



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ALISSANA ESTER IAKMIU CAMARGO

**REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO
CARDÍACO DE RATOS COM CAQUEXIA INDUZIDA PELO
TUMOR DE WALKER-256**

Londrina
2008

ALISSANA ESTER IAKMIU CAMARGO

**REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO
CARDÍACO DE RATOS COM CAQUEXIA INDUZIDA PELO
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C172r Camargo, Alissana Ester Iakmiu.
Redução do estresse oxidativo no músculo cardíaco de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 / Alissana Ester Iakmiu Camargo. – Londrina, 2008.
67f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Caquexia. – Teses. 3. Tumor de Walker-256 – Teses. I. Cecchini, Rubens. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

ALISSANA ESTER IAKMIU CAMARGO

**REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO
CARDÍACO DE RATOS COM CAQUEXIA INDUZIDA PELO
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de fevereiro de 2008.

Ao único Deus, nosso Salvador, sejam
glória, majestade, poder e autoridade,
mediante Jesus Cristo, nosso Senhor,
antes de todos os tempos, agora e para
todo sempre! Amém.

“O sábio de coração é considerado prudente; quem fala com equilíbrio promove a instrução, e o entendimento é fonte de vida para aqueles que o têm.”

Provérbios de Salomão 16.21-22

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Orientador Rubens Cecchini, pela sua sábia orientação e incentivo, instrução e aprendizado, e pelas palavras de motivação e encorajamento em todas as etapas desse trabalho.

A minha família, meu pai Valdair que apesar de estar longe sempre deu apoio nas minhas decisões. Amo você Pai! . Minha mãe Marli que sempre me incentivou nos estudos colaborando com todas as suas forças para o meu êxito, com sua paciência infinita e sua crença na capacidade de realização a mim atribuída. Meus irmãos Elisana e Junior pela confiança e paciência, principalmente nos estágios finais desse trabalho.

Ao estimado Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa, a quem eu devo sempre honras e gratidão, por ter acreditado em mim desde a graduação e quem me iniciou na pesquisa científica.

Ao meu namorado Jomar, companheiro nesta trajetória. Soube compreender, a fase tão importante da minha vida, as minhas dificuldades e as minhas ausências.

A Prof^a. Dr^a. Alessandra Cecchini, minha amiga co-orientadora e a pessoa que ampliou a minha visão científica.

A Flávia pela pessoa amiga e companheira, pela colaboração em todas as etapas do trabalho e principalmente pelas valiosas contribuições feitas nos momentos de escrever a dissertação.

As colegas, que Deus permitiu que se tornassem meus amigos de todas as horas: Carolina Fábio e Vânia. Vocês são uma bênção!

Aos professores Phileo Pinge e Marli Pinge, modelo de pesquisadores e de pessoas cristãs.

Ao técnico do nosso laboratório, Jesus Antonio Vargas, que sempre demonstrou disposição e bom humor em preparar reagentes, me ajudar nos experimentos e acompanhar pra que o laboratório estivesse em ordem! Obrigada por você ter ficado até mais tarde pra me ajudar a fazer a glutatona. Que Deus te abençoe sempre!

Ao Teco pela sua colaboração na informática e ao Pedro Dionisio pelo prazeroso convívio.

Aos meus colegas da pós-graduação: Aida, Cláudia, Cristiane, Custódio, Débora, Franciele, Ivete, Jair, Josiane, Leila, Marcelo, Patrícia, Priscila, Rosália,, Samantha,.

Aos professores do curso de pós graduação em Patologia Experimental: Emerson, Halha, Helenir, Ionice, Maria Angélica, Mario Augusto, Tânia.

Aos estagiários Lucas, Patrícia, Suelem e Vitor, pelos momentos que passamos juntos.

As secretárias Vânia e Ana

Agradeço a CAPES, pela bolsa concedida.

IAKMIU-CAMARGO, A. E. **Redução do estresse oxidativo no músculo cardíaco de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.** 2008. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O desenvolvimento da caquexia em doenças malignas como o câncer manifesta-se pela perda de massa corporal, incluindo atrofia, anorexia, anemia, alteração no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As citocinas, especialmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α), participam de forma importante na indução do estresse oxidativo e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias. Os miócitos cardíacos contêm muitas mitocôndrias e estas contribuem em grande proporção pela produção de EROs que são formadas durante a fosforilação oxidativa, refletindo a dependência quase completa do miocárdio para com o metabolismo aeróbio. No entanto existem mecanismos celulares que inibem o excesso da produção de EROs como o sistema enzimático da catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a superóxido dismutase (SOD), e não enzimático como as vitaminas E, C e β -caroteno, entre outros. As EROs estão associadas a muitas doenças cardiovasculares como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes, levando a carência de defesas anti-oxidantes. Não existem evidências experimentais que demonstrem os acontecimentos oxidativos no miocárdio provocado pela caquexia induzida pelo tumor de Walker-256. Em virtude disso foram medidos os níveis de hidroperóxidos lipídicos e o potencial anti-oxidante (TRAP), SOD, CAT e o sistema glutathiona em três estágios do desenvolvimento do tumor sólido de Walker-256 (5 dias, 10 dias e 14 dias). Além disso, foram avaliadas a ingestão alimentar, a perda de massa muscular do gastrocnêmio e do miocárdio, além do índice de caquexia. A perda de massa do miocárdio foi 8,3% no grupo 5 dias, 10,8% no grupo 10 dias e 16,8% no grupo 14 dias. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos diminuíram significativamente a partir do grupo 10 dias ($p < 0,05$), demonstrando uma queda na lipoperoxidação neste tecido, enquanto o TRAP aumentou a partir dos 10 dias (em μM Trolox) $2,29 \pm 0,14$ e 14 dias $2,07 \pm 0,11$, controle $1,13 \pm 0,04$ ($p < 0,05$), apresentando aumento das defesas anti-oxidantes de baixa massa molecular. A atividade da SOD foi significativamente maior em todos os grupos experimentais, (USOD/mg proteína⁻¹) tumor 5 dias $6,61 \pm 0,22$, tumor 10 dias $6,94 \pm 0,41$ e tumor 14 dias $6,02 \pm 0,3$, comparados ao grupo controle $5,11 \pm 0,28$, ($p < 0,05$), enquanto que a atividade da CAT foi (absorbância/mg proteína⁻¹.min⁻¹) significativamente maior no grupo controle ($0,392 \pm 0,008$) comparado ao grupo 5 dias de tumor ($0,341 \pm 0,009$), mas quando comparado aos grupos 10 dias ($0,601 \pm 0,04$) e 14 dias ($0,559 \pm 0,02$) foi menor, demonstrando também aumento nessas enzimas anti-oxidantes após a inoculação do tumor. A GSSG não apresentou diferença entre os grupos avaliados, enquanto que os níveis de glutathiona total (GT) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) comparado ao grupo controle ($7,98 \pm 0,39$) foi menor no grupo 10 dias ($6,50 \pm 0,45$) e maior no grupo 14 dias ($9,99 \pm 0,19$; $p < 0,05$). O índice de estresse aumentou significativamente comparado ao grupo controle ($0,45 \pm 0,03$), no grupo 5 dias ($0,66 \pm 0,06$) e no grupo 10 dias ($0,78 \pm 0,10$), no entanto diminuiu com relação no grupo 14 dias comparado ao grupo 10 dias ($0,52 \pm 0,02$; $p < 0,05$), estando estes dois parâmetros elevados no grupo 14 dias pelo provável recrutamento de glutathiona reduzida sistêmica para o interior do miócito cardíaco. Estes resultados revelam uma proteção anti-oxidante exacerbada na caquexia induzida pelo tumor neutralizando a ação das EROs, diferente do que acontece em outros tecidos e em outras patologias cardiovasculares, sugerindo futuros trabalhos com a perspectiva de averiguar as alterações

morfológicas e estruturais, e monitorar as funções cardíacas que ocorrem na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

Palavras-chave: Miocárdio. Estresse oxidativo. EROs. Anti-oxidantes. Caquexia. Tumor de Walker-256.

IAKMIU-CAMARGO, A. E. **Reduction of oxidative stress in rat cardiac muscle with cachexia by Walker-256 solid tumor.** 2008. 69p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The development of cachexia in malignancies such as cancer manifests itself for the loss of body mass, including atrophy, anorexia, anemia, alteration in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. The cytokines, particularly tumor necrosis factor- α (TNF- α) a major part in the induction of oxidative stress and increased production of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria. The cardiac myocytes contain many mitochondria and these contribute to a large proportion of the production ROS that are formed during oxidative phosphorylation, reflecting the almost complete dependence of the myocardium to the aerobic metabolism. But there are cellular mechanisms that inhibit the excess production of ROS as the enzyme system of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and no enzyme such as vitamins E, C and β -carotene, among others. The ROS are associated with many cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart insufficiency, leading to lack of defenses anti-oxidants. There are no experimental evidence demonstrating the events in the myocardium caused by oxidative cachexia induced by tumor of Walker-256. Under applicable were measured levels of lipid hydroperoxides and anti-oxidant (TRAP), SOD, CAT and glutathione system in three stages in the development of solid tumor of Walker-256 (5 days, 10 days and 14 days). Moreover, the food intake were assessed, the loss of the gastrocnemius muscle mass and myocardium, in addition to the rate of cachexia. The loss of mass myocardial was 8.3% in group 5 days, 10.8% in group 10 days and 16.8% in group 14 days. The levels of lipid hydroperoxides decreased significantly from the group 10 days ($p < 0.05$), showing a drop in lipoperoxidação this tissue, while TRAP increased from 10 days (in μM Trolox) 2.29 ± 0.14 and 14 days 2.07 ± 0.11 , control 1.13 ± 0.04 ($p < 0.05$), showing an increase of anti-oxidants defenses of low molecular weight. The activity of SOD was significantly higher in all experimental groups, (USOD / mg protein-1) tumor 5 days 6.61 ± 0.22 , tumor 10 days 6.94 ± 0.41 and tumor 14 days 6.02 ± 0.30 , compared to the control group 5.11 ± 0.28 , ($p < 0.05$), while the activity of CAT was (absorbance / mg protein⁻¹.min⁻¹) significantly higher in the control group (0.392 ± 0.008) compared to 5 days of tumor group (0.341 ± 0.009), but when compared to the groups 10 days (0.601 ± 0.04) and 14 days (0.559 ± 0.02) was lower, showing these enzymes also increase anti - oxidants after inoculation of the tumor. The GSSG presented no difference between the groups studied, while the levels of total glutathione (GT) (μM / mg protein) compared to the control group (7.98 ± 0.39) was lower in the group 10 days (6.50 ± 0.45) and higher in group 14 days (9.99 ± 0.19 , $p < 0.05$). The index of stress increased significantly compared to the control group (0.45 ± 0.03) in group 5 days (0.66 ± 0.06) in group 10 days (0.78 ± 0.10), however decreased with respect to the group 14 days compared to 10 days group (0.52 ± 0.02 , $p < 0.05$), and these two parameters high in the group 14 days by the likely recruitment of reduced glutathione systemic into the miocito heart. These results show a protective anti-oxidant-induced cachexia exacerbated the tumor neutralize the action of ROS, different from what happens in other tissues and other cardiovascular diseases, suggesting future work with a view to ascertain the structural and morphological changes, and monitor the functions that occur in cardiac cachexia induced by tumor of Walker-256.

Keywords: Myocardium. Antioxidants. ROS. Oxidative stress. Cachexia. Walker-256 tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – As fases cronológicas da caquexia induzida pelo câncer	17
Figura 2 – A via da ubiquitina-proteassoma	21
Figura 3 – Visão simplificada das vias de sinalização que levam à ativação da caspase-3.....	25
Figura 4 – Gráfico representativo do TRAP	41
Figura 5 – Ingestão alimentar diária do grupo controle PBS/ <i>ad libitum</i> e do grupo de ratos com tumor Walker-256 observada no 5º, 10º e 14º dias	45
Figura 6 – Efeito da caquexia no miocárdio de ratos na avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido	47
Figura 7 – TRAP dos homogenatos do miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256.....	48
Figura 8 – Atividade da SOD nos sobrenadantes de miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256	49
Figura 9 – Atividade da CAT nos sobrenadantes de miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256	50
Figura 10 – Níveis de GSH, GSSG e IE no miocárdio nos grupos controle, 5º, 10º e 14º dias de tumor	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anti-oxidantes intracelulares	29
Tabela 2 – Perda progressiva de massa corporal e muscular na caquexia induzida pelo Tumor Walker-256	46

LISTA DE SIGLAS

ABAP – 2,2-azo-bis(2-amidinopropano diidroclorido)

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

Bax – proteína pro-apoptótica

Bcl-2 – proteína oncogênica que inibe apoptose

CAT – catalase

CNRF – fator neurotrópico ciliar

COX-II – ciclooxigenase II

eNOS – \cdot NO sintase endotelial

Eros – espécies reativas de oxigênio

γ -GT – gama glutamil transferase

GMC – ganho de massa corpórea

GSH – glutationa reduzida

GSH-Px – glutationa peroxidase

GSH-Rd – glutationa redutase

GSSG – glutationa oxidada

GT – glutationa total

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

ICC – insuficiência cardíaca congestiva

IE – índice de estresse

IFN- γ – interferon gama

IL – interleucina

I κ B – subunidade do NF- κ B

iNOS – \cdot NO sintase induzível

MDA – dialdeído malônico

Mn-SOD – manganês superóxido dismutase

MtDNA – ácido desoxi-ribonucléico mitocondrial

NADPH – nicotinamida adenina difosfonucleotídeo

NF- κ B – fator nuclear K β

\cdot NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

\cdot O₂ – ânion radical superóxido

$\cdot\text{OH}$ – radical hidroxil

ONOO^- – peroxinitrito

QL – quimiluminescência

PRFA – proteínas de resposta de fase aguda

SOD – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α – fator de necrose tumoral α

Ub – ubiquitina

URL – unidade relativa de luz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 MEDIADORES DA CAQUEXIA	18
1.2 METABOLISMO PROTÉICO NA CAQUEXIA.....	20
1.3 O ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CAQUEXIA	24
1.4 ANTI-OXIDANTES	27
1.4.1 Anti-oxidantes Celulares.....	28
1.4.2 Anti-oxidantes de Membranas	30
1.4.3 Anti-oxidantes Extracelulares	30
1.4.3 Anti-oxidantes de Baixa Massa Molecular	31
1.5 O MIOCÁRDIO	31
1.5.1 O Miocárdio e o Estresse Oxidativo	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ANIMAIS	36
3.2 REAGENTES	36
3.3 MANUTENÇÃO DO TUMOR DE WALKER-256	37
3.4 MODELO EXPERIMENTAL DO TUMOR DE WALKER-256.....	38
3.5 TECIDOS UTILIZADOS	38
3.5.1 Preparo do Músculo Cardíaco.....	38
3.6 DETERMINAÇÃO DO ESTADO CAQUÉTICO	39
3.7 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS	40
3.7.1 Quantificação de Proteínas.....	40
3.7.2 Quimiluminescência Induzida por Tert-butil Hidroperóxido	40
3.7.3 Determinação da Capacidade Anti-oxidante Total (TRAP) por Quimiluminescência	40
3.7.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase	42
3.7.5 Atividade da Catalase	42
3.7.6 Determinação de Glutathione Total	42

3.7.7 Determinação de Glutathione Oxidada	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA	45
4.2 O ESTRESSE OXIDATIVO NO MIOCÁRDIO.....	46
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

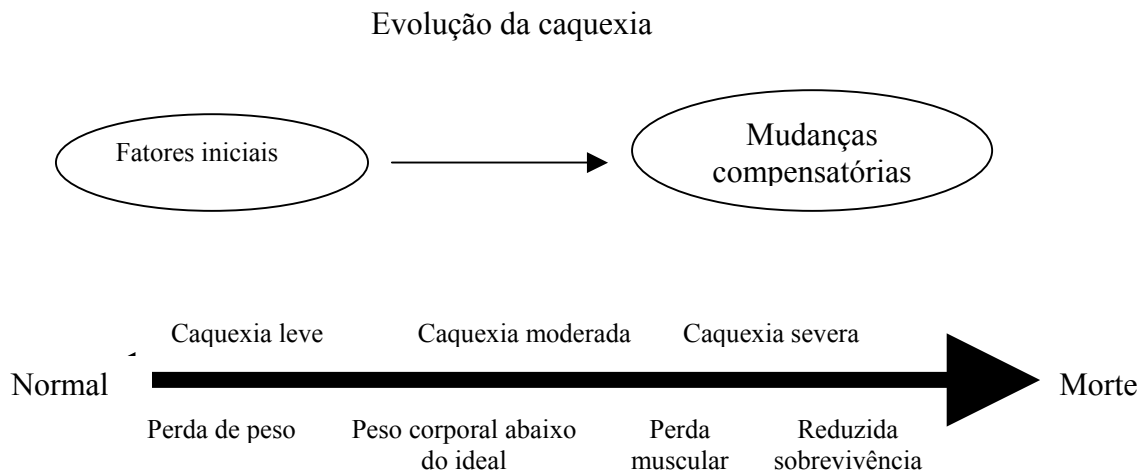
Muitas doenças crônicas ou em estágios avançados como o câncer, AIDS, insuficiência cardíaca congestiva, artrite reumatóide, tuberculose, fibrose cística e doença de Cronh desenvolvem caquexia sem sintomas aparentes (TISDALE, 2002; HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; COSTELLI et al., 2005).

A perda de peso e a caquexia são conseqüências comuns em pacientes com câncer, contribuindo para a diminuição da qualidade e da expectativa de vida. A caquexia é uma síndrome clínica difícil de ser definida, sendo que a sua origem multifatorial e complexa impede a uniformidade em sua definição patofisiológica (TISDALE, 2002).

Tisdale (2002) a define como uma síndrome de perda de massa crônica, envolvendo perda do tecido adiposo e massa magra, sendo difícil de ser revertida com apoio nutricional. É uma desordem metabólica complexa que envolve aspectos da anorexia, anemia, lipólise, ativação de resposta de fase aguda, e resistência a insulina (GONÇALVES et al., 2006) levando a má nutrição. No entanto é importante reconhecer que ela é uma síndrome de etiologia complexa e que a perda de peso é somente um dos componentes dessa síndrome (FEARON; MOSES, 2002).

A caquexia é observada em 80 por cento dos pacientes com câncer avançado, e é a principal causa de morbidade e mortalidade, sendo responsável por 20 por cento dos casos de morte, embora a frequência da caquexia varie com o tipo do tumor. Em pacientes com carcinoma de pâncreas e estômago a incidência de caquexia é de 85 por cento, enquanto que em pacientes com câncer de mama e sarcoma é menor, ocorrendo em cerca de 40 por cento (TISDALE 2002; TISDALE, 2004). Embora certos tipos de tumor estejam associados à caquexia, é notável como pacientes com o mesmo tipo de tumor podem variar na extensão da caquexia. A influência nutricional na caquexia provocada por doenças crônicas pode ocorrer através de consumo aumentado de nutrientes devido ao metabolismo anormal, ingestão reduzida devido à anorexia ou má absorção e elevada perda (WITTE; CLARK, 2002).

A caquexia não é um estado que existe independente do tempo. Ela representa uma condição que se desenvolve através das fases inicial, intermediária e tardia conforme a figura 1.



Fonte: Skipworth, Dahele e Fearon (2006).

Figura 1 – As fases cronológicas da caquexia induzida pelo câncer.

A caquexia avançada é facilmente diagnosticada em pacientes com perda de peso involuntária, perda muscular, anorexia, saciedade precoce, função física reduzida, fadiga, anemia e edema. Porém essas características não são específicas e não podem ser usadas para identificar um paciente nos estágios iniciais da caquexia (SKIPWORTH; DAHELE; FEARON, 2006). Com frequência, a perda de peso de mais que 10 por cento indica severa depleção, e é usada como um critério inicial para a síndrome anorexia-caquexia em pacientes obesos. Em contraste, pacientes caquéticos parecem passar por seletiva depleção da sua massa muscular esquelética com certa preservação da massa protéica visceral. A preservação visceral deve ser explicada parcialmente pela estimulação da resposta de proteínas hepáticas de fase aguda face ao tumor (SKIPWORTH; DAHELE; FEARON, 2006).

A depleção de massa corporal magra é uma das principais características da caquexia, e envolve não apenas a musculatura esquelética, mas também proteínas cardíacas, resultando em alterações importantes no desempenho do coração (ARGILEZ et al., 2005).

Alterações neuro-endócrinas, assim como a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e a liberação de fatores caquéticos pelo tumor induzem um estado hipermetabólico no hospedeiro, causando um balanço energético e nitrogenado negativo, resultando em perda funcional e de massa em diversos órgãos. Desta forma, sintomas incluindo anorexia, perda de massa corpórea e muscular, astenia e anemia surgem como

reflexos destas alterações, sendo responsáveis pela redução da qualidade e expectativa de vida em indivíduos com caquexia (YOUNES; NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2001; FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005).

O tumor Walker-256 tem sido usado como modelo experimental para induzir caquexia em ratos. Em curto espaço de tempo após sua implantação, verifica-se redução no peso do animal devido ao aumentado catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos e a dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia). Aos 14 dias após o implante, a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO et al., 2002). O modelo animal de inoculação do carcinoma de Walker-256 em ratos induziu diminuição da ingestão alimentar quando o tamanho do tumor foi menor que 5% do peso corporal. Essa anorexia foi acompanhada por uma diminuição do tecido adiposo e, em menor extensão, da musculatura tecidual (GARATTINIE; GUAITANI, 1981).

Tem sido relatado que o tratamento crônico com óleo de peixe reduz o crescimento tumoral em um modelo de caquexia induzida por tumor de Walker-256 (PINTO et al., 2004). Usando o mesmo modelo, outro estudo verificou que o tratamento com agentes anabolizantes, tais como insulina e clenbuterol, e com naproxeno, um inibidor da síntese de prostaglandinas, isoladamente ou associados, diminui significativamente o crescimento tumoral e a perda de massa corpórea (PIFFAR et al., 2003). Além disso, outro trabalho mostrou que a administração de uma dieta rica de leucina em ratas grávidas com tumor de Walker aumentou a síntese protéica no músculo gastrocnêmio (VENTRUCCI et al., 2007).

Ratos com tumor de Walker-256 apresentaram níveis aumentados de MDA e hidroperóxidos lipídicos, além de redução dos níveis de anti-oxidantes no músculo gastrocnêmio (GUARNIER, 2006), no fígado (SUZUKAWA, 2005) e no sangue (ROTTUNO, 2007). Freitas et al. (2001) também encontraram níveis aumentados de MDA em diferentes regiões do cérebro de ratos, utilizando esse mesmo modelo.

1.1 MEDIADORES DA CAQUEXIA

As citocinas têm um papel importante entre os fatores humorais envolvidos na caquexia pelo câncer. Acredita-se que um grande número delas possa ser responsável pelas mudanças metabólicas associadas com a perda de peso no câncer. Muitas citocinas pró-

inflamatórias/caquéticas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (INF- γ) e fator neurotrópico ciliar (CNRF), têm sido implicadas na caquexia. Em modelos animais, a administração dessas citocinas leva a anorexia, perda de peso, resposta de proteínas de fase aguda, quebra de proteínas e gorduras, aumento nos níveis de cortisol e glucagon, diminuição nos níveis de insulina, resistência a insulina, anemia, febre, e elevado gasto de energia (ARGILES et al., 2003). Evidências recentes têm sugerido as cadeias pesadas de miosina como alvo das citocinas pró-inflamatórias por contar com marcada perda muscular esquelética nessa condição (ACHARYYA et al., 2004)

Skipworth et al. (2007), sugerem que as citocinas liberadas por células tumorais agem localmente para promover inflamação e ativar as células inflamatórias do hospedeiro. Essas células do hospedeiro ativadas iniciam sua própria cascata de citocinas que induzem a produção de proteínas de resposta de fase aguda (PRFA). Falconer et al. (1994) em um estudo com pacientes com caquexia decorrente de câncer pancreático observaram que a concentração de TNF- α ou IL-6 não estava relacionada com a presença das PRFA, ao passo que a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico, *in vitro*, estavam significativamente elevadas nestes pacientes. Alvarez et al., (2002) mostraram que em cultura de células de miotubos esqueléticos (C2C12) os efeitos do TNF- α na síntese de proteína muscular são mediados por IL-6, mas que TNF- α exerce efeitos independentes de IL-6 na proliferação de mioblastos esqueléticos murinos.

O TNF- α parece estar envolvido na degradação protéica, embora isso não tenha uma relação com a perda de peso (TISDALE, 1999; ARGILES et al., 2005a, 2005b). Os autores Buck e Chojkier (1996), sugeriram que a degradação do músculo esquelético de camundongos tratados com TNF- α seja mediada por estresse oxidativo. Em um modelo de perda muscular murina, o TNF- α induziu o estresse oxidativo e a expressão de óxido nítrico sintase (NOS) no músculo esquelético. O tratamento com antioxidantes, α -tocoferol, BW755c ou inibidor da NOS preveniu a perda muscular, de peso total e as anormalidades moleculares do músculo esquelético. Ainda no mesmo modelo, o gasto energético muscular produzido pelo TNF- α , estava associado à indução do estresse oxidativo, como foi indicado por um aumento significativo de adutos de MDA-lisina no músculo esquelético. Citocinas, especialmente TNF- α desempenharam uma função importante na caquexia, em parte por induzir o estresse oxidativo. Adicionalmente, os níveis de peroxidação lipídica, oxidação de proteína e 3-nitrotirosina se mostraram aumentados na perda muscular de camundongos com caquexia induzida por hepatoma (BARREIRO et al., 2005).

Por outro lado, tem sido reportado que certas citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) exibem atividade antiinflamatória e devem então representar fortes respostas supressoras da caquexia (SKIPWORTH et al., 2007). Ademais, tem se observado que a interleucina-15 (IL-15) tem efeitos anabólicos no músculo esquelético de ratos pela direta inibição da proteólise muscular (BUSQUETS et al., 2005).

Dessa forma a situação de depleção em pacientes caquéticos é dependente não somente da disponibilidade dos nutrientes, mas também por interferência no balanço entre citocinas pró-caquéticas e anticaquéticas (SKIPWORTH et al., 2007).

1.2 METABOLISMO PROTEICO NA CAQUEXIA

Sabe-se que a massa muscular esquelética que compõe aproximadamente metade do estoque total de proteínas corporais é severamente depletada na caquexia (TISDALE 2001, DELANO; MOLDAWER, 2006). A massa muscular depende do balanço entre a taxa de síntese e de degradação protéica (DELANO; MOLDAWER, 2006).

Existem quatro vias proteolíticas que têm sido identificadas e que são responsáveis pelo catabolismo muscular.

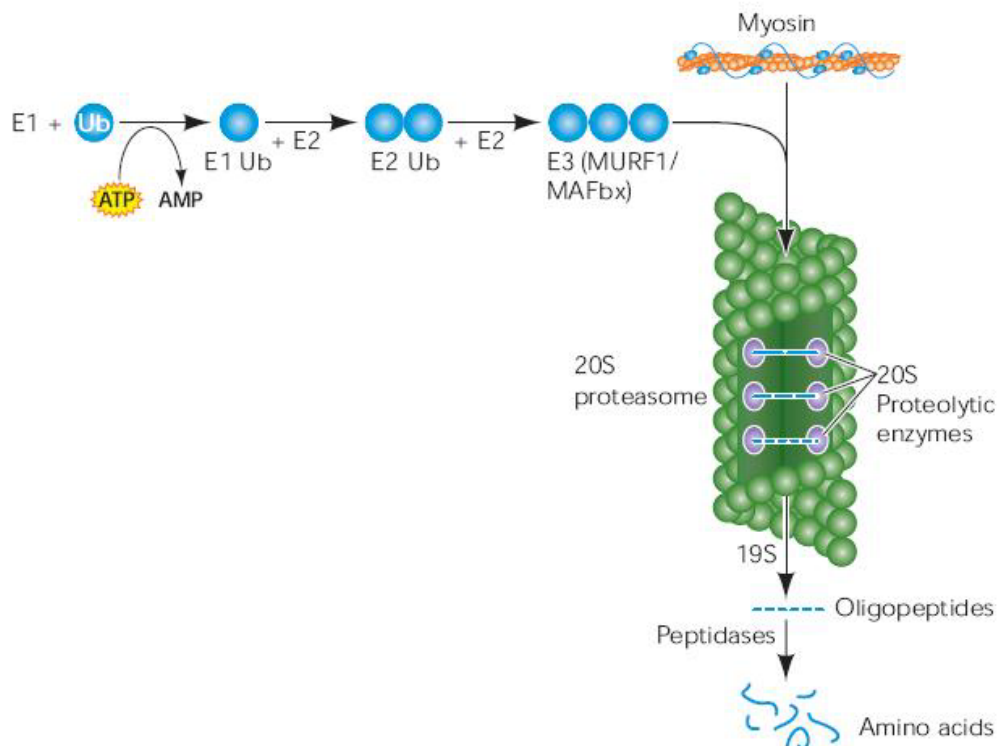
A primeira via é o sistema lisossomal que contém catepsinas, e está envolvido na proteólise de proteínas extracelulares e de receptores celulares de superfície. Os lisossomos degradam proteínas capturando as células por endocitose, e também capturando algumas proteínas e organelas citoplasmáticas para destruição (LECKER et al., 1999; HALLIWELL;GUTTERIDGE, 2007).

A segunda via é um sistema proteolítico das calpaínas, que envolve cisteínas proteases ativadas pelo cálcio (Ca^{2+}) (independente de ATP), que estão principalmente envolvidas no dano tecidual, necrose e autólise. Duas formas de calpaínas têm sido descritas e diferem na sua atividade pelo Ca^{2+} . As calpaínas existem no citosol na forma inativa, sendo ativadas pelo influxo de Ca^{2+} em concentrações da ordem de μM (calpaína μ ou 1) ou mM (calpaína m ou 2). As calpaínas μ e m são expressas em uma variedade de tecidos, enquanto a calpaína 3, também conhecida como calpaína p94, é expressa predominantemente no tecido muscular (COSTELLI et al., 2005). Um inibidor específico de calpaínas, a calpastatina, está presente também no citosol de mamíferos e é capaz de se ligar e inativar quatro moléculas de

calpaínas diferindo na sua afinidade pelo cálcio. Essas proteases aparecem ativadas quando as células são lesadas.

Outra importante família de proteases citosólicas são as caspases, que estão envolvidas na via da apoptose em eucariotos (LECKER et al., 1999). Coletivamente, as caspases são endoproteases que degradam proteínas e, em alguns casos, causam apoptose. Na célula, as caspases são expressas como precursores inativos (procaspases), e a ativação das caspases podem resultar em apoptose. Especificamente, a ativação da caspase-3 por espécies reativas de oxigênio (EROs) promove degradação dos complexos actina e miosina. (POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU, 2005).

A quarta via e provavelmente a principal colaboradora proteolítica para a perda muscular na caquexia pelo câncer, e aonde a maior parte de toda a proteína intracelular é degradada, é a via proteolítica ubiquitina-proteassoma (Ub-proteassoma) dependente de ATP que é modulada, pelo menos em parte, pelo TNF- α (Figura 2) (ARGILEZ et al., 1998; LECKER et al., 1999; HASSELGREN; FISHER, 2001).



Fonte: TISDALE (2005).

Figura 2 – A via da ubiquitina-proteassoma . Ub-ubiquitina; E1, Ub ativando a enzima; E2, Ub conjugando a enzima; E3, Ub-proteína ligase.

A Ub é uma proteína altamente conservada que foi inicialmente isolada do timo na década de 1970 e logo sua presença foi detectada em todos os tecidos dos organismos e por isso recebeu essa denominação (DELANO; MOLDAWER, 2006).

Os substratos protéicos são inicialmente marcados para a degradação pela reação covalente de cadeias de moléculas de Ub. A enzima ativadora de ubiquitina (E1) ativa ubiquitina em uma interação dependente de ATP para formar Ub-E1. Uma vez ativada, a ligação Ub-E1 é transferida para um resíduo específico de cisteína de pelo menos doze proteínas carreadores de Ub ou E2s. O grande número de E2 ajudam a gerar a especificidade do sistema de ubiquitinação na degradação de diferentes tipos de substratos.

Em seguida, as proteínas que estão para ser degradadas são alvos da proteína E3(MURF1/MAFbx), uma proteína Ub-ligase, que conjuga a proteína alvo ao peptídeo Ub. As E3-ligasas possuem sítios de ligação específicos para o substrato, no caso E2, e no mínimo uma molécula de Ub. Muitas E3 catalisam a formação de cadeias longas de Ub, por meio da qual os sítios ativados das E3 são capazes de transferir diretamente a Ub para qualquer lisina do substrato, ou processar o grupo funcional Ub para formar uma cadeia. Adicionalmente, duas únicas ubiquitinas E3 ligases, atrogina 1 e “muscle ring finger-1” foram descobertas no músculo esquelético (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Então o ciclo é repetido, e muito mais cadeias de ubiquitinas são adicionadas ao complexo protéico já ubiquitinizado (Figura 2) (LECKER et al., 1999; TISDALE, 2002; DELANO ; MOLDAWER, 2006).

Subsequentemente, o complexo Ub-proteína está pronto para a degradação no proteassoma. A proteólise é então catalisada pelo proteassoma 26S que degrada proteínas em pequenos peptídeos.

A representação esquemática de um proteassoma mostra sua formação cilíndrica e composta de subunidades proteolíticas, incluindo o core proteassoma 20S, com dois proteassomas 19S regulatórios. O proteassoma 20S é uma estrutura em forma de barril de quatro “estacas” de anéis na qual é composta de sete subunidades circundantes a uma cavidade central, sendo responsável pela atividade de degradação protéica catalítica, na qual é regulada pelo proteassoma 19S. Para o complexo Ub-proteína ser degradado pela subunidade 20S do proteassoma, primeiramente, é necessário ser reconhecido, processado e desubiquitinado pela subunidade 19S do proteassoma (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Uma vez degradado pelo core 20S, o proteassoma 26S libera pequenos oligopeptídeos para serem, mais adiante, degradados por uma grande tripeptil peptidase II (TPPII) e outras aminopeptidases (TISDALE, 2002). A ubiquitina é então separada dos peptídeos e reciclada

de volta para a via ubiquitina-proteassoma para ser usada na degradação de outras proteínas (Figura 2) (DELANO; MOLDAWER, 2006). Os peptídeos liberados do proteassoma são rapidamente hidrolisados a aminoácidos no citosol (LECKER et al., 1999).

As vias lisossomais e do sistema Ub-proteassoma podem operar exaustivamente degradando as proteínas celulares em aminoácidos ou pequenos peptídeos, enquanto que a via dependente de Ca^{+2} e o sistema de caspases têm o seu sistema proteolítico limitado, devido a sua restrita especificidade (COSTELLI et al, 2005).

Muitos estudos indicam que os transplantes de tumores em ratos ativam a via do sistema Ub-proteassoma no músculo, aparentemente via fatores que agem no local e sistemicamente. Um exemplo é o implante do sarcoma de Yoshida no músculo da pata de ratos, produzindo atrofia dos músculos adjacentes, presumivelmente por causa de fatores catabólicos liberados pelo tumor (TEMPARIS et al., 1994). Usando o mesmo modelo de caquexia, a depleção protéica foi significativamente inibida pela leupeptina, um inibidor de cisteína protease (TESSITORE; COSTELLI; BACCINO, 1994). A atrofia muscular aconteceu por um aumento na taxa de degradação protéica comparada às taxas medidas no músculo da pata contralateral. Similar resposta muscular foi observada em estudos dos efeitos da injeção de células do hepatoma ascítico de Yoshida (BARACOS et al., 1995). Neste modelo houve uma rápida perda de peso corporal e massa muscular, apesar da massa tumoral representar menos de 3% do peso corporal. A marcada perda muscular aconteceu pela ativação do sistema proteolítico ATP-dependente, embora a capacidade para proteólise lisossomal também tenha aumentado ligeiramente e a síntese protéica tenha diminuído (BARACOS et al., 1995).

Busquets et al. (2004) testaram em diferentes modelos animais de caquexia pelo câncer a eficiência anti-caquética do formoterol, e encontraram que esta droga regula a expressão gênica da ubiquitina e das subunidades do proteassoma e mais ainda, diminui a taxa de degradação protéica em até 20%.

Li et al. (2003) mostraram que peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estimula a conjugação da ubiquitina nas proteínas musculares por meio de regulação transcricional das enzimas E2 e E3 em miócitos C2C12.

Muitos alvos moleculares inibem a via Ub-proteassoma, e várias proteínas modificam sua função. Entre elas incluem-se: NF- κ B e seu inibidor I κ B; proteínas quinases ativadas por mitógenos como p44/42 (p44/p42 MAPK); o gene supressor do tumor p53 e a proteína pró-apoptótica p53 (CAMPS et al., 2006).

O fator de transcrição NF- κ B tem sido reconhecido como o regulador central dos genes da inflamação sendo ativado pelo TNF- α e IL-1 β , e também por muitas outras condições patogênicas como a oncogênese (BAEUERLE, 2000; CAMPS et al., 2006). A forma clássica e inativa do NF- κ B apresenta-se como um trímero de subunidades: p65, p50, e I κ B (com subunidades α e ϵ). Quando ativado a subunidade inibitória, I κ B α , dissocia-se e o dímero do p50/p65 move-se para o núcleo (DEORA; LANDER, 2000), liga-se ao DNA e aumenta a expressão de múltiplos genes, incluindo aqueles que codificam muitas citocinas (IL-2, IL-6, IL-8, TNF α), proteínas de fase aguda, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fatores de crescimento, moléculas de adesão, ciclooxigenase 2 e receptores de citocinas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Em resposta a um largo número de estímulos pró-inflamatórios, várias formas de I κ B são irreversivelmente inativadas pela degradação mediada pelo proteassoma (BAEUERLE, 2000).

O acúmulo de NF- κ B pode induzir incontrolável proliferação celular, supressão da apoptose, angiogênese, invasão tecidual, e caquexia induzida por câncer (ORLOWSKI; BALDWIN, 2002). O sistema Ub-proteassoma regula positivamente fatores de transcrição da família do NF- κ B, que são convertidos em formas maduras no proteassoma. Além disso, I κ B bloqueia NF- κ B no citoplasma, prevenindo sua translocação ao núcleo celular (CAMPS et al., 2006).

A degradação do p53 é grandemente conduzida via sistema Ub-proteassoma. Isso leva a um aumento na transcrição de p21 e p27 adiando o ciclo celular, e de proteínas pro-apoptóticas. A expressão de importantes genes pro-apoptóticos e anti-apoptóticos está alterada na caquexia pelo tumor (LIMA et al., 2005).

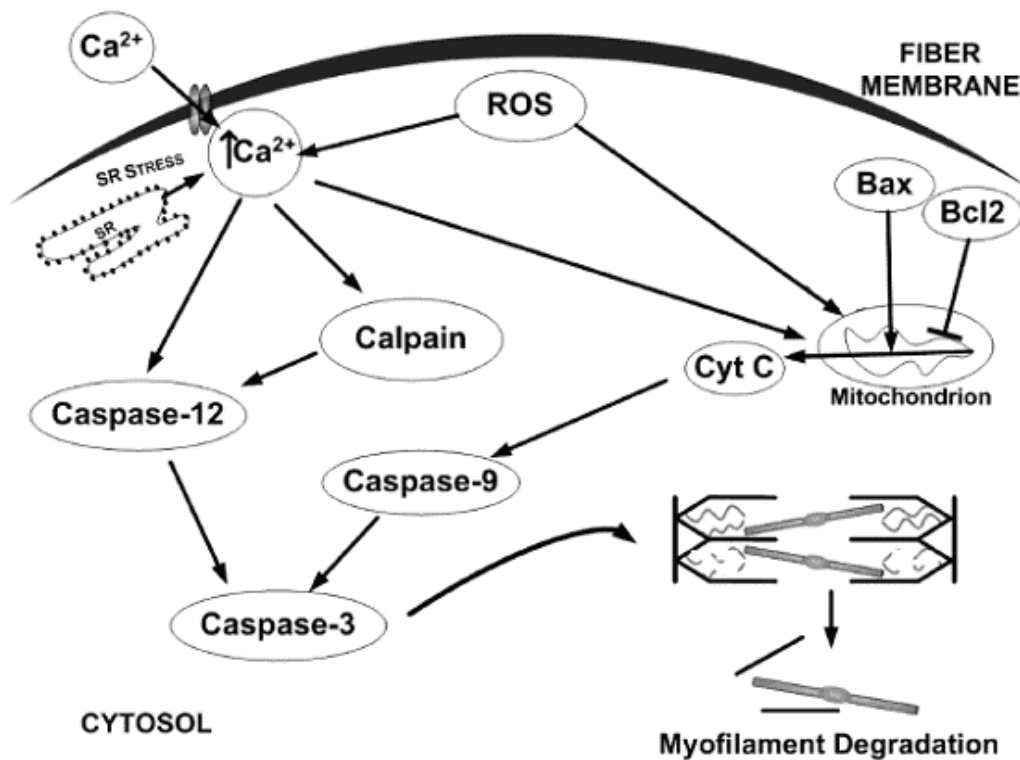
1.3 O ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CAQUEXIA

Os radicais livres de oxigênio e nitrogênio desenvolvem uma importante função modulando muitas alterações inflamatórias que ocorrem na musculatura (SUPINSKI; CALLAHAN, 2007).

Já está estabelecido que quando a produção de agentes oxidantes excede a capacidade anti-oxidante no músculo, o estresse oxidativo ocorre e a oxidação pode alterar a estrutura e a função dos lipídeos, proteínas, e ácidos nucleicos, levando ao dano e até morte celular (POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU, 2005).

Tem sido sugerido que o estresse oxidativo poderia desempenhar uma importante função nos distúrbios iônicos celulares. Uma explicação para isso é que agentes oxidantes intervêm na formação de aldeídos reativos (por exemplo, 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal) reduzindo a atividade da Ca^{2+} ATPase na membrana plasmática, permitindo o retardo da remoção de Ca^{2+} , promovendo o seu acúmulo (SIEMS et al., 2003).

Possivelmente a caspase-3 é ativada pela ativação da caspase-12 (por liberação de cálcio) e/ou ativação da caspase-9 (via mitocondrial). A chave entre essas vias de interação é que ambas podem ser ativadas pelas EROs (Figura 3). A via de liberação de Ca^{2+} ativa caspase-3 via uma trajetória de sinalização que culmina na caspase-12. A ativação da calpaína também pode contribuir para a ativação da caspase-3 por intermédio da via do Ca^{2+} . A via mitocondrial de ativação da caspase-3 é complexa e pode ser iniciada por numerosos sinais de interação que incluem EROs e altas taxas de proteínas pro-apoptóticas (como a Bax) e anti-apoptóticas (como a Bcl-2) na mitocôndria. EROs podem levar a liberação mitocondrial do citocromo *c*, resultando na ativação da caspase-9 e subsequente ativação da caspase-3 (POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU, 2005).



Fonte: POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU (2005).

Figura 3 – Visão simplificada das vias de sinalização que levam à ativação da caspase-3.

Muitas isoformas de calpaínas são ativadas pelo estresse oxidativo. A ativação destas calpaínas no músculo esquelético promove uma infiltração de células inflamatórias que também produzem EROs, potencializando o estresse oxidativo (BARKER; TRABER, 2007). Smith e Doodd (2007) encontraram que a ativação da calpaína aumenta a degradação protéica total, assim como a proteólise dependente do proteassoma, e que a inibição do proteassoma previniu a elevação da proteólise seguida de ativação da calpaína. Desse modo a ativação da calpaína parece estar associada com a elevação dos níveis de estresse oxidativo e aumento de degradação protéica pela via Ub-proteassoma (BARKER; TRABER, 2007).

Novas evidências revelam que o core 20S do proteassoma pode degradar seletivamente proteínas oxidadas com ubiquitinação. Desse modo parece ser possível que o estresse oxidativo possa acelerar a degradação protéica muscular via exclusivamente o core 20S do proteassoma (GRUNE et al., 2003).

Freitas et al. (2001), em um estudo para avaliar a participação do estresse oxidativo no cérebro de ratos com tumor de Walker-256, observaram que os níveis de MDA aumentaram significativamente no hipotálamo (82%), cerebelo (75%), hipocampo (117%), 14 dias após o implante mantendo-se inalterado no córtex. Os autores sugerem que níveis de MDA aumentados são um indicativo de estresse oxidativo no cérebro de ratos portadores de tumor de Walker-256. No mesmo estudo a atividade anti-oxidante enzimática em regiões do cérebro foi avaliada. Nos ratos portadores de tumor Walker-256 houve uma significativa diminuição na atividade da catalase (CAT) no hipotálamo (31%), e cerebelo (40%). A atividade da glutathione peroxidase (GSH-PX) teve uma diminuição significativa no hipotálamo (45%), cerebelo (31,3%) e hipocampo (30%) (FREITAS et al., 2001). A GSH-PX remove o H_2O_2 por acoplar a sua redução a H_2O com oxidação da glutathione reduzida, GSH, um tiol contendo um tripeptídeo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre a formação do H_2O_2 , via dismutação do ânion superóxido pela SOD, e a remoção pela CAT e GSH-Px (FREEMAN CRAPO, 1982). Um aumento da atividade da SOD com redução da atividade da CAT e GSH-Px é prejudicial aos tecidos, devido ao acúmulo de H_2O_2 .

Existe a possibilidade da H_2O_2 ser um mensageiro secundário na ativação do NF- κ B e este modular a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo como a ciclooxigenase II (COX-II), óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e Mn- superóxido dismutase (Mn-SOD) nos neurônios (MATTSON et al., 2000).

Em outro modelo, com o objetivo de determinar se o estresse oxidativo moderado aumentava a degradação de proteínas no músculo esquelético na caquexia induzida pelo câncer, foi avaliada a oxidação de lipídeos (MDA), como indicativo de lipoperoxidação. Os autores utilizaram também métodos para avaliar o aumento expressivo da maioria dos componentes da via Ub-proteassoma. Culturas de células (C2C12) submetidas ao estresse oxidativo demonstraram um aumento da expressão da maioria dos componentes da via proteolítica Ub-proteassoma, indicando a degradação protéica através da ativação deste sistema e significativo aumento dos níveis de MDA, confirmando a lipoperoxidação (GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002). No estudo *in vivo* desse mesmo trabalho, o músculo gastrocnêmio de ratos caquéticos, mostraram níveis aumentados de MDA, sinalizando que a depleção do músculo que ocorre na caquexia provocada pelo câncer estaria associada com o estresse oxidativo. Observou-se também um aumento da expressão da p42, uma ATPase da subunidade do complexo regulador 19S, que promove uma associação dependente de ATP do proteassoma 20S com o regulador 19S, formando o proteassoma 26S. O estresse oxidativo causou além do aumento da expressão e atividade do proteassoma 20S, um aumento da expressão da enzima E2, conjugadora de ubiquitina.

1.4 ANTI-OXIDANTES

Halliwell e Gutteridge (2007) definem os anti-oxidantes como alguma substância que adia, previne ou remove o dano oxidativo direcionado a uma molécula alvo. Os anti-oxidantes podem agir nos diferentes estágios da seqüência oxidativa como:

- a) removendo oxigênio ou diminuindo a sua concentração no local;
- b) removendo íons metais;
- c) removendo espécies reativas de oxigênio como $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 ;
- d) capturando radicais livres iniciadores como hidroxil, alcoxil, e peroxil;
- e) quebrando a cadeia da seqüência inicial
- f) scavenger do oxigênio singlet .

Além disso os anti-oxidantes também inibem a peroxidação pelos mecanismos *a*, *b*, *d* e *f*, podendo ser chamados de anti-oxidantes preventivos. Os anti-oxidantes que agem pelo mecanismo *c* são também preventivos, mas pelo fato deles serem enzimas (CAT, SOD e GSH-Px), não são consumidos na reação. Anti-oxidantes que quebram a cadeia,

scavengers de oxigênio singlet e queladores de metais são consumidos enquanto desempenham suas funções protetoras ao mesmo tempo que muitos outros anti-oxidantes são capazes de exercer múltiplos mecanismos de ação (GUTTERIDGE, 1995).

1.4.1 Anti-oxidantes Celulares

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes oxido-redutores e o sistema anti-oxidante. O balanço não é perfeito, tanto que as defesas anti-oxidantes controlam os níveis de radicais livres eliminando-os. As EROs são geradas endógenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂. Radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), produtos derivados do peróxido de hidrogênio são exemplos de espécies EROs que são formadas durante esse processo que normalmente ocorre na mitocôndria. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Para proteger-se a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta é constituída por GSH, SOD, CAT, GSH-Px e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os principais anti-oxidantes intracelulares e suas respectivas funções são representados na tabela 1.

Tabela 1 – Anti-oxidantes intracelulares

Superóxido dismutases (cobre, zinco, manganês) *	Remove o $\bullet\text{O}_2^-$ por via catalítica
CAT; contêm 4 moléculas de NADPH (Fe)	Remove o H_2O_2 quando presente em altas concentrações
GSH-Px (Se)	Remove H_2O_2 quando presente em baixas concentrações; pode remover hidroperóxidos orgânicos
Prevenção da formação de $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$ pelo citocromo oxidase (Cu)	Nenhuma liberação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do $\bullet\text{O}_2^-$ a H_2O

* Símbolos em parênteses representam os metais envolvidos no centro ativo.

Fonte: GUTTERIDGE (1995, p. 1825)

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que a SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Enzimas como a SOD promovem mais rapidamente a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ em H_2O_2 do que enzimas não catalíticas. O H_2O_2 formado pela reação de dismutação pode ser destruído por duas enzimas, CAT e GSH-Px. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE, 1995).

A CAT é uma enzima fundamental para a remoção do H_2O_2 nos peroxissomos, enquanto que na mitocôndria, usualmente falta CAT, com exceção das mitocôndrias do coração de ratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

GSH-Px além de remover H_2O_2 formado depois da reação de dismutação catalisada por SOD também detoxifica hidroperóxidos lipídicos, demonstrando superior eficiência como anti-oxidante na proteção contra o dano oxidativo, atribuída pelo fato de estar localizada tanto no citosol como na matriz mitocôndrial, e que pode utilizar peróxidos lipídicos tão bem como o H_2O_2 como substrato (SHIOMI et al., 2004).

1.4.2 Anti-oxidantes de Membranas

A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante anti-oxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O β -caroteno interage com os radicais livres solúveis em lipídios e contendo o oxigênio singlet especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 , enquanto a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE, 1995). A vitamina C, ou ascorbato, é um anti-oxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as EROs, No entanto pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando a lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Outros anti-oxidantes de membrana importantes são a coenzima Q e a própria estrutura de organização dos fosfolipídios de membrana. A coenzima Q é essencial no transporte de elétrons mitocondrial sofrendo oxidação e redução via um intermediário de radical livre e é encontrada na membrana celular e em lipoproteínas (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

1.4.3 Anti-oxidantes Extracelulares

Os anti-oxidantes nos fluidos extracelulares ajudam a proteger o dano por radicais livres nas superfícies celulares com a qual eles estão em contato, constituindo a fase aquosa dos fluidos ou fazendo parte da fase lipídica dos fluidos. Os fluidos extracelulares contêm baixos níveis das enzimas descritas como anti-oxidantes intracelulares no geral, com algumas exceções. Os principais anti-oxidantes extracelulares são: transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, eritrócitos (capturam o $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 principalmente através do metabolismo da SOD/CAT/GSH-Px), albumina, haptoglobina, hemopexina, urato, α -tocoferol, glicose e bilirrubina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

1.4.4 Anti-oxidantes de Baixa Massa Molecular

Muitas moléculas pequenas são vistas como importantes anti-oxidantes. Algumas são produzidas *in vivo* e outras obtidas da dieta. Considerando inicialmente os produzidos *in vivo* temos a GSH e outros tiols, taurina e hipotaurina, poliaminas, plasmalogens que são encontrados em níveis significantes nas hemáceas, coração, sêmem e tecido nervoso, como anti-oxidantes de membrana, além da coelentarazina e coelentaraina, e os produtos derivados do triptofano. Outros anti-oxidantes de baixa massa molecular incluem a bilirrubina, α -cetoácidos, melatonina, ácido lipóico, coenzima Q, ácido úrico, dipeptídeos contendo histidina e melanina. Os principais constituintes da dieta que são sugeridos como anti-oxidantes de baixa massa molecular são a vitamina C e a vitamina E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

1.5 MIOCÁRDIO

O miocárdio, composto principalmente de um conjunto de células musculares especializadas denominadas miócitos cardíacos, é fundamental para a função cardíaca. Tais células estão dispostas em sua maioria em uma orientação circular e espiral ao redor do ventrículo esquerdo. Os miócitos cardíacos têm cinco componentes principais: membrana celular (sarcolema) e túbulos T, para a condução dos impulsos; retículo sarcoplasmático, um reservatório de Ca^{2+} necessário para a contração; elementos contráteis; mitocôndrias e núcleo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os miócitos compreendem apenas cerca de 25% do número total de células do coração. Contudo, pelo fato dos miócitos cardíacos serem muito maiores que as demais células presentes no órgão, eles são responsáveis por mais de 90% do volume do miocárdio. As células restantes consistem em células endoteliais, na maioria das vezes associadas à rica rede capilar miocárdica, e os fibroblastos. No miocárdio normal, as células da inflamação são raras e o colágeno é escasso (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005)

O músculo cardíaco, como o músculo esquelético, usa energia química para permitir o trabalho de contração. Essa energia é derivada, principalmente, do metabolismo oxidativo dos ácidos graxos e, em menor grau, de outros nutrientes, especialmente lactato e

glicose. Portanto, o consumo de oxigênio pelo coração é uma excelente medida da energia química liberada enquanto o coração desempenha o seu trabalho (GUYTON; HALL, 2002).

1.5.1 O Miocárdio e o Estresse Oxidativo

As células do músculo cardíaco contêm muito mais mitocôndrias entre as miofibrilas (23%) do que as células do músculo esquelético (2%), e estas contribuem com uma grande proporção da produção de H_2O_2 por grama de tecido, que refletem a dependência quase completa do músculo cardíaco para com o metabolismo aeróbio (SCHOEN, 2005). As conseqüências de elevadas concentrações mitocondriais de H_2O_2 são a peroxidação lipídica, o rompimento da homeostase do Ca^{2+} , inativação dos carreadores da cadeia respiratória e outras enzimas mitocondriais, e o desacoplamento da respiração (RADI; BUSH; FREEMAN, 1993).

As mitocôndrias do coração apresentam-se resistentes ao dano oxidativo pelas defesas anti-oxidantes, incluindo Mn -SOD, GSH-Px, e CAT, sendo essas as primeiras linhas de defesa contra o mecanismo das EROs que provocam a lesão cardíaca. Entre esses anti-oxidantes GSH-Px é a enzima mais importante, que executa muitas funções vitais. GSH-Px não funciona somente removendo H_2O_2 formado depois da reação de dismutação catalisada por SOD, mas também detoxificando hidroperóxidos lipídicos. A peroxidação lipídica das membranas biológicas ocorre secundariamente ao excesso de produção de H_2O_2 que pode levar ao dano celular (RADI; BUSH; FREEMAN 1993; TOUSSAINT; HOUBION; REMACLE, 1993). Em muitos estudos *in vitro*, GSH-Px demonstrou conferir maior proteção contra o dano oxidativo do que SOD, CAT, ou combinação da SOD e CAT (TOUSSAINT; HOUBION; REMACLE 1993).

As formas mais importantes de EROs no sistema cardiovascular incluem $\bullet O_2^-$; H_2O_2 , $\bullet OH$ e NO, que são produzidos pelos sistemas enzimáticos NADPH oxidase (produz $\bullet O_2^-$), xantina oxidase ($\bullet O_2^-$ e H_2O_2) e NOS ($\bullet O_2^-$ e ONOO \cdot) (MOLAVI; MEHTA, 2004).

O aumento das EROs pode estar associado com o dano e disfunção do DNA mitocondrial (mtDNA). As EROs levam a uma progressiva destruição do mtDNA, e tal dano ao mtDNA pode levar a um declínio da transcrição do mtRNA e perda da sua função, na qual é importante no desenvolvimento da remodelação e falência do miocárdio (IDE et al., 2000; IDE et al., 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado o aumento da geração de EROs em doenças como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), choque e diabetes. Além disso, o estresse oxidativo também está envolvido na disfunção endotelial associada com essas patologias (HEISTAD, 2006).

Concentrações plasmáticas de produtos da peroxidação lipídica foram encontradas elevadas em pacientes com DPOC e ICC (RAHMAN et al., 1996; KEITH et al., 1998). Keith et al. (1998), em um estudo com 50 pacientes com ICC, demonstraram um aumento nos níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos, MDA e nos receptores do TNF- α , com diminuição da GSH-Px e vitamina C. Ide et al. (2000) observaram o aumento na produção de $\bullet\text{OH}$ como um produto reativo de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 em homogenatos de tecido cardíaco na indução da falência cardíaca em cachorros. Esse aumento de EROs acompanhou a disfunção contrátil no ventrículo esquerdo. A hipertrofia ventricular esquerda e a disfunção após infarto do miocárdio está associada com o aumento da produção de EROs e a depressão das defesas anti-oxidantes, sugerindo que o estresse oxidativo deva contribuir para a remodelação ventricular e o desenvolvimento da hipertrofia ventricular e ICC (GIORDANO, 2005).

Flaherty e Zweir (1991) encontraram que as EROs desempenham uma função importante no dano por reperfusão, baseando-se nos efeitos benéficos que os *scavengers* de radicais livres administrados exogenamente demonstraram e também da observação da geração de radicais livres após 60 segundos de isquemia e reperfusão, resultados obtidos do coração de coelho perfundido.

Shen et al. (2004) relataram o dano mitocondrial cardíaco e a biogênese no modelo crônico de diabetes do tipo I em camundongos e propuseram que o estresse oxidativo, particularmente as EROs derivadas da mitocôndria estão envolvidas na cardiomiopatia diabética (SHEN et al., 2006). Esses autores mostraram que a redução do $\bullet\text{O}_2^-$ foi efetiva em proteger a mitocôndria e os cardiomiócitos na cardiomiopatia diabética, indicando que as EROs mitocondriais são essenciais para causar complicações no coração do diabético.

Limitações no suprimento de oxigênio estão associadas com a redução da atividade da SOD em tecidos como cérebro, pulmões e coração de mamíferos, embora essa mudança não seja encontrada no músculo esquelético. Além disso, miócitos obtidos de hipóxia crônica do miocárdio humano, em cultura a baixa tensão de oxigênio, demonstraram atividade de enzimas anti-oxidantes menor do que em miócitos em cultura com alta tensão de oxigênio. Em virtude disso, possivelmente em pacientes com doença obstrutiva pulmonária

crônica (DPOC) e ICC a hipóxia crônica deve resultar em redução das defesas anti-oxidantes com aumento das EROs (GOSKER et al., 2000).

Apesar de relatada a perda de massa do coração em ratos portadores do tumor (BARREIRO et al., 2005), até momento não foi evidenciada a implicação desta perda em termos oxidativos, em relação à resposta do coração à síndrome caquética induzida por câncer. Embora o grau de estresse oxidativo e a severidade do dano ao miocárdio dependam do desequilíbrio entre o excesso de produção de EROs e defesas anti-oxidantes (IDE et al., 2000), esta correlação ainda não foi relatada em literatura. A caquexia por si só leva a atrofia cardíaca com promoção de deterioração da função cardíaca (MORRINSON; EDWARDS, 1991). Segundo Kinugawa et al. (2000) e Siwik et al. (1999) o aumento na produção de EROs pode resultar em apoptose e fibrose intersticial, que deve contribuir para o desenvolvimento da depressão da função e progressão da falência cardíaca.

Tendo em vista o que foi exposto e o número reduzido de dados na literatura que apontem para um caminho ou uma conclusão consistente a respeito do real envolvimento do estresse oxidativo e do sistema anti-oxidante na perda de massa do miocárdio apresentada no quadro de caquexia, pelo tumor de Walker-256, torna-se justificável a realização deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações oxidativas ocorridas no músculo cardíaco de ratos Wistar com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os níveis dos principais parâmetros de avaliação de estresse oxidativo através do índice de estresse (IE), glutaciona total (GT), glutaciona oxidada (GSSG), da análise de produtos da ação direta dos EROs (lipoperóxidos), e anti-oxidantes (enzimas anti-oxidantes, SOD e CAT, e anti-oxidantes totais), ocorrido no músculo estriado cardíaco pela ação da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O uso de animais experimentais foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, no qual aprovou a realização desse trabalho.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos pesando entre (200-300g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com sepilho autoclavado, nas dimensões 16 x 34 x 40 cm em número não superior ao de quatro animais por gaiola. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada, sob ciclo de claro/escuro de 12 h, sendo alimentados *ad libitum* com água e alimento completo durante o experimento (Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR, Brasil).

3.2 REAGENTES

Para este estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

- 2,2-azo-bis-2-amidinopropano diidrocloreto (ABAP) (Aldrich);
- Albumina sérica bovina (Sigma);
- Azul de Tripán (Vetec Química Final);
- Éter etílico (Nuclear);
- 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) (Sigma);
- Reagente fenólico de Folin-Ciocalteus (Merck);
- Glutationa reduzida (Sigma);
- Glutationa redutase (Sigma);
- KCl (Reagen Quimibrás);
- KH₂PO₄ (Merck);
- KI (Reagen Quimibrás);
- Heparin[®] (heparina sódica 5000 UI, Cristália);

- H₂O₂ (Synth);
- H₂SO₄ (Quimex);
- Luminol (5-Amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinadiona, Sigma);
- N₂ (Air Liquide Brasil LTDA);
- NaCl (Reagen Quimibrás);
- Na₂CO₃ (Merck);
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Sigma);
- Na₂HPO₄ (Merck); NaH₂PO₄ (Merck);
- NaKC₄H₄O₆.H₂O (Sigma);
- NaNO₂ (Aldrich Chemical);
- NaOH (Merck); Pirogalol (Sigma);
- Terc-butil hidroperóxido (Sigma);
- Tris (Sigma); Trolox (Aldrich);
- 4-vinilpiridina (Sigma).

3.3 MANUTENÇÃO DO TUMOR DE WALKER-256

O tumor de Walker-256, um carcinossarcoma mamário de ocorrência espontânea em ratos Wistar, foi mantido em laboratório através de passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos. Previamente os ratos com as células do tumor ascítico eram anestesiados com éter etílico e cerca de 6 mL de 16,5mM, NaCl 137mM e KCl 2,7mM (PBS) pH 7,4 gelado heparinizado eram inoculados intraperitonealmente para a remoção do líquido ascítico. Após centrifugação a 545 g, durante 15 min e a 4°C, a fração composta por células tumorais era removida e adicionada à igual volume de PBS. A viabilidade celular era determinada em câmara de Neubauer, através do método de exclusão pelo azul de Tripán. Cerca de 2×10^6 células eram injetadas na cavidade abdominal de outro rato para a manutenção das células do tumor e 8×10^7 células eram injetadas subcutaneamente no flanco direito dos animais do grupo experimental.

3.4 MODELO EXPERIMENTAL DO TUMOR DE WALKER-256

Os animais foram divididos em grupos controle (PBS/ *ad libitum*), grupo 5 dias de tumor, 10 dias de tumor e 14 dias de tumor. Para o grupo controle foram inoculados 0,5mL de PBS no flanco posterior direito subcutâneamente e no décimo quarto dia após a inoculação do PBS, os animais foram pesados e sacrificados. Nos grupos experimentais 5 dias, 10 dias e 14 dias foram inoculadas subcutaneamente de $8,0 \times 10^7$ células tumorais em 0,5 mL PBS no flanco posterior direito e após o tempo determinado para cada grupo os animais foram pesados e sacrificados.

A decapitação foi feita sob anestesia geral inalatória prévia com éter etílico, para todos os grupos de animais.

Para cada determinação foram utilizadas amostras de cinco a onze ratos.

3.5 TECIDOS UTILIZADOS

O coração de todos os grupos de animais, 5 dias, 10 dias, 14 dias e controle, foram retirados, pesados, separados em partes e estocados em nitrogênio líquido. O músculo gastrocnêmico esquerdo de todos os grupos de animais também foi retirado e pesado para a realização do cálculo da caquexia. O tumor dos grupos de animais experimentais, tumor 5 dias, tumor 10 dias e tumor 14 dias foram dissecados cuidadosamente para pesagem e realização do cálculo da caquexia. Após esses procedimentos o músculo gastrocnêmio e o tumor foram descartados.

3.5.1 Preparo do Músculo Cardíaco

Para cada determinação uma parte do miocárdio foi retirado do nitrogênio líquido, pesado e levado à homogeneização em gelo 5x 30s/45s, em homogeneizador Ultra-Turrax, em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ em KCl 120mM, pH 7,4. Para as técnicas de GT,

GSSG, IE e quimiluminescência (QL) o homogenato foi preparado na concentração de 10mg/mL, enquanto que para as técnicas de potencial anti-oxidante total (TRAP), SOD e CAT o homogenato do coração preparado e utilizado foi de 50mg/mL.

A quantificação de proteínas com uma padrão de albumina bovina foi realizada nos homogenatos para a realização das técnicas de SOD, CAT e sistema glutatona.

3.6 DETERMINAÇÃO DO ESTADO CAQUÉTICO

A determinação da caquexia foi feita de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \textit{perda de massa corpórea} = \frac{[mi - mf + (mt) + gmc]}{(mf + gmc)} \times 100$$

onde :

mi - massa inicial do animal com tumor;

mf - massa final do animal com tumor;

mt - massa do tumor;

gmc - ganho de massa do animal controle.

Para este cálculo, foi utilizada a média do ganho de massa corpórea (GMC) obtida através do acompanhamento da ingestão alimentar apresentada pelos animais do grupo controle PBS / *ad libitum* durante 14 dias. Os animais foram considerados caquéticos quando a porcentagem de perda de massa corpórea foi maior que 10%.

A perda de massa muscular (%) e a perda de massa do miocárdio (%) foram calculadas usando os valores de massa dos músculos gastrocnêmios e do miocárdio respectivamente, em relação à média apresentada dos respectivos músculos dos animais do grupo controle PBS / *ad libitum*.

3.7 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS

Todos os homogenatos preparados a partir dos músculos cardíacos dos 4 grupos de animais foram submetidos às seguintes técnicas:

3.7.1 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas dos homogenatos foi determinada, utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY et al., 1951; MILLER, 1959).

3.7.2 Quimiluminescência (QL) Induzida por Tert-butil Hidroperóxido

Para avaliar o grau de estresse oxidativo prévio foi utilizado o método de QL induzida por tert-butil hidroperóxido (FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Os homogenatos totais dos miocárdios (10mg/mL) controle, 5, 10, 14 dias após a inoculação do tumor foram utilizados no ensaio. A QL estimulada por *t*-butil hidroperóxido foi aferida em um luminômetro TD 20/20 (Turner Designs), que possui comprimento de onda de reposta de 300-650nm, a 28°C, em ambiente de baixa luminosidade, durante 40 minutos. Os resultados das curvas finais foram expressos em Unidades Relativas de Luz (URL) /g de tecido.

3.7.3 Determinação da Capacidade Anti-oxidante Total (TRAP) por Quimiluminescência

A técnica do TRAP (REPETTO et al., 1996) mede os níveis de anti-oxidantes totais de um tecido, principalmente anti-oxidantes de baixa massa molecular. Neste método, o 2,2- azo-bis (2-amidinopropano diidroclorido) (ABAP), um sistema

gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em um luminômetro. A reação é inibida por análogos da vitamina E e outros anti-oxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis.

A adição 70 μL de homogenato 50mg/mL do miocárdio também diminuiu a quimiluminescência a níveis basais (tempo de indução, T_i) proporcionalmente a concentração de anti-oxidantes até radicais de luminol serem gerados.

O sistema foi calibrado com um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox). Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e homogenato permitiu obter valores de TRAP com uma concentração relativa a concentração do Trolox (Figura 4).

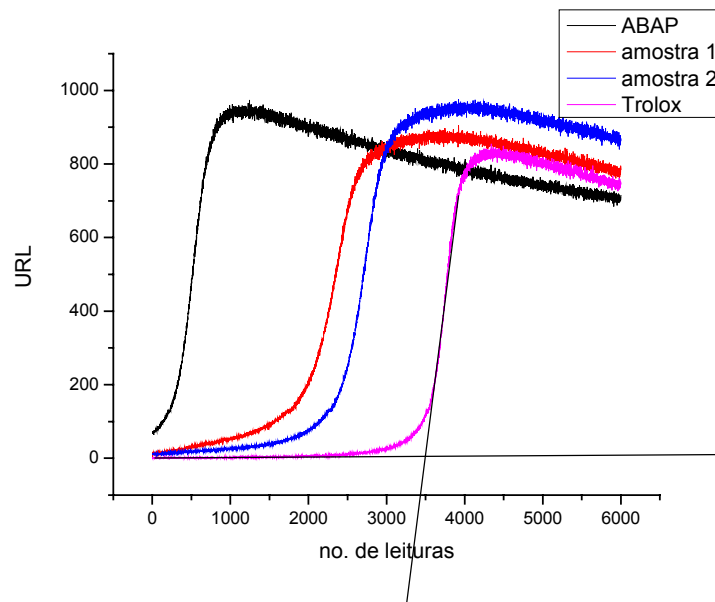


Figura 4 – Gráfico representativo do TRAP, mostrando a emissão de fótons pelo nº de leituras . A interseção das retas representa a fase de indução da reação.

Para obtenção do resultado a seguinte equação foi usada:

$$TRAP (\mu\text{M Trolox}) = D \times T_{amostra} / T_{Trolox}$$

onde:

D - é uma fator de diluição;

$T_{amostra}$ - é o tempo de indução da amostra;

T_{Trolox} - é o tempo de indução provocado pela adição 1 μM de Trolox.

3.7.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por MARKLUND e MARKLUND (1974), baseado na inibição da autooxidação do pirogalol em solução aquosa. A SOD inibe a autooxidação do pirogalol por catalisar a dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 . Esta oxidação pode ser acompanhada pelo aparecimento de cor amarela no meio de reação, monitorada a 420 nm por cinco minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol é definida como uma unidade de atividade enzimática (U).

Foram usados os sobrenadantes obtidos da centrifugação a 10500 g, 4°C por 15 minutos do homogenato de 50mg/mL dos músculos cardíacos.

Os resultados foram expressos por USOD/mg proteína.

3.7.5 Atividade da Catalase

A determinação da atividade da catalase foi realizada conforme COHEN et al. (1970) e AEBI (1984). A decomposição do H_2O_2 está relacionada diretamente com a queda da absorbância a 240 nm.

Foram usados os sobrenadantes obtidos da centrifugação a 10500 g 4°C por 15 minutos do homogenato de 50mg/mL dos músculos cardíacos.

Os resultados foram expressos em absorbância/mg proteína/minuto.

3.7.6 Determinação de Glutathiona Total

A determinação dos níveis de GT da amostra foi realizada espectrofotometricamente, à temperatura ambiente, conforme o método descrito por Tietze (1969). Após a obtenção do sobrenadante de centrifugação a 10500 g, 4°C por 15 minutos do homogenato de 10mg/mL dos músculos cardíacos dos diferentes compartimentos, entre os

diferentes grupos, os níveis de GT foram determinados pela tritiação com 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) durante cinco minutos.

Para a obtenção da curva padrão de glutathiona realizou-se o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra por 5 µl da solução padrão de GSSG 6,6mM diluída 1:30, chegando a uma concentração final de 0,22 mM.

Com a diferença da densidade óptica do quinto e primeiro minuto, calculou-se o nível de GT das amostras correlacionando absorvância do padrão com amostra segundo a fórmula abaixo:

$$C.A = [(D.O \text{ amostra} \times \text{Concentração padrão} / D.O \text{ padrão}) / 40] / \text{Concentração de proteína} \times 10^3$$

Onde:

C.A: Concentração da amostra

D.O: Densidade óptica

Os resultados foram expressos em µM/mg proteína.

3.7.7 Determinação de Glutathiona Oxidada

A GSSG foi determinada do sobrenadante previamente incubado com 4-vinilpiridina (4-VP) por 60 minutos, em temperatura ambiente, e centrifugado por 15 minutos a 10500 g a 4°C. O 4-VP reage com o glutathiona reduzida (GSH) formando um composto estável e irreversível. A determinação e o cálculo da concentração de GSSG foram realizados da mesma forma como para GT. Os resultados foram expressos em µM/mg de proteínas.

O Índice de Estresse (IE), que representa a relação entre os níveis de GSSH e GT e também o estado oxidativo celular, foi calculado pela equação a seguir:

$$IE = [(GSSG/GT - GSSG)]$$

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados representam a média e erro padrão da média de 6 a 11 animais por grupo. A análise de significância foi realizada por teste *t* de Student para dados não-pareados. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para os resultados de quimiluminescência estimulada por tert-butil a análise foi avaliada por two-way ANOVA. O programa Origin 6.0 e GraphPad Prisma 4 foram utilizados para as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA

Para demonstrar que o tumor de Walker-256 leva ao desenvolvimento da caquexia foram avaliados os parâmetros de ingestão alimentar e perda de massa muscular.

A figura 5 mostra a comparação do consumo de alimento do grupo de animais controle, tumor 5 dias, tumor 10 dias e tumor 14 dias. Percebe-se que houve diferença significativa, com $p < 0,05$, na quantidade de alimento ingerida (em gramas) entre o grupo de animais, com 10 dias ($18,55 \pm 0,82$) e 14 dias ($17,55 \pm 0,77$) de tumor comparado ao grupo controle ($21,72 \pm 0,32$). Também observou-se uma diferença significativa na ingestão de alimento entre o grupo 5 dias ($20,72 \pm 0,66$) e 14 dias de tumor.

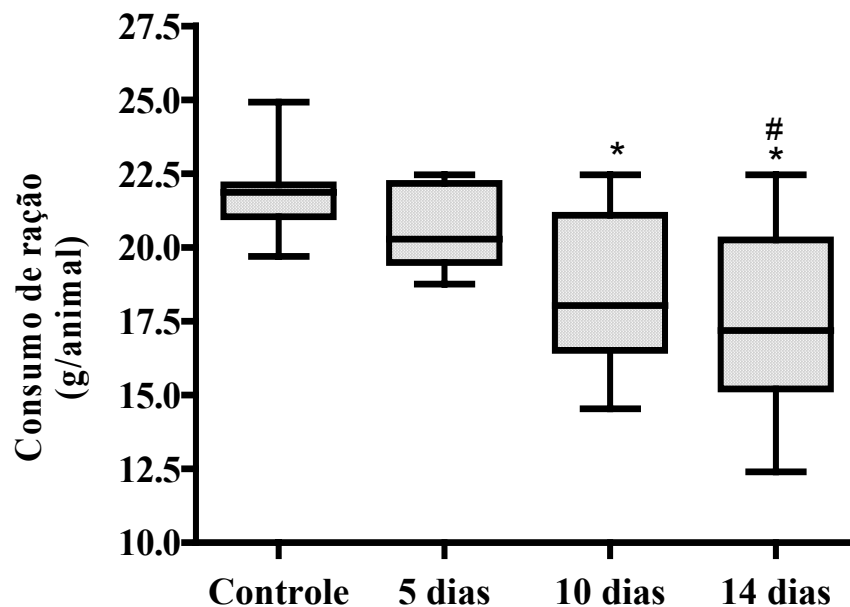


Figura 5 – Ingestão alimentar diária do grupo controle PBS/ *ad libitum* e do grupo de ratos com tumor Walker-256 observada em 5 dias, 10 dias e 14 dias. Os resultados são apresentados pelas médias da ingestão dos animais nos grupos. * $p < 0,05$ para comparação com o grupo controle; # $p < 0,05$ para comparação com o grupo 5 dias.

Para confirmar se os animais, nos quais foram implantadas as células para o desenvolvimento do tumor sólido, apresentaram perda de massa muscular e perda de massa

corpórea, e confirmar a caquexia, os pesos dos músculos gastrocnêmio (músculo padrão para avaliação de perda de massa), e os pesos do miocárdio, foram comparados com a massa muscular dos respectivos controles PBS/*ad libitum* (Tabela 2).

Tabela 2 – Perda progressiva de massa corporal e muscular na caquexia induzida pelo Tumor Walker-256

	<i>Dia 5</i>	<i>Dia 10</i>	<i>Dia 14</i>
<i>Perda de massa corpórea (% das médias)*</i>	6,04	15,18	20,76
<i>Perda de massa muscular gastrocnêmio (% das médias)</i>	20,9	26,6	36,0
<i>Perda de massa miocárdio (% das médias)</i>	8,3	10,8	16,8

* Porcentagens de perda comparadas ao controle (100%). Os grupos representam os números de dias após a injeção subcutânea 8.0×10^7 células do tumor.

No músculo gastrocnêmio a ação do tumor é bastante evidenciada, pois houve uma elevada perda de massa (20,9%) a partir do 5º dia, enquanto que no miocárdio a perda de massa é menor. Pela perda de massa corpórea a caquexia foi estabelecida no grupo 10 dias (>10%).

4.2 Estresse Oxidativo No Miocárdio

A figura 6 ilustra a QL estimulada por tert-butil hidroperóxido emitida pelos grupos experimentais, refletindo os níveis de hidroperóxidos lipídicos formados durante as lesões peroxidativas no miocárdio. As curvas 10 e 14 dias de tumor são significativamente menores em relação ao grupo de animais controle e 5 dias de tumor ($p < 0,05$). Além disso, a comparação entre o grupo tumor 10 e 14 dias também mostrou significativa com um $p < 0,05$.

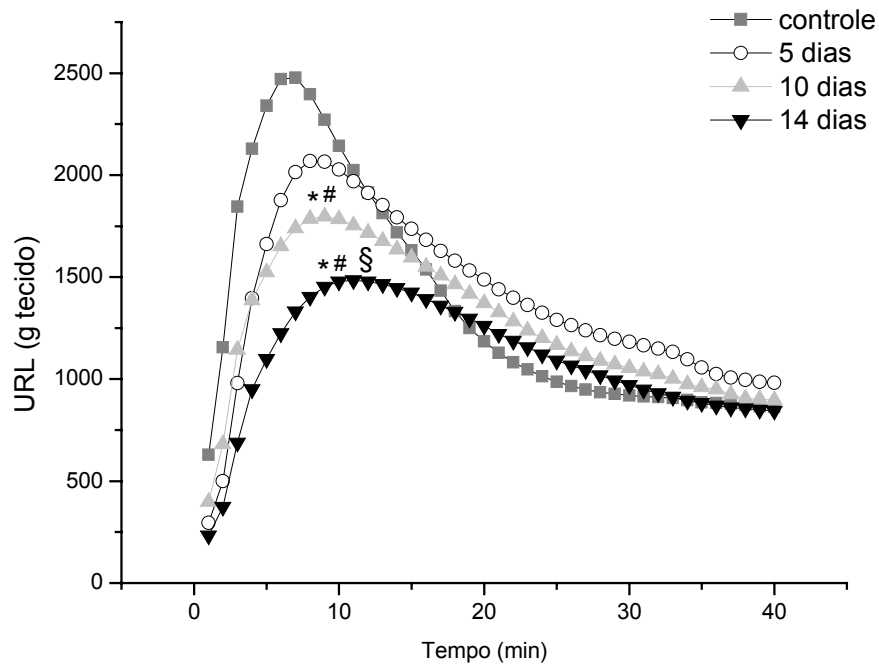


Figura 6 – Efeito da caquexia no miocárdio de ratos na avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido. Os dados representam as médias de 40 pontos extraídos da curva original e a comparação foi feita pelo teste ANOVA onde $p < 0.05$ (* quando comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo 5 dias e § comparado ao grupo 10 dias).

Os níveis de TRAP (figura 7) foram significativamente elevados nos animais com 10 ($2,29 \pm 0,14 \mu\text{M Trolox}$) e 14 dias ($2,07 \pm 0,11 \mu\text{M Trolox}$) de tumor em relação aos animais controle ($1,13 \pm 0,04 \mu\text{M Trolox}$) e 5 dias ($1,37 \pm 0,12 \mu\text{M Trolox}$) com $p < 0,05$.

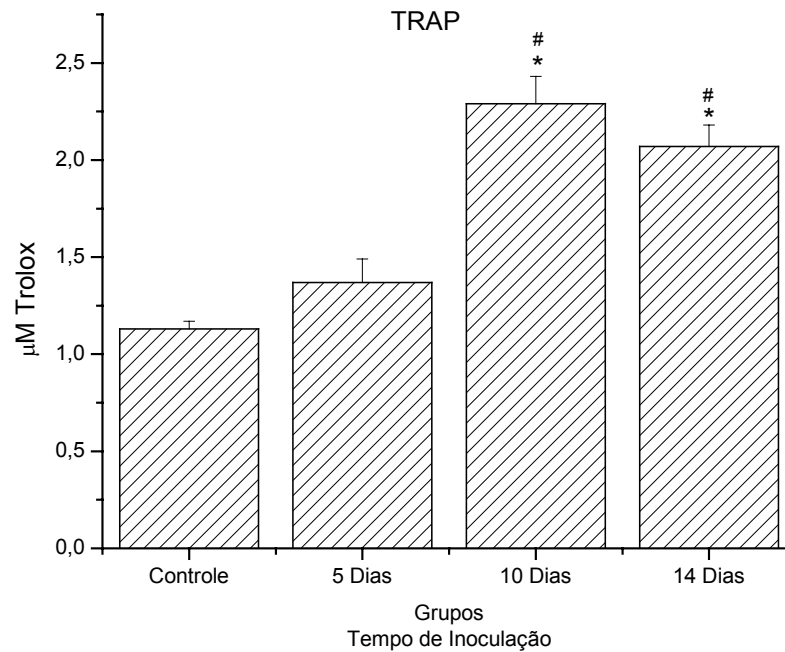


Figura 7 – Capacidade anti-oxidante total dos homogenatos do miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256. Esses resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo teste-t (duas populações) são: * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$, comparado ao grupo 5 dias de tumor.

A avaliação da atividade da SOD demonstrou-se significativamente elevada ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($5,11 \pm 0,28$ USOD/mg proteína⁻¹.min⁻¹) em todos os grupos com o tumor: 5 dias ($6,61 \pm 0,22$ USOD/mg proteína⁻¹.min⁻¹), tumor 10 dias ($6,94 \pm 0,41$ USOD/mg proteína⁻¹.min⁻¹) e tumor 14 dias ($6,02 \pm 0,3$ USOD/mg proteína⁻¹.min⁻¹). Não foi observada diferença significativa entre os diferentes tempos de inoculação do tumor (Figura 8).

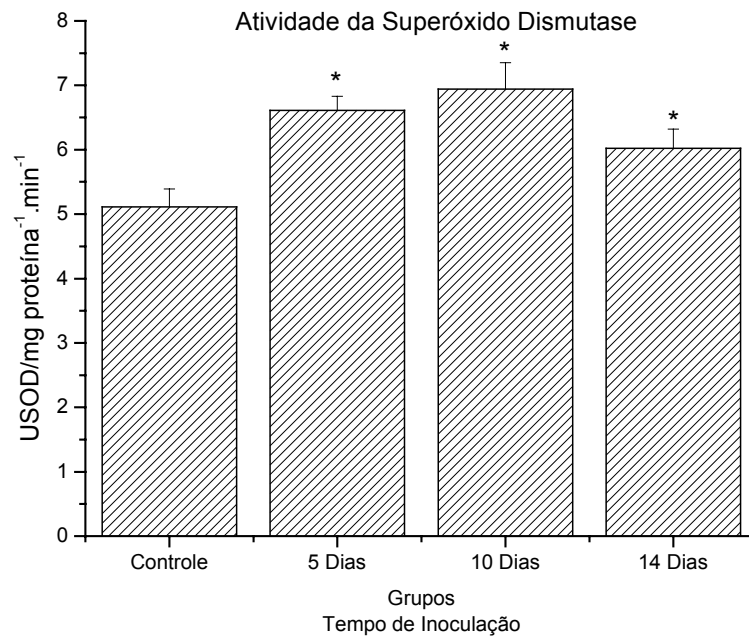


Figura 8 – Atividade da SOD nos sobrenadantes de miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256. Esses resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo teste-t (duas populações) são: * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle.

A atividade da CAT diminuiu significativamente ($p < 0,05$) no grupo 5 dias de tumor ($0,341 \pm 0,009$ absorvância/mg proteína⁻¹.min⁻¹) em relação ao grupo controle ($0,392 \pm 0,008$ absorvância/mg proteína⁻¹.min⁻¹), enquanto que nos grupos 10 dias ($0,601 \pm 0,04$ absorvância/mg proteína⁻¹.min⁻¹) e 14 dias ($0,559 \pm 0,02$ absorvância/mg proteína⁻¹.min⁻¹) de tumor se elevou significativamente ($p < 0,05$) (Figura 9). Quando comparada a atividade da CAT entre o grupo 5 dias e o grupo 10 dias de tumor, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) e o mesmo aconteceu também comparando o grupo 5 dias e 14 dias. Contudo entre o grupo 10 dias e 14 dias não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 9).

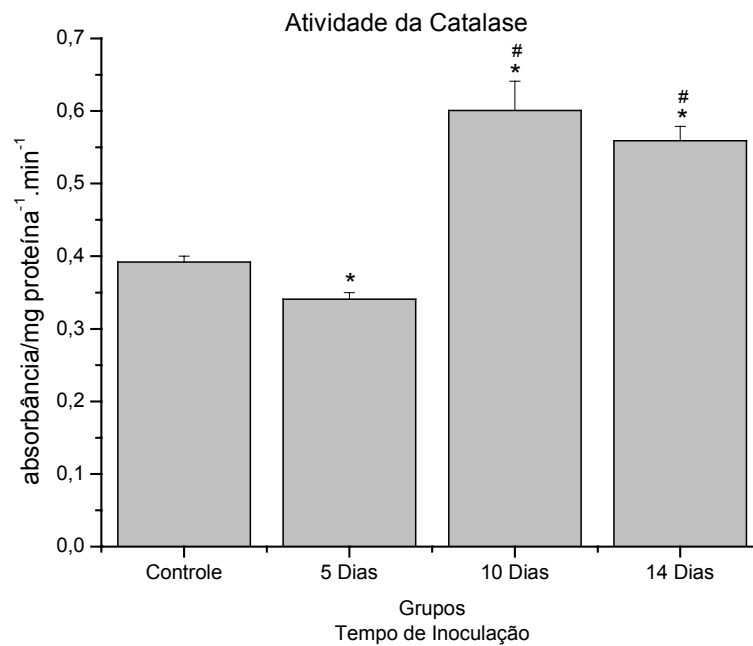


Figura 9 – Atividade da catalase nos sobrenadantes de miocárdio de ratos inoculados com células do tumor Walker-256. Esses resultados representam a média \pm erro padrão. Valores de p foram determinados pelo teste-t (duas populações) são: * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$, comparado ao grupo 5 dias.

As médias dos níveis de GT, GSSG e IE estão apresentados na figura 10, e os resultados expressos nele mostram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da GT no 10º dia ($6,50 \pm 0,45 \mu\text{M}/\text{mg prot}$) e um aumento no 14º dia ($9,99 \pm 0,19 \mu\text{M}/\text{mg prot}$) de implantação do tumor comparados ao controle ($7,98 \pm 0,39 \mu\text{M}/\text{mg prot}$) e ao grupo 5 dias ($7,83 \pm 0,28 \mu\text{M}/\text{mg prot}$) respectivamente. Um aumento significativo, com $p < 0,05$, também foi demonstrado na comparação entre o 10º e 14º dia de tumor.

Para GSSG não houve alteração significativa da sua atividade em todos os grupos analisados. Enquanto que o IE elevou-se no 5º ($0,66 \pm 0,06$) e 10º dia ($0,78 \pm 0,10$) com relação ao grupo controle ($0,45 \pm 0,03$), mas apresentou queda significativa ($p < 0,05$) no 14º dia ($0,52 \pm 0,02$) em relação ao 10º dia.

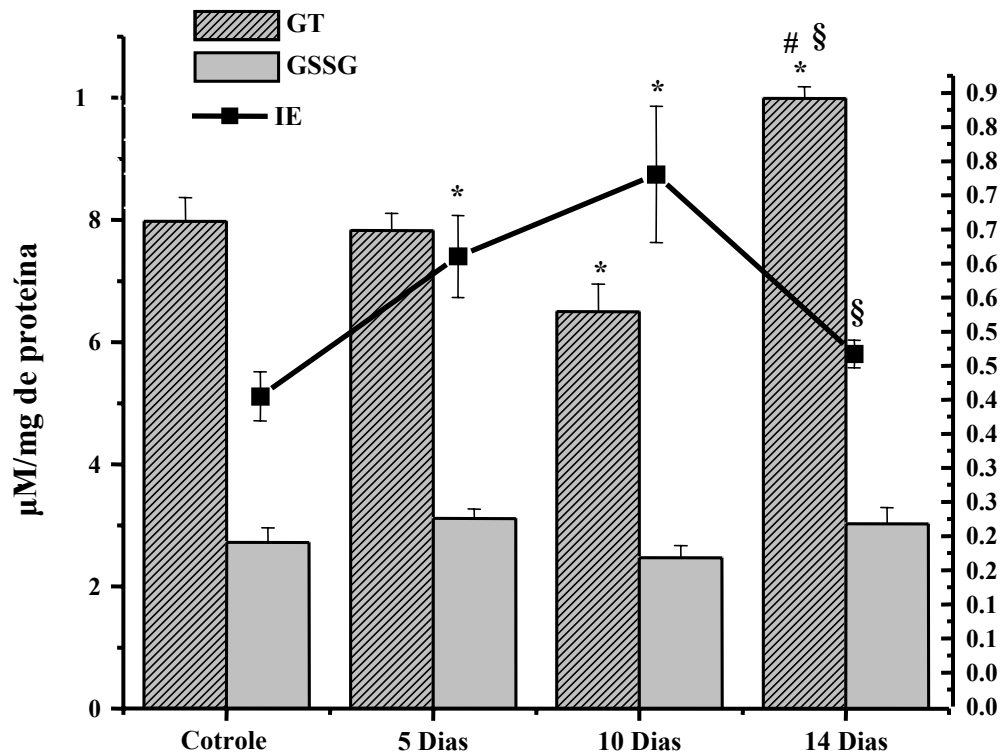


Figura 10 – Níveis de GT, GSSG e IE no miocárdio nos grupos controle, 5 dias, 10 dias e 14 dias de tumor . Valores de p foram determinados pelo teste-t (duas populações) $p < 0.05$, onde * comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo 5 dias; § comparado com o grupo 10 dias.

5 DISCUSSÃO

O estresse oxidativo se desenvolve em algumas condições nas quais oxidantes metabólitos (como radicais de oxigênio) podem exercer efeitos tóxicos por causa do aumento da produção ou mecanismo celular de proteção alterado. Os efeitos do estresse oxidativo podem ser evidenciados pelo acúmulo celular de peróxidos (como lipoperóxidos) ou por seus produtos, tais como dialdeído malônico, e pela glutathiona oxidada (CECONI et al., 2003). A atuação do estresse oxidativo no mecanismo de perda de massa do miocárdio foi investigada em ratos com a forma sólida do tumor de Walker-256, que cresce exponencialmente durante 14 dias e induz a caquexia. Em ratos inoculados com células do tumor de Walker-256, o tumor cresce sem causar aparentes distúrbios fisiológicos por certo período de tempo (usualmente perto de 5-8 dias), no qual é repentinamente interrompido pela iniciação do período de crescimento rápido e marcada mudança metabólica no hospedeiro (BONATTO et al., 2004).

Foram avaliados três tempos experimentais depois da inoculação do tumor, em relação ao estresse oxidativo e os anti-oxidantes, além da avaliação de perda de massa muscular do coração e do músculo gastrocnêmio, e controle de ingestão alimentar. Os animais com tumor, nesse estudo, apresentaram ingestão diferente do grupo controle somente a partir do 10º dia (Figura 5), com queda no consumo de alimento. Estudo feito por Lima et al. (2005) usando o mesmo modelo de indução da caquexia em ratos Wistar mostrou diminuição da ingestão alimentar devido ao crescimento tumoral, iniciando-se por volta do 4º dia após a inoculação das células, e chegando a uma diminuição de 35% no 14º dia em relação ao grupo controle. Em nosso estudo o grupo 5 dias de tumor não foi vista diminuição de ingestão, entretanto apenas a partir do grupo 10 dias de inoculação a ingestão foi 14,6% menor do que no grupo controle chegando a 19,2% no 14º dia, apesar da perda de peso não ser evidenciada em nenhum dos grupos. Essas diferenças observadas em um mesmo modelo de caquexia podem ser explicadas pela alteração das características de virulência das células tumorais, as quais podem levar o tumor a ser mais ou menos agressivo ao hospedeiro, ou por modificações da técnica de inoculação, ou ainda pelo estado basal do animal inoculado. A anorexia, que é comum em pacientes com câncer (GORDON; GREEN; GOGGIN, 2005), foi demonstrada menor neste trabalho em relação a outros trabalhos e mais pronunciada nos estágios finais do câncer, enquanto que observando o trabalho de Iamamoto (2007), nota-se que a diminuição da ingestão alimentar já foi evidente a partir do grupo 5 dias de tumor.

A perda de massa muscular foi evidenciada nos dois tecidos (gastrocnêmio e miocárdio), porém bem menos pronunciada no miocárdio. A perda de massa muscular do gastrocnêmio de até 35% já tinha sido demonstrada por Yamamoto (2007), sendo coerente devido ao aumento da lipoperoxidação medida por quimiluminescência no músculo gastrocnêmio a partir do 5º dia de inoculação do tumor (GUARNIER, 2006). No miocárdio a perda de massa chegou somente até 16,8% no grupo 14 dias de inoculação (Tabela 2). A oxidação pode alterar a estrutura e função dos lipídeos, proteínas, e ácidos nucleicos, levando ao dano celular e até morte celular (POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU, 2005). Os efeitos da peroxidação lipídica são diminuição da fluidez da membrana, facilitando as trocas entre cada lado da bicamada, o aumento das fendas de passagem para substâncias que normalmente não ultrapassam a membrana e necessitam de canais específicos (como o Ca^{2+}) e o dano a proteínas de membrana, inativando enzimas e canais iônicos (HALLIWELL, GUTTERIDGE 2007). A determinação de lipoperóxidos por quimiluminescência iniciada por tert-butil hidroperóxido parece ser um ensaio sensível que tem sido aplicado na detecção da existência de estresse oxidativo associado a situações patológicas experimentais como cardiotoxicidade pela adriamicina em ratos, camundongos e coelhos, e em camundongos com tumores (FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1990). O coração teve uma perda de massa muscular menor que o músculo gastrocnêmio desde os 5 dias de inoculação, sendo explicada pela capacidade deste músculo de gerar elevados níveis de anti-oxidantes (McDONOUGH, 1999) oferecendo uma certa proteção contra as EROs, como visto pelo aumento de todas as enzimas anti-oxidantes, e evitando o gasto energético, permitindo que este órgão fosse poupado de dano metabólico que o próprio tumor causa no hospedeiro. Ratos com o hepatoma de Yoshida também apresentaram diminuição da massa do miocárdio no sétimo dia após a inoculação (23,25%), enquanto que na musculatura esquelética o músculo tibial chegou a perder 31% (BARREIRO et al., 2005).

A célula normal está confinada pelos programas genéticos do seu metabolismo, diferenciação e especialização, a uma variação muito limitada de função e estrutura, pela repressão das células vizinhas e pela disponibilidade de substratos metabólicos. Entretanto ela é capaz de lidar com exigências fisiológicas normais, mantendo um estado de homeostasia. Estresses fisiológicos como os provocados pelo tumor podem desencadear um grande número de adaptações celulares fisiológicas e morfológicas durante as quais são alcançados novos estados de estabilidade, porém alterados, preservando a viabilidade da célula e modulando sua função conforme ela responde a tais estímulos (KUMAR;ABBAS;FAUSTO, 2005). A resposta adaptativa, neste caso pode consistir na

redução no tamanho e na função das células, levando a atrofia, refletida na perda de massa do miocárdio.

No trabalho de Evelson et al. (2001), os valores de TRAP de homogenatos do coração e rins de ratos hipertensos foram medidos para avaliar se o método do TRAP é satisfatório para a determinação da condição anti-oxidante dos tecidos em situações de estresse, e os valores foram comparados com a intensidade de luminescência obtida quando os homogenatos foram submetidos ao estresse oxidativo por tert-butil hidroperóxido. Para o coração, o modelo de hipertensão empregado induziu um aumento de 50% na quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido, indicativo de ocorrência de estresse oxidativo nesse órgão, e diminuição estatisticamente significativa na medida de TRAP, sugerindo que o aumento da susceptibilidade do tecido ao estresse oxidativo está correlacionado com a diminuição das defesas anti-oxidantes.

Existem evidências de que as EROs possam estar envolvidas em inúmeras patologias como doenças pulmonares, doença de Parkinson, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares como ICC, infarto agudo do miocárdio, hipertensão aterosclerose e ainda o evento do envelhecimento (RAHMAN et al., 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GIORDANO, 2005; ZHU et. Al, 2006; HWANG; KIM, 2007).

A produção de EROs em modelos *in vivo* tem sido demonstrada indiretamente em corações com hipóxia e isquemia, pela medida da GSSG e anti-oxidantes, e enzimas (CECONI et al., 2003). Ademais, Kinugawa (2000) observou no seu trabalho através de espectroscopia de ressonância eletrônica que os radicais $\bullet\text{OH}$ estavam aumentados no miocárdio de corações de camundongos após o infarto do miocárdio, o que conseqüentemente deveria envolver a remodelação do ventrículo esquerdo e a falência cardíaca.

Shen et al. (2004) encontraram que a quantidade de GSH na mitocôndria cardíaca de camundongos com diabetes do tipo 1, em relação a camundongos normais estava reduzida por volta de 33%. Nesse mesmo trabalho os autores afirmaram que a diminuição do conteúdo de GSH indica que as mitocôndrias diabéticas estão submetidas ao estresse oxidativo e estão menos protegidas do dano do que as mitocôndrias de indivíduos não diabéticos.

Avaliando o que aconteceu com o miocárdio na figura 6, em relação aos níveis de hidroperóxidos lipídicos, nota-se que o estresse oxidativo diminuiu significativamente a partir do 10º dia de inoculação do tumor, sendo acompanhado pelo aumento do TRAP (figura 7). Interessantemente o estresse sistêmico que ocorreu no sangue visto trabalho feito por Rottuno (2007) e que poderia induzir inicialmente o aumento da

produção de lipoperóxidos, como visto no músculo gastrocnêmio por Guarnier (2006), e que também já estava elevado devido a maior quantidade basal de mitocôndrias nesse tecido, é bloqueado parcialmente pelo aumento de anti-oxidantes (de baixo peso molecular) no miocárdio, evitando desse modo que o miocárdio sofra lesões celulares e grande perda de massa. Além disso, o sistema anti-oxidante deve interferir na ativação da proteólise dependente de Ca^{2+} , que faz parte da caquexia estimulada pelo tumor tanto na musculatura esquelética quanto no coração como demonstrado por Costelli et al. (2001), neutralizando as EROs. A diminuição da lipoperoxidação pode ser explicada por uma proteção do miocárdio como uma forma de preservação de energia (ATP) neste órgão, já que as alterações metabólicas que o tumor provoca no hospedeiro pela competição de nutrientes entre o tumor e o hospedeiro leva a uma aceleração do estado de fome promovendo distúrbios metabólicos severos (como alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas), incluindo hipermetabolismo, que leva a uma diminuição da eficiência energética em todo o organismo (ARGILES et al., 2005). Segundo Younes e Noguchi (2000) as alterações no metabolismo da glicose em pacientes com câncer é caracterizada pelo aumento da taxa de *turnover* da glicose de todo o organismo, diminuição da captura e utilização devido a resistência a insulina, e aumento da síntese de glicose hepática, ou neoglicogênese de substratos derivados da proteólise e da lipólise.

Evidências experimentais sugerem que as EROs desempenham uma função importante na patogênese da isquemia e reperfusão. Segundo Zimiani et al. (2005), a peroxidação lipídica representa um dos mais significativos processos que precedem a degeneração celular e necrose.

Os nossos resultados, de diminuição da formação de lipoperóxidos acompanhados do aumento de TRAP no miocárdio, contraria todos os trabalhos da literatura que avaliaram o dano das EROs em doenças cardiovasculares e na própria caquexia induzida pelo tumor em outros órgãos.

Suzukawa (2005) observou aumento nos níveis de lipoperóxidos a partir do grupo 5 dias de tumor com queda nos níveis do TRAP no fígado de ratos perfundidos. No músculo gastrocnêmio de ratos com o tumor de Walker-256, Guarnier (2006) observou aumento da lipoperoxidação em todos os tempos de inoculação do tumor, 5 dias, 10 dias e 14 dias, com níveis de TRAP diminuídos no 5 dias de inoculação, mas com um aumento nos 14 dias.

O músculo cardíaco de ratos possuem três enzimas anti-oxidantes chave, Mn-SOD, GSH-Px e CAT que decompõe eficientemente muitos $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 gerados na

mitocôndria, sendo que a CAT é removedora predominantemente de H_2O_2 (RADI; BUSH; FREEMAN, 1993). A SOD teve um aumento significativo desde o 5º dia de inoculação (Figura 8), sendo sua participação responsável por catalisar inicialmente a remoção do $\bullet O_2^-$ transformando-o em H_2O_2 (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). O aumento da CAT a partir do 10º dia (Figura 9) conferiu o papel de neutralizar o H_2O_2 formado pela SOD. Desse modo a célula do miocárdio pôde demonstrar-se resistente a lipoperoxidação provocada pelo H_2O_2 e $\bullet O_2^-$, por causa da sua propriedade estrutural no interior da membrana mitocondrial e a presença de um organizado sistema de reparação anti-oxidante (RADI; BUSH; FREEMAN, 1993).

Dell et al. (2008) encontraram que em corações infartados de camundongos C57BL/6 nocautes para SOD houve maior hipertrofia e fibrose do que em corações de camundongos selvagens, com diminuição da fração de ejeção no ventrículo esquerdo entre outros achados cardiovasculares. Além disso esses mesmos autores encontraram aumento no estresse oxidativo nesses camundongos nocautes.

A GSSG é produto do metabolismo de hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. A GSH é a chave molecular na homeostasia redox do corpo e o estresse oxidativo induz a transformação do GSH em GSSG pela ação da GSH-Px (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A razão GSH /GSSG foi quantificada no sangue de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich e no sangue de pacientes com câncer de mama e carcinoma de cólon em diferentes estágios e mostrou estar significativamente diminuída com a progressão da neoplasia (NAVARRO et al., 1999).

Na avaliação do sistema glutathiona (Figura 10) foi verificado aumento do IE a partir do 5º dia de inoculação do tumor com queda nos níveis de GT no 10º dia. Hodge et al. (1997) sugerem que o aumento intracelular do IE por oxidantes resulta na formação de adutos E1-SSG e E2-SSG (glutatiolação) e esta reação poderia levar a diminuição da atividade das E1 e E2 do sistema Ub-proteassoma. Esses autores usaram células de retina bovina, que tem um sistema ubiquitina ativo, para demonstrar que após a exposição a um agente oxidante, como o H_2O_2 , houve diminuição nos níveis de proteína-Ub endógena ou resintetizada. Isto foi devido à diminuição da capacidade de E1 e E2 formarem Ub tiol ésteres. A capacidade de formação de E1 e E2 formarem Ub tiol ésteres foi inversamente correlacionada com a IE. E1 foi S-tiolada após exposição ao H_2O_2 *in vivo*. A S tiolação de E1 e E2 inibiu a formação de seus respectivos tiol ésteres e a formação de E1 e E2 ubiquitina tiol éster foi restabelecida após a remoção do agente oxidante e/ou subsequente re-estabelecimento do IE. Possivelmente com o aumento da IE e conseqüentemente diminuição da GT, houve uma diminuição no nível

de proteólise, evidenciada pela diminuída perda de massa do miocárdio comparada com o músculo gastrocnêmio que sofre mais pelas ações oxidativas provocadas pelo tumor (GUARNIER, 2006), e esta proteólise provavelmente não foi maior pelo fato das duas enzimas anti-oxidantes SOD e CAT estarem aumentadas, além dos anti-oxidantes de baixa massa molecular, como demonstrado pelos níveis de TRAP.

O aumento do GT e queda no índice de estresse sem alteração na GSSG no 14º dia pode ser explicada pelo recrutamento de GSH sistêmico através do aumento da expressão do seu receptor de membrana celular na célula do miocárdio, gama-glutamil transferase (γ GGT). Esta enzima tem o seu sítio ativo para o lado de fora da membrana agindo no GSH extracelular para a transferência do resíduo de glutamato para outro aminoácido como a cistina, metionina e glutamina. O cisteína-glicina dipeptídeo pode então ser hidrolisado por dipeptidases na membrana plasmática, e ser capturada. Os γ -glutamil aminoácidos são então capturados e convertidos a 5-oxoprolina e então a glutamato, ou no caso a glutamato-cisteína, diretamente reciclado a GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Isso acontece com a mobilização da vitamina A do fígado para o coração no infarto agudo do miocárdio, que parece ser facilitada pelo sistema enzimático que hidroliza ésteres de vitamina A no fígado e está aumentado nesta patologia, levando há uma maior quantidade de vitamina A no miocárdio do que no plasma, mantendo as concentrações plasmáticas durante o estresse oxidativo e acumulando esse anti-oxidante no miocárdio para preservação deste órgão (PALACE et al., 1999).

Nesse modelo de avaliação do estresse oxidativo pela caquexia estimulada pelo tumor de Walker-256 notamos um perfil oxidativo diferente do observado no fígado (SUZUKAWA, 2005), músculo gastrocnêmio (GUARNIER, 2006) e hemáceas (ROTTUNO, 2007), com um predomínio do estresse oxidativo em todas as fases do tumor para os trabalhos anteriores. O resultado da QL demonstrou que esse tecido foi protegido da ação dos radicais livres, o que permitiu até mesmo diminuir os níveis de lipoperóxidos basais deste tecido. É evidente que existe uma proteção anti-oxidante e esta foi demonstrada claramente pelos níveis de TRAP, SOD, CAT e GT elevados. Estes resultados no miocárdio são observados pela primeira vez neste modelo, e contribuem com perspectivas interessantes para os estudos das alterações cardiovasculares, morfológicas e estruturais deste órgão, além de estimular o estudo promissor das vias proteolíticas, que é diferente para cada órgão na caquexia pelo câncer.

6 CONCLUSÕES

- No modelo experimental de caquexia induzida por tumor de Walker-256, foi observada redução da ingestão alimentar, caracterizando a anorexia, somente 10 dias após o implante do tumor;
- A lesão peroxidativa no miocárdio diminuiu no grupo 10 e 14 dias da inoculação do tumor;
- O potencial antioxidante total no miocárdio aumentou no grupo 10 dias de inoculação do tumor e permaneceu elevado no grupo 14 dias;
- A SOD aumentou a partir do grupo 5 dias de inoculação e permaneceu elevada;
- A CAT aumentou a partir do grupo 10 dias de inoculação e permaneceu elevada;
- O sistema glutaciona apresentou variações entre os grupos avaliados, mas ao final dos 14 dias a GT demonstrou-se elevada.
- A intensa atividade do sistema antioxidante, tanto enzimática como não enzimática supera o estresse oxidativo no miocárdio na caquexia provocada pelo tumor de Walker-256.
- Houve redução no estresse oxidativo no miocárdio na caquexia pelo câncer, mostrando uma proteção anti-oxidante maior para esse órgão nobre.

REFERÊNCIAS

ACHARYYA, S.; LADNER, K. J.; NELSEN, L. L.; DAMRAUER, J.; REISER, P. J.; SWOP, S.; GUTTRIDGE, D. C. Cachexia is Regulated by Selective Targeting of Skeletal Muscle Gene Products. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.114, n.3, p.370-378, aug. 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALVAREZ, B.; QUINN, L. S.; BUSQUETS, S.; QUILES, M. T.; LOPES-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Tumor necrosis factor- α exerts interleukin-6-dependent and – independent effects on cultured skeletal muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1542, p. 66-72, 2002.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; FELIPE, A.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Molecular Mechanisms Involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v.37, p.1084-1104, 2005a.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LOPEZ-SORIANO, F. J. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**, New York, v. 21, n. 9, p. 977-985, sep. 2005b.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cytokines in the Pathogenesis of Cancer Cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S.l], v.6, p.401-406, 2003.

ARGILÉS, J. M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LLOVERA, M.; LOPEZ-SORIANO, F. J. The role of tumor necrosis factor- α in muscle wasting disorders. **Basic Appl. Myol**, [S.l], v. 8, n. 5, p. 371-380, 1998.

BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen species as costimulatory signals of cytokine-induced NF-kB activation pathways. In: SEN, C. K; SIES, H.; BAEUERLE, P. A. **Antioxidant regulation of the genes**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 181-198.

BARACOS, V. E.; DeVIVO, C.; HOYLE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. **American Journal Physiology-Endocrinology Metabolism**, Bethesda, v.268, n.5, p.E996-E1006, 1995.

BARKER, T., TRABER, M. G. From animals to humans: evidence linking oxidative stress as a causative factor in muscle atrophy. **The Journal of Physiology**, Oxford, v. 583, n. 2, p. 421-422, 2007.

BARREIRO, E.; PUENTE, B.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; GEA, J.; ARGILÉS, J. M. Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats, **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 7, p. 1646-1652, mar. 2005.

BODINE, S.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K. M.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUYMIROU, W. T.; PANARO, F. J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z. Q.; VALENZUELA, D. M.; DECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, Washington, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H. H. P.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, New York, v. 231, p. 56-62, Sep. 2004.

BUCK, M.; CHOJKIER, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. **EMBO Journal**, Eynsham, v. 15, n. 8, p. 1753-1765, Apr. 1996.

BUSQUETS, S.; FIGUEIRAS, M. T.; MEIJSSING, S.; CARBÓ, N.; QUINN, L. S.; ALMENDRO, V.; ARGILÉS, J. M. LÓPEZ-SORIANO, F. J. Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect. **International journal of molecular medicine**, Athens, v. 16, n. 3, p. 471-476 Sep. 2005.

BUSQUETS, S.; FIGUERAS, M. T.; FUSTER, G.; ALMENDRO, V.; MOORE-CARRASCO, R.; AMETLLER, E.; ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6725-6731, Sep. 2004.

CAMPS, C.; IRANZO, V.; BREMNES, R. M.; SIRERA, R. Anorexia-Cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway. **Supportive care in cancer**, Berlin, v. 14, p. 1173-1183, Jul. 2006.

CECONI, C.; BORASO, A.; CARGNONI, A.; FERRARI, R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? **Archives of Biochemistry and Biophysics**. New York, v.420, p. 217-221, Dec. 2003.

COHEN, G.; DEMBIEC, D.; MARCUS, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, p. 30-38, Mar. 1970.

COSTELLI, P.; REFFO, P.; PENNA, F.; AUTELLI, R.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M. Ca^{2+} -dependent proteolysis in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n, 10, p. 2134-2146, Out. 2005.

COSTELLI, P.; DE TULLIO, R.; BACCINO, F. M.; MELLONI, E. Activation of Ca^{2+} -dependent proteolysis in the skeletal muscle and heart in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, London, v. 84, n. 7, p. 946-950, Apr. 2001.

DELANO, M. J., MOLDAWER, L. L. The Origins of Cachexia in Acute and Chronic Inflammatory Diseases. **Nutrition in Clinical Practice**, [S.I], v. 26. p. 68-81, Feb. 2006.

DELL, E. D. V.; LU, Z.; XU, X.; ZHU, G.; HU, X.; OURY, T. D.; BACHE, R. J.; DUNKER, D. J.; CHEN, Y. Extracellular superoxide dimutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, prelo, Dec. 2007

DEORA, A. A., LANDER, H. M. Regulation of signal transduction and gene expression by reactive nitrogen species. In: SEN, C. K; SIES, H.; BAEUERLE, P. A. **Antioxidant regulation of the genes**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 147-170.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 388, n. 2, p.261-266, Apr. 2001.

FALCONER, J. S.; FEARON, K. C. H.; PLESTER, C. E.; ROSS, J. A; CARTER, D. C. Cytokines, the Acute-Phase Response, and Resting Energy Expenditure in Cachectic Patients with Pancreatic Cancer. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v.219, n.4, p.325-331, Apr. 1994.

FEARON, K. C. H.; MOSES, A. G. H. Cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 73-81, Sep. 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan/mar. 1997.

FLAHERTY, J. T.; ZWEIER, J. L.; Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: experimental and clinical evidence. **Klinische Wochenschrift**, Berlin, v. 69, p. 1061-1065, Apr. 1991.

FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease. **Laboratory Investigation**, [S.l], v. 47, p. 412-423, 1982

FREITAS, J. J. S.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; CURI, R. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 655-663, Apr. 2001.

GARATTINI, S.; GUAITANI, A. Animal models for the study of cancer-induced anorexia. **Cancer treatment reports**, Bethesda, v. 65, n. 5, p.23-35, 1981.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **European journal of clinical investigation**, Oxford, v. 115, n. 3, p. 500-508, Mar. 2005.

GLICKMAN, M. H., CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 82, p. 373-428, Apr. 2002.

GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, Dec. 2001.

GOMES-MARCONDES, M. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 69-74, Jun. 2002.

GONÇALVES, C. G.; CAMPOS, A. L. C.; COELHO, J. C. U.; SUSUKI, S.; MEGUID, M. M. Malnutrition and cachexia. . In: HOFBAUER, K. G , ANKER, S. D.; INUI, A.; NICHOLSON, J. R.(org). **Pharmacotherapy of cachexia**. United States, Taylor & Francis, 3-11, 2006.

GORDON, J. N.; GREEN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **Q J Med**, Oxford, v. 98, p. 779-788, Oct. 2005.

GOSKER, H. R.; WOUTERS, E. F. M.; VUSSE, G. J. V. D.; SCHOLS, A. M. W. J. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.71, p. 1033-1047, Jan. 2000.

GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; DAVIES, K. J. A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.305, n.3, p.709-718, Jun. 2003.

GUARNIER, F. A. **Estresse oxidativo em músculo esqueléticos de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256**. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipide peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, Sep. 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed..Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford, 2007.

HASSELGREN, P. O.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 290, n. 1, p. 1-10, Jan. 2002.

HASSELGREN, P. O.; FISCHER, J. E. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 233, n. 1, p. 9-17, Jan 2001.

HEISTAD, D. D. Oxidative stress and vascular disease 2005 duff lecture. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 26, p. 689-695, Jan. 2006.

HODGE, J. J.; OBIN, M. S.; GONG, X.; SHANG, F. NOWELL, T. R.; GONG, J. ABASI, H.; BLUMBERG, J.; TAYLOR, A. Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, v. 272, n. 45, p. 28218-28226, Aug. 1997.

HWANG, E. S.; KIM, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. **Toxicology**. Limerick, v. 229, p. 1-10, Nov. 2007.

IAMAMOTO, C. A. **Quantificação de óxido nítrico em músculo estriado esquelético de ratos através de quimiluminescência. Modelos de lesão por isquemia-reperfusão e caquexia induzida por tumor de Walker-256**. 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; HAYASHIDANI, S.; KANG, D.; SUEMATSU, N.; NAKAMURA, K.; UTSUMI, H.; HAMASAKI, N.; TAKESHITA, A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circulation Research**, Dallas, v. 88, p. 529-535, Mar 2001.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; SUEMATSU, N.; HAYASHIDANI, S.; ICHIKAWA, K.; UTSUMI, H.; MACHIDA, Y.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. **Circulation Research**, Dallas, v.86, p. 152-157, Feb. 2000.

KEITH, M.; GERANMAYEGAN, A.; SOLE, M. J.; KURIAN, R.; ROBINSON, A.; OMRAN, A. S.; JEEJEEBHOY, K. N. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**. New York, v. 31, n. 6, p. 1352-1356, May. 1998.

KINUGAWA, S.; TSUTSUI, H.; HAYASHIDANI, S.; IDE, T.; SUEMATSU, N.; SATOH, S.; UTSUMI, H.; TAKESHITA, A.. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. **Circulation Research**, Dallas, v. 87, p. 392-398, Jul. 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **The Journal of Nutrition**, New York, v. 129, p. 227S-237S, Jan. 1999.

LI, Y. P.; CHEN, Y.; LI, A. S.; REID, M. B. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, Washington, v. 285, p.C806-C812, May. 2003.

LIMA, T. M.; LIMA, M. M. R.; ALMEIDA, D. C. G.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. Cachexia induced by Walker 256 tumor growth causes rat lymphocyte death. **Cancer immunology and immunotherapy**, Heidelberg, v. 54, n. 2, p. 179-186, Feb. 2005.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. S.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry** Berlin, v.47, p. 469-474, Jun 1974.

MATTSON, M. P. et al. Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 443-456, Feb. 2000.

McDONOUGH, K. H. The role of alcohol in the oxidant antioxidant balance in heart. **Frontiers in Bioscience**, [S.l], v. 4, p. d601-606, Jul. 1999.

MILLER, G. L. Protein determination for large number of samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 5, p. 964, May. 1959.

MOLAVI, B.; MEHTA, J. L. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. **Current Opinion in Cardiology**, London, v.19, p. 488-493, Sep. 2004.

MORRISON, W.L; EDWARDS, R. H. T. Cardiac cachexia. **British Medical Journal** London, v. 302, p. 301-302, Feb. 1991

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVINO, J.; PEREZ, P. ESTRELA, J. M. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**. New York, v.26, n 3-4, p. 410-418, Feb. 1999.

ORLOWSKI, R. Z.; BALDWIN JR, A. S. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, [S.l], v. 8, n.8, p.385-389, Aug. 2002.

PALACE, V. P.; HILL, M. F.; KHAPER, N.; SINGAL, P. K. Metabolism of vitamin a in the heart increases after a myocardial infarction. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 11/12, p. 1501-1507, Jun. 1999.

PIFFAR, P. M.; FERNANDEZ R.; TCHAIKOVSKI O.; HIRABARA S. M.; FOLADOR A.; PINTO G. J.; JAKOBI S.; GOBBO-BORDON D.; ROHN T. V.; V. FABRÍCIO E. B.; MORETTO, K. D.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES L.C. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 201, n. 2, p. 139-148, Nov. 2003.

PINTO, J. A.; FOLADOR, A.; BONATO, S. J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H. H. P.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A. C.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 15, n. 6, p. 358-365, Jun. 2004.

POWERS, S. K., KAVAZIS, A. N., DERUISSEAU, K. C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. **American journal of physiology . Regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 288. p. R337-R344, 2005.

RADI, R.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 300, n.1, p. 409-415, Jan 1993.

RAHMAN, I.; MORRINSON, D.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Systemic oxidative stress in asthma, CPOD, and smokers. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 154, n. 4, p. 1055-1060, Oct. 1996.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. L. G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LIESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 255, p. 107-117, Nov. 1996.

ROTTUNO, L. **Avaliação do estresse oxidativo no sangue de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256**. 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SHEN, X.; ZHENG, S.; METREVELI, N. S.; EPSTEIN, P. N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**. New York, v. 55, p. 798-805, Mar. 2006.

SHEN, X.; ZHENG, S.; THONGBOONKERD, V.; XU, M.; PIERCE, W. M.; KLEIN, J. B.; EPSTEIN, P. N. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. **American Journal Physiology-Endocrinology Metabolism**, Bethesda, v. 287, p. 896-905, Jul. 2004.

SHIOMI, T.; TSUTSUI, H.; MATSUSAKA, H.; MURAKAMI, K.; HAYASHIDANI, S.; IKEUCHI, M.; WEN, J.; KUBOTA, T.; UTSUMI, H.; TAKESHITA, A. Overexpression of glutathione prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. **Circulation Research**, Dallas, v. 109, p. 544-549, Jan. 2004.

SIEMS, W.; CAPUOZZO, E.; LUCANO, A.; SALERNO, C.; CRIFO, C. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal. **Life Sciences**, New York, v. 73, n.20, p. 2583-2590, Oct. 2003.

SIWIK, D. A.; TZORTZIS, J. D.; PIMENTAL, D. R.; CHANG, D. L. F.; PAGANO, P. J.; SINGH, K.; SAWYER, D. B.; COLUCCI, W.S. Inhibition of cooper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. **Circulation Research**, Dallas, v.85, p. 147-153, 1999.

SKIPWORTH, R. J. E.; STEWART, G.D. DEJORNG, D.H.C.; PRESTON, T.; FEARON, K.C.H. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumor interaction? **Clinical Nutrition**, Kidlington, v. 26. n. 6, p. 667-676, Dec. 2007.

SKIPWORTH, R. J. E., DAHELE, M., FEARON, K. C. H. Diseases associated with cachexia: cancer. In: HOFBAUER, K. G; ANKER, S. D.; INUI, A.; NICHOLSON, J. R. (org). **Pharmacotherapy of cachexia**. United States, Taylor & Francis, 118-135, 2006.

SMITH, I. J.; DODD, S. L. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signaling pathway in rat diaphragm muscle. **Experimental Physiology**, New York, v. 92, n. 3, p. 561-573, May. 2007.

SUPINSKI, G. S; CALLAHAN, S. A. Free radical mediated muscle dysfunction in inflammatory conditions, **Journal of Applied Physiology**. Bethesda, v. 102, p. 2056-2063, Jan. 2007.

SUZUKAWA, A. A. **Estresse oxidativo hepático no desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

TEMPARIS, S.; ASENSI, M.; TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; LARBAUD, D.; OBLED, A.; BÉCHET, D.; FERRARA, M.; ESTRELA, J. M.; ATTAIX, D. Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. **Cancer Research**, Chicago, v. 54, n. 21, p. 5568-5573, Nov. 1994

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Pharmacological interference with tissue hypercatabolism in tumour-bearing rats. **The Biochemical Journal**, London, v. 299, n. 1, p. 71-78, Apr. 1994.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 27, p. 502-522, Mar. 1969.

TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**. Washington, v. 20, p. 340-348, Oct. 2005.

TISDALE, M. J. Cancer Cachexia. **Langenbecks archiv fur chirurgie**, Berlin, v.389, p.299-305, May. 2004.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 861-871, Nov. 2002.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, New York, v. 17, n. 5, p. 438-442, May. 2001.

TISDALE, M. J. Wasting in Câncer. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, p. 243S-246S, Jan. 1999.

TOUSSAINT, O.; HOUBION, A.; REMACLE, J. Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. **Toxicology**, Limerick, v. 81, n. 2, p. 89-101, Jul 1993.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **British Medical Journal**, London, v. 7, p.42, Mar 2007.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRANCHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Liver**, Copenhagen, v. 22, p. 342 -350, Aug. 2002.

WITTE, K. K. A., CLARK, A. L. Nutritional abnormalities contributing to cachexia in chronic illness. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 85, p. 23-31, Sep. 2002.

YOUNES, R. N., NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v.55, n.5, p.181-193, Oct. 2000.

ZHU, X. Y.; DAGHINI, E.; CHADE, A.R.; RODRIGUEZ-PORCEL, M.; NAPOLI, C.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Role of oxidative stress in remodeling of the myocardial microcirculation in hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. Dallas, v. 26, p. 1746-1752, May. 2006.

ZIMIANI, K.; GUARNIER, F. A.; MIRANDA, H. C.; WATANABE, M. A.; CECCHINI, R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 13, n. 3, p. 196-203, Nov. 2005.