formação de novos focos carcinogênicos não detectados anteriormente (SHIMIZU *et al.*, 2015).

O acúmulo de alterações genéticas como mutações no gene supressor de tumor p53



(a) Variação regional das taxas de incidência de CHC no ano de 2008. As taxas de incidência apresentadas (número de casos por 100.000 habitantes) são referentes a ambos os sexos e todas as idades. Retirado de (GOMES *et al.*, 2013) .



(b) Com atualização de 2012 realizada pela Organização Mundial da Saúde registra as taxas mais recentes de casos de câncer de fígado. Disponível em <<http://gco.iarc.fr/today>> Acesso em 12 jan 2018

Figura 1 – Comparando-se os dois mapas pode-se observar a semelhança na distribuição regional mundial e apesar de não haver um mapa com distribuição mundial regionalizada de CHC atual emitida pelos órgãos de saúde mundiais, é possível verificar o mesmo padrão de distribuição no mapa (b) com os indicadores de câncer de fígado.

e no CTNNB1 envolvido com a expressão de beta-catenina, anormalidades na expressão e função do receptor de tirosina-cinase (RTKs) e seus caminhos de sinalização incluindo a Ras e a cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a via de sinalização fosfoinositol 3-cinase (PI3K)/Akt, estão intimamente envolvidos com a proliferação de células e a progressão do tumor, por fim, a via do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)/eixo do receptor IGF-1 - que está comumente alterada em várias malignidades, também está alterada no caso do CHC. Essas são algumas das vias de sinalização que podem ser modificadas por essas alterações genéticas somatórias e podem gerar focos de clones de

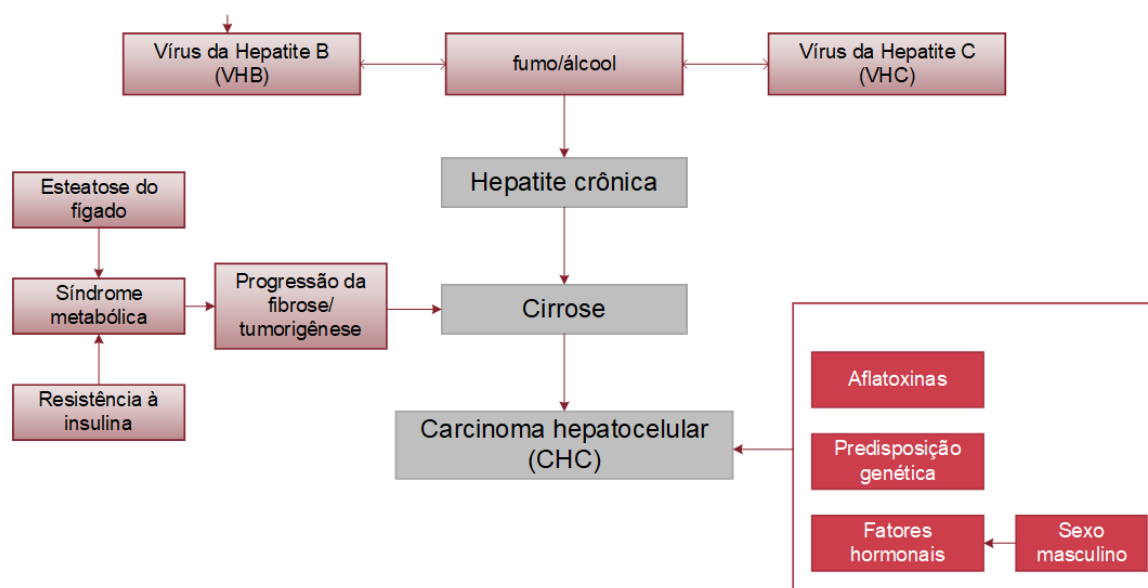


Figura 2 – Fatores etiológicos (externos) do carcinoma hepatocelular (Adaptado de (PI-MENTA; MASSABKI, 2010; SHIMIZU *et al.*, 2015))

células malignas e que caracterizam o processo carcinogênico do CHC (SHIMIZU *et al.*, 2015).

Outros fatores externos podem estar envolvidos nesse processo de carcinogênese como o gênero, o CHC costuma ocorrer mais em homens na taxa de 2:1-4:1, mas os estudos indicam que não somente o sexo pode ser o único fator envolvido, mas os hábitos mais frequentes no gênero masculino como a adicção ao álcool e o fumo, além da maior quantidade de massa corpórea devido níveis maiores de testosterona. A aflatoxina produzida pelo metabolismo secundário das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* de fungos que são encontrados em alimentos básicos como arroz, amendoins, milho, grãos que em certas condições ambientes, como a presença de umidade no seu processo de estocagem, tornam-se potencialmente carcinogênicos. (BALOGH *et al.*, 2016); (KEW, 2013)

As sintomatologias nos casos de CHC não são muito específicas e geralmente a evolução da doença em estágio inicial é silenciosa. Quando ocorrem os sintomas já indicam estágio avançado com comprometimento das funções hepáticas. Nesse momento, seu prognóstico é sombrio com uma taxa de sobrevivência de algumas semanas até um ano. Esse fato limita a escolha terapêutica pelo clínico reduzindo as chances de uma melhor sobrevida. Em estágios precoces e iniciais há uma diversidade de opções de tratamentos alternativos que são de baixa invasividade, além de dispensar um pós-operatório arriscado. Balogh *et al.* (2016) informa que na base de dados de reivindicações da MarketScan, mais de 700.000 pacientes com pelo menos uma reivindicação de NAFLD / NASH / HCV mais de um quarto dos diagnosticados com HCC não tinham conhecimento de doença hepática antes do diagnóstico.

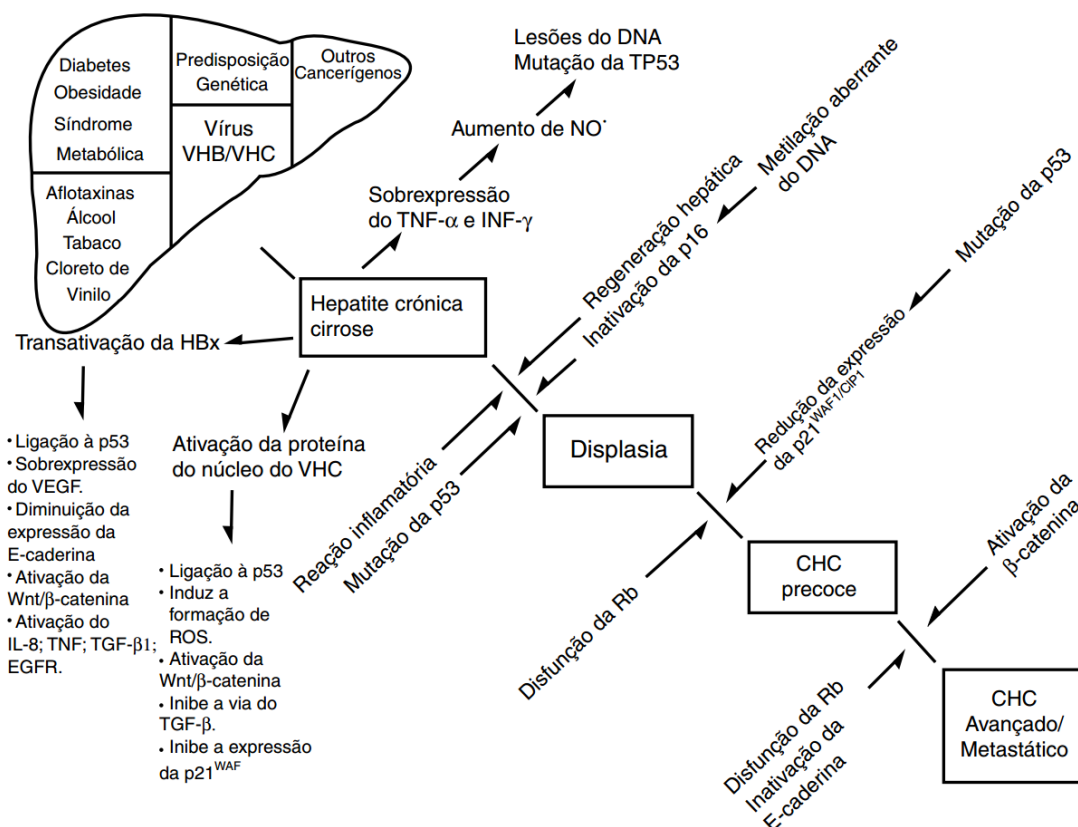


Figura 3 – Modelo molecular para hepatocarcinogênese com as múltiplas etapas de formação tumoral a partir dos fatores etiológicos externos desencadeantes até o processo de metástase. Retirado de (GOMES *et al.*, 2013)

Papaiordanou, Ribeiro-Junior e Saad (2009) conclui que mesmo com os avanços nas técnicas para diagnóstico precoce, nas últimas três décadas não houve uma melhora significativa na sobrevida desses pacientes. Esse fator gera um prolongamento na fila de transplantes para esse tipo de malignidade apesar de ser a opção terapêutica com real potencial de cura, a quantidade de pacientes que mesmo com indicação para essa opção receba um fígado de um doador é pequena, por esses serem poucos e o órgão doado necessitar de um tempo curto para sua transferência. Portanto, há ainda desafios a serem superados no tratamento oncológico do CHC.

A triagem do CHC utiliza a imagenologia como a ressonância magnética com uso de contraste, tomografia computadorizada multifásica e ultrassonografia. Dentre os marcadores sorológicos como a alfafetoproteína (AFP) que exceda o limite de 20 ng/mL são indicadores da presença da malignidade, no caso de níveis acima de 400 ng/mL, considera-se um diagnóstico definitivo de CHC. Mas, há pouca precisão nesse marcador e outros estão disponíveis para avaliação clínica como a protrombina des-gama carboxi e a fração da AFP reativa com aglutinina *Lens culinaris*, são ferramentas que auxiliam uma melhor anamnese e estadiamento da doença favorecendo a melhor escolha de tratamento do paciente. (BALOGH *et al.*, 2016)

2.1.2 Formas de tratamento

O tratamento do CHC depende de seu estadiamento e por estar muito relacionada à cirrose pode-se utilizar as características dessa enfermidade. Conforme Pascual, Herrera e Irurzun (2016) algumas variáveis são fundamentais para o prognóstico, como a função do fígado, o tamanho e número de nódulos tumorais e a invasão vascular. Considera-se que na atualidade não há um sistema de classificação adotado universalmente, mas o sistema mais consolidado é o sistema de classificação para estadiamento BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) prevê a melhor opção de tratamento para cada subclasse que permite ao clínico oncologista tomar decisões de terapias conforme as características de cada paciente e obter uma melhor previsão de resultados.

Esse sistema utiliza um conjunto de possibilidades terapêuticas mais completo incluindo o tamanho e número de nódulos, invasão vascular, performance status e o estágio Child-Pugh que permite a classificação do estado clínico do fígado em casos de cirrose e indica a sua capacidade funcional, função hepática, indícios de cirrose e sua gravidade (PASCUAL; HERRERA; IRURZUN, 2016; PORTARIA, 2012). No Brasil tem sido o sistema mais adotado nos casos de hepatocarcinoma e cirrose (PORTARIA, 2012). No quadro a seguir (Figura 4), tem-se o estadiamento conforme o sistema BCLC.

Dentre as opções de tratamento existentes, há os procedimentos acessórios como a ablação por radiofrequência que são largamente utilizados em estágios iniciais da doença e que também auxiliam na redução do estadiamento permitindo um paciente aguardar com boa sobrevida em uma fila de transplante (XU; WAN; XIA, 2016). Mas, como na grande maioria dos tumores, a ressecção cirúrgica sempre é considerada como primeira opção se as condições do fígado estiverem preservadas, a sobrevida após a cirurgia em 5 anos alcança 60% e a recorrência ou recidiva do tumor ocorre em 70% dos casos.

O transplante também é considerado uma opção terapêutica e para esse tratamento utiliza-se o Critério de Milão definido em 1996 por Mazzaferro e já validado em vários estudos: tumor único menor que 50 mm de diâmetro ou menos de 3 tumores com 30 mm de diâmetro cada um e com ausência de extrapolação vascular extrahepática. No Brasil é o segundo órgão com maior índice de transplante contabilizando 1564 realizados logo após aos 4429 transplantados com um rim conforme indicam os dados de 2017 da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. Por fim, o uso de sorafenib, quimioterápico que inibe a proliferação do tumor e angiogênese pela via da tirosina-cinase sendo indicada para pacientes com a função hepática preservada ou estágio avançado como tratamento paliativo em casos que outras formas terapêuticas não são possíveis. (PASCUAL; HERRERA; IRURZUN, 2016).

Alguns estudos comparativos compararam os procedimentos interventivos atuais que incluem a ablação por radiofrequência, a quimioembolização transcater arterial

(TACE), injeção percutânea de etanol (PEI), além da ressecção cirúrgica (HC) para o estadiamento 0 e A da classificação BLCL e se verificou que, apesar da diversidade de técnicas existentes, a melhor escolha pelo avaliador clínico ainda é conflitante entre essas opções (LAN *et al.*, 2016). Em revisões sistemáticas como a de Lan (2016) mostram resultados indicando a ARF (Ablação por radiofrequência) e TACE (Quimioembolização transcater arterial) como sendo os procedimentos com maior índice de sobrevivência e o uso combinado das duas técnicas como sendo positivo.

Também Wu *et al.* (2015) em sua revisão sistemática, comparou a crioablação à RFA e foi possível perceber que a ARF fornece menos complicações após o procedimento. Já Thomasset, Dennison e Garcea (2016) em sua revisão indicou ser a ablação um procedimento seguro com baixo índice de complicações pós-cirúrgico em casos de recidivas de pacientes irresssecáveis. A técnica de ablação de radiofrequência tem sido tradicionalmente utilizada como estratégia facilitadora para outros procedimentos como a ressecção e transplante, além da possibilidade de redução do estadiamento (DONADON *et al.*, 2017).

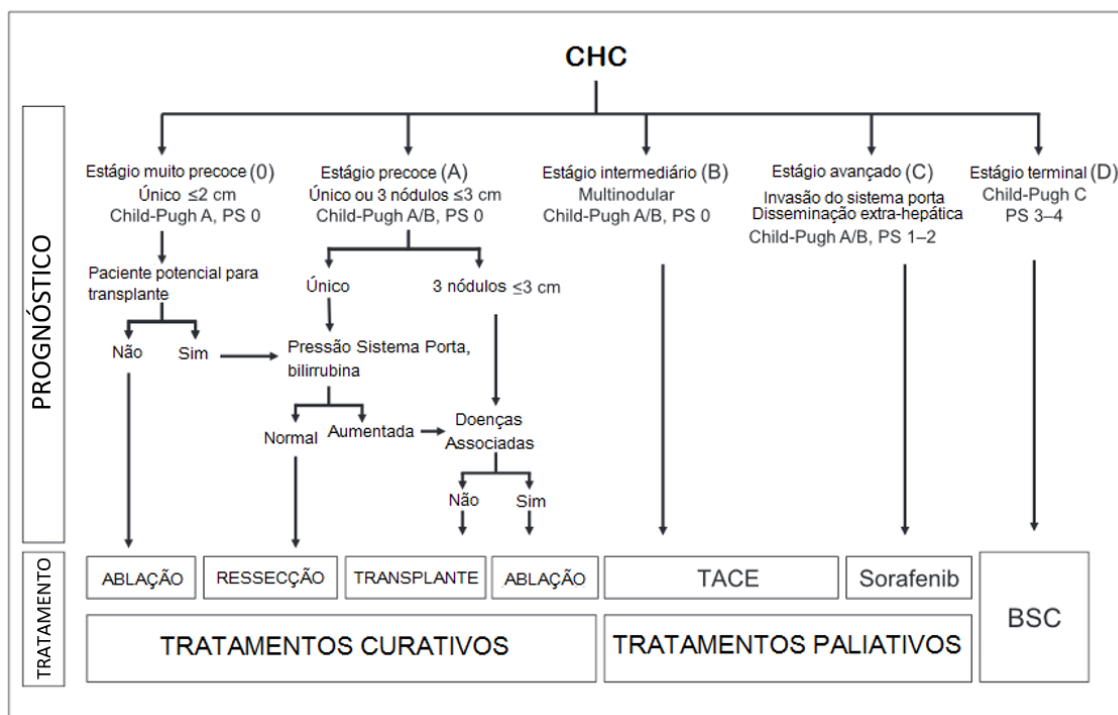


Figura 4 – Sistema de classificação BCLC. Nesse sistema estão previstas as relações entre os estágios do CHC e as indicações de tratamento e prognóstico – *Barcelona Clinic Liver Cancer/Clinica de Câncer de Fígado Barcelona* Retirado de (CARRILHO *et al.*, 2015). Legenda: BSC - *Best Supportive Care/Melhores Cuidados de Suporte*, PS - *Performance Status/Status de Performance*

2.1.3 Prognóstico e causas de recidiva ou recorrência

Para melhor prognóstico do CHC propõe-se que o tratamento deva ser multidisciplinar pelo manejo das opções terapêuticas existentes no momento. A recidiva após as opções de tratamento acessório como a ARF é possível ocorrer após um certo período de tempo. Em um estudo sobre a recidiva registra a recorrência em 43 pacientes de CHC a partir do acompanhamento de 113 casos. Percebe-se que a diferença nos tipos de recidiva estão relacionados ao procedimento terapêutico usado, no caso de ressecção cirúrgica, geralmente a recidiva ocorre em outro local diferente do tumor inicial e já na ablação, a recidiva ocorre na mesma região. No caso das técnicas ablativas, o sucesso e redução da recidiva está associado ao uso de laparotomia como melhor opção. O tamanho do tumor e quantidade de lesões também influenciam diretamente a redução da recidiva. O aumento da probabilidade de sucesso é significativo quando há a associação de uma técnica ablativa com a quimioablação, por exemplo, como o etanol absoluto em que verificou-se um aumento de 70% a área de necrose quando associado à ablação de ARF (JR *et al.*, 2007).

Estudos indicam que há comumente 3 áreas típicas no local da lesão causada por ablação, como mostrado por (ZHANG *et al.*, 2014) em que alterações celulares típicas são observadas conforme a variação de temperatura, descritas a seguir a partir do local do eletrodo em direção à região não afetada ou saudável: (1) **área com dano letal** com temperatura maior ou igual a 50°C gerando necrose identificada por colapso da membrana celular, desnaturação proteica e inutilização de enzimas e um dos fatores usados como referência de necrose completa, a disfunção mitocondrial, (2) **área com dano subletal** com temperatura entre 41° a 45°C indicado pelo metabolismo prejudicado incluindo danos ao reparo de DNA, assim como danos teciduais indicados pelo ácido hialurônico e citocinas, além de hiperemia dos vasos sanguíneos e (3) **área normal** abaixo de 40°C, com células intactas e antígenos tumorais. Portanto, na zona de necrose, é esperado que aconteça a morte celular definitiva, a recidiva está geralmente relacionada à área subletal aonde ocorre tipicamente a coagulação celular, mas que após a intervenção por ablação, pode haver a recuperação dessas células danificadas e sua proliferação (Figura 5).

Portanto, na zona de necrose ou área com dano letal, é esperado que aconteça a morte celular definitiva. A recorrência está geralmente relacionada à área com dano subletal onde ocorre tipicamente a coagulação celular, mas que após a intervenção por ablação, pode haver a recuperação dessas células danificadas e sua proliferação (IKEMOTO; SHIMADA; YAMADA, 2017). O estudo também observou além do risco de retorno do tumor pela área com dano subletal, identificou com precisão a fisiopatologia da recorrência e verificou que alterações em vias de sinalização envolvidas com proliferação e adesão celular são ativadas podendo tornar esse tumor mais agressivo e metastático.

A análise fisiopatológica de Ikemoto (2016) elencou cinco mecanismos padrões de recorrência pós-ablação: **(a)** semeadura de células tumorais por ação direta da inserção

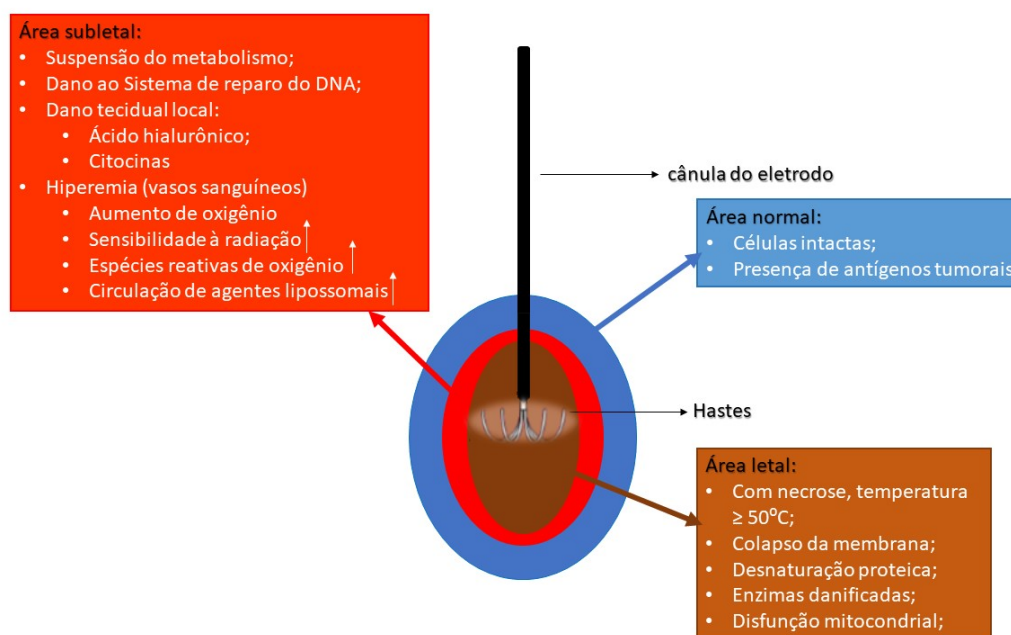


Figura 5 – Esquema com indicação das três áreas típicas que ocorrem na região da ablação com detalhamento dos eventos celulares em cada uma delas.

do eletrodo; **(b)** recorrência após ablação incompleta; **(c)** metástase transversa ocorrida por ablação incompleta devido a uma derivação arterioportal ocasionada pela inserção do eletrodo na artéria-porta; **(d)** progressão transportal após ablação em torno do ramo principal do sistema porta ou de seus ramos secundários; **(e)** microrruptura do tumor durante ablação ocasionada por um aumento da pressão intratumoral. A partir desses dados, o estudo de Ikemoto inseriu esses mecanismos em dois grandes padrões de recorrência: **(I)** recorrência por ablação incompleta e, **(II)** recorrência sistêmica por existência de microtumores não-detectáveis pós-ablação.

Portanto, busca-se nesse estudo fornecer mais uma ferramenta para a saúde pública do país no quesito CHC possibilitando ao clínico intervencionista, o uso de uma tecnologia que retira o paciente da fila de transplante e reduz seu estadiamento fornecendo maior sobrevida com riscos mínimos de invasividade que a ressecção suscita. Essa perspectiva suaviza o prognóstico do CHC e amplia o acesso de pacientes à essa tecnologia.

2.2 A ABLAÇÃO POR RADIOFREQUÊNCIA

2.2.1 Procedimento de ablação por ARF

A ARF de um tumor é um tratamento guiado por imagem, minimamente invasivo, usado para destruir as células cancerosas. O funcionamento de um equipamento de ARF se dá pela indução de dano térmico ao tecido por meio da energia eletromagnética. Para tanto, o paciente torna-se parte de um circuito fechado, incluindo o gerador de radiofrequência, a agulha presente no eletrodo e o eletrodo dispersivo (*ground pads*),

conduzindo a corrente alternada até o tecido do paciente (figura 5).

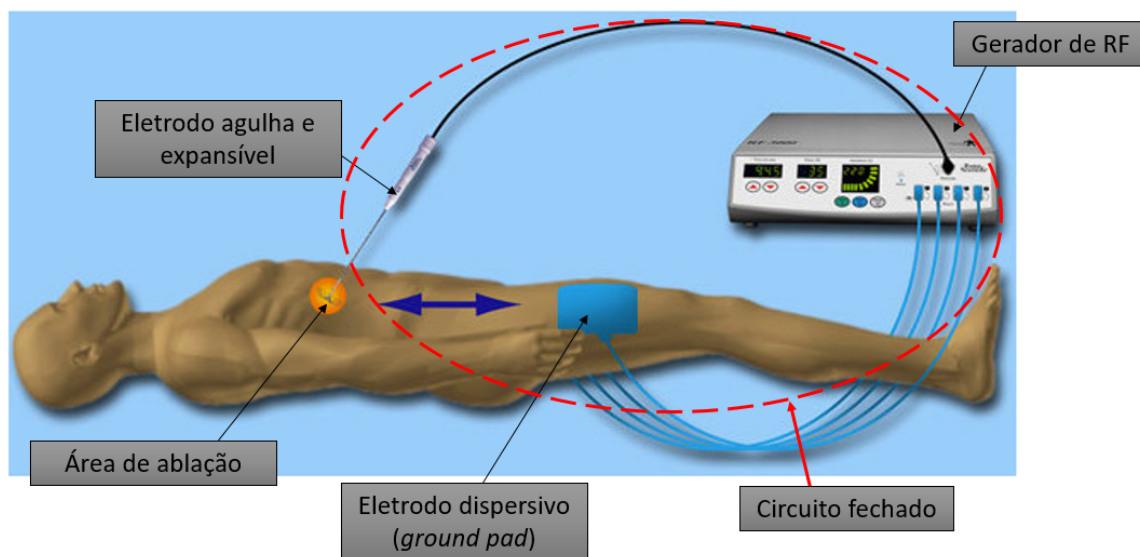


Figura 6 – Esquema da produção do circuito fechado no procedimento de ablação no fígado com uso de equipamento gerador de radiofrequência e eletrodo expansível. (Retirado do Google Imagens e adaptado pela autora)

A passagem da corrente no tecido faz com que os íons no local da ablação se agitem resultando em calor friccional ao redor do eletrodo. Como explica Marques (2016) o gerador de radiofrequência do equipamento permitirá transferir para o eletrodo uma corrente alternada que alcançará o tecido do fígado. Nos hepatócitos, os elétrons livres de Na^+ , K^+ e Cl^- , conduzem essa corrente elétrica pela sua movimentação e a geração do calor ocorrerá pela fricção desses íons (figura 6). Em sequência, há a propagação do calor no sentido do tecido no ponto local do eletrodo para as áreas mais distantes (HAEMMERICH, 2010).

Nesse contexto, a hipertermia por radiofrequência, realizada em decorrência da elevação de temperatura local, é uma abordagem terapêutica empregada para destruir células cancerígenas sem causar dano térmico à região sadia circunvizinha, considerando-se uma área como margem de segurança de região sadia afetada já prevista para este tipo de procedimento de acordo com estudos realizados por (FENG, 2014).

Os equipamentos utilizados para ablação por rádiofrequência compõe-se por um gerador de sinal capaz de fornecer potências entre 50 W a 200 W; um eletrodo para a condução da corrente e um circuito para o retorno do terra. Quanto a aplicação do sinal de RF, há duas formas mais utilizadas: monopolares e bipolares. Há eletrodos dispersivos monopolares que para haver a liberação da energia da radiofrequência é necessário um circuito fechado que pode ser obtido por um eletrodo de retorno localizado nas coxas ou costas do paciente. No caso dos bipolares, o cátodo e o ânodo estão posicionados dentro do eletrodo ativo separados por um isolador e por fim, há os multipolares em que um

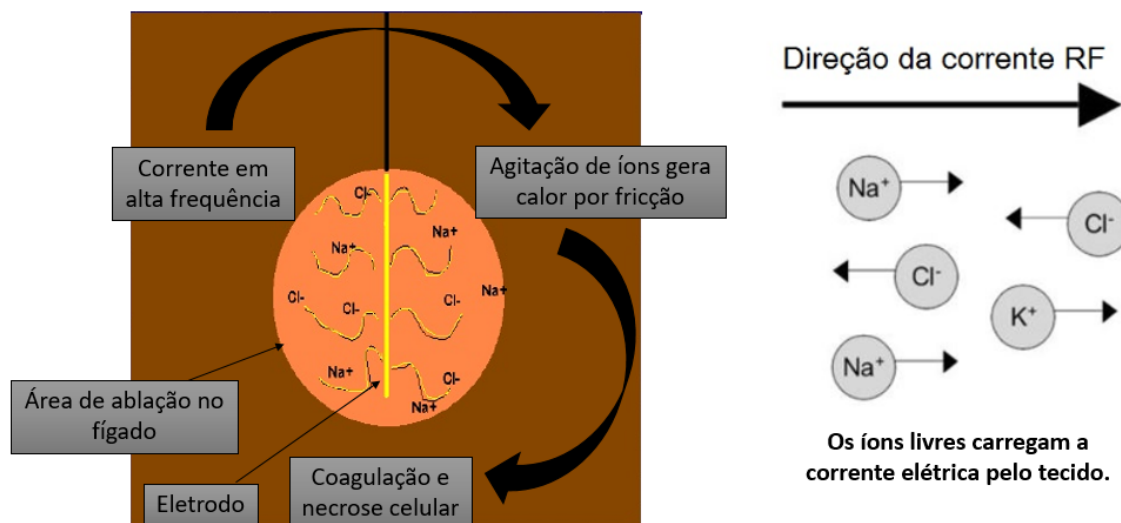


Figura 7 – Teoria da agitação dos íons no mecanismo de ablação proposta por Haemmerich (2010). (Adaptado de Haemmerich (2010))

algoritmo realiza a troca entre múltiplos eletrodos permitindo a alternância da corrente entre eles. Seu formato também pode variar, como o modelo de guarda-chuva e o agulha, além de poderem ser secos ou molhados sendo na segunda opção liberadas substâncias químicas no local da ablação. (MARQUES, 2016); (DELFINO, 2017)

Na literatura revisada, houve uma diversificação no uso da Ablação por Radiofrequência (ARF) na área médica. Dentre essas aplicações temos: o hepatocarcinoma, o câncer de pulmão de células não pequenas, os tumores ósseos, a fibrilação atrial, as varizes e tratamento para dores crônicas da face e cabeça. A neoplasia mais estudada para o uso da ARF é o CHC, para o qual existem diversos estudos e desenvolvimento de equipamentos mais diversificados e sofisticados (NISHIKAWA *et al.*, 2013). É dentro do panorama de CHC que esse estudo fornecerá bases para transposição dessa técnica para os estudos clínicos que efetivarão o uso da ARF.

2.3 O PROJETO SOFIA

O projeto SOFIA atualmente está no protótipo final (Figura 11) e configura-se como um equipamento com um sistema de processamento de imagens que permite ao clínico oncologista pela técnica laparoscópica identificar a localização do tumor e seu dimensionamento. O sucesso da necrose efetuada pela ablação está intimamente relacionada à localização precisa do nódulo tumoral. Assim, com esse sistema de processamento de imagens, a margem de erro é reduzida consideravelmente.

O SOFTWARE OF INTENSE ABLATION (*Software de Ablação Intensa*) – SOFIA, é um dispositivo minimamente invasivo de ablação por radiofrequência. O SOFIA foi concebido para fornecer energia de radiofrequência BIPOLAR para ser utilizada na coa-

gulação e ablação de tecidos moles por via percutânea, laparoscópica ou intra-operatória. Na figura 8 pode-se observar a estrutura do *case* do SOFIA, imagem retirada de seu manual.



Figura 8 – Esquema da estrutura externa do equipamento SOFIA. (Retirado do manual do SOFIA)

O projeto SOFIA visa atender uma demanda da saúde pública no Brasil em consonância com as diretrizes do Ministério da Saúde comandadas pelas suas Secretarias internas e o direcionamento das inovações tecnológicas da Universidade de Brasília visando a transferência tecnológica para o mercado e suprimindo a carência dessa tecnologia no Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento da enfermidade Carcinoma Hepatocelular (figura 9)

2.3.1 O equipamento de ablação por radiofrequência SOFIA

O equipamento de ablação por radiofrequência SOFIA, quanto ao seu *hardware* eletrônico (figura 10), constitui-se de um oscilador que gera um sinal fixo na frequência de operação do equipamento. Esta frequência para ARF está entre 300 kHz e 1 GHz.

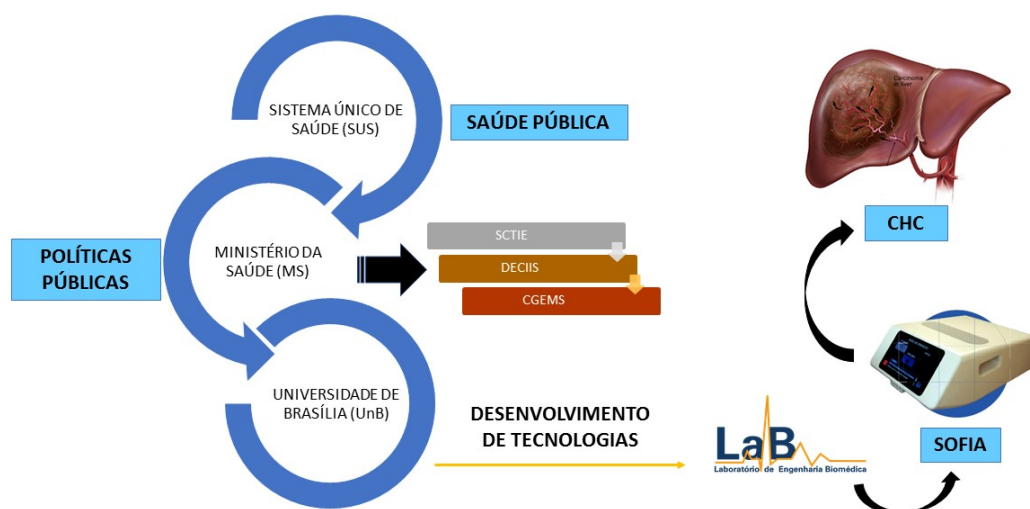


Figura 9 – O Ministério da Saúde (MS) através de parcerias com Universidades incentivam a produção pública de tecnologias estratégicas para o SUS. A Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), pelo seu Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (DECIIS) e Coordenação Geral de Equipamentos e Materiais de Uso em Saúde (CGEMS) em parceria com a Universidade de Brasília (UnB) tem orientado o desenvolvimento de tecnologias em saúde. O Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília desenvolveu o SOFIA para pacientes elegíveis à aplicação da radiofrequência.

Nesta faixa, a impedância do tecido é menor (PRAKASH et al., 2015) e evita-se a estimulação dos demais órgãos em faixas menores ou ainda, em faixas maiores, causando efeitos indesejáveis produzidos por reatâncias capacitivas e indutivas que podem dificultar a condução do sinal de ARF. Um *driver* que gera um segundo sinal de mesma frequência defasado em 180° e um amplificador para amplificar o sinal do *driver* que fornece uma corrente maior e eleva a tensão do sinal. (FONSECA, 2017)

Para retirar a frequência fundamental do sinal amplificado na etapa anterior é realizado um casamento de impedância entre a saída do gerador e do fígado. Para realizar a captura de amostras da tensão e corrente aplicadas ao tumor, medindo a temperatura do tecido de forma concomitante ao procedimento com um sensor termopar, tem-se uma interface de aquisição de sinais. Um circuito de controle para segurança do equipamento e realizar o controle de potência utilizando uma tensão constante ao receber o retorno de tensão e corrente. (FONSECA, 2017)

As características eletrônicas do SOFIA envolvem a uma potência de saída em que o gerador é capaz de fornecer uma potência de 50 W em uma impedância de 50Ω a 300Ω . O controle de potência entregue pelo SOFIA pode ser feita de forma contínua na qual o

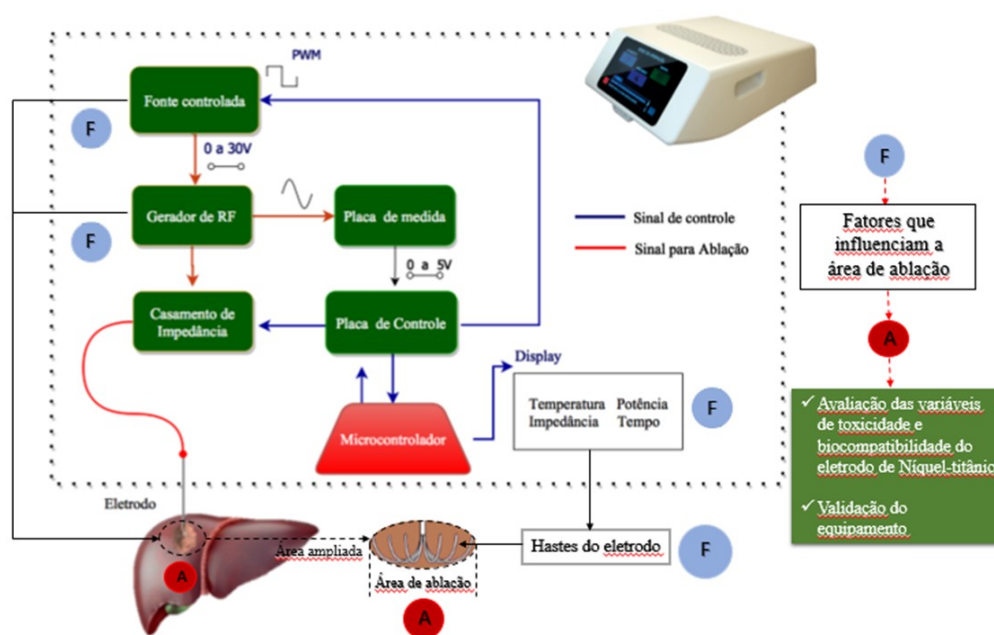


Figura 10 – Diagrama do funcionamento geral do equipamento SOFIA. As linhas azuis correspondem ao sinal digital utilizado para controle e as linhas vermelhas correspondem ao sinal analógico que é utilizado para realizar a ablação. Além do diagrama de blocos, pode-se observar os fatores do *hardware* que influenciam a produção da área de ablação e interferem nos resultados das variáveis biológicas obtidas. (MARQUES, 2016)

equipamento é ligado na sua máxima potência. Pode ser feita de forma pulsada, na qual o algoritmo de controle liga o gerador por um certo tempo e o mantém desligado por outro intervalo ou ainda pelo aumento gradual de potência. (FONSECA, 2017)

A corrente é um fator importante na ablação. Os diâmetros da área da necrose serão proporcionais à corrente aplicada. Entretanto, não se pode aplicar uma corrente indiscriminada a um órgão humano. Os riscos de queimaduras na área próxima ao eletrodo dispersivo aumentam a corrente aplicada e pode gerar queimaduras pós-procedimento quando o clínico não domina a técnica. Dessa forma, a International Electrotechnical Commission (IEC) preconiza que o limite de 0,7A a corrente máxima a ser aplicada em equipamentos de ARF.(FONSECA, 2017)

Para que haja a máxima transferência de potência do gerador para o fígado (carga), a impedância de saída do circuito deve acompanhar a impedância da fígado (carga). Essa impedância sofre variações durante a ARF e pode estar associada à localização do tumor e suas dimensões. O equipamento foi projetado para apresentar uma impedância de saída no centro da faixa de 50 Ω a 300 Ω , ou seja, 125 Ω . (FONSECA, 2017)



Figura 11 – (A) Protótipo final do equipamento SOFIA com o eletrodo Marina 5H apoiado na lateral esquerda (B) Detalhe da tela interface do *software* do SOFIA que interagirá com o clínico. Nessa tela estão três botões disponíveis para o protocolo de tratamento escolhido: Automático, Manual ou Pré-clínico (Arquivo pessoal).

2.3.2 Eletrodo MARINA 5H

Quando o sistema de imagens identifica o foco tumoral, um controlador aciona a potência e tempo necessários para a ablação do tumor pelo eletrodo de NiTi, modelo guarda-chuva com 5 hastes que produzirá um volume de área em uma circunferência e permitirá a entrega dessa potência fornecida pelo gerador (figura 12). Há a possibilidade da temperatura local alcançar os 100°C , mas a necrose tecidual é suficiente a 50°C a 60°C e considera-se mínima a possibilidade de recidiva se for realizada com uma margem de 1 cm de área saudável.

O eletrodo MARINA 5H foi produzido em parceria com os laboratórios laboratórios do Centro de Competência em Manufatura (CCM) e Laboratório de Processamento de Materiais (LPM) do ITA (Instituto de Tecnologia e Aeronáutica) e no Laboratório de Fotônica do Instituto de Estudos Avançados (IEAv), todos em São José dos Campos, São Paulo e envolveram o projeto de dissertação de outra aluna da equipe do Projeto SOFIA. A liga metálica escolhida foi de níquel-titânio ou NiTi que possui característica de uma Liga de Efeito de Memória de Forma (LEMF) com propriedades mecânicas de superelasticidade, boa resistência a corrosão e a abrasão, alta ductibilidade uma memória de forma permitindo que retornem à geometria original mesmo quando deformadas. Uma das razões da escolha é o uso já conhecido desse material em áreas como a odontologia, possuindo portanto, biocompatibilidade mesmo após tratamento térmico (RAO;

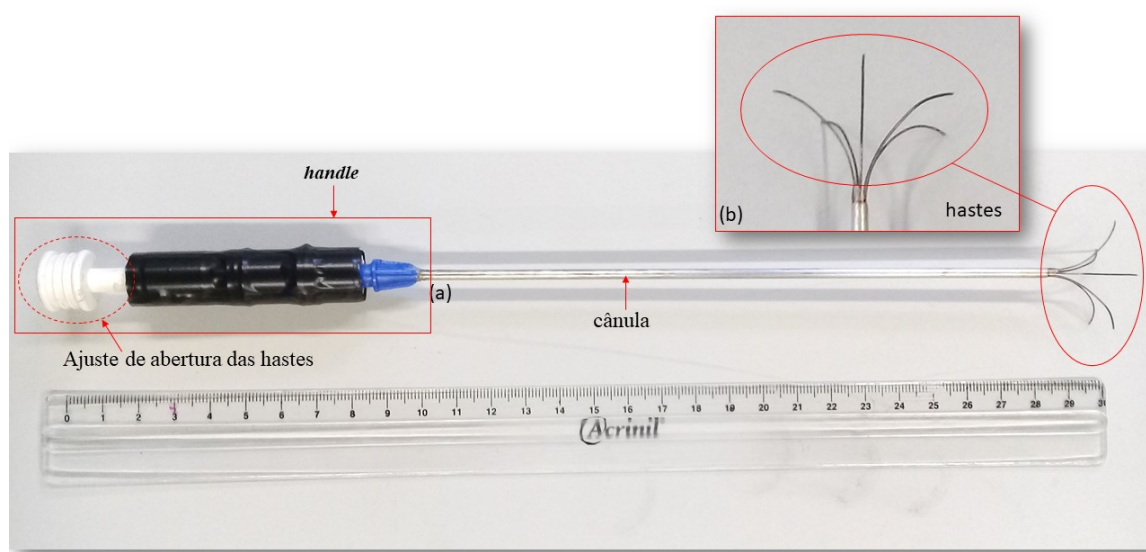


Figura 12 – (A) Foto do protótipo do eletrodo MARINA 5H produzido no Laboratório de Engenharia Biomédica (LAB/UnB). Nos contornos em vermelho tem-se as partes do eletrodo: o suporte para manipulação manual - o *handle* -, a cânula, que permite a inserção e saída das hastes e as hastes de níquel-titânio (NiTi). (B) Detalhe das hastes de níquel-titânio (Arquivo pessoal).

SRINIVASA; REDDY, 2015; SHARIAT *et al.*, 2017).

A configuração em guarda-chuva com 5 hastes fornece uma densidade de corrente menor na área do eletrodo o que permite reduzir o risco de carbonização que isola a transferência de energia na área de aumento da temperatura. Essa vantagem favorece o aumento da energia entregue e reduz a impedância do circuito. Outra vantagem desse formato é a possibilidade de uma área de ablação máxima sem a necessidade de refrigeração interna que oneraria o processo de fabricação do eletrodo.

O modelo utilizado como padrão-ouro foi o eletrodo em formato guarda-chuva Le Veen TM da Boston Scientific de número de referência no catálogo 26-224 (BOSTON SCIENTIFIC CORPORATION, 2013). As hastes foram soldadas por microsoldagem a laser para garantir a biocompatibilidade e resistência. É utilizado um sensor de temperatura local na cânula do eletrodo próximo às hastes que permite a realização de medições periódicas durante o procedimento de ablação que ocorre em uma média de tempo de 12 a 15 minutos (LI *et al.*, 2012; MARQUES, 2016).

O projeto SOFIA fornece a inovação tecnológica do uso da radiofrequência para preencher lacunas da saúde pública nacional, sendo conduzido de forma a alcançar o usuário de ponta e permitir a transferência tecnológica com o sucesso esperado para uma pesquisa de bancada, estando esse estudo pré-clínico garantindo os quesitos normatizados exigidos pelos órgãos de regulação.

2.4 PROCESSO DE NECROSE E APOPTOSE DURANTE A ABLAÇÃO POR RADIOFREQUÊNCIA

O processo celular principal que envolve o sucesso da terapêutica com radiofrequência é a total necrose de toda a extensão do tecido tumoral identificado no imageamento. A hipertermia local causada pela radiofrequência ocasiona uma lesão que pode ser reversível até certo ponto, depois do qual a célula morre. A morte celular pode seguir a via da necrose ou da apoptose (figura 13). No caso do processo de necrose que ocorre pelo aumento da temperatura causada pela radiofrequência, os dois tipos de danos podem ocorrer, sendo o processo apoptótico mais comum no processo de coagulação celular e pode ser revertida pelo organismo (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006). A morte celular é uma variável fundamental no desenvolvimento de um câncer e na prevenção e terapia desse câncer devendo ser compreendido seus mecanismos para evitar recidivas (KANDUC *et al.*, 2002).

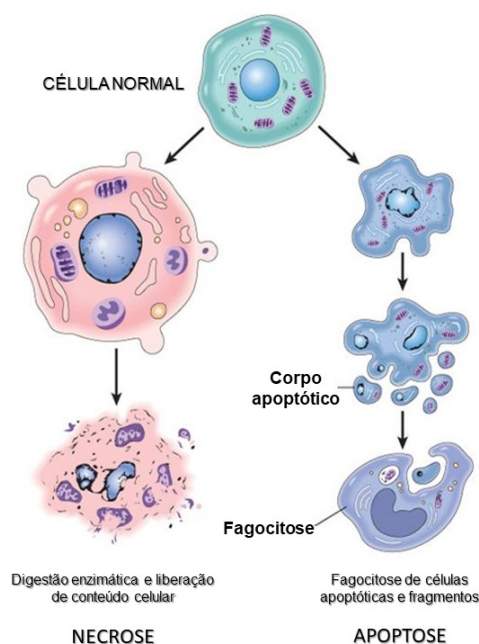


Figura 13 – Esquema comparativo do processo de necrose e apoptose a partir de uma célula normal mostrando algumas alterações mais representativas como o extravasamento celular na necrose e o processo de encolhimento celular da apoptose. (Disponível em <<http://nutricaoinformacao.blogspot.com.br/2012/>>, acesso em 9 de fev 2018).

A necrose é caracterizada pelo inchaço do citoplasma, dano irreversível da membrana plasmática e rompimento das organelas. Durante a necrose, há vazamento de conteúdo celular que atua como "sinal de perigo" sendo comumente associada à inflamação. O estímulo nocivo desencadeará vários processos intracelulares, como o dano à membrana, que afeta a mitocôndria (levando à diminuição da produção de ATP e morte celular),

os lisossomos (causando digestão enzimática dos componentes celulares) e a membrana plasmática em si, culminando na perda do conteúdo celular.

Há também aumento do cálcio intracelular e das espécies reativas de oxigênio (radicais livres, como o O_2^- , H_2O_2 , OH^-), o que leva a proteólise e dano ao DNA. O cálcio ativa muitas enzimas que levam a degradação celular, como as endonucleases e as proteases. Acontece diminuição da quantidade de ATP, levando a perda das funções celulares dependentes de energia (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

Uma lesão isquêmica apresenta uma tendência para lesionar os tecidos mais rápido do que a hipóxia (pouco oxigênio). As células sofrem essas alterações bioquímicas e morfológicas conforme a lesão progride, evoluindo para morte celular e necrose. As alterações morfológicas que acontecem após a morte celular em um tecido vivo, devido à ação progressiva de enzimas nas células que sofreram uma lesão letal auxiliam a caracterizar o processo de necrose. Macroscopicamente e histologicamente observa-se uma lesão exógena irreversível. Assim que a célula morre, ela ainda não é necrótica, pois esse é um processo progressivo de degeneração e por não manterem a integridade da membrana plasmática, extravasam seu conteúdo e podem causar inflamação no tecido adjacente resultante do debridamento celular por ação fagocítica (ROBBINS *et al.*, 2005).

Percebe-se que a necrose é um processo que ocorre após a morte celular e é irreversível, já a possibilidade de recuperação celular após a apoptose é a recuperação de uma célula que ainda não morreu e é realizada por mecanismos de reparo moleculares. Esse conceito é fundamental para observação das alterações pre- e pos-mortem especificamente em casos de terapias antineoplásicas e sua análise deve recorrer a imagens microscópicas (como a microscopia eletrônica de transmissão) e outras técnicas com marcadores celulares para identificação dos sinais diferenciais de uma apoptose e uma necrose e perceber a real efetividade dessa terapia (KANDUC, 2002).

As células necróticas são vistas ao microscópio eletrônico de transmissão com descontinuidade de membranas plasmáticas e organelas. Há vários padrões morfológicos de necrose, sendo os principais: necrose de coagulação, necrose liquefativa, necrose caseosa e necrose gordurosa. A necrose de coagulação acontece caracteristicamente quando da morte celular por hipóxia em todos os tecidos, à exceção do cérebro. Nesse tipo de necrose, predomina a coagulação protéica, e tende a acontecer em tecidos com alto teor de proteínas. Os tecidos afetados apresentam uma textura firme. A acidose intracelular desnatura proteínas e enzimas, bloqueando a proteólise celular. Há manutenção da arquitetura básica e contorno das células por, pelo menos, alguns dias. É essa a necrose que deve ser encontrada no tecido ablado por radiofrequência (ROBBINS e COTRAN, 2013).

A apoptose é a via de morte celular programada e controlada intracelularmente através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana celular permanece intacta (o que difere bastante das situações de

necrose), com alteração estrutural para que a célula seja reconhecida como um alvo fagocitário. A célula é eliminada rapidamente, de maneira a não dar tempo de o seu conteúdo extravasar, causando uma reação inflamatória que poderia assemelhar-se à necrose tecidual. A apoptose acontece tanto em eventos patológicos como em eventos fisiológicos. No caso da interação das células do fígado com a radiofrequência, ocorre tipicamente a apoptose patológica (ROBBIN e COTRAN, 2013).

Morfologicamente, as células apoptóticas apresentam encolhimento celular (citoplasma denso e organelas mais agrupadas), condensação da cromatina (a cromatina se agrega na periferia do núcleo, em massas densas de várias formas e tamanhos. O próprio núcleo pode se romper em dois ou mais fragmentos), formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos. Há a fagocitose das células ou corpos apoptóticos pelos macrófagos principalmente e as células saudáveis do tecido migram, se proliferando permitindo ocupar o espaço da célula morta. Esse tipo de evento ocorre na área subletal e é geralmente o mecanismo celular inicial para a recorrência, além da indução de fatores tumorigênicos. Essas características serão fundamentais para a validação do equipamento dentro da expectativa de alcance mínimo de ablação em uma área de 3 cm e torna-se o foco ideal desse estudo pré-clínico. (KANDUC, 2002).

2.5 TESTES PRÉ-CLÍNICOS

2.5.1 Importância, normas e protocolos associados

Equipamentos eletromédicos devem realizar um conjunto de ensaios previstos pelas normas da ABNT: NBR IEC60601-1-2:2006 para o seu licenciamento tecnológico. São ensaios de certificação que sob a orientação da ANVISA versam sobre as prescrições gerais de segurança e compatibilidade eletromagnética. As normas (1) NBR IEC 60601-2-2:2001 que enuncia as prescrições de segurança de equipamentos cirúrgicos de alta frequência e a (2) ABNT NBR IEC/CISPR 11:2012 que relaciona as características das perturbações de radiofrequência devem ser os norteadores para a produção de equipamentos elétricos para a saúde. (MARQUES, 2016)

A Diretriz Metodológica do Ministério da Saúde permite padronizar e impor critérios para o desenvolvimento de novos Equipamentos Médico-Assistenciais (EMA), que por determinação da ANVISA é aplicado a equipamento ou acessório de aplicação médica utilizados na assistência à saúde da população. Seguindo essas Diretrizes, o SOFIA busca atender a todos os domínios que estão envolvidos no desenvolvimento de um EMA (MARQUES, 2016).

Um padrão de classificação foi desenhado pela ANVISA para identificação do perfil do equipamento. No caso do SOFIA sua classificação é Classe II, produto cirurgicamente invasivo para uso transitório em cirurgia que dura menos de 60 minutos e, quanto ao

grau de proteção e choque elétrico, Classe I, segundo a norma NBR 5410. Quanto ao grau de proteção do paciente, ele é classificado como Tipo CF, pois fornece o maior grau de proteção pelo isolamento das saídas aterradas e outras partes acessíveis do equipamento, limitando ainda mais a intensidade da possível corrente fluindo através do paciente. Para esse tipo de equipamento são necessários estudos pré-clínicos ou não clínicos e os estudos clínicos, conforme as fases já supracitadas (Manual do SOFIA).

Os estudos pré-clínicos que são o objeto dessa avaliação ocorrem em modelos animais e são preditivos para garantir segurança aos futuros ensaios clínicos em seres humanos. Assim, considerando o efeito promissor da ARF é imprescindível a avaliação pré-clínica de todas as variáveis físicas e de modelagem matemática para o equipamento SOFIA, mais especificamente, do eletrodo MARINA 5H (MARQUES, 2016) e de suas variações, utilizando um modelo animal e no caso, um modelo da enfermidade ou malignidade envolvida - o hepatocarcinoma.

Esta pesquisa com ratos tem como objetivo final dar suporte para aplicar e testar futuramente o sistema SOFIA em humanos. Então, sob esse prisma, a relevância desse estudo avaliativo será permeada pelos seguintes pontos: (1) será possível conhecer efeitos biológicos da ARF por meio do equipamento SOFIA que terá tecnologia totalmente nacional; (2) será possível validar o sistema desenvolvido o que será imprescindível para sustentar o próximo passo: a pesquisa clínica fase 1 em humanos. Com isso, este estudo tem como objetivo avaliar (a) a toxicidade do nitinol - liga de níquel-titânio (NiTi) do eletrodo MARINA 5H (b) a biocompatibilidade do eletrodo durante e após o procedimento de ablação e (c) a eficácia terapêutica do dispositivo SOFIA em ratos Wistar portadores de carcinoma hepático. Todos os procedimentos propostos neste trabalho estão em conformidade com a ISO – 10993-4 para avaliação de equipamentos médicos.

2.5.2 Validação do equipamento

De acordo com a Unimed (2006), para a ablação por radiofrequência (ARF) sua potencialidade terapêutica é maior para tumores com até 3 cm, pois estes são mais bem definidos por imagem e é possível alcançar toda sua dimensão pela ARF. Sua limitação está associada aos riscos de contaminação do aparato, manipulação imprecisa pelo profissional e disseminação tumoral. Para esse procedimento a taxa de mortalidade é de 0,3%, considerando-se as complicações observadas com a técnica (AKAHANE *et al.*, 2005). Em virtude dessas limitações e potencialidades, é imprescindível a validação da ARF mediada pelo novo equipamento produzido no projeto SOFIA tanto com relação ao procedimento da termoablação, parâmetros de hardware e software e parâmetros relacionados aos efeitos biológicos, sendo esses parâmetros objetos do presente documento.

A ANVISA como agência reguladora de produtos para a saúde, dentre outras funções, elabora um grupo de diretrizes e processos descritivos que permitem estabelecer

os parâmetros mínimos que gerem a confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade necessárias para um produto ou substância ter a segurança necessária para ser utilizado pela população. Dados analíticos devem gerar informações confiáveis para permitir uma avaliação denominada validação. A validação de um método ou substância ou equipamento deve ser um processo contínuo e exigem um planejamento da estratégia analítica com metodologias, técnicas e procedimentos que permitam produzir as evidências objetivas necessárias para sua aprovação e garantia de qualidade e eficiência necessárias ao seu uso final pelo consumidor (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação do equipamento com utilização de um modelo animal associado a um modelo tumoral permitirá (i) verificar a temperatura máxima para a queima do tecido alvo sem atingir tecidos sadios adjacentes à massa tumoral, (ii) verificar a variação de impedância do tecido durante a queima, (iii) verificar o funcionamento dos circuitos de proteção contracorrente de fuga, (iv) avaliar o sistema de controle de abertura das hastes do eletrodo e a (v) eficiência do modelo matemático desenvolvido para prever a área tratada em tempo real. Essa validação permitirá garantir a segurança do equipamento em fase pré-clínica.

Esse trabalho integra esses dois modelos experimentais citados: modelo animal e modelo tumoral para garantir a avaliação da segurança do uso clínico da ARF mediada pelo dispositivo SOFIA. Para tanto, foram consideradas as propriedades termofísicas dos tecidos envolvidos, bem como a escolha da fonte de calor do dispositivo e tempo de exposição do mesmo no tecido (STOFFNER *et al.*, 2012). Ainda, há outras variáveis relacionadas com a resposta de tecidos hepáticos ao aquecimento térmico, como por exemplo, as propriedades do material hepático, duração da ablação, características do tumor e geometria do eletrodo.

Também é proposta a avaliação da interferência dessas variáveis no processo de ARF a fim de garantir a validação do equipamento e avaliação da potencial toxicidade do eletrodo de níquel-titânio (NiTi) associado ao dispositivo SOFIA em ratos Wistar portando hepatocarcinoma. Visto que o aquecimento, gerado pelo procedimento de ARF, pode afetar células saudáveis nas proximidades do eletrodo é fundamental investigar estes efeitos para avaliação do custo-benefício da terapia.

O modelo experimental para testes pré-clínicos ou não clínicos, seja para novos medicamentos ou para equipamento médicos é realizado conforme orientações normativas da ANVISA nas Diretrizes Metodológicas - Elaboração de estudos para avaliação de equipamentos médicos-assistenciais e Guia para a realização de estudos não clínicos e clínicos para registro de heparinas como produto biológico pela via de desenvolvimento por comparabilidade, documentos que auxiliam o pesquisador e empresa certificadora no processo de regularização de produtos para saúde baseados na RDC nº 40 de 27 de agosto de 2015.

Esses documentos orientam para o uso de um modelo animal que permita a trans-

posição de informações para o ser humano e inclui camundongos, ratos, coelhos, cobaias, de várias espécies cada um a escolha do pesquisador conforme fatores como disponibilidade, tipo de doença, tipo de linhagem tumoral, tipo de equipamento ou medicamento e no caso de equipamentos médicos voltados para a oncologia, faz-se necessário o uso de uma linhagem tumoral compatível com o câncer específico. Portanto, o modelo experimental escolhido para o estudo pré-clínico estabelecido nesse estudo segue padrões definidos por normas nacionais que corroboram com normas internacionais como as da agência regulatória *Food and Drug Administration* (FDA) e seu órgão regulador específico para equipamentos médicos e radiológicos *Center for Devices and Radiological Health* e todos esses órgãos são conduzidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KAMPFRATH; COTTEN, 2013).

2.5.3 O carcinosarcoma Walker 256

O tumor Walker é um carcinosarcoma em que há três variantes conforme o local de implantação: carcinoma, carcinosarcoma e sarcoma. Foi identificado em 1928 pelo professor George Walker em glândulas mamárias de uma rata albina prenha, por histopatologia, esse tumor foi identificado como adenocarcinoma. Nesse momento, foram iniciadas as técnicas de transplante e o índice de pega alcançava uma média de 56%, hoje alcança até 100% e as técnicas são variadas (WALKER; HEBER, 2009). No caso desse estudo, a escolha para o implante foi direcionada para o carcinoma hepático. Atualmente, o tumor Walker é considerado um excelente modelo de tumor transplantável com alta reprodutibilidade (VILLAS-BÔAS; MONICO, 1988). A escolha deste modelo de tumor deve-se a algumas vantagens relativas ao seu desenvolvimento no animal, o que proporciona sua imediata aplicabilidade para pesquisa e curto tempo de sobrevivência do animal reduzindo, assim, o tempo de observação e, conseqüentemente, seu sofrimento (ZARUR *et al.*, 2004).

A transferências das células tumorais podem ser realizadas a partir de células ascíticas, do implante de fragmentos do tumor sólido em regiões diversas ou transferidas diretamente de uma cultura de células *in vitro*. Observa-se na literatura que o tumor de Walker pode ser utilizado como modelo para câncer de rim (SILVA *et al.*, 2002), pulmão (NETO *et al.*, 2002), estômago (OLIVEIRA *et al.*, 1998) e outros órgãos, além do fígado e para cada modelo utiliza-se um procedimento próprio de implante e processo de avaliação da densidade celular mas, geralmente, utiliza-se o corante de Azul de tripan para a contagem de células na Câmara de Neubauer. O processo de manutenção da linhagem sempre é realizada pela transferência de inóculos em matrizes de ratos *Wistar* (MORAES *et al.*, 2000). No caso de implantação para hepatocarcinoma, utiliza-se a retirada de fragmentos tumorais a partir de uma matriz inicial aonde a inoculação foi realizada com a forma ascítica (FANG *et al.*, 2010). Para esse procedimento, faz-se uma incisão e a implantação ocorre no lobo esquerdo do fígado. No caso desse estudo, a forma de transplante escolhida

foi a forma direta no lóbulo esquerdo do fígado a partir de uma cultura de células *in vitro* para redução de procedimentos cirúrgicos e de uso de animais.

3 METODOLOGIA

Para esse estudo foram utilizados experimentos *ex vivo* com fígado bovino para avaliação dos parâmetros do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H para potências abaixo de 50W, experimentos *in vivo* com suínos para avaliação dos parâmetros do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H em um animal de porte médio em perfusão sanguínea durante um procedimento de ablação, experimentos *in vitro* para análise de citotoxicidade do eletrodo MARINA 5H e experimentos *in vivo* com ratos *Wistar* (albino de médio porte), da espécie *Rattus norvegicus* para estudo de um modelo experimental pré-clínico para um equipamento de radiofrequência durante procedimentos de ablação térmica para tratar um modelo de carcinossarcoma de células tumorais *Walker 256* equivalente a um carcinoma hepatocelular humano.

Esse estudo iniciou-se com ajustes de parâmetros do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H para um animal de pequeno porte (figura 14). O capítulo está organizado para sistematizar essa sequência experimental citada acrescida do método analítico de estatística, nessa ordem de apresentação. Para cada experimento é descrita a sua relevância acrescentada sua caracterização e implicações no protocolo experimental, no caso das análises são descritas as técnicas e a importância de cada uma no estudo. O conjunto experimental tem uma relação de interdependência e cada etapa interfere na posterior. Considera-se o protocolo experimental proposto como inovador no panorama nacional para a tecnologia de uso da ARF e capaz de cumprir as normas dos órgãos reguladores.

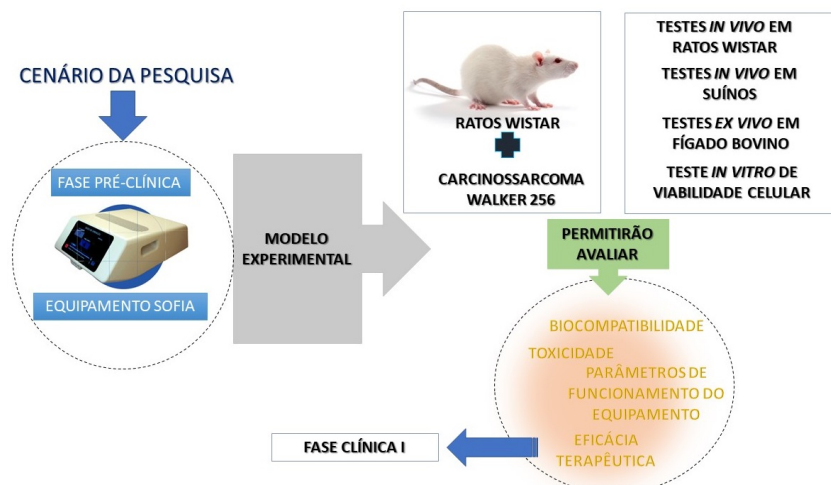


Figura 14 – Esquema explicativo do modelo experimental proposto como etapa para estudo não-clínico do SOFIA permitindo a validação de parâmetros de funcionamento do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H envolvendo testes *ex vivo* (em fígado bovino), *in vivo* (em ratos *Wistar* e suínos). Inclui o teste *in vitro* (em cultivo de células *Walker*) para verificação de toxicidade e biocompatibilidade da composição de níquel-titânio das hastes do eletrodo.

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E MODELO EXPERIMENTAL

Para alcançar os objetivos desse estudo, foi construído um desenho experimental que permitiu alcançar a meta de avaliação dos ajustes necessários para um estudo não clínico ou teste pré-clínico do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H. Um resumo do desenho experimental com os grupos animais e controle mais a rotina a ser seguida no grupo de animais com tumor está proposto na figura 15 e inseridas as variáveis a serem avaliadas e os procedimentos envolvidos.

Os procedimentos com as células tumorais foram realizados em fluxo laminar localizado em sala de biossegurança 2 no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia/UnB. Os procedimentos com fígado bovino foram realizados no Laboratório de Engenharia Biomédica/LaB no prédio SG11 do Campi Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília. Os procedimentos cirúrgicos com os suínos ocorreram na PUC (Pontifícia Universidade Católica) de Goiânia/GO, sob supervisão da Dr^a Fátima Mrué e supervisão anestésica da veterinária local. E por fim, os procedimentos realizados nos ratos *Wistar* ocorreram no Laboratório de Cirurgia Experimental (CiEx) da Faculdade de Medicina/UnB sob supervisão técnica do veterinário local responsável.

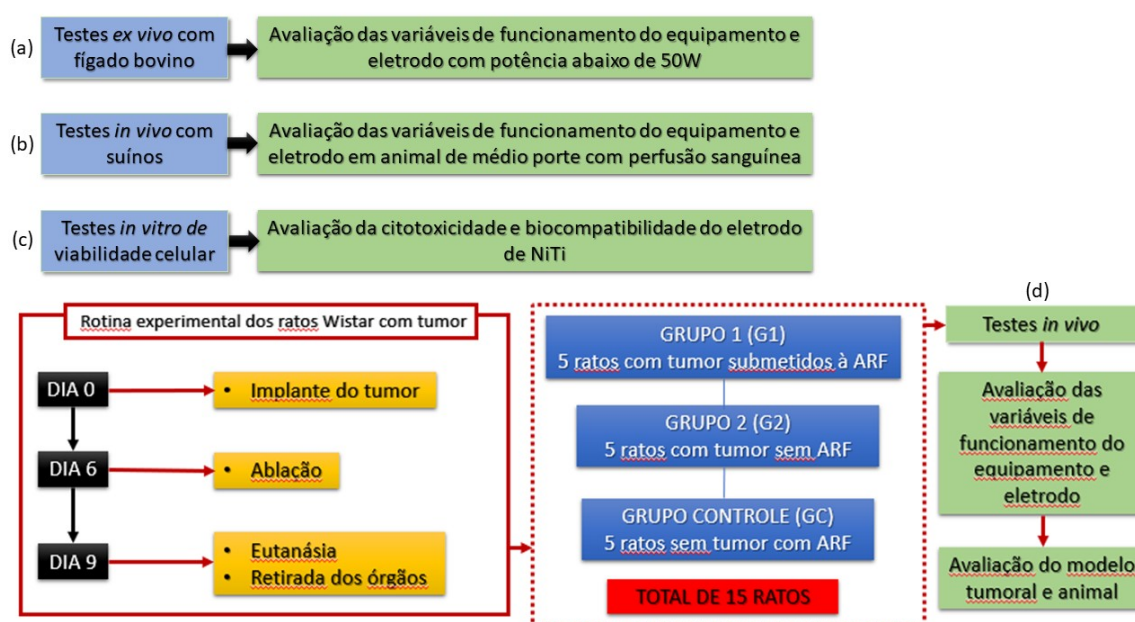


Figura 15 – Esquema explicativo do protocolo experimental com as análises a serem realizadas para os testes *ex vivo* (a), os testes *in vivo* (b) e (d), os testes *in vitro* (c) e a rotina experimental para os grupos de animais com tumor.

3.2 TESTES *EX VIVO* EM FÍGADO BOVINO

Foi realizada uma análise prévia de tempo e potência em ensaios *ex vivo* utilizando-se fígado de boi para avaliação de dados de temperatura, potência, tempo com o eletrodo e uma análise estatística final que fornecesse uma avaliação da variação do tempo e potência ótimas para cada nível de abertura do eletrodo em uma potência abaixo de 50 W que é a fornecida para humanos ou animais maiores experimentais como um suíno. Como a expectativa desse estudo estava em animais de pequeno porte, ratos *Wistar*, buscou-se reduzir essa potência em diferentes tempos e aberturas das hastes do eletrodo.

Estes testes *ex vivo* ocorreram no LAB – Laboratório de Engenharia Biomédica na Universidade de Brasília e compreenderam um grupo de amostras programadas com análise de cinco repetições para cada tempo em cada potência escolhida, e esse conjunto de repetições ocorreu para cada nível de abertura das hastes do eletrodo: menor, com 3 mm (1), mediana, com 4 mm (2) e maior, com 5 mm (3) abertura em três tempos diferentes: 1, 3 e 5 minutos e nas potências de 5 W, 10 W e 15 W.

3.3 TESTES *IN VIVO* EM SUÍNOS

A ação ablativa do eletrodo *in vivo* em fígado de suínos foi observada para compreensão de seus parâmetros em animal de grande porte com perfusão sanguínea constante, no Centro Cirúrgico do Departamento de Medicina da PUC (Pontifícia Universidade Católica) de Goiás, sob a supervisão técnica da professora Dr^a Fátima Mrué. Todos os

procedimentos realizados ocorreram com a observância dos preceitos regidos na Diretriz da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – animais de prática cirúrgica.

Os animais utilizados pertenciam à PUC e passaram pelo Comitê de Ética como animais para aula da própria da Universidade. Posteriormente, em outubro do ano de 2016, na mesma universidade e também com supervisão técnica da professora Dr^a Fátima Mrué, novos procedimentos foram realizados em fígados de suínos, com abdômen aberto e perfusão sanguínea, a ablação por ARF foi realizada diretamente em fígado exposto.

3.4 MODELO ANIMAL - RATO *WISTAR*

Escolheu-se o rato albino *Wistar* (espécie *Rattus norvegicus*) fêmea heterogênea para ser o modelo animal que permitisse ser uma opção de fácil manipulação e manejo, ciclo de vida curto e que desenvolvesse o CHC de forma similar ao ser humano favorecendo a transposição de dados para o ensaio clínico de Fase I com humanos. Os animais foram obtidos da Universidade Católica de Brasília (UCB) após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UnB), documento em anexo.

O rato *Wistar* é um animal dócil possui porte médio e adequou-se ao modelo experimental pré-clínico proposto. Os animais obtidos estavam na fase adulta com média de 3 a 4 meses de idade pesando na faixa de 200 a 300 gramas. Sua cauda geralmente apresenta 85% do comprimento de seu corpo, seus olhos são exoftálmicos e suas orelhas são pequenas em relação à cabeça.

3.4.1 Rotina de manejo e manipulação dos animais

Os três grupos de animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina e no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília com regularidade de iluminação - 12 horas de claro e 12 horas de escuro -, ração e água *ad libitum*, em caixas apropriadas para a espécie com maravalha autoclavada (serragem) e estante climatizada à temperatura de 22 a 30°C. Na quinzena antecedente às cirurgias, os animais eram visitados pela autora constantemente para ambientá-los com sua presença, alimentando-os com complementos alimentares como granola, damasco e sementes de abóbora reduzindo a animosidade nos de manipulação para os procedimentos cirúrgicos.

Foram mantidos no máximo 3 animais por caixa reduzindo o estresse em grupos populosos e nos dias da cirurgia, em seu retorno para o biotério, os animais foram mantidos aquecidos ao longo do procedimento e após o momento para reduzir a probabilidade de morte por hipotermia. Também eram acrescentados os complementos alimentares e fornecido um enriquecimento ambiental de tufo de papel pardo cortado em tiras para estimular a formação de ninhos, comportamento típico dessa espécie no ambiente natural.

Essa forma de manejo e manipulação permite reduzir o estresse já vivenciado pelo animal e garante resultados com o mínimo de influência de estresse metabólico.

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E COMPORTAMENTAIS

Uma avaliação de parâmetros clínicos como medida de peso corpóreo, aspecto da urina e fezes, padrões de comportamento e alimentação. Análises clínicas são preditivas de toxicidade e são fundamentais para avaliar um sistema terapêutico. A análise comportamental refere-se aos sinais clínicos que foram observados sistematicamente e registrados.

Os sinais clínicos avaliação foram a ocorrência de diarreia, ulcerações na pele, hiper ou hipoatividade, letargia, alterações neurológicas motoras, dores e câimbras abdominais e mortes não esperadas, cianose, consumo de ração/água. Em cada tumor macroscopicamente visível ou palpável, eram verificadas sua progressão, aparência e tamanho. Essas observações eram avaliadas durante todo o período experimental e, em particular, até duas horas após cada procedimento.

3.6 ANÁLISE DE TOXICIDADE *IN VITRO* POR AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

Essa é uma técnica colorimétrica baseada na absorbância da concentração presente do produto formazan - sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água, obtido após redução do reagente MTT (brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) - sal de coloração amarela e solúvel em água (figura 16), por ação de desidrogenases mitocondriais, indicando atividade dessas organelas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

3.6.1 Modelo de células normais - Fibroblastos

Para o grupo controle positivo de MTT foi utilizada uma cultura de células primárias de fibroblastos obtidas de polpa de dente humano e transferida para garrafas de cultura para sua manutenção e expansão utilizando-se o meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, meio sintético complexo). Uma garrafa de 250 mL foi utilizada para o teste de viabilidade celular. Os fibroblastos são células aderentes com longas projeções de adesão. As culturas primárias são obtidas a partir de um fragmento de um tecido e as células que sobreviverem após a desagregação na garrafa de cultura formam uma monocamada inicial. Essa monocamada foi formada e estabelecida uma cultura de fibroblastos para o teste em questão. Esse tipo de cultura permite analisar as características genotípicas e fenotípicas do tipo celular cultivado. E nesse estudo foi a referência de células não-neoplásicas. A manutenção e expansão dessa cultura ocorreu em estufa úmida a 65,6°C e 5% de CO₂

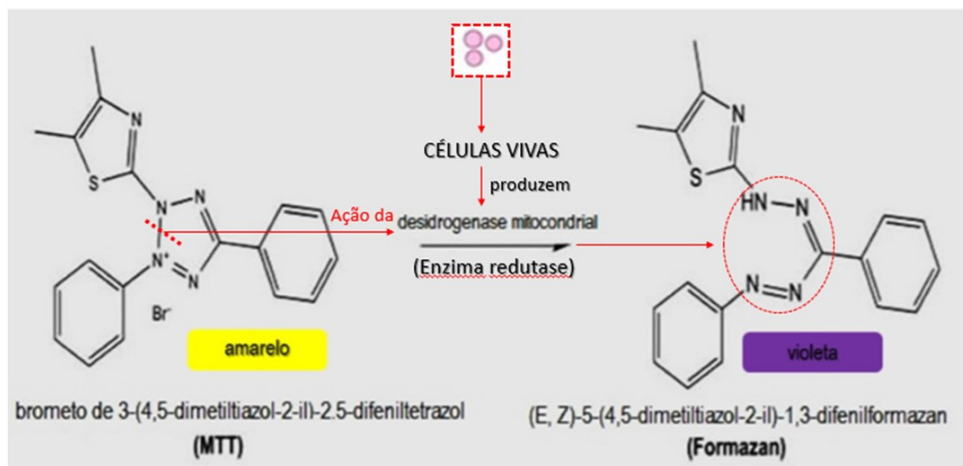


Figura 16 – Reação de redução do MTT em formazan por ação de desidrogenases mitocondriais. (Disponível em < cursobioquimica.iq.usp.br > acesso em 15 fev 2018, imagem adaptada pela autora)

3.6.2 Procedimento da análise de viabilidade celular

Utilizou-se para comparação o grupo de células normais de fibroblastos e um grupo experimental de uma alíquota da cultura de células *in vitro* Walker256. Fez-se o cultivo em placas de 24 poços de cada grupo por 24 horas após realização da contagem das células em câmara de Neubauer. Para cada poço, foram colocadas 1×10^5 células de cada linhagem. Os poços foram organizados em triplicatas como descritas a seguir: 3 (três) poços com fibroblastos e meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, meio sintético complexo) sem eletrodo e outros 3 (três) com os mesmos componentes, mas com uma haste do eletrodo posicionada no fundo do poço; 3 (três) poços com células Walker 256 e meio RPMI, (*Roswell Park Memorial Institute medium*, meio sintético complexo) sem eletrodo e outros 3 (três) com os mesmos componentes, mas com uma haste do eletrodo posicionada no fundo do poço. As hastes foram esterilizadas previamente utilizando-se luz ultravioleta por 20 minutos.

Após 72 horas, $350 \mu\text{L}$ do reagente MTT foi adicionado a cada poço (em fluxo laminar com luz fria desligada) e após 4 horas, estando a placa acondicionada em papel alumínio, adicionou-se $500 \mu\text{L}$ de DMSO (dimetilsulfóxido) e logo após fez-se a ressuspensão para ser realizada em seguida a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm próprio para identificação do Formazan. A proposta de uso desse protocolo para avaliação de toxicidade conforme proposto por (MOSMANN, 1983).

O protocolo de cultivo celular utilizado para o modelo tumoral do carcinossarcoma

Walker 256 está descrito a seguir na seção Modelo Tumoral.

3.7 MODELO TUMORAL

3.7.1 Implante tumoral do carcinossarcoma *Walker* em ratos *Wistar*.

Inicialmente, foi necessário acompanhar e avaliar o modelo tumoral de carcinossarcoma no grupo de ratos *Wistar* para acompanhar seu crescimento e verificar sua expansão, presença ou ausência de metástase, para coleta de dados clínicos comportamentais dos animais com o tumor e acompanhar o padrão do crescimento tumoral ao longo do tempo previsto para o experimento.

O carcinossarcoma *Walker* 256 foi implantado de forma direta para desenvolver um carcinoma hepatocelular de ratos e favorecer a transposição dos dados obtidos para o ser humano, observando que o rato é o modelo animal mais utilizado por ser de fácil manipulação, tempo de vida curto e desenvolvimento similar de carcinoma hepatocelular humano, com as mesmas características e prognóstico.

A obtenção das células tumorais é o procedimento prévio ao implante em que se utiliza a cultura de células *in vitro* para transferência das células. Esse procedimento ocorreu em etapas e se iniciou após a obtenção da linhagem tumoral *Walker* 256 (LLC-WRC) da *Sigma-Aldrich* a partir de linhagem *in vitro* (figura 17) que se caracteriza como uma linhagem aderente (que se adere à superfícies lisas como uma garrafa de cultura). As etapas prévias à inoculação incluem: (1) **criocongelamento de alíquotas de células** em *freezer* a -80°C para reserva temporária realizada a cada dois meses e em nitrogênio líquido, para reserva a longo prazo, realizada a cada semestre; (2) **descongelamento de alíquotas** de células para experimentação; (3) **manutenção da linhagem** a partir de alíquotas descongeladas utilizando-se a técnica de passagens ou repique em garrafas de cultura; (4) **expansão celular** das garrafas de cultura; (5) **contagem das células** em câmara de Neubauer utilizando-se o corante Azul de tripan; (6) **transferência** de uma alíquota de $100\ \mu\text{L}$ com a densidade celular necessária para o implante direto no lóbulo do fígado (7) **implante direto** no lóbulo do fígado após anestesia e incisão.

(1) CRIOCONGELAMENTO DE ALÍQUOTAS DE CÉLULAS

Para esse procedimento as células presentes na garrafa de cultura foram primeiramente desaderidas utilizando-se a enzima tripsina 0,25% EDTA por 4 minutos em estufa a 37°C , após essa etapa, as células foram transferidas para um falcon de 15 mL a 300 g por 3 (três) minutos. As células foram ressuspensas em solução de criocongelamento (aproximadamente $1 \times 10^6/500\ \mu\text{L}$) em solução de criocongelamento que contém DMSO (dimetilsulfóxido) e o meio de cultura adequado à essa linhagem - o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*). A solução é fracionada em alíquotas e transferidas para criotubos que serão levados para o *freezer* de -80°C e após 24h, algumas amostras são

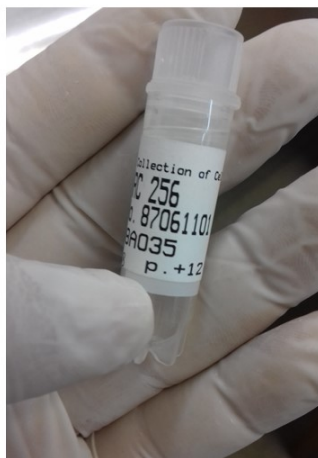


Figura 17 – Criotubo com *pellet* de células *Walker 256* obtido da Sigma-Aldrich. (Arquivo pessoal)

transferidas para o nitrogênio líquido.

(2) DESCONGELAMENTO DE ALÍQUOTAS DE CÉLULAS

Foram selecionados pelo menos 3 a 4 criotubos armazenados no *freezer* de -80°C levados ao banho-maria previamente aquecido à 37°C . Realizou-se a transferência do conteúdo para um falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio RPMI completo pré-aquecido. O falcon foi centrifugado a 300 g por 3 minutos, retirado o sobrenadante e ressuspendido em 5 mL de meio RPMI e transferido seu conteúdo para uma garrafa de cultura 75 mL. A garrafa estufa foi mantida em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 .

(3) MANUTENÇÃO DA LINHAGEM

Esse procedimento ocorreu a cada 2 dias em média para garantir a sobrevivências das células de forma saudável e manutenção de suas características da linhagem. Usou-se o mesmo procedimento de remoção das células aderidas na placa com tripsina utilizado na etapa (1), o que permitiu transferir alíquotas de células para outras garrafas que foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 impedindo que fatores limitantes ao crescimento celular como espaço e alimento (presente no meio de cultura RPMI) impedissem sua proliferação e manutenção.

(4) EXPANSÃO CELULAR

Após a remoção das células da placa com tripsina, alíquotas das células foram transferidas para garrafas de cultura de 250 mL inicialmente até alcançar 3 garrafas de 600 mL para favorecer sua proliferação e aumentar sua população até alcançar a densidade

de 3×10^7 suficiente para a inoculação direta.

(5) CONTAGEM CELULAR

Também após a remoção das células da placa com tripsina de 3 garrafas de cultura de 600mL, esse conteúdo celular foi transferido para 3 falcons de 15 mL, centrifugadas a 300 g por 3 minutos e depois ressuspendidas em 5 mL de meio RPMI. Após a ressuspensão, 100 μ L com PBS (tampão fosfato-salino) e azul de tripan são levados para a contagem em câmara de Neubauer.

(6) TRANSFERÊNCIA

A transferência foi realizada logo após a contagem de células em que uma alíquota de 0,1 mL foi colocada em uma seringa de 1 mL, levada ao gelo e deslocada até o local aonde os procedimentos cirúrgicos com os animais foram realizados.

A figura 18 mostra a sequência de etapas desses procedimentos de (1) a (7).

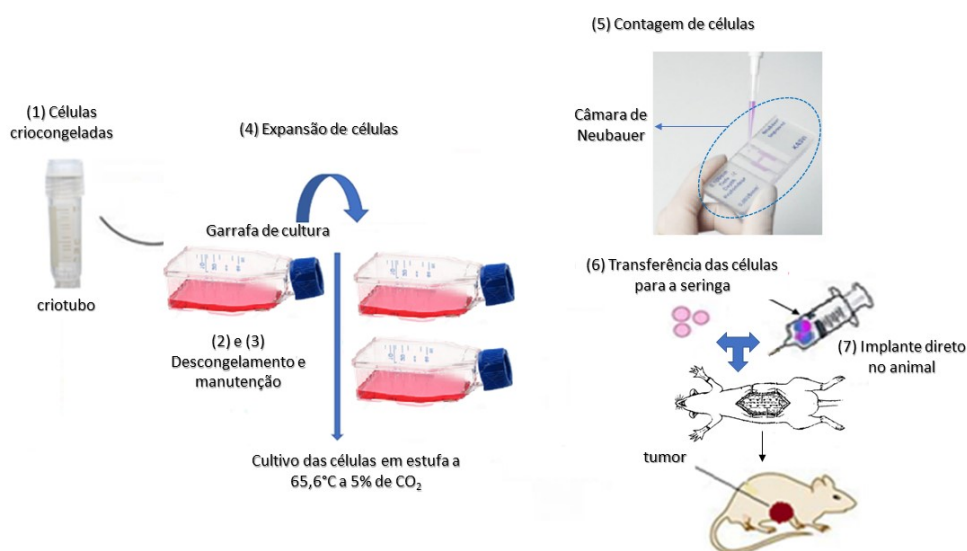


Figura 18 – Etapas do cultivo de células *in vitro* até o implante direto realizado no lobo esquerdo do fígado do rato.(Autoria própria)

(7) IMPLANTE DIRETO

Para transferência do tumor, a solução de 0,1 mL com o tumor *Walker* foi inoculada com uma seringa de 1 mL contendo duas opções de densidade celular: 3×10^7 de células e 1×10^7 de células com agulha 3 G1/2 sob visão direta no lobo esquerdo do fígado conforme imagem da figura 19. Essa inoculação ocorreu após incisão de 5 cm, próxima ao processo xifóide, com lâmina de bisturi de nº 11 estando os animais anestesiados com quetamina 10% e xilazina 2% intraperitoneal conforme o peso do animal. Logo após a inoculação das células, a incisão foi suturada com fio de *catgut* 4.0 para o peritônio e *mononylon* 4.0 para o

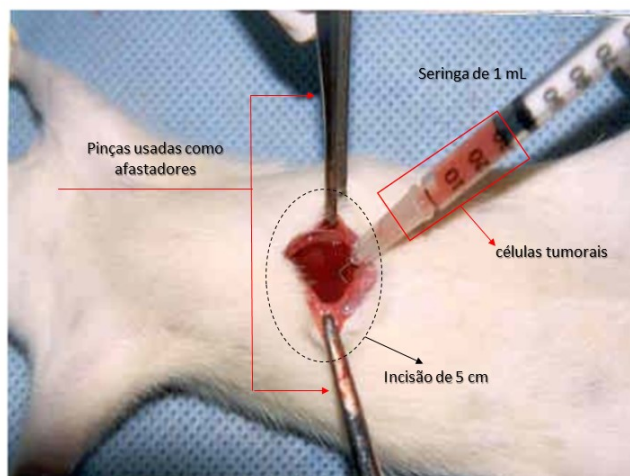


Figura 19 – Imagem da incisão no rato *Wistar* e implante do tumor de *Walker* por inoculação no lóbulo esquerdo do fígado (ZARUR *et al.*, 2004, adaptado pela autora.)

tegumento em plano único. A solução possuía a mesma densidade de células tumorais para cada implante, garantindo uma formação tumoral equivalente ao carcinoma hepatocelular para os 10 ratos *Wistar*. A viabilidade das células frescas foi determinada por meio de coloração com Azul de Tripán 0,2% utilizando-se 25 μL da coloração para 10 μL de células observadas em microscópio invertido. Também foram realizados implantes diretos com as mesmas opções de densidade celular na forma subcutânea no flanco do animal e na forma intramuscular no músculo de sua pata. Os procedimentos pós-implante seguintes se repetiram em todos os casos.

Após esse procedimento, os animais receberam uma dose de Meloxicam (1mg/kg) por 2 dias, sendo a primeira logo após a sutura, após essa etapa, os animais foram mantidos em observação até sua recuperação anestésica no biotério para acompanhamento do crescimento do tumor e posterior procedimento de ablação. Após 6 dias, o animal foi conduzido ao procedimento de ablação por ARF. Os animais foram mantidos no biotério até a eutanásia que ocorreu três dias após a ARF (DIA 9). Os animais foram eutanasiados com o anestésico isofluorano inalatório.

3.7.2 Ablação

No dia 6, foi realizado o procedimento de ablação por ARF, o abdômen do rato foi aberto utilizando-se material estéril. Os eletrodos foram inseridos cuidadosamente para evitar danos aos vasos e a ablação realizada usando o dispositivo SOFIA (figura 20). A anestesia do animal foi realizada com quetamina 10% e xilazina 2% intraperitoneal com seringa de 1mL.

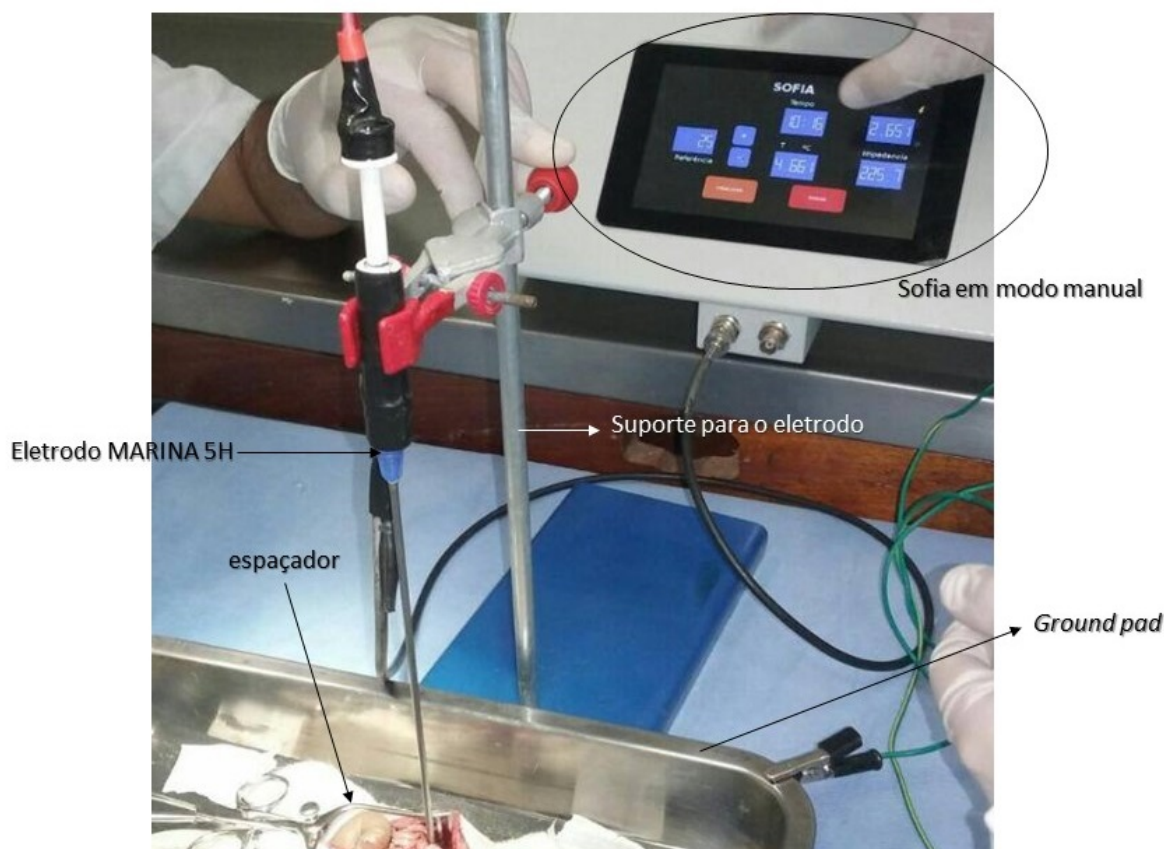


Figura 20 – Procedimento de ablação no rato utilizando o modo manual do SOFIA e suporte para o eletrodo MARINA 5H realizado em ambiente estéril na Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. (Arquivo pessoal)

Para o procedimento foi realizada nova incisão de 6 cm para introdução passiva do eletrodo formato guarda-chuva no lobo do fígado. A incisão foi feita após tosa dos pêlos da região frontal e assepsia com solução de iodo a 1%. O circuito foi fechado estando o eletrodo *ground pad* na região dorsal do animal iniciando o tratamento ablativo. Na figura 21 tem-se a disposição do plano de terra com um corte de 6 cm x 6 cm na camada isolante de acrílico (material de cor preta) aonde o animal foi disposto com o dorso tosado anteriormente (para evitar isolamento) e garantir a condução somente nessa região. Após o procedimento, a incisão foi suturada com os mesmos critérios utilizados para o implante

de células. Nos dois dias contados a partir da ablação foi realizada a analgesia do animal com Meloxicam (1mg/kg) e o animal foi mantido no biotério até o dia 9.



Figura 21 – Plano de terra do eletrodo de retorno. Esta figura mostra o isolante acrílico (material de cor preta), o material condutor (suporte metálico) e o corte retangular nas dimensões 6 x 6 cm que permitia a condução somente nessa região aonde o animal foi posicionado deitado com o dorso para baixo, com as patas afixadas e já com a incisão realizada. O animal estava anestesiado. (Arquivo pessoal)

3.8 REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE

Uma revisão sistêmica duplo cego foi realizada nas bases de dados: PUBMED, SCIELO, LILACS, BIREME, COCHRANE, SCIENCE DIRECT, IEEE. As palavras-chaves utilizadas foram: "CARCINOMA HEPATOCELULAR", "PRIMARY LIVER CANCER", "REVIEW", "RADIOFREQUENCY", "HEPATIC ABLATION DEVICE", "CATHETER ABLATION", "RECURRENCE", "MORTALITY", "MORBIDITY", "LOCAL TUMOR PROGRESSION", "RECURRENCE", com os conectivos lógicos "AND" e "OR" para a ampliação dos termos de busca. Essas palavras-chaves foram usadas para buscar referências que envolvessem a ablação por radiofrequência em hepatocarcinoma celular percutânea envolvendo eletrodos monopolares, bipolares ou multipolares. Inclusion Criteria Os critérios de inclusão para os estudos foram: estudos com pacientes com CHC em estadiamento 0 ou A conforme a classificação de BLCL, submetidos a RFA com geradores

comerciais e eletrodos monopolar, bipolar ou multipolar; estudos com a RFA combinada com outras terapias (quimioembolização, crioablação, ressecção etc); avaliações dos volumes ou área de ablação feitos por imagem e análise de sobrevida, com as taxas de sobrevida e de recorrência da doença nos pacientes. Ainda no caso de revisões e estudos qualitativos sobre ablação por radiofrequência ou sobre carcinoma hepatocelular, considerou-se os últimos cinco anos e a seleção final considerou os trabalhos a partir de 2015 que se observaram serem bastante abrangentes e com duplicidade de dados com os mais antigos.

Os critérios de exclusão adotados excluíram CHC com diâmetros maiores que 3 cm, as neoplasias que não eram carcinoma hepatocelular ou outras enfermidades, outros tipos de ablação que não fossem a RFA, técnicas de ablação que não fossem conjugadas com RFA. O tamanho do tumor versus a recorrência foi o conceito central a ser abordado. A recorrência foi analisada no aspecto geral quanto a sua origem e também foi avaliada de forma específica quanto ao padrão denominado Local Tumor Progression (LTP) já estabelecido na literatura e que considera uma formação tumoral recorrente localizada na área ablada. Esse critério se diferencia do padrão antagônico denominado Intrahepatic Distant Recurrence (IDR) que caracteriza uma recorrência de origem sistêmica, portanto quando a recorrência é analisada no aspecto geral os dois padrões foram considerados.

Utilizou-se dois autores desse artigo de forma independente para avaliação dos dados obtidos. No caso, eles realizaram a extração de dados e avaliaram: (1) o tipo de estudo; (2) ano de publicação e autores; (3) o objetivo da revisão desse artigo; (4) as contribuições inéditas ou relevantes nos estudos randômicos e não-randômicos. As divergências foram resolvidas em discussão.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conforme orientações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA, UnB), (FONTELLES *et al.*, 2010) e (PAES, 1998) nesse estudo foi adotada uma análise pareada (teste “t” de Student) no delineamento experimental definido para os grupos de ratos que permitiu a redução da variabilidade das medidas e necessidade numérica amostral bem como maior comparabilidade entre os indivíduos de acordo com os cálculos a seguir (equações 1 e 2).

Na figura 15 está definida a distribuição amostral dos três grupos de ratos que estiveram envolvidos com o implante tumoral. Os três grupos seguem uma distribuição fixa de número amostral de cinco animais para cada ensaio. Reforça-se que o delineamento exige que os grupos apresentem o mesmo tamanho amostral (n); então, o tamanho da amostra foi calculado para cada um dos grupos isoladamente e multiplicado pelo número total de grupos (3 grupos). O *software* usado para realizar o cálculo foi o BioEstat versão

5.0, programa distribuído gratuitamente. A fórmula empregada foi:

$$n = \frac{2s^2}{d^2} [z_{\alpha/2} + z_{\beta}]^2 \quad (1)$$

De acordo com dados da literatura (FONTELLES *et al.*, 2010), para o cálculo do n, considerando-se o teste “t” de Student, o erro alfa corresponde a 0,05 ($\alpha = 0,05$) e poder do teste = 0,80, logo o z_{α}

2 = Valor do erro alfa (bicaudal) é $z_{0,025} = 1,96$ e para o poder de teste adotado o $z_{\beta} =$ Valor do erro beta é $z_{\beta} = 0,84$. Assim, adotamos d = diferença mínima a ser detectada, com base no delineamento experimental realizado preliminarmente em suínos (detalhado na secção 9.4.2) de 2 cm de área entre os grupos, e adotou-se um desvio padrão 1,2 cm. Desta forma, o n amostral resultou em:

$$\begin{aligned} n &= 2 \frac{(1.2)^2}{2^2} [(1.96 + 0.84)^2 \\ n &= \frac{1.2^2}{2} (7,84) \\ n &= 5,6 \end{aligned} \quad (2)$$

Logo, a amostra definida é de 15 animais no total, o que corresponde ao n de 5 animais para cada grupo experimental, sendo que temos um total de 3 grupos de estudo. Para analisar a viabilidade celular estimada pela técnica de MTT dos grupos experimentais realizou-se também o teste "t" de *Student* não pareado para avaliar a redução da porcentagem de células viáveis devido a citotoxicidade do eletrodo. A análise estatística considerou a população inicial de células de cada grupo como 100%. Em todos os casos diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE PRÉ-CLÍNICO INOVADOR NA SAÚDE PÚBLICA

O estabelecimento de um modelo experimental para a validação do equipamento SOFIA e o eletrodo MARINA 5H é inédito no Sistema Único de Saúde para ensaio pré-clínico para um equipamento de ablação por radiofrequência com tecnologia nacional e de baixo custo. Utiliza as possibilidades de modelos animais e celulares e estabelece uma sequência de testes experimentais elegendo o teste *in vitro* como opção inicial para determinação de toxicidade estabelecendo-se como parâmetro para comparação com dados hematológicos *in vivo* de toxicidade.

Observa-se no mercado de equipamentos médicos que há empresas com fornecimento de serviço de análise de ensaios pré-clínicos e a orientação do órgão regulador ANVISA ainda é pobre na condução do pesquisador nas suas resoluções para esse tipo de ensaio para equipamentos médicos. A orientação já está mais ampla e direcionada para medicamentos. Um ensaio pré-clínico de um equipamento médico envolve etapas que avançam além dos testes de metrologia do equipamento previamente realizados.

É fundamental a interação entre áreas médicas, biológicas e engenharias na criação de novos EMAs percebe-se que a interface entre áreas ainda surge como desafio e é fundamental um trabalho integrado dentro do projeto para que haja interação de linguagens técnicas específicas para resolução de problemas. Essa integração já citada em capítulo anterior nesse estudo exige um quantitativo alto de pesquisadores de todos os níveis de formação abrangendo desde a Iniciação científica, alunos em trabalho de conclusão de curso, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos.

Por ser um conjunto de muitas pessoas interagindo fez-se necessária uma equipe de gestão administrativa que possuísse esse conhecimento técnico e orientasse a gestão de atividades e fomentos necessários para aquisição de materiais e disponibilidade de bolsas para permitir a disponibilidade de cada pesquisador imerso no trabalho de pesquisa. Na construção do projeto pré-clínico ficou clara a necessidade de pesquisadores da área biológica interagindo com os engenheiros envolvidos com a construção do equipamento e do eletrodo para percepção e compreensão das interferências envolvidas com a ablação realizada pelo sofia em animais.

Com esse protocolo experimental *textit*in vivo, é possível assegurar a integração das partes do equipamento após os testes tradicionais metrológicos e prever a viabilidade do eletrodo e sua atuação sobre o órgão do animal. A efetividade dos testes garantirá sem dúvida uma mudança no perfil de internação de pacientes para tratamento de CHC, reduzindo os custos da saúde pública com essa parcela da população que precisará de

somente um dia pós-procedimento para observação durante essas 24h dos efeitos adversos que possam originar-se da intervenção laparoscópica. A progressão positiva do prognóstico pela redução do estadiamento por uma possibilidade de cura sem a necessidade de ressecção – reduzindo as chances de complicações típicas de um procedimento cirúrgico ou transplante – reduzindo a quantidade de pacientes na fila com risco de óbito pelo tempo de espera.

4.1.1 Testes *ex vivo* em bovinos e testes *in vivo* em suínos e ratos *Wistar*

Já nos resultados preliminares em suínos e os posteriores em ratos foi evidenciada a relevância da observação do comportamento do equipamento. No caso dos suínos, o formato do dorso do animal dificultou o fechamento do circuito no eletrodo de retorno devido um mal posicionamento do eletrodo *ground pad*, a anatomia do fígado com lobos pouco espessos, a perfusão sanguínea e diversidade de impedância de cada órgão interferiram na estabilidade do funcionamento do equipamento e foram variáveis que trouxeram desafios para a equipe multidisciplinar. Nos dois casos, essas variáveis interferiram no tempo do procedimento e na sua eficiência ablativa.

A análise dos resultados dos ensaios *ex vivo* utilizando-se fígado de boi para avaliação de dados de temperatura e potência permitiu a definição dos parâmetros do equipamento de ablação SOFIA para utilização no modelo animal e modelo experimental descrito nesse estudo. A partir dos dados obtidos com os experimentos *ex vivo*, percebeu-se que ocorre uma área tipicamente arredondada e bem definida com uma área menor mais escura próxima ao local de inserção do eletrodo que macroscopicamente é identificada como área de carbonização. As melhores opções de potência foram 10 W em 3 minutos de ablação e 15 W em 1 minuto de ablação (figura 22).

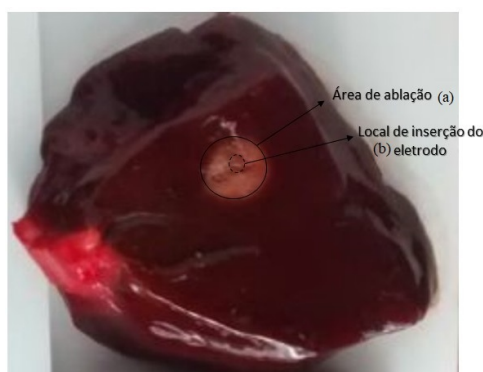


Figura 22 – Região de ablação a 15 W de potência em 1 minuto de ablação realizada em fígado bovino *ex vivo* escolhida como a melhor relação de potência e tempo para uma ablação com potências abaixo de 50W. (a) área total de ablação comparada com a (b) área de carbonização ou área menor próxima à região de inserção do eletrodo aonde macroscopicamente gera uma área de cor castanho-escuro.

A avaliação das áreas concêntricas menor e maior foi realizada pela análise da dispersão e desvio padrão utilizando o *software* Excel para construção de um histograma com os valores dessas duas áreas concêntricas típicas em testes *ex vivo*: a área completa de ablação comparada com a área próxima à região de inserção do eletrodo aonde macroscopicamente já ocorre um processo de carbonização gerando uma área de cor castanho-escuro. Também foi analisada a curva de temperatura utilizando o *software* MATLAB (*MathWorks*) para acompanhar o aumento de temperatura ao longo do tempo na região de ação do eletrodo. Os melhores resultados foram com a abertura de 3 mm (menor) e nas potências de 10 W e tempo de 3 minutos (figura 23 e figura 24) e potência de 15 W, no tempo de 1 min (figura 25 e figura 26).

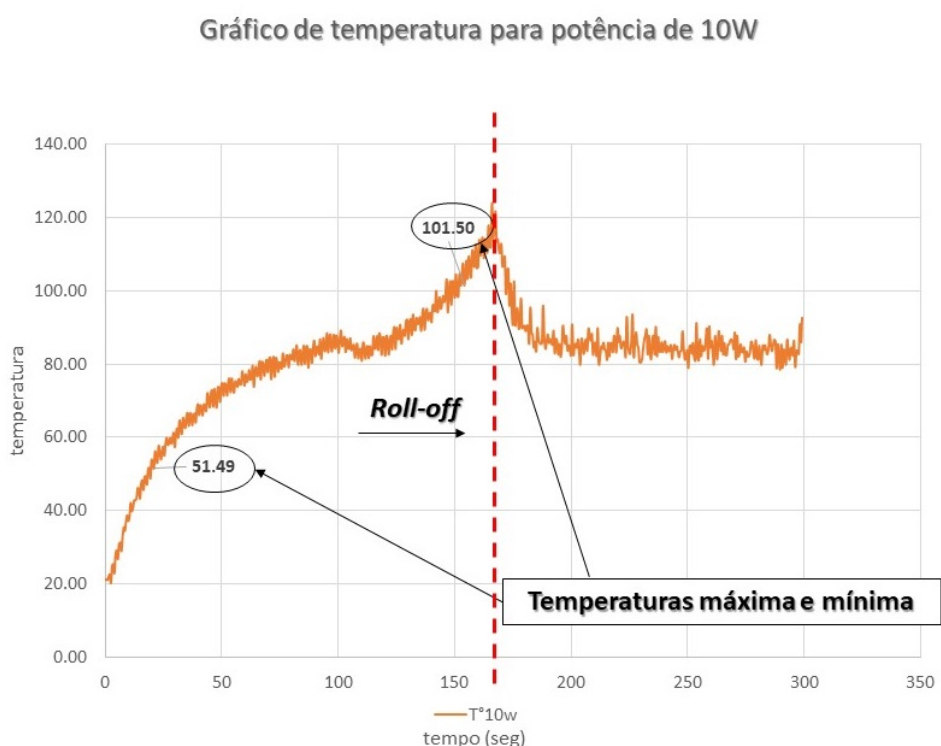


Figura 23 – Gráfico de temperatura com a indicação do momento do *roll-off* quando a temperatura alcança 100°C (temperatura máxima) e a indicação da temperatura mínima para haver ablação que são 50°C (temperatura mínima) para a potência de 10W. O tempo antes de alcançar 50 °C foi de 18 segundos e o intervalo de tempo entre 50°C e 100°C foi de 136 segundos.

Quando a ablação realizada *ex vivo* é comparada com a ablação realizada em suínos, percebe-se a interferência da impedância dos outros tecidos presentes nos sistemas fisiológicos de um animal vivo, além da redução da energia liberada pela ARF por interferência da perfusão sanguínea e diferenças entre as impedâncias de cada órgão, além do fígado. As áreas ablatadas não são facilmente localizadas e por ser o fígado do porco diferente em espessura do fígado bovino, a formação da área ablatada nem sempre é homogênea como a encontrada no fígado bovino (figura 27).

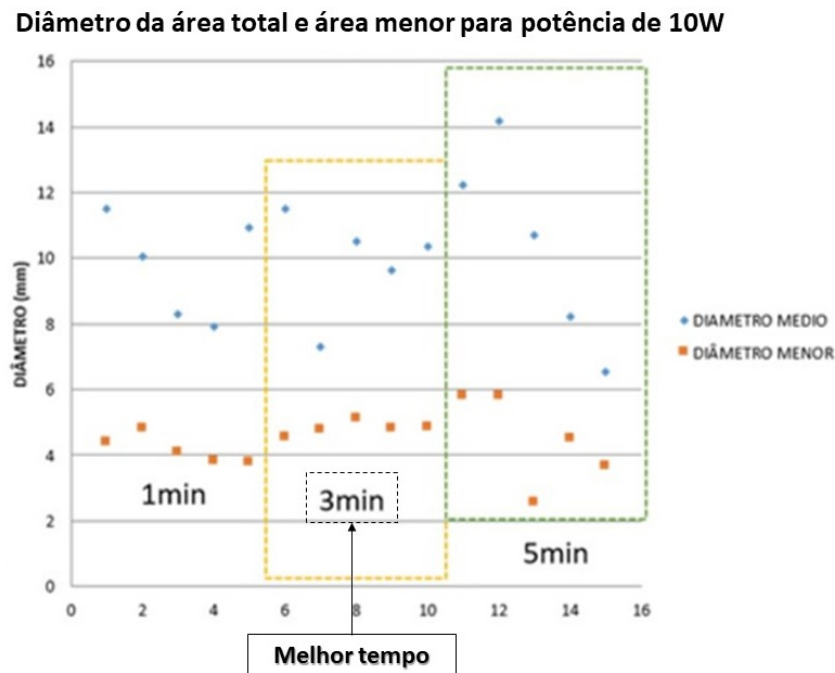


Figura 24 – Histograma com os três tempos definidos: 1, 3 e 5 minutos com a indicação da escolha do melhor tempo para a potência de 10 W devido à maior proximidade dos pontos da área concêntrica menor e a área concêntrica maior. O indicador de dispersão de áreas obtidas considera o desvio padrão do diâmetro de $9,86 \pm 1,58$ e desvio padrão do diâmetro da área menor $4,82 \pm 0,21$.

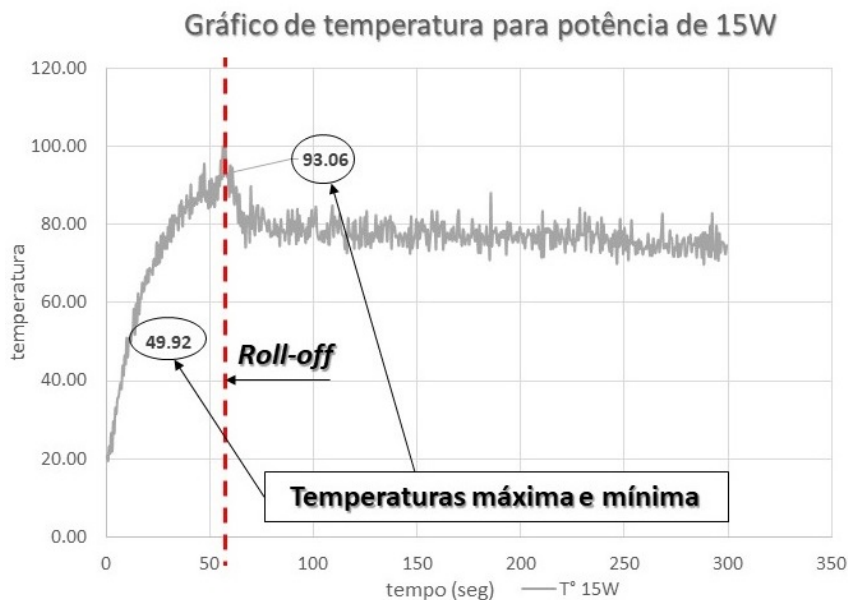


Figura 25 – Gráfico de temperatura com a indicação do momento do *roll-off* quando a temperatura alcança 100°C (temperatura máxima) e a indicação da temperatura mínima para haver ablação que são 50°C (temperatura mínima) para a potência de 15W. O tempo antes de alcançar 50°C foi de 12 segundos e o intervalo de tempo entre 50°C e 100°C foi de 47 segundos.

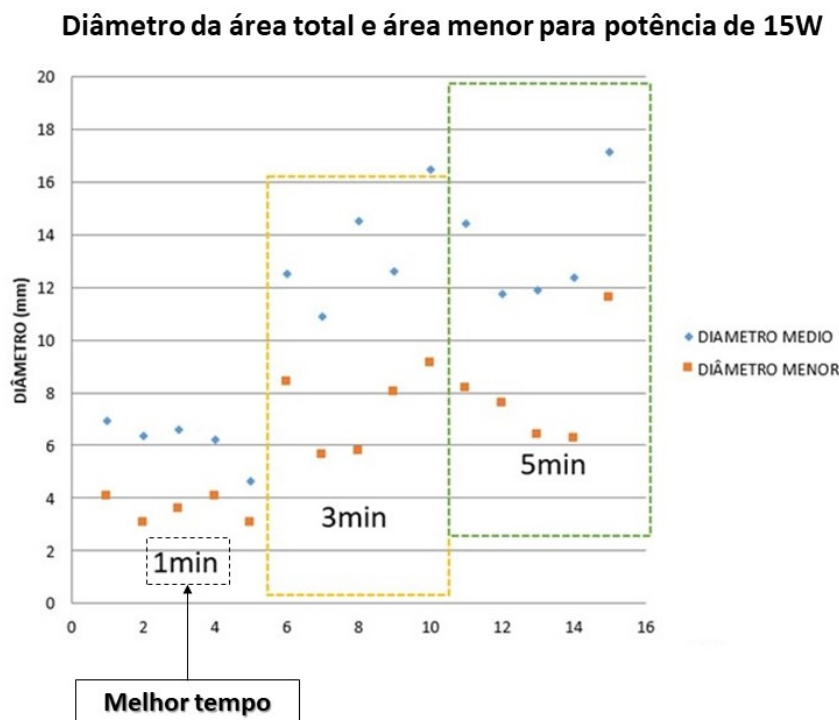


Figura 26 – Histograma com os três tempos definidos: 1, 3 e 5 minutos com a indicação da escolha do melhor tempo para a potência de 10 W devido à maior proximidade dos pontos da área concêntrica menor e a área concêntrica maior. O indicador de dispersão de áreas obtidas considera o desvio padrão do diâmetro de $6,17 \pm 0,88$ e desvio padrão do diâmetro da área menor $3,57 \pm 0,50$.

Nos experimentos em fígado de suínos realizada no Centro Cirúrgico do Departamento de Medicina da PUC (Pontifícia Universidade Católica) de Goiás seus resultados permitiram uma compreensão dos parâmetros do equipamento SOFIA em animal com perfusão sanguínea constante. Os porcos são animais com anatomia e fisiologia semelhante à do ser humano, além de uma semelhança na patogênese das doenças tipicamente humanas, por essa razão torna-se um excelente parâmetro para obtenção de informações acerca do funcionamento de um equipamento médico-assistencial, pois os dados podem ser extrapolados para o ser humano. Os resultados permitiram observar que a uma potência de 10W, a tensão se manteve constante e a manutenção da potência também ocorreu ao longo do processo até o momento de *roll-off* provavelmente devido a impedância do tecido hepático do animal que impede a propagação da energia local.

No caso da ablação realizada em rato *Wistar* no grupo de animais sem tumor, com ARF, observou-se a formação de uma área de queimadura típica, com vermelhidão e definição de raios oriundos da energia liberada ao longo do eletrodo. Não foi possível identificar uma área de necrose real no aspecto macroscópico. O resultado final foi o alcance da estabilidade da potência entregue de 2,5 W durante 3 minutos, em modo manual do equipamento SOFIA com o eletrodo MARINA 5H. Esse resultado permite

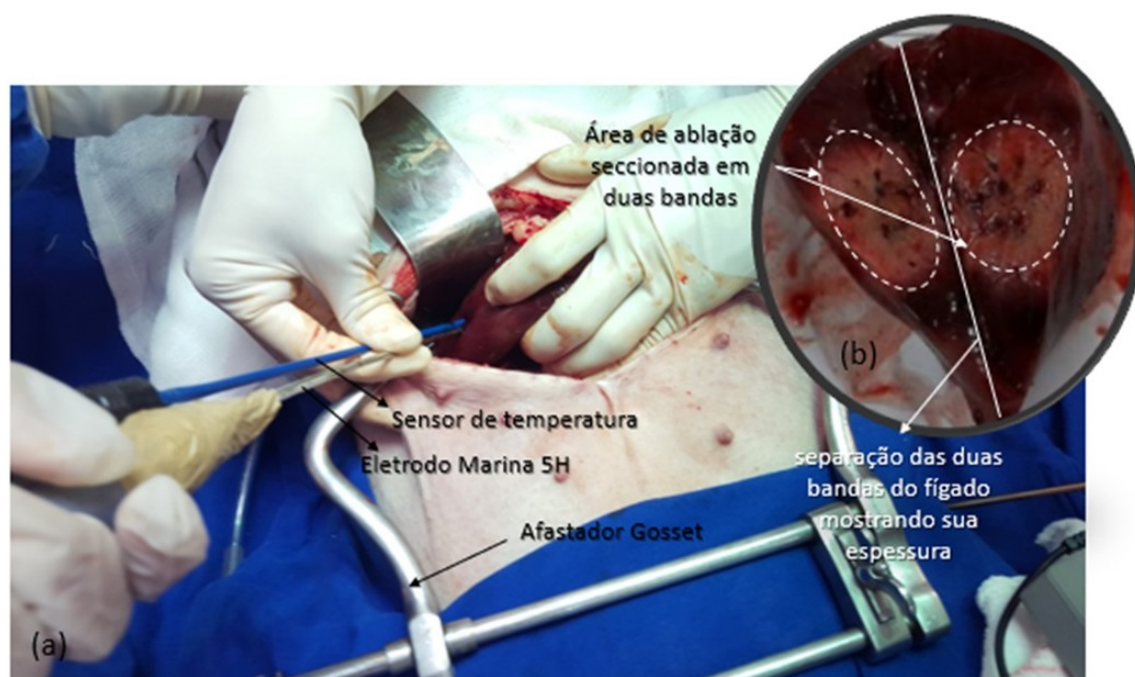


Figura 27 – (a) Procedimento de ablação em fígado exposto em suíno fêmea perfundido ocorrido na PUC/GO. No detalhe (b) observa-se a secção de parte de um lobo do fígado aonde a região foi ablada mostrando a espessura do lobo. (Arquivo pessoal).

verificar que a impedância do organismo do animal interfere no retorno de informações recebida pelo equipamento e diferentemente do resultado *ex vivo*, a instabilidade está presente também na tensão. Na figura 28 pode-se observar a área de ablação produzida em um dos lobos do fígado do animal.

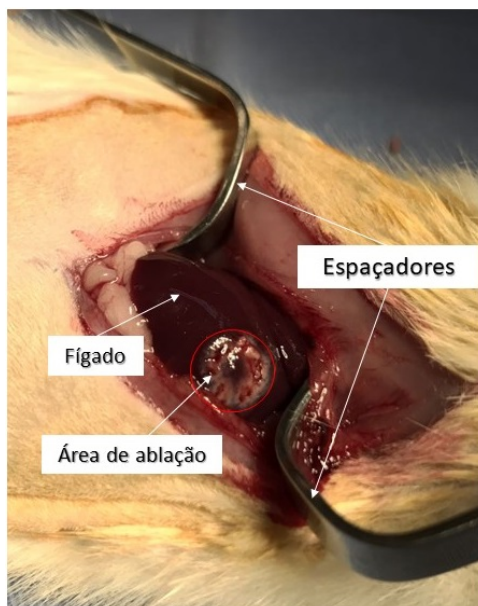


Figura 28 – (a) Procedimento de ablação em fígado de rato *Wistar* fêmea sob efeito de anestesia e realizada diretamente no lobo direito do fígado em incisão de 5 cm realizada próxima ao processo xifóide. Resultado obtido sob potência de 2,5 W por 3 minutos. Observa-se a área de ablação obtida pelo uso do equipamento SOFIA e eletrodo MARINA 5H, a região central próxima ao eletrodo não tem uma área típica de carbonização e o restante da área de ablação ocorre uma queima com pouca evidência de ablação real. (Arquivo pessoal)

4.1.2 Estudo sistemático com metanálise de área de necrose *versus* recorrência

Como resultado de publicação a partir desse estudo, uma metanálise permitiu posicionar a técnica de ablação por radiofrequência para tumores menores que 3 cm como segura e eficiente mesmo quando comparada à ressecção cirúrgica como relatado pela pesquisa de (POMPILI *et al.*, 2013). Os estudos de (BRUNELLO *et al.*, 2013) e (NA *et al.*, 2017) confirmaram com metodologias diferentes a segurança e eficiência da técnica, (BRUNELLO *et al.*, 2013) analisou uma amostra de 209 pacientes de centros clínicos diferentes por 10 anos e no caso do estudo de (NA *et al.*, 2017) esse levantamento originou-se de uma revisão de 37 casos de um mesmo centro clínico.

Kono *et al.* (2014) verificou os fatores clínicos que influenciam a recorrência em tumores menores que 3 cm e comprovou a sua influência independente do tipo histológico do tumor e sua dimensão, a partir de uma análise da taxa cumulativa de recorrência comprovando a importância da anamnese clínica do paciente e a construção do estadiamento com uma equipe multidisciplinar como recomendado pelas sociedades de oncologia.

Liao *et al.* (2017) comprovou em seu estudo prospectivo com dois grupos amostrais definidos de forma aleatória para o margearamento de segurança durante o procedimento ablativo aos quais denominou margens amplas (maior que 10 mm) ou margens estreitas

(de 5 mm a 10 mm) e seu resultado demonstrou que quanto maior o margeamento menor a recorrência.

O tamanho do tumor *versus* a recorrência foi o conceito central a ser abordado. A recorrência foi analisada no aspecto geral quanto a sua origem e também foi avaliada de forma específica quanto ao padrão denominado Local Tumor Progression (LTP) já estabelecido na literatura e que considera uma formação tumoral recorrente localizada na área ablada. Esse critério se diferencia do padrão antagônico denominado Intrahepatic Distant Recurrence (IDR) que caracteriza uma recorrência de origem sistêmica, portanto quando a recorrência é analisada no aspecto geral os dois padrões foram considerados.

As taxas agrupadas de recorrência e LTP foram utilizadas como os efeitos principais desta metanálise. Para efetuar o agrupamento dos efeitos utilizou-se o método da variância inversa para o cálculo dos pesos, das proporções agrupadas e o respectivo intervalo de confiança de 95%. A heterogeneidade dos dados foi avaliada pelo teste Cochrane Q e I^2 sendo considerada uma heterogeneidade significativa se $I^2 > 50$, neste caso um modelo efeitos aleatório DerSimonian-Liard e se $I^2 < 50$ um modelo de efeitos fixo foi adotado para a combinação das taxas. A análise estatística foi feita por meio do software R 3.4.1. Os gráficos estão no artigo reproduzido no anexo desse estudo.

Verifica-se que algumas variáveis se interpõe na recorrência do tumor e que podem ser identificadas em uma linha temporal desde o início do procedimento até o *follow up* do paciente. Essas variáveis já estão definidas na literatura e é possível identificar alguns momentos de intervenção essenciais para evitar a recorrência além do sucesso terapêutico da ablação do tumor (figura 29). Os momentos ideais de intervenções são descritos a seguir: (1) inserção do eletrodo no paciente; (2) procedimento de ablação em si; (3) momento da finalização do procedimento, ainda com o eletrodo posicionado e imageamento disponível com identificação de áreas não totalmente abladadas; (4) identificação de regiões residuais do tumor durante o *follow up* do paciente com o uso de imagens e novo procedimento ablativo para sua imediata eliminação. Essas etapas estão ilustradas na figura 6 em uma sequência temporal com a descrição da forma de atuação pelo clínico.

Portanto, com a metanálise apresentada é possível afirmar que a técnica de radi-frequência ainda é o procedimento mais seguro e eficiente para tumores menor que 3 cm e que a margem de segurança ainda deve ser um fator de preocupação do clínico somada ao quadro clínico do paciente. Permite-nos identificar que a atual fronteira de novas tecnologias surgidas nessa última década designadas para superação das limitações da técnica. O cenário nacional brasileiro o estímulo são fundamentais para os investimentos de construção e nacionalização de um equipamento para uso do Sistema Único de Saúde (SUS).

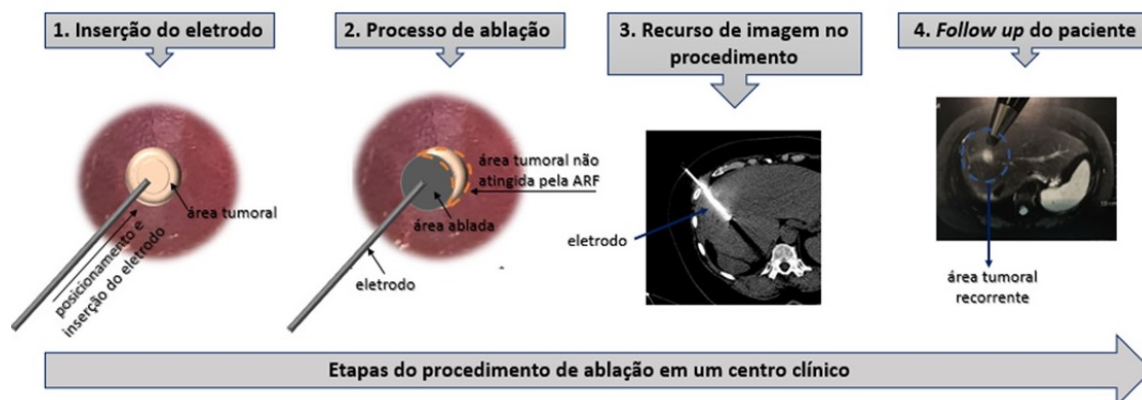


Figura 29 – Etapas desde o início do procedimento de ablação por radiofrequência até o *follow up* do paciente com identificação dos momentos em que uma intervenção é possível e permite reduzir a recorrência tumoral. (Arquivo pessoal)

4.1.3 Análise da toxicidade *in vitro* do eletrodo MARINA 5H

Utilizando dois tipos de células: normal (fibroblasto) e tumoral (carcinossarcoma Walker 256) obteve-se como resultado a ausência de citotoxicidade na presença de hastes inteiras do eletrodo MARINA 5H no tempo de 72h. Considerando-se uma significância estatística de 5%, os dados coletados não levaram a rejeição da hipótese nula de que as médias dos grupos controle e tumor sejam iguais estatisticamente. Utilizou-se o método estatístico *t-student* não-pareado para realizar uma comparação dos grupos no Graph Pad 5.0, não havendo diferença estatística quando se comparou a triplicata de controle e eletrodo para cada linhagem. A média da linhagem de fibroblastos para os dois grupos foi de $105,8 \pm 5,76$ e para a linhagem *Walker* foi de $100 \pm 11,15$ e a representação gráfica utilizada foi a de *boxplot* para melhor visualização dos valores obtidos para a porcentagem de células viáveis (figura 30).

Esse resultado corrobora com a expectativa já consolidada do uso da liga de níquel-titânio (NiTi) como material biocompatível e que a presença do níquel como metal pesado na sua constituição não gera a produção de resíduos que possam ser liberados para o metabolismo de um organismo complexo.

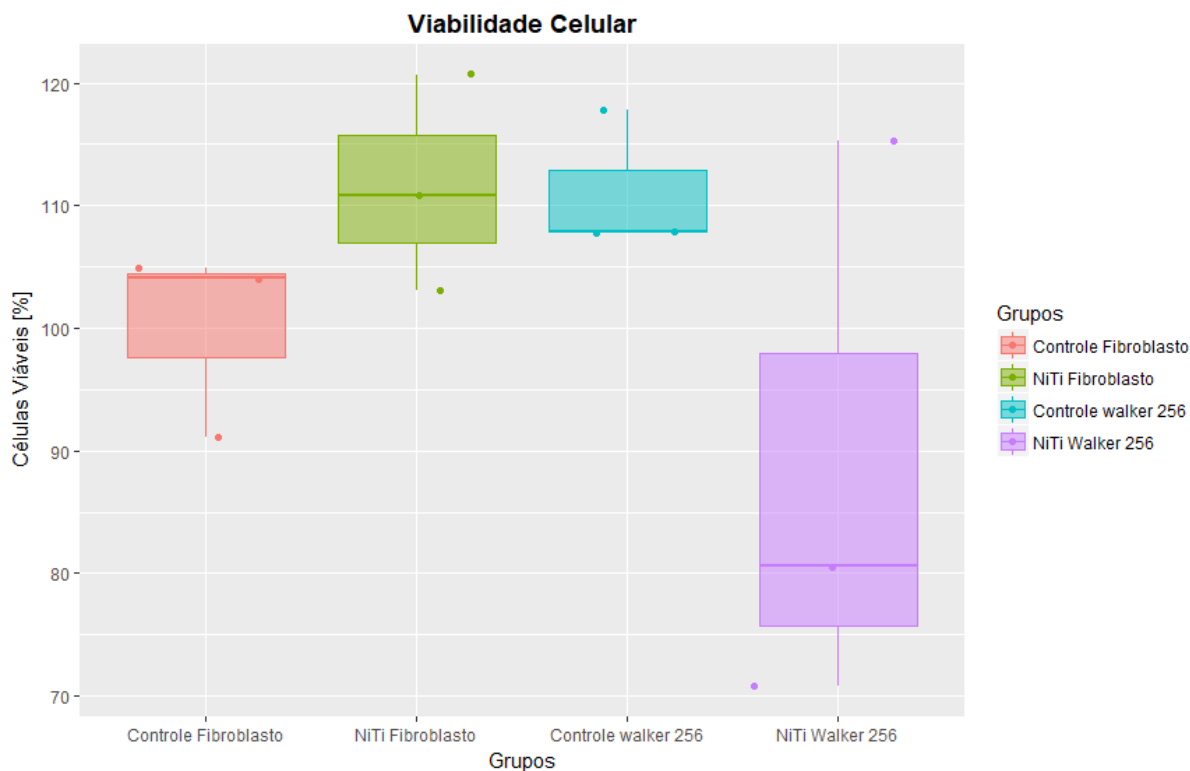


Figura 30 – Gráfico *boxplot* para a viabilidade celular. Este gráfico indica a dispersão das duas linhagens de células e seus grupos controle correspondentes. PodeDe acordo com a dispersão e teste *t student*- não houve variação significativa entre os grupos. A dispersão dos dados indica para o grupo NiTi Walker uma pequena diminuição na média. Tal diminuição se deve a morte das células em uma das triplicatas devido a superpopulação, mas ainda assim o intervalo de confiança dos dados são equivalentes.

4.1.4 Validação do modelo animal para pré-clínico

Nos testes realizados de ablação com o rato *Wistar* observou-se que o SOFIA necessita ser utilizado em seu modo manual devido as dimensões do animal e da sua impedância. Ajustes para evitar o isolamento elétrico foram necessários como a raspagem do dorso, além da raspagem na área frontal para o procedimento cirúrgico. Tentou-se utilizar o gel condutor, mas a condução se tornou muito elevada e a carbonização foi rapidamente alcançada sem produção de ablação efetiva.

Por fim, consolidou-se o uso de potência 2,5 W por 3 a 4 minutos com a abertura menor de 3 mm das hastes do eletrodo gerando uma área de ablação razoável, mas ainda com sinais de vermelhidão por queimadura e não necrose efetiva (figura 28). Apesar de não ser possível considerar a ablação efetiva, nesses parâmetros, foi possível estabelecer um funcionamento contínuo do equipamento com potência constante. São necessários novos ajustes no eletrodo para uma área de ablação efetiva. Considerou-se o modelo animal rato *Wistar* excelente para novos testes pré-clínicos e um modelo já consolidado por outras

pesquisas com ARF (KUDO, 2017; LYON *et al.*, 2017).

4.1.5 Validação do modelo tumoral *Walker 256* para pré-clínico

A linhagem *Walker 256* apesar de aparecer na literatura até 2008 como sendo de 100% de pega, houve uma dificuldade de efetivação do implante. Foram realizadas tentativas com mais de uma possibilidade de densidade celular: 3×10^7 , proposto por Zarur (2004), 1×10^5 proposto por Kuczera (2007), 1×10^7 proposto por Oliveira (2006), mas sem sucesso. Observa-se que há poucos trabalhos recentes e os encontrados não foram elucidativos quanto às técnicas de implantação. Também foram realizados testes em mais de um local de inoculação da alíquota celular: implante direto no fígado, no flanco direito, intramuscular e subcutânea.

Observou-se que o local de inoculação foi identificado pelo organismo no caso do **implante direto no fígado, subcutâneo no flanco e intramuscular na pata**, mas o sistema imunológico do animal foi capaz de conter a proliferação celular. Esse fato está muito associado à perda de agressividade tumorigênica de células cultivadas *in vitro* e já é conhecido na literatura (BORGHETTI, 2015). Nesse caso recomenda-se uma imunomodulação das células tumorais em um animal-hospedeiro produzindo uma ascite intraperitonealmente. Após geralmente 5 dias, o líquido ascítico é retirado e inoculado em outro animal após proliferação em cultura.

Outra opção, seria optar por outras linhagens celulares como a H22 que se apresenta como um adenocarcinoma (YAN, 2017) e a linhagem de MH-3924A (Morris-Hepatoma) de hepatoma (BETHLEMFALVA-HORA, 2014). Sendo as duas para ratos *Wistar* e já testadas na literatura para estudo com equipamentos de radiofrequência.

Uma última possibilidade seria o uso da técnica de indução química, em que a inoculação das células ocorre de forma intraperitoneal e o crescimento do tumor acontece ao longo de 3 a 4 meses em média (CARNEIRO, 2017).

Por fim, foi possível caracterizar a linhagem tumoral quanto às suas características como linhagem aderente que se apresenta como uma célula com projeções de adesão longas e grande em dimensão (figura 31). Sua capacidade de proliferação *in vitro* é vigorosa fazendo-se necessárias passagens de 2 em 2 dias e permitindo alcançar uma densidade superior à 3×10^7 . Considerando a curva logarítmica típica de crescimento de células isoladas, percebeu-se que seu tempo de *lag* após o descongelamento é lento podendo alcançar 3 semanas e seu tempo de *log* para proliferação após a recuperação pós-descongelamento é rápido e pode ocorrer em até 1 dia.

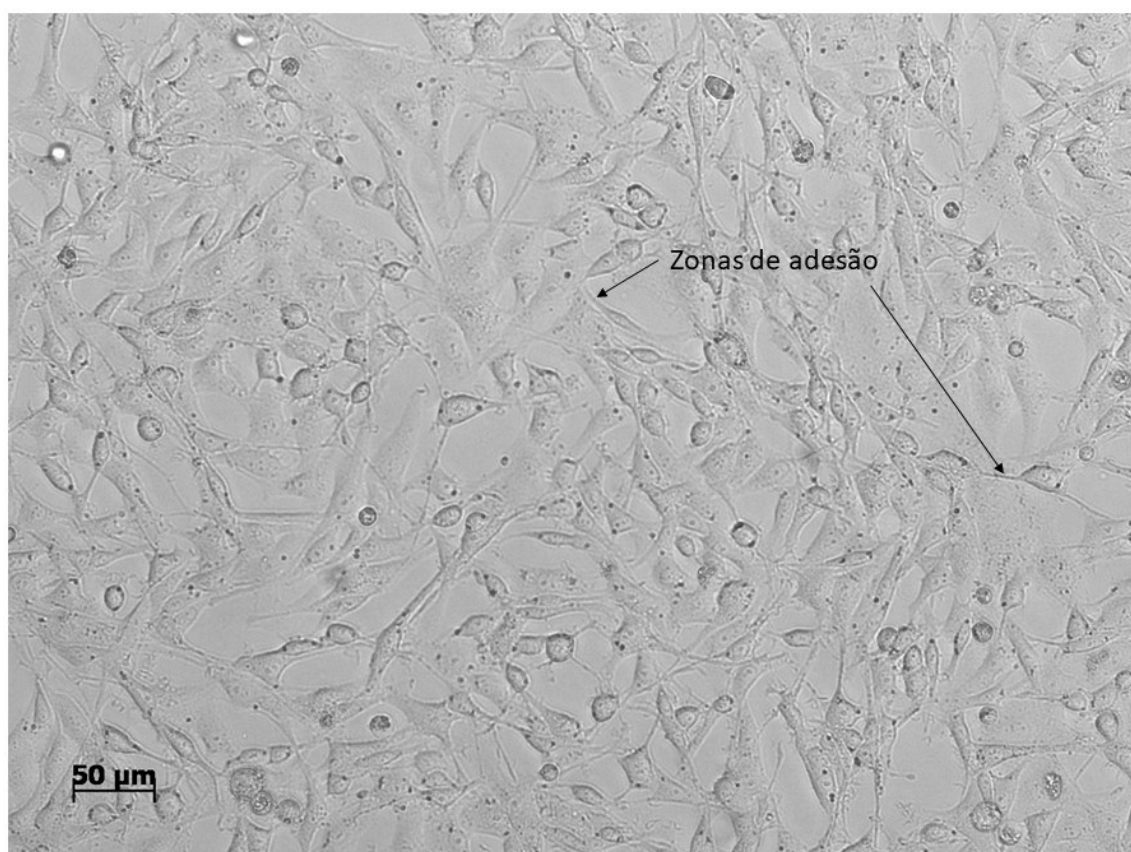


Figura 31 – Foto obtida em microscópio invertido da marca Zeiss com câmera acoplada para obtenção de imagem com o aplicativo Jimage da cultura em garrafa de células *Walker 256*. É nítida a característica de aderência da população celular e as dimensões celulares (Arquivo pessoal).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5.1 DISCUSSÃO

No contexto atual de inovação nacional em tecnologia para equipamentos médicos de ablação hepática, o grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Suélia, criou o equipamento SOFIA, para geração de ARF para ser utilizado em casos de CHC. Nesse mesmo contexto, o eletrodo considerado padrão para esse tipo de intervenção é o modelo guarda-chuva *LeVeenTM* da Boston Scientific tendo sido usado como padrão para a construção do eletrodo MARINA 5H de níquel-titânio (NiTi), formato guarda-chuva de 5 hastes que se integra ao equipamento SOFIA. A viabilidade elétrica, térmica e mecânica, do eletrodo MARINA 5H foi avaliada utilizando modelo matemático em COMSOL a partir de testes realizados *in vitro* e *in vivo* com simulação numérica e modelagem da equação COLE COLE adaptada. Partindo desse ponto da pesquisa, todos esses dados foram utilizados para a realização desse estudo.

O processo de confecção desse eletrodo envolveu avaliação puramente mecânica e térmica, a liga do material escolhido foi a LEMF, a curvatura dos fios foi realizada em forno de têmpera e definida após vários experimentos a melhor opção para a memorização em forma de semi-circunferência e opção de solda foi a micro-soldagem a laser e consolidada como melhor opção após análise em microscopia de varredura. Diante desse cenário existe a necessidade de avaliação dos aspectos que envolvem as características do tecido hepático, as alterações que acontecem em nível celular nos processos de apoptose e necrose, esse último objetivo fim desse procedimento de ablação, a influência do sistema no qual essas células estão inseridas, ou seja, o organismo e suas variáveis como a perfusão sanguínea. As características dos materiais que constituem o eletrodo e seu processo de fabricação e que interagirá com esse tecido, portanto, a liga de níquel-titânio e a micro-soldagem a laser das hastes envolveram a proposta central desse estudo que foi a validação do eletrodo MARINA 5H de níquel-titânio (NiTi) em seus aspectos biológicos. Soma-se a influência do seu formato e a quantidade de hastes integrados à influência do equipamento SOFIA sobre o eletrodo e suas variáveis.

Com a busca por uma melhor probabilidade de sucesso significativo na técnica de ablação ou para uma melhor compreensão do eletrodo que permita promover a área de ablação máxima que minimize, e se possível, elimine por completo a possibilidade de recidiva, nesse estudo também foi necessário avaliar as influências do equipamento sobre a atuação do eletrodo como a variação da potência entregue, condutividade e tensão e a interferência do formato escolhido do eletrodo, no caso 5 hastes com curvatura de semi-circunferência que são fatores que também atuarão em conjunto para uma necrose

completa.

O equipamento ao enviar uma corrente de alta frequência de 300 kHz a 1 GHz causa a agitação dos íons Na^- , K^- , Cl^- presentes no citoplasma e matriz extracelular do tecido hepático, essa agitação permite a transferência do calor por condução (ZHANG *et al.*, 2016) e no caso das células tumorais já consolidada na literatura como termolábil e que aumentos de temperatura acima de 42°C são suficientes para causar sua morte, diferentemente das células normais que são termicamente mais resistentes suportando até $52^\circ\text{-}54^\circ\text{C}$ (SOUSA, 2015).

O níquel é um metal pesado presente na nossa vida diária devido a sua propriedade de formação de ligas com elevada resistência ao aquecimento e corrosão e por isso muito utilizadas em implantes e equipamentos médicos, mas também no processamento de alimentos (CAMPOS Jr., 2015). Portanto, nosso trato digestório está exposto ao contato com essa liga de alguma forma na vida diária. Mas, mesmo diante dessa perspectiva e considerando o aumento de temperatura local causada pela ARF no eletrodo pelo período de tempo do procedimento, a análise *in vitro* garante que o comportamento celular da área de queima está isenta de contaminação.

A partir dos dados das técnicas de MTT para viabilidade celular, pode-se validar o eletrodo como atóxico e sem alteração de metabolismo do tecido biológico, e a partir desse dado, é possível inferir um indicador biológico que influenciará as duas principais áreas de ablação - letal e subletal e que ao ser analisado pela bioequação de transferência de calor de Pennes utilizada para modelagem de um fenômeno físico de aquecimento elétrico-térmico ocorrendo em um sistema biológico, trará influência ao parâmetro do metabolismo do tecido biológico que resulta do metabolismo celular oriundo da agitação dos íons intra e extracelulares. Como proposta de trabalhos futuros, uma simulação no COMSOL aonde se realizaria uma distribuição da curva de temperatura com os parâmetros pertinentes a esse modelo desse estudo e outro para comparação é sugerida.

5.2 CONCLUSÃO

Considera-se que um novo desenho para o protocolo pré-clínico foi efetivado para a tecnologia nacional de equipamentos médicos assistenciais e os resultados permitiram identificar os ajustes necessários para que esse protocolo se estabeleça como um modelo a ser reproduzido para estudos pré-clínicos ou não-clínicos. O modelo tumoral *Walker* apesar de não ter sido possível efetivar sua implantação nesse estudo, não o descarta como um bom modelo tumoral, apenas são necessárias novas análises para definir o melhor protocolo para sua utilização. A sua capacidade de rápida proliferação *in vitro* é altamente vantajosa e capacidade de aderência faz-se pressupor que há alta probabilidade de adesão ao tecido de um organismo vivo.

No parâmetro de avaliação da influência na resposta biológica do eletrodo quanto ao seu formato e interação com o equipamento, também se observou nos testes *in vivo* e *ex vivo* que a potência entregue, não a fornecida, tem correlação com alguns parâmetros no eletrodo e equipamento, havendo uma integração desses fatores na resultante da área de ablação e distribuição da temperatura ao longo das hastes e o tempo necessário para que isso ocorra. Os componentes dessa teia de fatores envolve a teoria da agitação dos íons, o eletrodo expansível e sua quantidade de hastes, o circuito fechado, o eletrodo de dispersão, todos esses fatores tanto serão impactados pelo metabolismo celular do tecido, quanto impactarão essa agitação iônica e os fatores internos celulares e de interação entre células como tecido.

A partir dos dados dos testes *ex vivo* em fígado bovino e *in vivo* em suínos e rato *Wistar* se observa a diferença no comportamento do equipamento e eletrodo. No primeiro caso, a temperatura e potência entregue são estáveis e a formação da área de ablação é facilmente previsível. Ao se comparar os dados macroscópicos da área ablada, percebe-se que o teste com o rato *Wistar* necessitou de ajustes relacionados à diferença de impedância do organismo do animal como um todo por ser a informação retornada ao equipamento para ajuste de sua potência, que nesse caso, mostrou-se mais instável e bem menor que o esperado de 10 a 15 W para 2,5 W em um tempo de 3 minutos.

Está claro pelo teste *in vitro* de toxicidade que a liga de níquel-titânio (NiTi) não é citotóxica quanto às enzimas envolvidas no teste de viabilidade celular utilizado *in vitro* e possui grau de biocompatibilidade não havendo formação de resíduos danosos em nível celular. Esse resultado foi obtido utilizando-se como parâmetro células de fibroblastos humanos oriundos de cultura primária saudável com boa proliferação que forneceu um quantitativo ótimo de $5,5 \times 10^5$ células, esse parâmetro permite indicar que o eletrodo MARINA 5H também não possui citotoxicidade para as células tumorais na mesma via enzimática, mas ainda é possível extrapolar e afirmar que não haverá uma transferência entre células pós-procedimento, o que seria arriscado em casos de área subletal, como também não é citotóxico para a margem de segurança de 1 cm comumente incluída pelos clínicos para garantir que não haja recorrência e que por se constituir de células normais que possuem características diferentes de uma célula neoplásica poderia ter alterações metabólicas celulares e transferir essa citotoxicidade para o restante do tecido. Portanto, considera-se eletrodo MARINA 5H pronto para as próximas etapas com outros testes *in vitro* e novos testes com animais que fornecerão resultados *in vivo* visualizando um quadro completo de garantias para a fase clínica usar o eletrodo MARINA 5H.

Diante desse contexto, é possível concluir com esse estudo que o eletrodo MARINA 5H não apresentou citotoxicidade, é biocompatível, sua configuração de 5 hastes com curvatura de semi-circunferência combinada à potência entregue de 50W do equipamento SOFIA forma uma área provável de necrose entre 2 e 3 cm no aspecto macroscópico.

6 TRABALHOS FUTUROS

Propõe-se que em trabalhos futuros sejam realizadas as seguintes análises:

- Novas técnicas de implante do tumor *Walker* em ratos *Wistar*;
- Complementação de análise de toxicidade *in vivo* do eletrodo MARINA 5H com técnicas de anatomohistopatologia, imunohistoquímica e avaliação metabólica com verificação de níveis enzimas renais e hepáticas do animal;
- Simulação no COMSOL aonde se realizaria uma distribuição da curva de temperatura com os parâmetros pertinentes a esse modelo desse estudo e outro para comparação;
- Avaliação da possibilidade de recorrência em animais após ablação com o equipamento SOFIA e análise dos fatores envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAHANE, M. *et al.* Complications of percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: Imaging spectrum and management 1. *Radiographics*, Radiological Society of North America, v. 25, n. suppl_1, p. S57–S68, 2005. 43
- ANDRADE, E. *et al.* Non-clinical studies required for new drug development-part i: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, SciELO Brasil, v. 49, n. 11, 2016. 21
- BALOGH, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of hepatocellular carcinoma*, Dove Press, v. 3, p. 41, 2016. 19, 27, 28
- BRUNELLO, F. *et al.* Radiofrequency ablation: technical and clinical long-term outcomes for single hepatocellular carcinoma up to 30 mm. *European journal of gastroenterology & hepatology*, LWW, v. 25, n. 7, p. 842–849, 2013. 67
- CARNEIRO, M. L. B. Efeitos biológicos de citrato de ródio ii livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo. 2017. 71
- CARRILHO, F. J. *et al.* Brazilian Society of Hepatology recommendations for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Arquivos Brasileiros de Gastroenterologia*, v. 52, p. 2–14, 2015. ISSN 1678-4219. 10, 18, 19, 30
- CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cellular & molecular biology letters*, v. 11, n. 4, p. 506, 2006. 40
- DELFINO, R. d. F. *Faculdade De Tecnologia Universidade De Brasília*. 88 p. Tese (thesis) — Universidade de Brasília, 2017. 34
- DONADON, M. *et al.* Hepatocellular carcinoma: the role of interventional oncology. *Liver cancer*, Karger Publishers, v. 6, n. 1, p. 34–43, 2017. 30
- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras*, SciELO Brasil, v. 19, n. 1, p. 59–65, 2004. 21
- FANG, J. *et al.* Therapeutic effects of all trans-retinoic acid combined with transarterial chemoembolization on walker-256 hepatoma in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology–Medical Sciences*, Springer, v. 30, n. 1, p. 113–118, 2010. 45
- FARIS, O.; SHUREN, J. An fda viewpoint on unique considerations for medical-device clinical trials. *New England Journal of Medicine*, Mass Medical Soc, v. 376, n. 14, p. 1350–1357, 2017. 21
- FENG, K. Value of radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 20, p. 5987, 2014. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4033438&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. 33

- FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, Elsevier, v. 1757, n. 9-10, p. 1371–1387, 2006. 41
- FONTELLES, M. J. *et al.* Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. *Rev. para. med*, v. 24, n. 2, p. 57–64, 2010. 59, 60
- GOMES, M. A. *et al.* Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 59, n. 5, p. 514–524, 2013. ISSN 01044230. 10, 20, 25, 26, 28
- GRETEN, T. *et al.* Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, Nature Publishing Group, v. 100, n. 1, p. 19, 2009. 25
- HAEMMERICH, D. Biophysics of radiofrequency ablation. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, Begel House Inc., v. 38, n. 1, 2010. 33
- HERMAN, P. *et al.* Is resection of hepatocellular carcinoma in the era of liver transplantation worthwhile? a single center experience. *Arquivos de Gastroenterologia*, SciELO Brasil, v. 53, n. 3, p. 169–174, 2016. 20
- IKEMOTO, T.; SHIMADA, M.; YAMADA, S. Pathophysiology of recurrent hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Hepatology Research*, Wiley Online Library, v. 47, n. 1, p. 23–30, 2017. 31
- JR, M. A. F. R. *et al.* Radiofrequency ablation of primary and metastatic liver tumors: 113 cases experience. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, SciELO Brasil, v. 20, n. 1, p. 38–44, 2007. 31
- KAMPFRATH, T.; COTTEN, S. W. *The new collaborative path in medical device development: The medical device innovation consortium*. [S.l.]: Elsevier, 2013. 45
- KANDUC, D. *et al.* Cell death: apoptosis versus necrosis. *International journal of oncology*, Spandidos Publications, v. 21, n. 1, p. 165–170, 2002. 40
- KEW, M. C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, v. 22, n. 3, 2013. 27
- KONO, M. *et al.* Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma measuring 2 cm or smaller: results and risk factors for local recurrence. *Digestive Diseases*, Karger Publishers, v. 32, n. 6, p. 670–677, 2014. 67
- KUDO, M. Immuno-oncology in hepatocellular carcinoma: 2017 update. *Oncology*, Karger Publishers, v. 93, n. Suppl. 1, p. 147–159, 2017. 71
- LAN, T. *et al.* Comparative efficacy of interventional therapies for early-stage hepatocellular carcinoma: A prisma-compliant systematic review and network meta-analysis. *Medicine*, Wolters Kluwer Health, v. 95, n. 15, 2016. 30
- LI, H. *et al.* Laser welding of thin shape memory alloy and stainless steel using ni interlayer. *Materials & Design*, Elsevier, v. 39, p. 285–293, 2012. 39

- LIAO, M. *et al.* Radiofrequency ablation using a 10-mm target margin for small hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis: A prospective randomized trial. *Journal of surgical oncology*, Wiley Online Library, v. 115, n. 8, p. 971–979, 2017. 67
- LYON, P. C. *et al.* Clinical trial protocol for tardox: a phase i study to investigate the feasibility of targeted release of lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin (thermodox®) using focused ultrasound in patients with liver tumours. *Journal of therapeutic ultrasound*, BioMed Central, v. 5, n. 1, p. 28, 2017. 71
- MAGISTRI, P. *et al.* The evolving role of local treatments for hcc in the third millennium. *Anticancer research*, International Institute of Anticancer Research, v. 37, n. 2, p. 389–401, 2017. 18
- MAJUMDAR, A. *et al.* Management of people with early-or very early-stage hepatocellular carcinoma. *The Cochrane Library*, Wiley Online Library, 2017. 19
- MARGOTTI, A. E. *et al.* *Diretrizes Metodológicas - Elaboração de Estudos para Avaliação de Equipamentos Médico-Assistenciais*. Ministério da Saúde, 2013. 96 p. ISBN 9788533419926. Disponível em: <filhttp://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes{_}metodologicas{_}elaboracao{_}es>. 21
- MARQUES, M. P. Eletrodo De Níquel-Titânio Guiado Por Imagem Eletrodo De Níquel-Titânio Guiado Por Imagem. 2016. 34, 39, 42, 43
- MAZZANTI, R.; ARENA, U.; TASSI, R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World journal of experimental medicine*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 6, n. 1, p. 21, 2016. 18
- MORAES, S. P. d. *et al.* Modelo experimental de tumor de walker. *Acta cir. bras*, v. 15, n. 4, p. 237–42, 2000. 45
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, Elsevier, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983. 52
- NA, B. G. *et al.* Clinical outcomes of laparoscopic radiofrequency ablation of single primary or recurrent hepatocellular carcinoma (3 cm). *Annals of surgical treatment and research*, v. 92, n. 5, p. 355–360, 2017. 67
- NETO, A. G. *et al.* Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de walker. *Acta Cir Bras*, p. 12–22, 2002. 45
- NISHIKAWA, H. *et al.* Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. v. 6736, n. 6, p. 558–568, 2013. 20, 34
- NITA, M. E. *et al.* Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, SciELO Brasil, v. 44, n. 1, p. 39–48, 2002. 25
- OLIVEIRA, P. F. d. M. *et al.* Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de walker em estômago de rato. *Acta Cirurgica Brasileira*, SciELO Brasil, v. 13, n. 4, p. 242–247, 1998. 45

- PAES, . A. T. Itens essenciais em bioestatística. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, scielo, v. 71, p. 575 – 580, 10 1998. ISSN 0066-782X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X1998001000003&nrm=iso>. 59
- PAPAIORDANOU, F.; RIBEIRO-JUNIOR, M. A. F.; SAAD, W. A. Prevenção do carcinoma hepatocelular. *ABCD arq. bras. cir. dig*, v. 22, n. 2, p. 115–119, 2009. 25, 28
- PARANAGUÁ-VEZOZZO, D. C. *et al.* Epidemiology of hcc in brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology*, v. 13, n. 4, 2014. 18
- PASCUAL, S.; HERRERA, I.; IRURZUN, J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 8, n. 9, p. 421, 2016. 18, 29
- PIMENTA, J. R.; MASSABKI, P. S. Carcinoma hepatocelular : um panorama clínico * Hepatocellular carcinoma : a clinical outlook. p. 59–67, 2010. 10, 18, 27
- POMPILI, M. *et al.* Long-term effectiveness of resection and radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma 3 cm. results of a multicenter italian survey. *Journal of hepatology*, Elsevier, v. 59, n. 1, p. 89–97, 2013. 67
- PORTARIA, N. 602, DE 26 DE JUNHO DE 2012, *Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Fígado no Adulto*. 2012. 17, 19, 29
- RAO, A.; SRINIVASA, A. R.; REDDY, J. N. *Design of shape memory alloy (SMA) actuators*. [S.l.]: Springer, 2015. v. 3. 39
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, SciELO Brasil, v. 27, p. 771–780, 2004. 44
- ROBBINS, S. L. *et al.* *Patologia: bases patológicas das doenças*. [S.l.]: Elsevier, 2005. 41
- SHARIAT, B. S. *et al.* Experiments on deformation behaviour of functionally graded niti structures. *Data in Brief*, Elsevier, v. 13, p. 562–568, 2017. 39
- SHIMIZU, M. *et al.* Chemopreventive potential of green tea catechins in hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 16, n. 3, p. 6124–6139, 2015. 10, 25, 27
- SILVA, L. F. G. *et al.* Modelo de tumor experimental em rim de ratos. *Acta cir. bras*, v. 17, n. 1, p. 62–66, 2002. 45
- STOFFNER, R. *et al.* Multipolar radiofrequency ablation using 4 – 6 applicators simultaneously : A study in the ex vivo bovine liver. *European Journal of Radiology*, Elsevier Ireland Ltd, v. 81, n. 10, p. 2568–2575, 2012. ISSN 0720-048X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2011.10.031>>. 44
- TERAPÊUTICAS, D. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. 2014. 21
- THOMASSET, S.; DENNISON, A.; GARCEA, G. Ablation for recurrent hepatocellular carcinoma: A systematic review of clinical efficacy and prognostic factors. *HPB*, Elsevier, v. 18, p. e718, 2016. 30

VILLAS-BÔAS, F. I. P.; MONICO, M. H. A sobrevivência de ratos com tumor de walker. v. 17, p. 165–168, 1988. ISSN 01011774. 45

WALKER, C. O. M. T. D. E.; HEBER, R. S. CAQUEXIA E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM RATOS. *Terra e Cultura*, v. 48 e 49, n. ano 25, p. 36–48, 2009. Disponível em: <http://web.unifil.br/docs/revista{_}eletronica/terra{_}cultura/n48{_}49/ter>. 45

WU, S. *et al.* Cryoablation versus radiofrequency ablation for hepatic malignancies: a systematic review and literature-based analysis. *Medicine*, Wolters Kluwer Health, v. 94, n. 49, 2015. 30

XU, D.-W.; WAN, P.; XIA, Q. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma beyond the milan criteria: A review. *World journal of gastroenterology*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 22, n. 12, p. 3325, 2016. 29

ZARUR, J. M. *et al.* Quimioembolização transarterial hepática: modelo experimental de tumor em ratos. *Acta Cir Bras*, SciELO Brasil, v. 19, n. 5, p. 511–6, 2004. 45

ZHANG, B. *et al.* Physica Medica Review paper A review of radiofrequency ablation : Large target tissue necrosis and mathematical modelling. 2016. 20

ZHANG, N. *et al.* Incomplete radiofrequency ablation enhances invasiveness and metastasis of residual cancer of hepatocellular carcinoma cell HCCLM3 via activating β -catenin signaling. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2014. ISSN 19326203. 31

ANEXO A – PUBLICAÇÕES

ARTIGO ACEITO

- **MONTEIRO, M.S.**; GUIMARÃES, G.A.; MOTTA, B. C.; FONSECA D. R. ; MARQUES P. M.; MENDONÇA, G. W. S.; RODRIGUES, S.S.F.R. *et al.* (2017) *The use of Radiofrequency for Hepatocellular Carcinoma Ablation: An Update Review and Perspectives.*
International Journal of Biosensors & Bioelectronics
v. 3, p. 00055, 2017. <<http://medcraveonline.com/IJBSBE/IJBSBE-03-00055.php>>
ISSN: 2573-2838

ARTIGOS SUBMETIDOS

- **MONTEIRO, M.S.**; FONSECA, R.D., MARQUES, M.P.; GUIMARAES G.D.A.; MOTTA, B.D.C., CARNEIRO, M. L. B.; RODRIGUES, S.S.F.R.; *et al.* (2017) *The Influence of Necrosis Area in Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Radiofrequency Ablation: A Systematic Review with Meta-Analysis.*
IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology
Qualis A1 ISSN: 2469-7257
- FONSECA, R.D.; **MONTEIRO, M.S.**; GUIMARAES, G.D.A.; MOTTA, B.D.C.; MARQUES, M.P.; RODRIGUES, S.S.F.R., *et al.* (2017) *Roll off displacement in ex vivo experiments of RF ablation with refrigerated saline solution and refrigerated deionized water.*
Revista: *Medical Engineering and Physics* Qualis: A1, Fator de impacto: 1,89
ISSN: 1350-4533.
- MARQUES, M.P.; RODRIGUES, S.S.F.R.; FONSECA, R.D.; CÓLON, D.; GUIMARAES, G.D.A.; MOTTA, B.D.C.; **MONTEIRO, M.S.**; *et al.* (2017) *Efficacy Monitoring and dose Control Radiofrequency Ablation using Electrical Impedance Modeling a Liver Tumor*
Revista: *Research on biomedical engineering* Qualis: B1. ISSN: 2446-4740 .

PARTICIPAÇÃO EM CAPÍTULO (PUBLICADO)

- RODRIGUES, S.S.F.R.; ROSA, M.F.F.R.; **MONTEIRO, M.S.**; MARQUES, M.P.; GUIMARAES, A.G.S. *Avanços e desafios no complexo industrial em produtos de*

saúde. Capítulo 3: PD e I e Desenvolvimento Produtivo - Pesquisa e Inovação: Desafios para o desenvolvimento e licenciamento de dispositivos médicos. Ministério da Saúde.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- CASADO, J; MONTEIRO S. M.; SILVA J. P.; RODRIGUES, S.S.F.R. *Revisão de atualização do uso da ablação térmica por radiofrequência: perspectiva de desenvolvimento de inovação tecnológica para neoplasias*. In: V Congresso Brasileiro de Eletromiografia e Cinesiologia. X Simpósio de Engenharia Biomédica, 2017, Uberlândia. Integrando Engenharia e Clínica: Convergindo esforços para o bem estar das pessoas, 2017.
- CASADO, J; MONTEIRO S. M.; SILVA J. P.; RODRIGUES, S.S.F.R. *Análise de desempenho de filtragem em biomecânica derivada de biomaterial látex aplicada em sistema de aquisição, exibição e análise de sinais eletromiográfico*. In: V Congresso Brasileiro de Eletromiografia e Cinesiologia. X Simpósio de Engenharia Biomédica, 2017, Uberlândia. Integrando Engenharia e Clínica: Convergindo esforços para o bem estar das pessoas, 2017.
- MONTEIRO S. M.; MARQUES M. P.; GRILLO JR. L. S. P.; RODRIGUES, S.S.F.R. *Projeto SOFIA: equipamento de radiofrequência e o uso combinado de nanopartículas magnéticas. Projeto SOFIA: Equipamento de radiofrequência e o uso combinado de nanopartículas magnéticas*. In: 20º Congresso da Sociedade Brasileira de Radiologia Intervencionista e Cirurgia Endovascular (SOBRICE), 2017, São Paulo. 20º Congresso da Sociedade Brasileira de Radiologia Intervencionista e Cirurgia Endovascular (SOBRICE), 2017. v. 1. p. 14-14.

ANEXO B – GLOSSÁRIO

Ablação = ação de tirar, arrancar, remover uma parte de órgão ou tecido.

Adenomatosa = Relacionado a adenoma (tipo de tumor não-cancerígeno ou benigno de origem glandular) ou a hiperplasia glandular.

Aflatoxina = substância tóxica e cancerígena produzida por alguns tipos de fungos, eventualmente encontrada em produtos agrícolas estocados.

Alfafetoproteína = Dosagem sérica de alfa-fetoproteína (AFP). O exame laboratorial mais comumente utilizado em pacientes com suspeita de câncer hepático (o carcinoma hepatocelular, ou CHC) é a dosagem sérica de alfa-fetoproteína (AFP), uma proteína normalmente produzida por células hepáticas imaturas do feto.

Alteração gênica = Alteração em algum gene.

Anamnese = Consiste no histórico de todos os sintomas narrados pelo paciente sobre determinado caso clínico.

Anatomopatológico = Diagnóstico das doenças baseado no exame macroscópico de peças cirúrgicas e microscópicos para o exame de células e tecidos.

Carcinoma = tumor maligno originário de tecidos epiteliais ou glandulares, que tende a invadir tecidos circundantes, originando metástases.

Carbonização celular = Quando a célula é exposta a temperaturas próximas a 100 °C ocorre um processo químico de combustão incompleta.

Carcinogênese = A carcinogênese, também denominada oncogênese, é o processo no qual as células normais se transformam em células cancerígenas, ou seja, o processo de formação do câncer. Esse processo acontece lentamente, podendo levar vários anos até que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível.

Carcinogenético = Fator que pode estimular um processo de carcinogênese.

Carcinossarcoma = É um tumor maligno com características de carcinoma e sarcoma.

Cianose = Coloração azul violácea da pele e das mucosas devida à oxigenação insuficiente do sangue e ligada a várias causas (distúrbio de hematose, insuficiência cardíaca, entre outros).

Cirrose hepática = é uma doença que afeta todo o fígado, caracterizada pela formação de nódulos de hepatócitos (células do fígado) envoltos por fibrose difusa. É o estágio final, difuso e teoricamente irreversível da fibrose hepática avançada, que leva à perda da arquitetura normal do órgão.

Deleções = Mutação caracterizada pela remoção de um segmento de um cromossomo ou de moléculas da constituição do DNA.

Desidrogenases = São enzimas que catalisam reações de retirada de hidrogênio de uma substância que atua como substrato.

Diabetes tipo 2 = é um distúrbio metabólico caracterizado pelo elevado nível de glicose

no sangue, resistência à insulina e relativa falta de insulina.

Eletroporação = Consiste na injeção do quimioterápico dentro das artérias que irrigam o tumor, seguido de seu fechamento.

Epigenético = é um termo usado na biologia para se referir a características de organismos unicelulares e multicelulares (como as modificações de cromatina e DNA) que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares mas que não envolvem mudanças na sequência de DNA do organismo.

Estadiamento = A necessidade de se classificar os casos de câncer em estádios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevivência são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos. Estadiar um caso de neoplasia maligna significa avaliar o seu grau de disseminação.

Esteato-hepatite não alcoólica = Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) representa a forma inflamatória que pode levar à fibrose avançada, cirrose e hepatocarcinoma, originária da Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), entidade clínica patológica na qual ocorre excessivo acúmulo de triglicérides no fígado.

Ex vivo = Refere-se a experimentos realizados em tecidos ou órgãos fora do organismo vivo.

Exoftálmico = Projeção do globo ocular para fora de sua órbita; exoftalmo, proptose.

Fatores etiológicos = Fatores ambientais ou não que favorecem o surgimento de uma doença.

Fenotípica = São as características observáveis ou caracteres de um organismo ou população, como: morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento.

Fibroblastos = É a célula constituinte do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância fundamental amorfa.

Genes aberrantes = Genes que têm sua expressão aumentada causando danos na célula e no organismo a que pertence.

Gene supressor = É um gene que reduz a probabilidade de uma célula num organismo multicelular se tornar um tumor. Uma mutação ou deleção de tal gene irá aumentar a probabilidade de formação de um tumor.

Genótipo = É a composição genética elementar de um organismo, são às características internas de um indivíduo, características passadas dos pais para os filhos.

Hepatócito = (*hepar* = fígado + *kytos* = célula), o componente estrutural básico do fígado.

Hábitos etílicos = hábitos de abuso de ingestão de bebidas alcoólicas (adição)

Hiperplasia = O aumento de tamanho de um órgão ou tecido, causada pela multiplicação do número de células. Na grande maioria dos casos, esse crescimento anormal do número de células não é câncer (é benigno) e pode indicar uma inflamação.

Imagenologia = É um termo que não consta da maioria dos dicionários de Português.

O conceito é usado para mencionar o conjunto das técnicas e dos procedimentos que permitem obter imagens do corpo humano com fins clínicos ou científicos.

In vivo = Refere-se a experimentos realizados em tecidos, órgãos dentro do organismo vivo.

Letargia = Estado de profunda e prolongada inconsciência, semelhante ao sono profundo, do qual a pessoa pode ser despertada, mas ao qual retorna logo a seguir.

Malignidade = É a tendência de uma doença, especialmente tumores, de se tornarem progressivamente piores e potencialmente causar a morte.

Metástase = É a implantação de um foco tumoral à distância do tumor original, decorrente da disseminação do câncer para outros órgãos.

Morbimortalidade = Relação entre o número de casos de enfermidade ou de morte e o número de habitantes em dado lugar e momento; Relação entre a morbidade e a mortalidade. **Mutações pontuais** = Afeta uma única posição no gene. Isto pode causar mudanças na proteína por ele codificada.

Necrose = Morte celular.

Neoplasia = neo (novo) + plasia (crescimento), “novos crescimentos”. Especificadamente uma proliferação descontrolada de células, que pode ser benigna ou maligna e por fim, o câncer é o termo utilizado para designar uma neoplasia maligna.

Nódulo displásico = São lesões pré-neoplásicas em doentes com cirrose hepática.

Percutânea = Terapia que se aplica na pele ou através dela.

Perfusão = A maneira pelo qual um líquido atravessa os tecidos ou órgãos lenta e continuamente

Procedimentos acessórios = Procedimentos para tratamentos oncológicos que auxiliam a redução do estadiamento da doença.

Protrombina des-gama carboxi = A des-gama-carboxi protrombina (DCP) é uma forma alterada de protrombina, um fator de coagulação produzido pelo fígado. A DCP pode ser produzida por tumores hepáticos e os níveis ficam aumentados quando o indivíduo apresenta carcinoma hepatocelular (CHC).

Quimioembolização = Consiste na injeção do quimioterápico dentro das artérias que irrigam o tumor, seguido de seu fechamento.

Oncogene = Gene que causa a transformação de uma célula normal em cancerosa.

Radioembolização = Uso de radiação direta sobre o tumor, não prejudicando o fígado saudável. A radiação é produzida por esferas radiativas microscópicas carregadas com ítrio-90, elemento que emite radiação de escassa penetração.

Roll off = Ponto crítico na ablação onde há um aumento abrupto da curva de impedância

Ressecção = ou Ressecação, intervenção cirúrgica para extração total ou parcial de um órgão ou de uma neoformação patológica.

Recidiva = Reaparecimento de uma doença ou de um sintoma, após período de cura

mais ou menos longo; recorrência.

Sarcoma = tumor maligno, formado pela proliferação de células de origem embriológica mesodérmica; neoplasma maligno de tecido conjuntivo que pode ocorrer em músculo, osso etc.

Síndrome metabólica = É um termo médico para designar o conjunto de fatores de risco fortemente relacionados com o desenvolvimento de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral(AVC) e Diabetes mellitus tipo II. Esse conjunto de doenças tem em sua base a resistência insulínica.

Sorafenib = Droga inibidora de proteínas que têm como alvo vários processos que estimulam o crescimento de um tumor.

Soroalbumina = Principal proteína presente no plasma, essencial para o transporte de ácidos graxos e pela regulação do volume do sangue; seroalbumina.

Transarterial = É também conhecida como embolização transarterial. Neste procedimento um cateter é inserido numa artéria através de um pequeno corte no interior da coxa até chegar à artéria hepática. Neste momento, um corante é injetado na corrente sanguínea para monitorar o caminho do cateter através de angiografia. Quando o cateter está no lugar pequenas esferas são injetadas na artéria para obstruí-la.

Triagem sorológica = Utilizar técnicas laboratoriais de diagnóstico hematológico em relação à um conjunto de doenças. No caso desse estudo, a triagem é realizada em relação às hepatites virais e cirrose.

Tumografia multifásica = Imagens de tumografias computadorizadas que são realizadas em mais de uma fase. Pode ser uma fase com meio de contraste intravenoso (primeira análise) e posteriormente outra fase sem contraste (segunda análise) para aumentar a quantidade de informações para um diagnóstico.

ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

DECLARAÇÃO DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - Protocolo nº 5/2017, em 9/03/2017.


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 9 de março de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AValiação da Biocompatibilidade e Eficácia Terapêutica da Ablação Térmica Utilizando um Eletrodo de Níquel-Titânio na Ablação Térmica em Modelo de Carcinossarcoma Hepático**", Protocolo n.º 5/2017, sob responsabilidade da Professora Marcella Lemos Brettas Carneiro foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (80 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/02/2017 a 10/04/2017 .




 Profa. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.