



Universidade  
Estadual de  
Londrina

---

LEILA REGINA ARIAS ROTUNNO

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS HEMÁCIAS E  
PLASMA DE ANIMAIS COM CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

LONDRINA  
2007

---

**LEILA REGINA ARIAS ROTUNNO**

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS HEMÁCIAS E  
PLASMA DE ANIMAIS COM CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-graduação em Patologia Experimental  
da Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito final ao título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini**

Londrina  
2007

LEILA REGINA ARIAS ROTUNNO

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS HEMÁCIAS E  
PLASMA DE ANIMAIS COM CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-graduação em Patologia Experimental  
da Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito final ao título de Mestre.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rubens Cecchini

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenir Medri de Souza

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rubia Casagrande

Londrina, 09 de Julho de 2007

## **DEDICATÓRIA:**

Dedico este trabalho aos meus pais Nelson Arias e Edne Bettoni Arias, que me ensinaram a encontrar na simplicidade, trabalho, amor, honestidade, perseverança e dedicação, a felicidade das realizações, e conseqüentemente a verdadeira felicidade para a vida.

“A felicidade não está em lugar algum, mas sim dentro de você mesmo”.

## **AGRADECIMENTOS:**

A Deus que me acompanhou em toda esta difícil jornada e jamais soltou de minha mão.

Ao meu orientador prof. Dr. Rubens Cecchini, profissional a quem tanto admiro, pela oportunidade que me foi ofertada.

Aos meus filhos Rocco e Nelson que são o meu combustível para o meu dia a dia. Aprendo muito com vocês que fazem a vida ter outro tempero.

Ao meu marido Domenico cujos exemplos de caráter, dignidade e competência inundam a todos. Companheiro de todas as horas. Estamos juntos em mais esta que é a maior batalha de sua vida. Você é um exemplo a ser seguido por aqueles que têm tudo e reclamam de tudo.

Aos meus irmãos: Maristela, Ariano e Wanderley pelo amor incondicional. Eu não poderia ter escolhido família melhor para nascer!!!

Aos técnicos de laboratório: Pedro e em especial a Jesus Antonio Vargas , o Zui, por toda a paciência, bom humor e principalmente disponibilidade com que ajuda a todos que dele precisam no laboratório de patologia.

Aos professores: Tânia, Helenir, Marli, Gláucia, Jair, Maria Angélica, Ionice, Thaís, a todos os professores do departamento, do programa e do nosso grupo de estudos, pelo apoio e incentivo.

Agradecimento especial à profa. Alessandra Cecchini pela atenção neste final de curso.

Aos meus colegas e amigos de trabalho do Centrolab, pela compreensão e torcida.

Àqueles que se tornaram meus colegas e amigos do transcorrer do curso: Cristiani Akemi, Andréia Bianchini, Fernanda Bovo, Eliana de Vito, Marcos Tanita, Thiago Nasser, Vera Lúcia Tatakihara, Alexandre Sasaki, Juliana

Rubira, Celso Borges, Alissana, Vânia Terra e Priscila. Foi muito bom estar com vocês, estudar, trocar informações e sempre receber alguma palavra de apoio.

Ao Alexandre Saito (Teco), pelas dicas e disponibilidade em ajudar a mim e aos demais colegas.

Às secretárias, Ana e Vânia pela atenção e carinho.

À Flávia Guarnier pelas dicas.

A todos os que de uma maneira direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

Aos ratos que me auxiliaram neste trabalho, vocês valem mais do que muitos, chamados de seres humanos.

Aos que atiraram pedras, usei-as para calçar o meu caminho.

Minha solidariedade a todos os pesquisadores, pela árdua vida.

Meu respeito aos doentes graves que lutam com todas as suas forças por um amanhã. Gostaria de lhes dizer que ser super-homem ou mulher, sendo jovem, bonito (a), saudável e inteligente, é extremamente fácil. Vocês são o desafio, vocês são os super-heróis.

ARIAS-ROTUNNO, Leila Regina. **Perfil do estresse oxidativo nas hemácias e plasma de animais com caquexia induzida por tumor de Walker-256**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina. 2007.

## RESUMO

A caquexia resulta de acentuada perda de massa magra e depleção de tecido adiposo. Aparece em diversas doenças graves, incluindo o câncer e sua patogênese é multifatorial. Estudos recentes mostram que as espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio têm papel importante no desenvolvimento da caquexia por câncer em animais. Este trabalho propõe investigar a participação da via sistêmica, como reflexo do estresse oxidativo (EO), no estado caquético induzido por tumor de Walker-256. Nos experimentos foram utilizados ratos portadores do tumor de Walker-256, no 7º (T7) ou 14º (T14) dias após a inoculação subcutânea das células tumorais no flanco direito traseiro dos animais ou ratos controles (inoculação de PBS). A lipoperoxidação no plasma foi determinada através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre elas o dialdeído malônico. Os antioxidantes totais foram determinados através do potencial antioxidante total (TRAP). A lipoperoxidação foi também avaliada no plasma e hemácias, por quimiluminescência (QL), um método indireto, porém mais sensível para avaliação da oxidação. As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH), bem como a forma oxidada da glutatona (GSSG) foram quantificadas nas hemácias. A lipoperoxidação das hemácias e plasma mostrou-se aumentada em T7 e T14 quando comparadas ao grupo controle. Os antioxidantes totais do plasma diminuíram em T7 e T14 nos grupos tumor em relação ao controle. A SOD, o índice de estresse (IE) que reflete o estado oxidativo celular e GSSG aumentaram nas hemácias. A concentração de TBARS no plasma não mostrou alterações significativas. Este estudo demonstrou o envolvimento da via sistêmica no EO em animais com caquexia. Observou-se lesão oxidativa na membrana da hemácia e lipoperoxidação no plasma em T7 e T14. As enzimas antioxidantes foram depletadas como resultado do aumento da lipoperoxidação. Com sete dias após inoculação do tumor verificou-se intenso ataque dos radicais livres às hemácias sendo evidenciado pelo aumento da QL de hemácias e da SOD. Este ataque foi confirmado também pelo IE e GSSG na fase de T7. Em conclusão, os resultados demonstraram nos animais com caquexia induzida pelo tumor de Walker 256: aumento significativo nos níveis de lipoperóxidos do plasma e membrana das hemácias. Aumento dos níveis de GSSG, IE e na atividade da SOD nas hemácias. Redução da capacidade antioxidante total do plasma. Estes dados analisados em conjunto evidenciam o EO sistêmico experimental na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, Caquexia, Câncer, Hemácias, Plasma.

ARIAS-ROTUNNO, Leila Regina. **Oxidative stress profile in hemocytes and plasma of animals with cachexia induced by Walker-256 tumor.** 2007. 51 f. Dissertation (Masters in Experimental Pathology) – State University of Londrina. 2007.

## ABSTRACT

Cachexia results from acute body mass loss and adipose tissues depletion. It's present in several severe diseases including cancer and its multifactorial pathogenesis. Recent studies show that reactive oxygen species (ROS) and nitrogen have an important role on cachexia development by cancer in animals. This study aims to investigate the systemic pathway participation as an oxidative stress (OS) reflex in a cachexia state induced by Walker-256 tumor on the 7<sup>o</sup> (T7) or 14<sup>o</sup> (T14) days after subcutaneous inoculation of tumor cells on the animals' or control rats' right rear flank (PBS inoculation). Plasma lipoperoxidation was determined through analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), specially malonic dialdehyde. Lipoperoxidation was also evaluated in plasma and hemocytes through chemoluminescence (QL), an indirect method, nevertheless more sensitive to evaluate oxidation. Antioxidant enzymes as well as oxidized glutathione were quantified in hemocytes. Plasma and hemocytes lipoperoxidation were increased on T7 and T14 when compared to the control group. Total antioxidant in plasma was decreased on T7 and T14 in the tumor groups in comparison to the control one. SOD, the stress index (SI) which reflects the oxidative stress and GSSG, was increased in hemocytes. TBARS concentration in plasma did not show significant alterations. This study demonstrated the systemic pathway participation related to OS in animals with cachexia. It was observed oxidative lesion on hemocytes membrane and plasma lipoperoxidation on T7 and T14. Antioxidant enzymes were depleted as a result from lipoperoxidation. Seven days after the tumor inoculation, it was verified an intense attack of free radicals to hemocytes what was evidenced by the increase on hemocytes QL and SOD. This attack was also confirmed by SI and GSSG on T7. In conclusion, the results showed that the animals with cachexia induced by the tumor Walker-256 presented with: a significant increase in the lipidperoxide levels in plasma and hemocytes membrane; increased levels of GSSG, SI and SOD activity in hemocytes; reduction of total antioxidant capacity in plasma. These data were analyzed as a whole and evidenced the experimental systemic OS in cachexia induced by Walker-256 tumor in rats.

Keywords: Oxidative stress, Cachexia, Hemocytes, Plasma.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES:**

<b>FIGURA 1</b> Sistema antioxidante enzimático das hemácias.....	3
<b>FIGURA 2</b> Tempo de indução da TRAP.....	13
<b>FIGURA 3</b> Consumo médio de ração.....	19
<b>FIGURA 4</b> Perda de massa nos diferentes órgãos de ratos com caquexia aos 14 dias.....	20
<b>FIGURA 5</b> Índice de caquexia.....	21
<b>FIGURA 6</b> Concentração de lipoperóxidos nas hemácias.....	22
<b>FIGURA 8</b> Concentração de lipoperóxidos no plasma.....	23
<b>FIGURA 9</b> Capacidade antioxidante total do plasma.....	24
<b>FIGURA 10</b> Concentração de glutathiona total em hemácias.....	25
<b>FIGURA 11</b> Concentração de glutathiona oxidada em hemácias.....	26
<b>FIGURA 12</b> Índice de estresse.....	27
<b>FIGURA 13</b> Quantificação da atividade da SOD em hemácias.....	28
<b>FIGURA 14</b> TBARS quantificadas no plasma.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

C - grupo controle

°C - graus Celsius

CAT - catalase

CuZn-SOD - cobre-zinco superóxido dismutase

EPM - erro padrão médio

ERN - espécies reativas do nitrogênio

ERO - espécies reativas do oxigênio

g - gramas

g - unidade de força centrífuga relativa

GSH - glutathiona reduzida

GSSG - glutathiona oxidada

GSH - Rd - glutathiona redutase

GSH - Px - glutathiona peroxidase

H<sup>+</sup> - átomos de hidrogênio

Hb - hemoglobina

He - hemácias

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

IE - índice de estresse

LDL - fração de baixa densidade

mc - massa corpórea

MDA - dialdeído malônico

mM - milimolar

μM - micro molar

MR - metahemoglobina redutase

n - n° de elementos da amostra

nm - nanômetros

nmoles - nanomoles

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NADP<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânions superóxido

O<sub>2</sub> - oxigênio molecular

pH - potencial hidrogeniônico

PPP - (*pentose phosphate pathway*) via das pentose fosfato

QL - quimiluminescência

RO<sub>2</sub><sup>•</sup> - radical peroxy

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

*t* - BOOH - *tert*-butil hidroperóxido

TNFα - fator de necrose tumoral alfa

TRAP - (*Total peroxy radical-trapping antioxidant potential*) potencial antioxidante total

T7d - grupo tumor 7d

T14d - grupo tumor 14 dias

U - unidade

URL - unidades relativas de luz

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
Participação da hemácia e plasma no processo de estresse oxidativo .....	02
Estresse oxidativo e câncer.....	04
Caquexia.....	06
Tumor de Walker-256.....	07
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	08
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	09
3.1 Animais.....	09
3.2 Preparo das amostras.....	10
3.3 Quimiluminescência (QL) de plasma e hemácias.....	10
3.3.1 Preparo das amostras para a técnica de QL.....	11
3.4 Capacidade antioxidante total (TRAP).....	12
3.5 Glutaciona total e oxidada.....	13
3.6 Superóxido dismutase.....	14
3.7 Determinação das subsâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	14
3.8 Dosagem de proteínas.....	14
3.9 Dosagem de hemoglobina (Hb).....	15
3.10 Análise estatística.....	15
<b>4. RESULTADOS</b> .....	16
4.1 Caracterização da caquexia.....	16
4.2 Avaliação da lipoperoxidação através da QL.....	17
4.3 Avaliação da capacidade antioxidante total.....	17
4.4 Avaliação da glutaciona total, oxidada e índice de estresse.....	17
4.5 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.....	18
4.6 Quantificação das subsâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .....	18
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6.0 CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de caquexia em doenças malignas como o câncer manifesta-se pela perda de massa corporal, anorexia, anemia, alteração no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (ARGILÉS; ALVAREZ; LÓPEZ-SORIANO, 1997). As citocinas, especialmente o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), participam de forma importante na indução do estresse oxidativo e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Estudos experimentais mostraram aumento do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica, com aumento da concentração de dialdeído malônico (MDA) e 4-hidroxi-2 nonenal, oxidação protéica através do aumento da concentração de carbonilação proteica e estresse nitrosativo, através do aumento da produção de 3-nitrotirosina no processo de perda muscular em camundongos com hepatoma (BARREIRO et al., 2005). Buck e Chojkjer (1996), em um modelo murino de perda de músculo esquelético, mostraram que o TNF- $\alpha$  participa na mediação da liberação de ERO e espécies reativas do nitrogênio (ERN), sendo este último, através da síntese de óxido nítrico. Estes pesquisadores mostraram que os aductos de proteínas de MDA estão aumentados no soro de animais com caquexia induzida por TNF- $\alpha$ . O aumento de MDA no sangue de paciente com câncer gástrico avançado também tem sido relatado (BAKAN et al., 2002).

Vários estudos sugerem que algumas células neoplásicas malignas *in vivo* geram mais ERO e ERN do que células normais (CLEMENT, et al., 2001; OKADA, et al., 2006; PAYNE et al., 2005; SZATROWSKI & NATHAN, 1991; PELICANO, CARNEY & HUANG, 2006). Das fontes de ERO pode-se citar a lisil-oxidase (PAYNE, et al., 2005), a prolina oxidase (GEISZT & LETO, 2004), o aumento da geração de  $O_2^-$  mitocondrial e o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (KAMIGUTI et al., 2005).

## Participação da hemácia e plasma no processo de estresse oxidativo

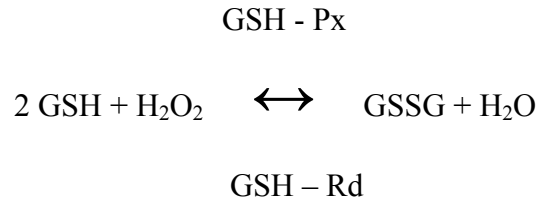
A hemácia é grande fonte de membranas no corpo humano. A membrana da hemácia contém aproximadamente 15 tipos de proteínas maiores que eclodem para o citoplasma. O  $O_2$  penetra na hemácia por difusão simples uma vez que a hemácia contém grandes quantidades de hemoglobina. A composição bioquímica da membrana das hemácias é de: 52% de proteínas, 40% de lipídios e 8% de carboidratos. A membrana da hemácia apresenta altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados e canais iônicos, através dos quais o  $O_2^-$  pode passar. A hemoglobina em constante contato com a alta tensão oxigênio molecular (oxihemoglobina) e nesta forma contendo íons ferrosos no estado ligante, todos estes fatores tornam a hemácia bastante susceptível à oxidação. (HALLIVELL & GUTTERIDGE, 1999; REPETTO et al., 1996)

A elasticidade e durabilidade da hemácia são atribuídas às propriedades físico-químicas do seu esqueleto de membrana especializado (ASTER, 2005).

A integridade das hemácias reflete o grau das alterações sistêmicas ocorridas dentro de um organismo. Um exemplo é a peroxidação da membrana das hemácias que causa perda da sua habilidade em alterar a forma e “espremer-se” através dos capilares finos (“deformabilidade”) (HALLIVELL & GUTTERIDGE, 1999). Dessa forma, as hemácias constituem bons modelos experimentais para o estudo dos mecanismos de lesão por radicais livres em biomembranas, pois são susceptíveis ao estresse oxidativo (ZOU et al., 2001).

O sistema de defesa antioxidante da hemácia (figura 1) constitui-se de: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GSH-Rd), glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), vitamina E e metahemoglobina redutase (MR) dependente de NADPH (CLEMENS & WALLER, 1987; HALLIVELL & GUTTERIDGE, 1999) além de ácido ascórbico (MANOHARAN, et al., 2005).

A auto-oxidação da oxihemoglobina para metahemoglobina, gera radicais  $O_2^-$ . A hemácia adulta contém altas concentrações de cobre-zinco-superóxido dismutase (CuZn-SOD). A SOD, rapidamente converte  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , o qual é removido pela CAT e GSH-Px. A GSH-Px, catalisa a redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos para seus respectivos álcoois e  $H_2O$  à custa da conversão de GSH para GSSG. A GSSG é novamente convertida em GSH, à custa de GSH - Rd conforme as reações:



O NADPH necessário para a GSH - Rd é fornecido pela via das pentoses fosfato (PPP), a qual também supre o NADPH para a MR, que converte a metahemoglobina de volta para hemoglobina.

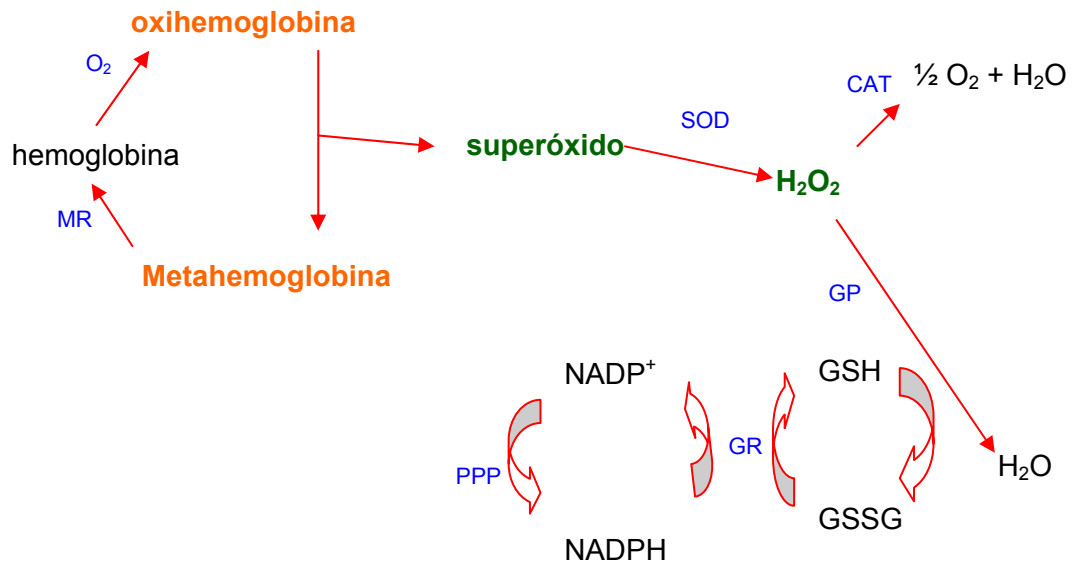


Figura 1 - Sistema antioxidante enzimático das hemácias. O<sub>2</sub> = oxigênio molecular, SOD = enzima cobre-zinco superóxido dismutase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio, CAT = catalase, GP = glutationa peroxidase, GR= glutationa redutase, GSH = glutationa reduzida, GSSG = glutationa oxidada, NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida), NADP<sup>+</sup>= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada), PPP = via das pentoses fosfato, MR = metahemoglobina redutase.

O citosol das hemácias, por outro lado, contém altas concentrações de tióis, particularmente GSH, que são facilmente oxidados, formando radicais tili e podem levar à formação de outros radicais livres sulfa-centrados e espécies reativas. Eles permanecem entre os agentes redutores com capacidade de reagir diretamente com a hemoglobina (MUNDAY, 1995).

Ferreira et al. (1999) demonstraram que hemácias humanas intactas são propensas ao estresse oxidativo quando expostas ao íon férrico e que as hemácias têm um potente sistema antioxidante que pode minimizar os danos potenciais causados pela exposição aguda ao ferro coloidal *in vitro*. Os grupos sulfidril da hemoglobina têm sido associados aos mecanismos de proteção celular contra agentes oxidantes, podendo formar pontes dissulfeto, servir como reservatórios do poder redutor e como fonte de GSH (TORSONI & OGO, 2000).

Em relação ao plasma, sabe-se que a presença de hidroperóxidos lipídicos no plasma é requerida para posterior oxidação das partículas de lipoproteínas na presença de metais de transição e lipoxigenase (PASTORINO, 2000). Zamburlini et al. (1995), demonstraram proporcionalidade entre hidroperóxidos purificados e os do LDL no plasma.

O plasma contém de antioxidantes não enzimáticos como a albumina, GSH, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido úrico, bilirrubinas, flavonóides e outros antioxidantes não-solúveis (PRIOR & CAO, 1999).

## **Estresse oxidativo e câncer**

O estresse oxidativo é definido como o aumento da concentração de ERO em decorrência de um aumento de sua produção ou redução de sua eliminação ou ainda ambos os eventos associados (HUNT et al., 1998; MILLS et al., 1998).

Subapriya et al (2002) relataram aumento na peroxidação lipídica com diminuição no nível dos antioxidantes GSH, CAT, GSH-Px e glutathione S transferase no sangue de pacientes com carcinoma oral de células escamosas. Um outro estudo, com o mesmo tipo de câncer apresentou redução nos níveis de antioxidantes proporcional à evolução da doença (MANOHARAN, et al., 2005).

A glutationa oxidada (GSSG) é produto do metabolismo de hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. A GSH é a chave molecular na homeostasia redox do corpo. O estresse oxidativo induz a oxidação de GSH em GSSG pela ação da GSH-Px (HALIWELL & GUTTRIDGE, 1999). 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 estadiamentos e mostrou estar significativamente diminuída com a progressão da neoplasia (NAVARRO et al., 1999).

Mantovani et al. (2002) observaram que as concentrações de ERO, bem como as de interleucina 6 e TNF- $\alpha$ , foram significativamente mais altas nos pacientes em câncer em relação ao grupo controle os quais foram reduzidos pelo tratamento com antioxidante. Em contrapartida, a concentração de GSH-Px, SOD e interleucina 2, foram mais baixos nestes pacientes, sugeriu-se redução na concentração dos antioxidantes, não só em função da administração de drogas antineoplásicas, como da própria evolução do câncer.

Szuster- Ciesielska et al. (2004) observaram que neutrófilos isolados do sangue de pacientes com carcinoma de laringe nas fases I, II, III e IV produziam níveis elevados de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , e apresentaram aumento da atividade da CAT e peroxidases. Outro estudo verificou baixas concentrações de GSH-Px, SOD e CAT no sangue de crianças com leucemia linfoblástica aguda (SENTURKER et al., 1997).

Barreiro et al. (2005) relataram associação entre câncer experimental indutor de caquexia, e desenvolvimento de estresse oxidativo juntamente com o aumento de compostos nitrosativo em músculo esquelético de ratos. O estresse oxidativo foi evidenciado através do aumento da concentração de MDA e 4-hydroxi-2 nonenal e o estresse nitrosativo através da nitração da tirosina. Outro estudo mostrou que o estresse oxidativo e nitrosativo estava aumentado no plasma de pacientes com câncer de laringe em estado avançado evidenciado pelo aumento na concentração plasmática de MDA, óxido nítrico e nitrato (SEYITAN et al., 2003).

## Caquexia

A síndrome da caquexia é a principal causa de mortalidade no câncer, com ocorrência em até 80% dos pacientes (ALBRECHT & CANADA, 1996), ocorre aumento da degradação e ou diminuição da síntese protéica. A perda de massa corpórea, em especial a muscular, é comum a várias condições clínicas, incluindo o câncer, deficiências auto-imunes, falência renal crônica, doenças gastrintestinais, artrite reumatóide e septicemia (TISDALE, 2000). Utiliza-se o termo caquexia, quando ocorre mais de 10% de perda de massa total em um curto espaço de tempo (TISDALE, 2004).

A caquexia pode ocorrer independentemente da diminuição da ingestão alimentar através de mecanismos próprios de degradação de proteínas sobre os quais o estresse oxidativo pode exercer um papel relevante. Estudos em ratos revelaram que a caquexia induzida por TNF $\alpha$  foi acompanhada por aumento de lipoperoxidação muscular e que tanto a caquexia como a lipoperoxidação foram revertidas pelo tratamento com vitamina E. (BUCK & CHOJKIER, 1996).

A perda de massa esquelética na caquexia é causada, entre outros mecanismos, por uma alteração na regulação da via catabólica da ubiquitina-proteassoma. O estresse oxidativo moderado aumenta a degradação de proteínas no músculo esquelético, causando um aumento na expressão da maioria dos componentes na via ubiquitina-proteassoma (GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002). Muitas citocinas pró-inflamatórias, produzidas por células tumorais têm demonstrado envolvimento na patogênese da perda muscular. Produtos formados nos processos inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ativam o fator de transcrição nuclear o fator nuclear Kappa-B pela degradação do inibidor Kappa-B estimulando o processamento proteolítico proteassomal (SEM et al., 2000). O fator nuclear Kappa-B, uma vez ativado, migra para o núcleo e liga-se a elementos regulatórios do DNA de mais de cinquenta genes pró-inflamatórios, expressando assim várias proteínas da resposta imune e inflamatória, incluindo muitas citocinas (BAEUERLE & RAICHWAL, 1997). Dois fatores supostamente produzidos pelas células tumorais estão sendo investigados como estimuladores da hidrólise molecular: a) fator mobilizador de lipídios, que atua estimulando a lipólise de maneira dependente do AMP cíclico e b) o fator indutor de proteólise uma glicoproteína sulfatada, a qual inicia diretamente o catabolismo protéico no músculo esquelético (TISDALE, 2001).

## **Tumor de Walker-256**

O tumor de Walker-256 é um carcinossarcoma, (originário de células epiteliais e tecido conjuntivo) identificado pela primeira vez na mama de uma rata prena. O tumor de Walker é de crescimento rápido, e a sua implantação em ratos tem sido um modelo adequado na indução da síndrome da caquexia (GUAITANI et al., 1982). Em um curto espaço de tempo após a sua implantação subcutânea, verifica-se redução progressiva no peso do animal. 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).

Freitas et al. (2001) demonstraram que o tumor de Walker-256 promove estresse oxidativo no cérebro de rato. Houve aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo, cerebelo e hipotálamo. O tumor de Walker estimulou a atividade da CuZn-SOD, porém suprimiu a atividade da CAT e GSH-Px em várias regiões do cérebro. Essas alterações ocorreram concomitantemente com um desequilíbrio do sistema antioxidante enzimático do cérebro. Resultados obtidos em nosso laboratório revelaram que a caquexia induzida por tumor de Walker-256 em ratos Wistar está relacionada a aumento da lipoperoxidação e formação de proteínas carbonílicas no músculo estriado esquelético (resultados não publicados).

Considerando todas estas informações, e também o fato de não existir nenhum estudo experimental demonstrando lesões oxidativas sistêmicas causadas pela síndrome da caquexia tumoral, este trabalho visa demonstrar o estresse oxidativo sistêmico em animais com caquexia induzida por tumor de Walker-256.

## 2 OBJETIVOS

### GERAL

O presente trabalho objetiva determinar o estresse oxidativo nas hemácias e no plasma de ratos com caquexia induzida por tumor sólido de Walker 256.

### ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos portadores do tumor de Walker-256:

- a) A concentração de lipoperóxidos nas hemácias e no plasma empregando-se uma técnica sensível de quimiluminescência.
- b) A concentração plasmática de antioxidantes totais.
- c) A concentração de GSH e GSSG e a atividade da SOD nas hemácias.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 200-250 g., cedidos pelo Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram alimentados com água e comida *ad libitum*. O consumo de ração foi medido diariamente. Todos os animais foram cuidadosamente mantidos e monitorados de acordo com as recomendações éticas de experimentação animal.

Os ratos foram divididos em 3 grupos: grupo controle (C), que recebeu tampão PBS (tampão fosfato, cloreto de sódio e cloreto de potássio) subcutaneamente no flanco direito traseiro. Grupos tumor, que receberam no mesmo local suspensão de células de  $8 \times 10^7$  de células de tumor de Walker-256. Estes animais dos grupos tumor foram utilizados em 7 (T7d) ou 14 (T14d) dias após inoculação das células tumorais. O sangue dos animais dos três grupos foi coletado pela manhã, com seringas e tubos heparinizados, através de punção cardíaca, após anestesia. A seguir, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

O percentual de caquexia dos animais foi determinado de acordo com a perda de massa corpórea ou alteração ponderal da massa corpórea dos animais inoculados com o tumor de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{(m_i - m_f + (m_t) + g_{mc}) \times 100}{m_i + g_{mc}} =$$

$m_i$  = massa corpórea inicial do rato inoculado com o tumor

$m_f$  = massa final do rato inoculado com o tumor

$m_t$  = massa do tumor

$g_{mc}$  = ganho de massa média do rato controle durante os 14 dias do experimento

O músculo gastrocnêmio do flanco esquerdo traseiro foi retirado e pesado nos animais controle, em T7d e T14d, para se determinar o percentual de perda de massa muscular.

### 3.2 Preparo das amostras

As amostras de sangue foram cuidadosamente homogeneizadas de modo a evitar hemólise ou formação de coágulos. As amostras foram centrifugadas a 560 g por 10 minutos. O plasma foi separado, aliquoteado e congelado a - 18 °C para posterior análise. A papa de hemácias foi lavada com solução fisiológica por três vezes antes do uso, e a mesma analisada no mesmo dia para os experimentos.

### 3.3. Quimiluminescência (QL) de plasma e de hemácias

O plasma e as hemácias dos três grupos estudados foram utilizados para determinação da QL (GONZALES-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). A QL estimulada por *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) foi aferida em luminômetro TD 20/20 (Turner Designs), que possui faixa de reposta de 300-650 nm, a 28°C, em ambiente de baixa luminosidade. Nesta técnica, a lipoperoxidação das amostras foi revelada pelo aumento da emissão de fótons produzidos na reação da terminação de radicais peroxil, após estimulação induzida pelo *t*-BOOH. O cálculo das curvas foi analisado levando-se em conta a área, ou seja, a integral destas curvas e também a média e o erro padrão tanto para hemácias quanto para o plasma. Os resultados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (URL) / ml de plasma e URL para hemácias.

### **3.3.1 Preparo das amostras para a técnica de QL**

#### **Plasma**

As alíquotas de plasma foram descongeladas, acrescidas de tampão fosfato dissódico pH 7,4; 30 mM, 120 mM de cloreto de potássio e mantidos a 30 °C. A esta diluição foi acrescido *t*-BOOH com concentração final de 3 mM e analisado em luminômetro.

#### **Hemácias**

A papa de hemácias teve uma diluição final de 0,081% em tampão fosfato monobásico de potássio, 10 mM, pH 7,4 com cloreto de sódio 0,9%. O *t*-BOOH foi preparado utilizando a mesma solução tampão. A concentração final foi de 3mM e a analisado em luminômetro. .

#### **Prova da hemólise**

Após realizar a QL de hemácias, realizou-se a prova da hemólise. Este teste verifica se a amostra que é retirada do luminômetro apresenta ou não hemólise. Como controle positivo de hemólise, utilizou-se uma amostra de hemácias do grupo controle diluído em água destilada ao invés do tampão. O controle negativo é uma amostra de hemácias do grupo controle diluído no mesmo tampão da amostra que vai ao luminômetro. Todo o restante do procedimento é igual para ambos e para as amostras. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

A prova da hemólise foi utilizada para validar a metodologia da QL de hemácias. Esta validação é importante pelo fato de a hemoglobina interferir na análise de QL. Isto ocorre porque a hemoglobina sofre oxidação da heme por hidroperóxidos orgânicos como o *t*-BOOH havendo a produção de radicais *t*-butil alcóxil e *t*-butil peróxil (TORSONI & OGO, 2000).

Uma vez constatada a ausência de hemoglobina, toda emissão captada deve-se às lesões oxidativas de membrana (CASADO, et al. 2007)

### **3.4. Capacidade antioxidante total (TRAP)**

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada segundo Repetto et al (1996). Esta técnica avaliou a concentração de antioxidantes totais da amostra. O princípio da técnica foi o de que os radicais  $RO_2^*$  gerados pela indução 2,2-azo-bis-(2-amidinopropano) diidroclorido (ABAP) reagem com antioxidantes da amostra. Somente quando os antioxidantes da amostra são depletados, é que os  $RO_2^*$  atacam os lipídios do plasma para causar a peroxidação. A este tempo da curva, em que os antioxidantes da amostra impediram o ataque dos referidos radicais, denominou-se tempo de indução. A luminescência foi aferida no luminômetro TD 20/20, em ambiente de baixa luminosidade, com resultados obtidos através da relação entre o tempo de indução (figura 2) do plasma e do trolóx, um antioxidante hidrofílico semelhante à vitamina E utilizado como padrão para o tempo de indução. Os resultados foram expressos em  $\mu M$  de trolóx.

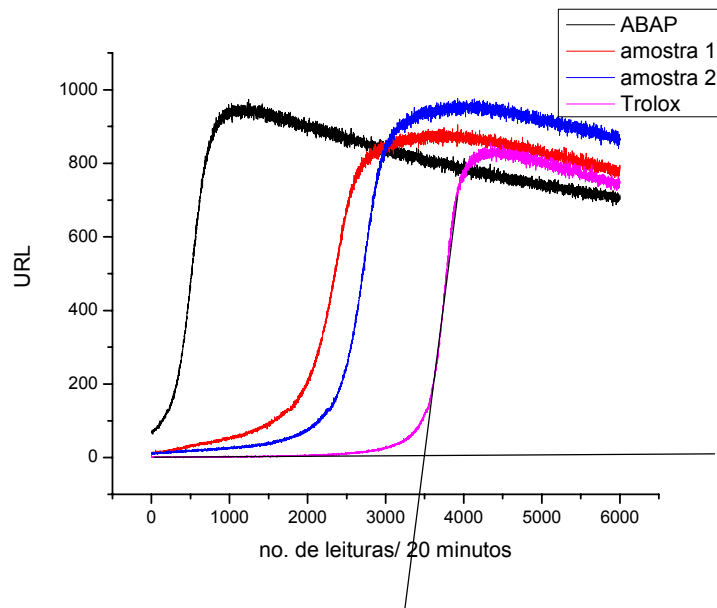


Figura 2 - Gráfico mostrando a emissão de fótons pelo n° de leituras (6000) realizadas durante a prova. O tempo decorrido do início da reação até a interseção das retas representa a fase de indução da reação. ABAP = 2,2-azo-bis-(2-amidinopropano) diidrocloreto.

### 3.5. Glutathiona total e oxidada

Hemácias diluídas a 1% em H<sub>2</sub>O destilada foram utilizadas para a determinação da concentração de GSH e GSSG (TIETZE, 1969). A concentração de GSH foi determinada pela tritiação, redução do 5,5'-dítio-bis ácido 2-nitrobenzóico para ácido 2 - nitro-tiobenzóico por ação do NADPH e GSH-Rd. O GSSG foi determinado incubando-se a amostra com 4-vinilpiridina por 1 hora a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em mM/g de hemoglobina (Hb). O Índice de Estresse (IE) reflete o estado oxidativo das hemácias e foi calculado pela seguinte equação:

$$IE = \frac{GSSG}{Glutathiona\ total - GSSG} \rightarrow IE = \frac{GSSG}{GSH}$$

### **3.6. Superóxido dismutase**

A papa de hemácias foi hemolisada a 2,5% e a SOD foi determinada pela técnica de Marklund & Marklund (1974). Esta enzima com papel antioxidante catalisa a a dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  na presença do próton H. Nesta técnica a SOD inibe a auto-oxidação do pirogallol em solução aquosa. A atividade enzimática da SOD, capaz de inibir 50% da oxidação do pirogallol, foi definida como uma unidade de quantificação da enzima SOD (U), sendo o resultado final expresso em USOD/g de Hb. A SOD avaliada neste experimento foi a CuZn-SOD, uma vez que as hemácias adultas não apresentam mitocôndrias.

### **3.7. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para a avaliação da lipoperoxidação no plasma, foi utilizada a técnica do TBARS (JENTZCH et al., 1996). Esta técnica quantifica moléculas de baixa massa molecular, predominantemente dialdeído malônico (MDA), que reagem com o ácido tiobarbitúrico e são extraídas pelo butanol.

### **3.8. Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), modificado por Miller (1959) e soro albumina bovina foi utilizada como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm.

### 3.9 Dosagem de Hb

A determinação da Hb foi realizada pela técnica de Drabkin, (1932), também chamado de método da cianometahemoglobina. As dosagens foram realizadas com hemolisados a 1%, 2,5% e 5% de cada uma das amostras em um comprimento de onda de 546 nm.

### 3.10 Análise estatística

Em todos os experimentos, com exceção da quimiluminescência induzida por *t*-butil, os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student, para amostras não pareadas.

Para a referida quimiluminescência utilizaram-se os testes *one-way* e *two-way* ANOVA. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da Caquexia

Os animais dos grupos tumor apresentaram redução progressiva da ingestão alimentar (figura 3). Houve perda da massa muscular (músculo gastrocnêmio) proporcional à evolução da caquexia, bem como perda de massa de outros órgãos como coração e cérebro (figura 4).

A redução da ingestão alimentar foi em torno de 41% em T7d e 69% em T14d. Esta redução alimentar na segunda semana não foi proporcional à perda de massa do músculo gastrocnêmio no mesmo período, sendo o percentual de perda do músculo gastrocnêmio em T7d de 23,13% e em T14d de 26,12%. O presente estudo verificou se a perda de massa do muscular foi proveniente da redução de ingestão alimentar observada nos animais com tumor. Incluiu-se, portanto outro grupo de animais denominado pair-fed. Este grupo foi constituído por animais normais e que não tiveram inoculação tumoral, porém foi submetido à mesma redução de ingestão alimentar dos animais inoculados com o tumor durante os 14 dias do experimento. Os animais pair-fed, com 14 dias apresentaram a mesma perda de massa muscular dos animais com 5 dias de inoculação tumoral (dados não apresentados).

Houve perda progressiva de massa corpórea após a inoculação do tumor (figura 5). A perda de massa corpórea foi de 11,90% em T7d e 20,04% em T14d em relação ao controle. A massa do tumor aumentou com a evolução da caquexia. Em T7d foi de 11,85 g. e em T14d de 19,84 g.

## **4.2 Avaliação da lipoperoxidação através da QL**

Na QL de hemácias observou-se dois picos de lipoperóxidos (figura 6). O primeiro, forma-se já nos dois primeiros minutos de reação e este apresenta um pico bastante elevado. O segundo pico forma-se em torno de 8 minutos e permanece até aproximadamente 20 minutos de reação. O primeiro pico é maior aos 14 dias de caquexia, enquanto o segundo é maior aos 7 dias de caquexia. Observa-se aumento da emissão de luz nos dois grupos tumor em relação ao controle ao mesmo tempo em que se observa ligeiro deslocamento à esquerda do grupo tumor em relação ao grupo controle. Este aumento foi mais acentuado em T7d.

A prova da hemólise a qual valida a quimiluminescência, demonstrou resultados muito baixos para a amostra, semelhantes ao controle negativo (dados não mostrados).

A QL de plasma de animais com tumor de Walker também aparece elevada nas duas fases analisadas da caquexia (T7d e T14d). Porém está mais acentuada aos 14 dias (figura 7).

## **4.3 Avaliação da capacidade antioxidante total**

A capacidade antioxidante total analisada no plasma apresentou queda significativa em T7d e que permaneceu até o T14d. Esta queda foi em torno de 50%. (figura 8).

## **4.4 Avaliação da glutatona total, oxidada e índice de estresse**

Os níveis de glutatona total nas hemácias não apresentaram alteração com a evolução da caquexia (figura 9).

A GSSG apresentou aumento em torno de 25% no sétimo dia de caquexia em relação ao grupo C (figura 10). A GSSG resulta de um ambiente mais oxidante, que favorece a formação

de pontes de sulfeto. Estas pontes são produzidas pela oxidação de grupos SH o que compromete a função da proteína pela alteração de sua estrutura terciária e quaternária.

O IE apresentou valores significativamente aumentados em relação ao controle no sétimo dia de caquexia (figura 11).

#### **4.5 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase**

A atividade da SOD mostrou aumento significativo (32%) no sétimo dia após a inoculação das células tumorais, reduzindo a seguir; porém os valores não foram significativos no décimo quarto dia (figura 12).

#### **4.6 Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico**

Não houve alterações significativas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico durante a evolução da caquexia (figura 13).

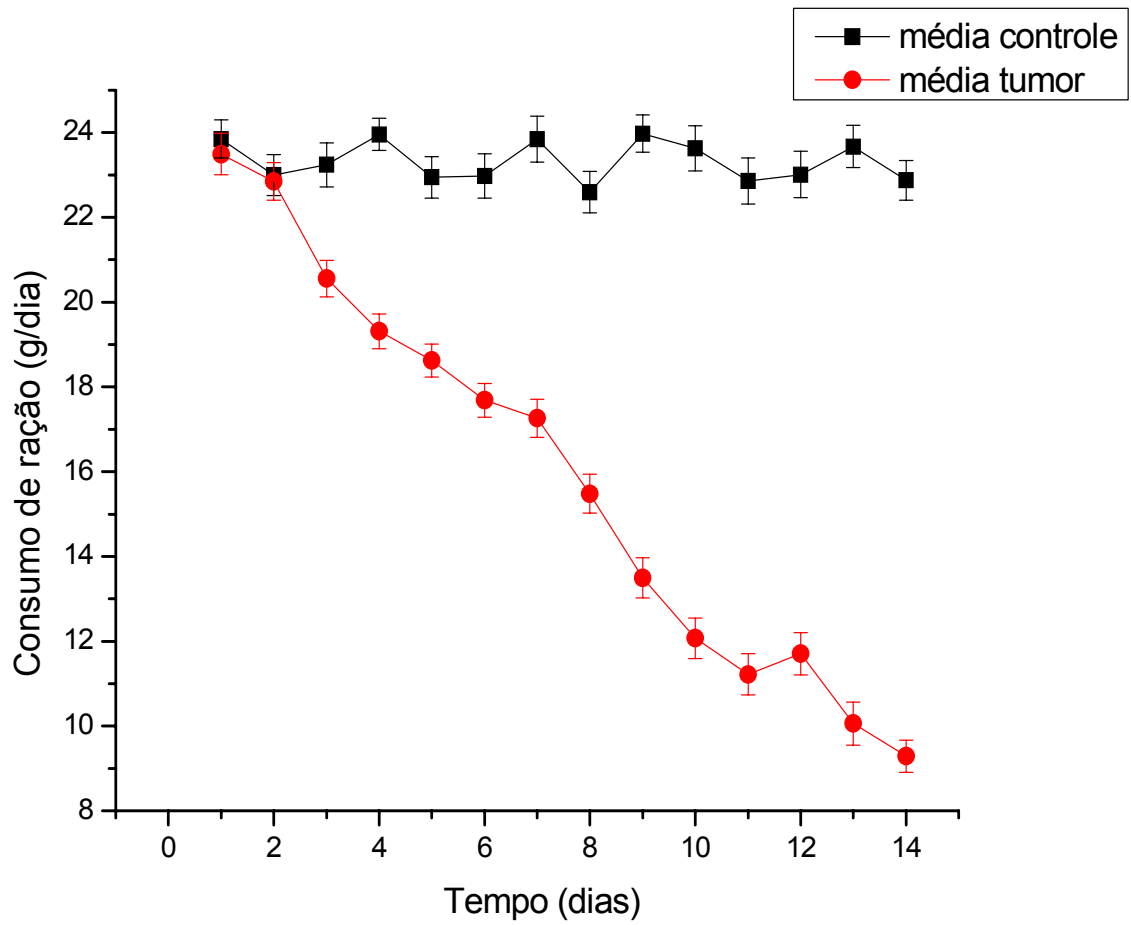


Figura 3 - Consumo médio de ração (24 horas) pelos animais durante a progressão da caquexia. O n foi respectivamente de 27, 16 e 14 para os grupos controle, T7d e T14d.

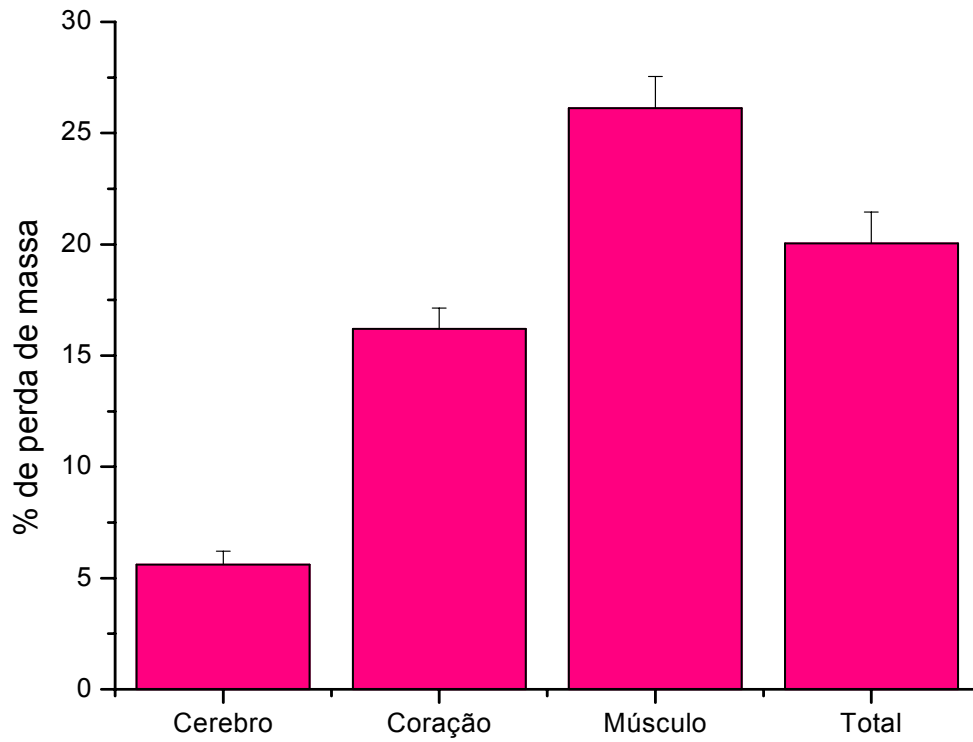


Figura 4 - Percentual de perda de massa do cérebro, coração, músculo gastrocnêmio e perda de massa corpórea total de ratos com caquexia de 14 dias em relação ao grupo controle.

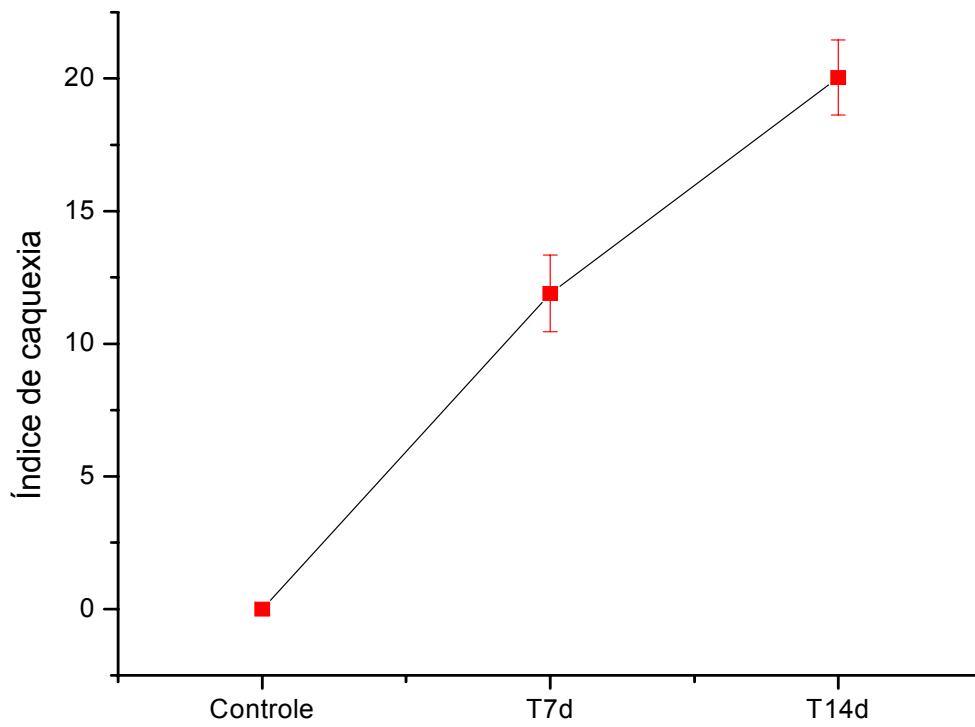


Figura 5 - Índice ou percentual de caquexia no sétimo e décimo quarto dias após inoculação com as células do tumor de Walker -256. O n foi respectivamente de 27, 16 e 14 para os grupos controle, T7d e T14d.

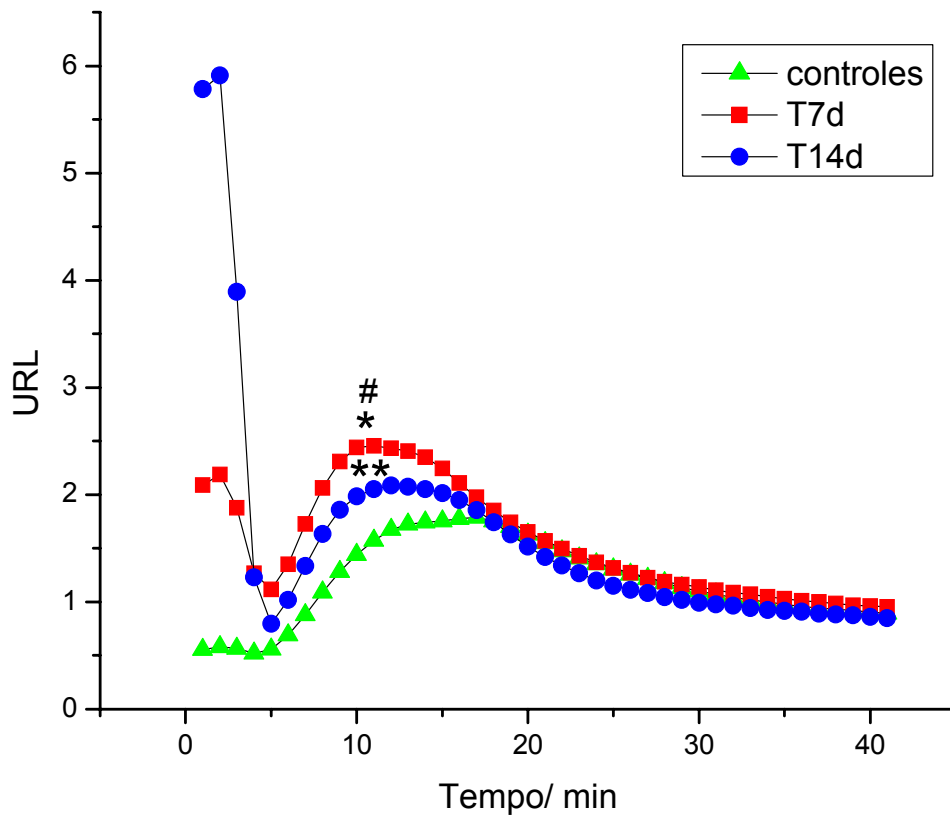


Figura 6 - Concentração de lipoperóxidos determinada por quimiluminescência na membrana das hemácias de ratos apresentando caquexia no sétimo (T7d) e décimo quarto dia (T14d) de indução do tumor. Análise através do *one-way* ANOVA (Tukey) considerou-se a área das curvas com os respectivos erros padrão. Comparação com o controle, T7d (# $p=0,01$ ). Análise da variância entre as curvas através do *two-way* ANOVA. Considerou-se a médias das curvas com os respectivos erros padrão. Comparação com o controle, T7d ( $*p<0,0001$ ), T14d ( $**p<0,0001$ ). Concentração das hemácias = 0,081%. O n foi respectivamente de 21, 16 e 13 para os grupos controle, T7d e T14d.

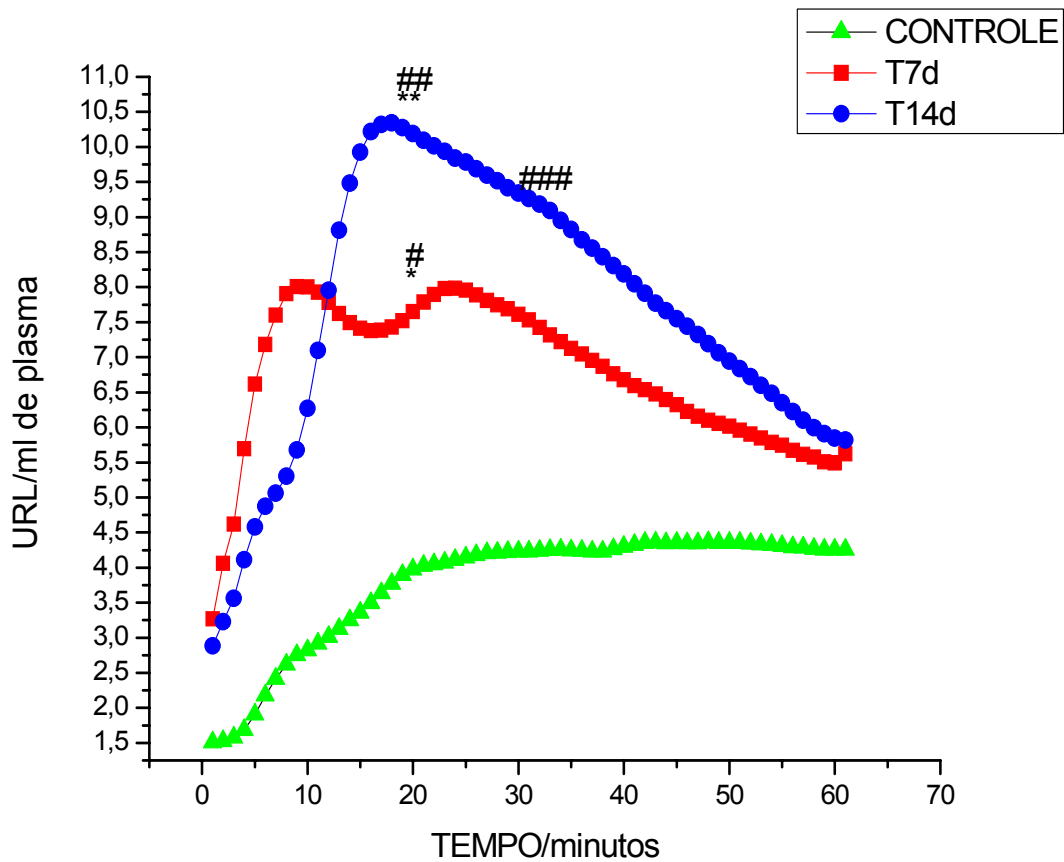


Figura 7 - Quimiluminescência em plasma mostrando a concentração de lipoperóxidos em ratos apresentando caquexia no sétimo (T7d) e décimo quarto dias (T14d) de indução do tumor. Análise através do *one-way* ANOVA. Considerou-se a área média das curvas com os respectivos erros padrão. Comparação dos grupos com o controle  $n=21$ ; T7d ( $*p<0,0001$ ;  $n=15$ ); T14d ( $**p<0,0001$ ;  $n=14$ ). Análise da variância entre as curvas através do *two-way* ANOVA. Comparação dos grupos com o controle  $n=21$ ; T7d ( $\#p<0,0001$ ;  $n=15$ ); T14d ( $\#\#\#p<0,0001$ ;  $n=14$ ) e comparação entre T7d e T14d ( $\#\#\#\#p<0,0001$ ). Cada minuto representativo da curva foi equivalente à média de 2 minutos da reação.

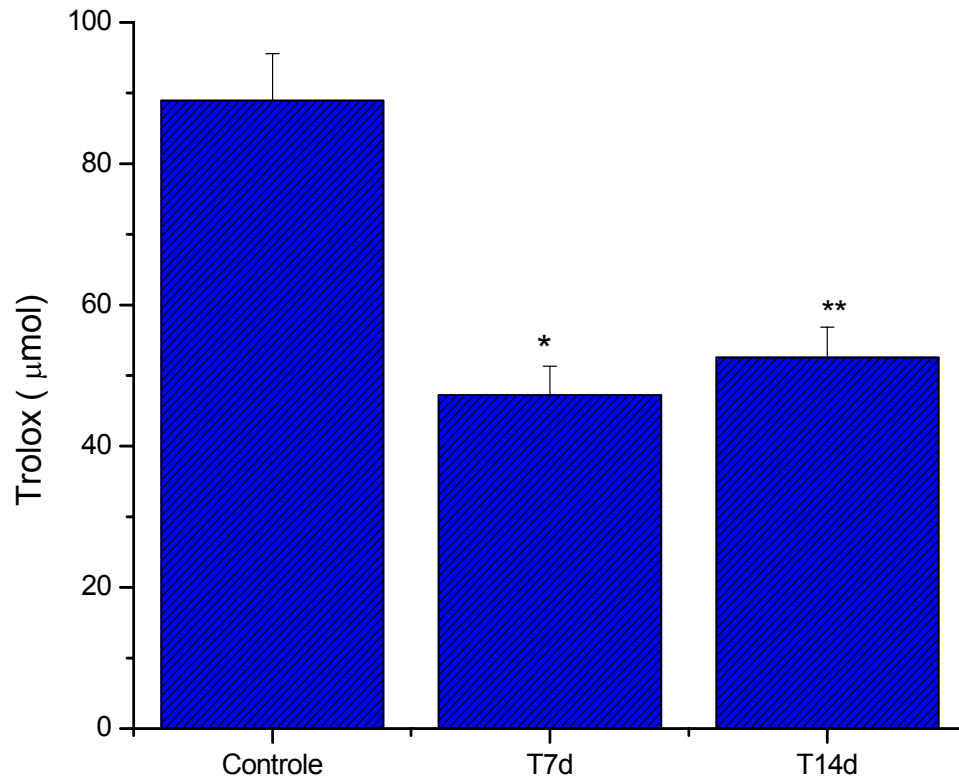


Figura 8 - Capacidade antioxidante total no plasma de animais controle e portadores de tumor no sétimo (T7d) e décimo quarto (T14d) dias após a inoculação com as células tumorais. \* $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,001$ . n: C = 19; T7d = 15; T14d = 13

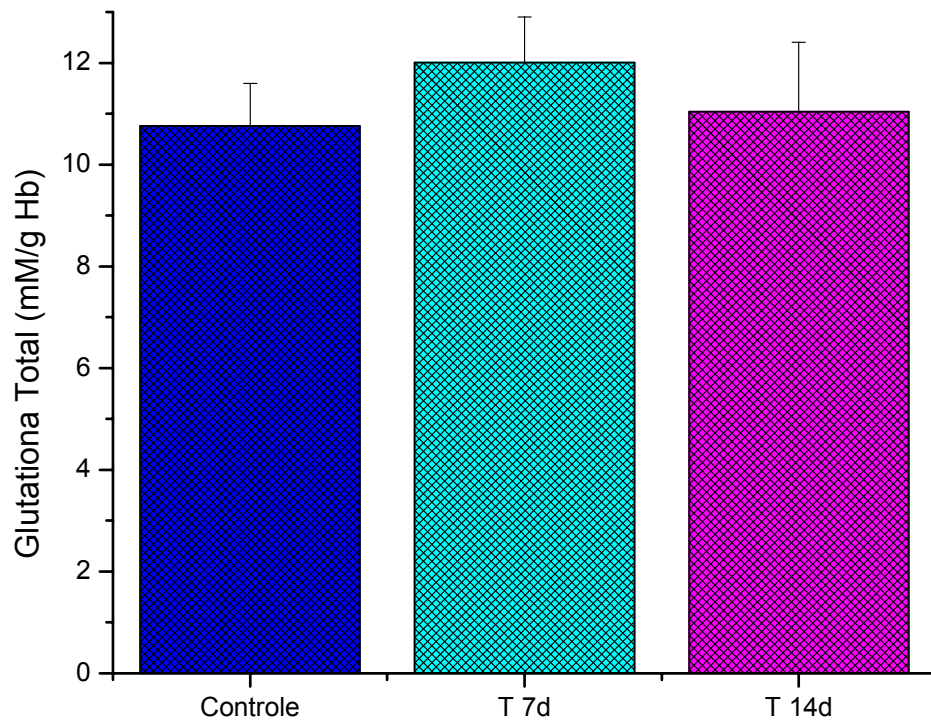


Figura 9 - Concentração de glutathiona total em hemácias. O n foi respectivamente de 27,16 e 14 para os grupos controle, T7d e T14d.

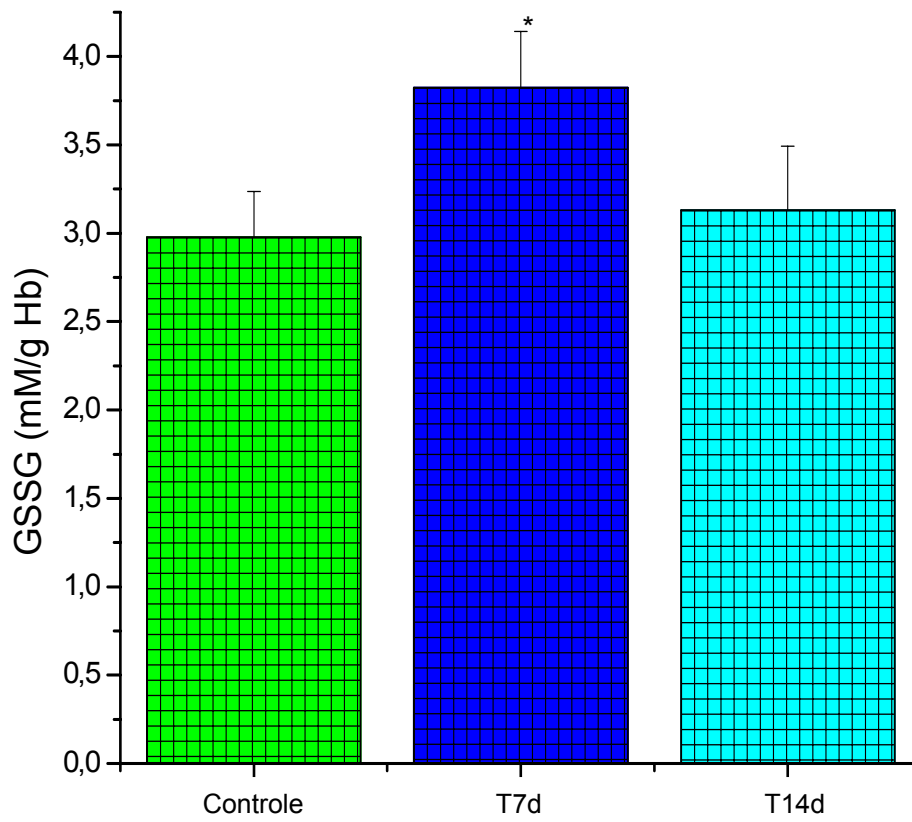


Figura 10 - Glutathiona oxidada em hemácias. \* $p = 0,05$  grupo tumor 7 dias em relação ao controle. n: C = 27; T7d = 16; T14d = 14

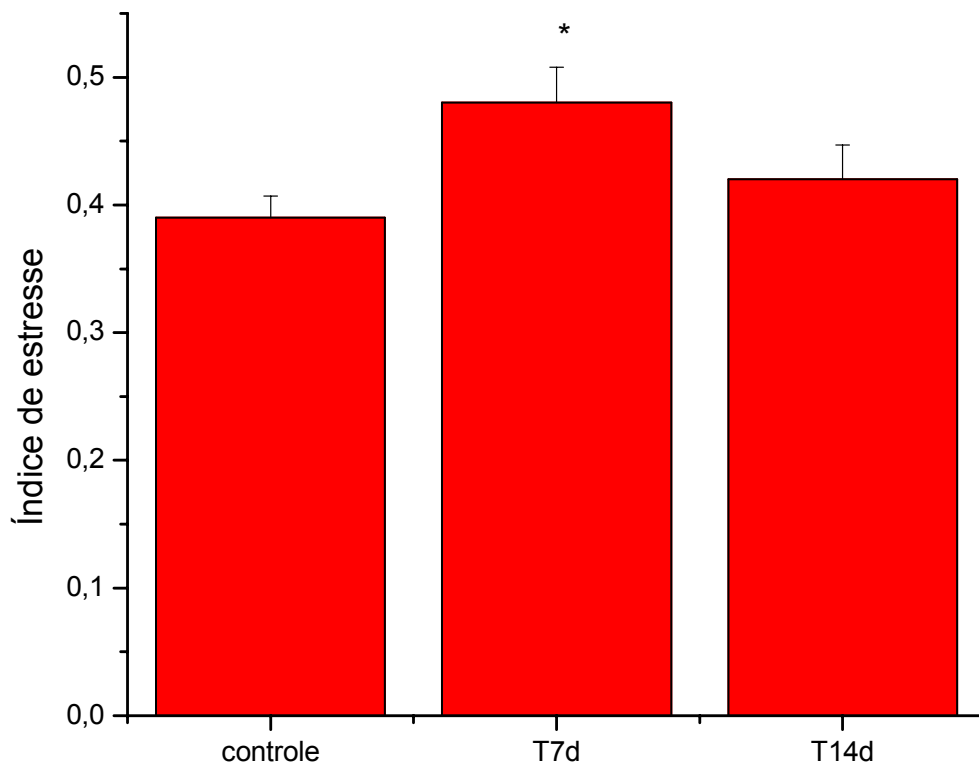


Figura. 11 - Índice de estresse (relação entre glutathiona oxidada e reduzida) obtidas de hemácias. \* $p < 0,01$  grupo tumor sete dias em relação ao controle.

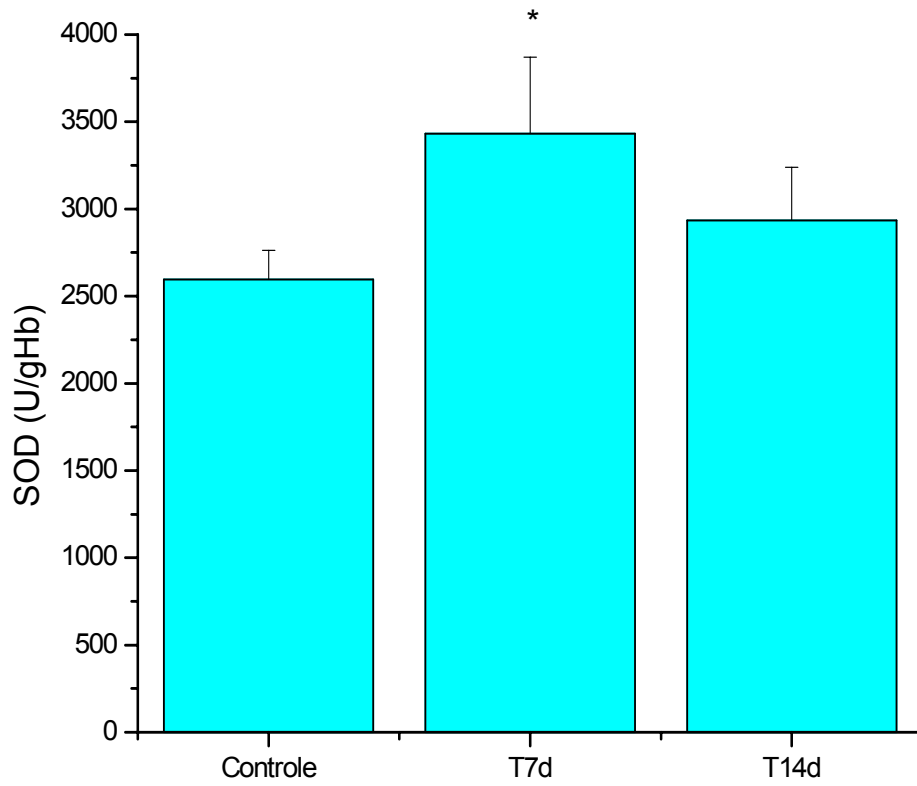


Figura 12 - Atividade da enzima superóxido dismutase em hemácias.  
\* $p = 0,05$  grupo tumor 7 dias em relação ao controle. n: C = 23; T7d = 16;  
T14d = 13

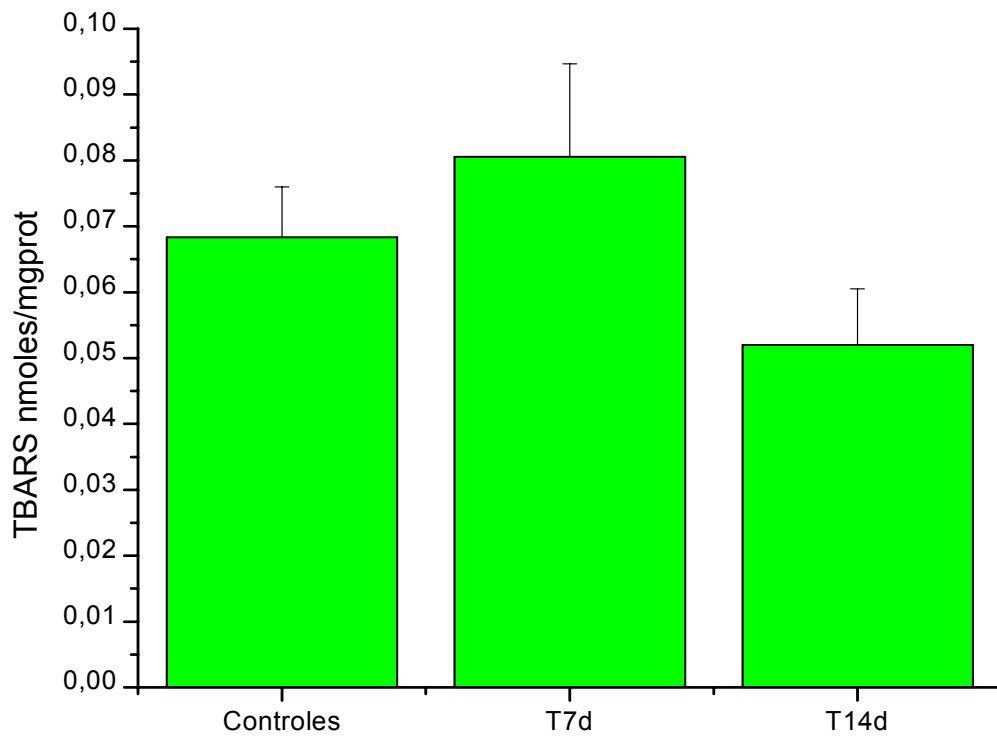


Figura 13 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico quantificadas no plasma.  
n: C= 22; T7d = 16; T14d = 14

## 5 DISCUSSÃO

A síndrome da caquexia está presente em várias patologias, dentre elas o câncer (FEARON & MOSES, 2002). Estudos mostram que as ERO e ERN têm papel importante na perda de massa muscular em animais com caquexia induzida pelo  $TNF\alpha$  (BUCK & CHOJKIER, 1996).

O modelo experimental de caquexia induzida pela inoculação de células tumorais Walker-256, utilizado neste estudo, mostrou-se adequado. Caracterizou-se a síndrome caquética pela perda de massa muscular, redução da ingestão alimentar, perda de massa corpórea e de outros órgãos (figuras 3, 4 e 5 ). Além disto, a redução alimentar na segunda semana não foi proporcional à perda de massa do músculo gastrocnêmio no mesmo período. Isto está de acordo com as observações verificadas no grupo pair-fed. Verificou-se no grupo pair-fed perda muscular bem menor e mais lenta do que a do grupo tumor na mesma fase analisada. Outros trabalhos utilizaram o mesmo modelo de indução de caquexia (FREITAS et al., 2001; GUAITANI et al., 1982; VICENTINO et al., 2002), sendo este um modelo de fácil manutenção que leva a um quadro de caquexia progressiva em até 14 dias.

As alterações metabólicas ocorridas na caquexia têm se tornado foco de intensa investigação (TISDALE, 1997; GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002), entretanto as análises do estresse oxidativo no sangue como reflexo das alterações sistêmicas ocorridas neste estado ainda são escassas e inconclusivas (AYMELEK et al., 2006; NAVARRO et al., 1999). Assim sendo, pela primeira vez um estudo usando o modelo de indução de caquexia pelo tumor de Walker-256, demonstrou de maneira clara o estresse oxidativo no plasma e hemácias de animais com perda progressiva de massa corpórea em diferentes momentos do desenvolvimento da caquexia.

A técnica de QL iniciada por *t*-BOOH é um ensaio sensível que tem sido aplicado para determinar a existência de estresse oxidativo associado a situações patológicas (BOVERIS et al., 1983). Observaram-se lesões oxidativas ou estresse oxidativo prévio através do aumento da concentração de lipoperóxidos no plasma e membrana das hemácias (figura 6) (figura 7) dos animais no sétimo e no décimo quarto dias após a inoculação do tumor. Nas hemácias as lesões oxidativas ocorreram de forma mais intensa em T7d. Verificaram-se também modificações significativas no perfil das curvas de QL que foram mais evidentes no plasma. Esta mudança pode representar alterações físico-químicas nas

partículas de LDL e VLDL, tornando mais acessíveis certas categorias de hidroperóxidos presentes nestas partículas e modificando o perfil de emissão de fótons (PASTORINO et al., 2000; GONZALES-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991; ZAMBURLINI et al. 1995).

O TRAP revela o consumo das defesas antioxidantes não enzimáticas (PRIOR & CAO, 1999; LIU et al., 2003). Os resultados obtidos neste ensaio revelam uma queda de aproximadamente 50% nos níveis da capacidade antioxidante total no plasma de ratos com caquexia no sétimo e décimo quartos dias (figura 8). Isto indica consumo das defesas antioxidantes (principalmente as de baixa massa molecular), devido à presença de  $RO_2^{\bullet}$  no plasma no período analisado. Estes resultados estão em concordância com o observado no início da reação de QL de plasma, aonde ocorreu consumo prévio de antioxidantes e *scavengers* naturais da amostra, estes dados concordam com o aumento de lipoperóxidos.

Os aumentos significativos da concentração de GSSG e do índice de estresse por sua vez, estão de acordo com a elevada concentração de lipoperóxidos encontrada nas hemácias. Reforça estas evidências o aumento significativo da atividade da SOD no 7º dia após a inoculação do tumor. Isto indica reação por parte do hospedeiro com relação à grande demanda de ERO e o ataque destes às hemácias. Uma possível explicação ao aumento da atividade da SOD seria o aumento da oferta de  $O_2^-$  pelos leucócitos do sangue. Nesta fase observou-se também aumento na quantidade dos polimorfonucleares como estudo recente mostrou, (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2004) quando sangue de pacientes com carcinoma de laringe foi analisado. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o tumor induz estresse sistêmico pela geração de ERO e ERN provocando desgaste das defesas antioxidantes e aumentando na concentração de hidroperóxidos na membrana das hemácias e nas lipoproteínas plasmáticas. Este processo estaria ocorrendo, em parte, através da ativação de fagócitos. De fato, tem sido descrito aumento significativo da produção de ERO pelos neutrófilos durante o desenvolvimento do câncer (PUSTOVIDKO et al., 2000). A ativação da cadeia do ácido aracdônico, e das células endoteliais na produção de óxido nítrico e  $O_2^-$  via  $TNF\alpha$  e interleucina-6 também podem estar envolvidas neste processo (BUCK & CHOJKIER, 1996). Alterações metabólicas nas vias mitocondriais oxidativas de diversos tecidos poderiam adicionalmente ser implicadas na geração destas espécies reativas.

No que diz respeito aos antioxidantes, um estudo de pacientes e animais portadores de câncer mostra que altas concentrações de GSSG são observadas com a progressão do câncer, fazendo com que diminua a relação GSH/GSSG (NAVARRO et al., 1999). Outros trabalhos mostram que as concentrações de GSH e vitamina E foram significativamente reduzidas em pacientes com câncer oral nas fases II a IV, quando

comparados com pessoas saudáveis (MANOHARAN, et al., 2005). Em relação à GSH foi encontrada diminuição da concentração no sangue de pacientes com câncer colorretal (UPADHYA, et al., 2004).

Os resultados de lipoperoxidação obtidos a partir da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, não tiveram diferenças significativas entre os grupos (figura 13), entretanto, estudos utilizando esta forma de análise são controversos. Enquanto trabalhos mostram diminuição da concentração de MDA no plasma (ALAGÖL et al., 1999; GERBER et al., 1996) de pacientes com câncer de mama, Huang et al., (1999), encontraram aumento na peroxidação lipídica (aumento de MDA) no soro de pacientes com o mesmo tipo de câncer. Além disto, Samir e El Kohly, (1999), relataram que as concentrações de MDA no plasma foram significativamente aumentadas em pacientes com carcinoma de laringe, sendo que outros trabalhos relatam resultados opostos (NAGINI et al., 1998; NAVARRO et al., 1999; AYMELEK et al. 2006; SEYITHAN, et al., 2003; BAKAN, et al., 2002; UPADHYA, et al., 2004; MANOHARAN, et al., 2005). Portanto interpretações baseadas nesta técnica devem ser analisadas com muita cautela e de preferência acompanhadas de outras análises técnicas mais sensíveis e menos susceptíveis a interferentes.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que os animais portadores de caquexia induzida por tumor de Walker-256 apresentam no sétimo e décimo quarto dias após a inoculação de células tumorais:

- 1 – Aumento na concentração de lipoperóxidos do plasma e membrana das hemácias.
- 2 – Aumento da concentração de GSSG, do índice de estresse e da atividade da SOD nas hemácias.
- 3 – Redução da capacidade antioxidante total do plasma.

Em conjunto, os resultados demonstram pela primeira vez a existência de estresse oxidativo sistêmico na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGÖL, H.; ERDEN, E.; SANCAK, B.; TÜRKMEN, G.; CAMLIBEL, M.; BUGDAYCI, G. Nitric oxide biosynthesis and malondialdehyde levels in advanced breast cancer. **Aust N Z J Surg**, v. 69. p.647-650. Carlton, september 1999.

ALBRECHT, J. and CANADA, T. W. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol. Oncolo. Clin. North. Am.**, v.10,p. 791-800. Philadelphia, august 1996.

ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, F.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Medicinal Researchs Reviews**, v. 17, n.5, p. 477-498. New York, september 1997.

ASTER, J. C. Distúrbios hemorrágicos e dos eritrócitos. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins & Cotran. Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 7<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 267.

AYMELEK, G.; DERYA, E.; SABAHATTIN, A.; MELIH, A.; BOLKAN, S.; MERAL, T. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. **Cell biology International**, v.30, p. 376-380. London, march 2006.

BAKAN, E.; TAYSI, S.; POLAT, F. M.; DALGA, S; UMUDUM, A.; BAKAN, N.; GUMUS, M. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n.5, p. 162-166. Keigaku, may 2002.

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

BAEUEERLE, P. A.; BAICHWAL, V. R. NF- $\kappa$ B as frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. **Adv. Immunol.**, v.6, p.111-137. New York, 1997.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.; VARSAVSKY, A. KOCH, O. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, p.534-541. New York, december 1983.

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. **The EMBO Journal**, v. 15 n.8, p. 1753-1765. Oxford, april 1996.

CASADO, M F, CECCHINI, A L, SIMAO, A N, OLIVEIRA, R D, CECCHINI, R. Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. *Food Chem Toxicol*, v.45, n.6, p. 945-52. Jun, 2007):.

CLEMENS, R. M.; WALLER, H. D; Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 45, p. 251-268. Amsterdam, november 1987

CLEMENT, M. V.; RAMALINGAM, J.; LONG, L. H.; HALLIVELL B. The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. **Antioxid. Redox signaling**, v. 3, p.157-163. Larchomont, february 2001.

DRABKIN, D.L., AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 98, p. 719-733, 1932.

FEARON, C. H. & MOSES, G. W. Cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 85, n. 1, p. 73-81, september 2002

FERREIRA, A. L. A. ; MACHADO, P. E. A; MATSUBARA, L.S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo,v. 32, p. 689-694.

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

GERBER, M.; ASTRE, C.; SEGALA, C.; SAINTOT, M.; SCALI, J.; SIMONY-LAFONTAINE J.,et al. Oxidant-antioxidant status alteration in cancer patients: relationship to tumor progression. **J Nutr** , v. 126, p. 1201S-1207S. Phyladelphia 1996.

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

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

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v. 39, n 3, p. 173-178. Basel, 1982.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** (4<sup>th</sup> edn.), Clarendon Press, Oxford, in the press. 2006

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C., **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press. 1999. 3<sup>a</sup> edition.

HUANG, S. S.; ZHENG, R. L. Biphasic regulation of angiogenesis by reactive oxygen species. **Pharmazie**, v. 61, p. 223-229. Toronto 2006.

HUANG, Y.L.; SHEU, J. Y.; LIN, T. H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clin Biochem**, v. 32, p.131-136. Toronto, march 1999.

HUNT, C. R.; SIM, J.E.; SULLIVAN, J. S.; FEATHRSTONE, T.; GOLDEN W.; KAPPHERR, C. V.; HOCK, R. A.; GOMEZ, A. J. Parsian and D.R. Spitz, Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. **Cancer Res.**, v. 58, n 17 p. 3986-3992. Chicago, September 1998.

JENTZCH, A. M., BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESLAKI, H. K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Rad Biol Méd**,; v. 20, n 2, p. 251-256. New York, 1996

KAMIGUTI, A. S., SERRANDER, L., LIN, K., HARRIS, R. J., CAWLEY, J. C., ALLSUP, D. J., SLUPSKY, J. R., KRAUSE, K. H. AND ZUZEL, M. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. **J. Immunol**, v. 175, 8424–8430. Baltimore, december 2005.

LIU, X.; ZHAO J.; ZHENG, R. DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. **Mutat Res.** ,v. 539, p. 1-8, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** , v.193, n. 1, p. 265. Baltimore, 1951.

MANOHARAN, S.; KOLANJIAPPAN, K., SURESCH,; PANJAMURTHY, K. Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma. **Indian J. Med. Res.**, v. 122, p. 529-534. New Delhi, december 2005.

MANTOVANI, G.; MACCIÓ, A. ; MADEDDU C,; MURA L.; MASSA, E.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M. R.; MURGIA, V.; CAMBONI, P.; FERRELI, L. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. **J. Cell. Mol. Med**, v. 6, n.4, p. 570-582. Philadelphia, december 2002.

MARKLUND, S. A.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pirogallol and convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, p. 469-474. Berlin, september 1974.

MILLS, E. M.; TAKEDA Z. X.; FERRANS Yu V.; KATAGIRI, Y.; JIANG,H.; LAVIGNE, M. C.; LETO,T. L. ; GUROFF, G. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n 35, p. 22165-22168. Baltimore, august 1998.

MUNDAY, R. **Methods enzymol.**, v. 231, p. 117-120, New York 1995.

NAGINI, S.; MANOHARAM, S. RAMACHANDAN, C. R. Lipid peroxidations and antioxidants in oral squamous cell carcinoma. **Clin Chim Acta**, v. 273, p. 95-98, Amsterdam 1998.

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 Radic. Biol. Med.** v.26, n 3-4, p. 410-418. New York, February 1999.

OKADA, F., KOBAYASHI, M., TANAKA, H., KOBAYASHI, T., TAZAWA, H., IUCHI, Y., ONUMA, K., HOSOKAWA, M., DINAUER, M. C. AND HUNT, N. H. The role of nicotinamide adeninedinucleotide phosphate oxidase-derived reactive oxygen species in the acquisition of metastatic ability of tumor cells. **Am. J. Pathol.** v. 169, 294–302. Phyladelphia, july 2006.

PASTORINO, A.M., MAIORINO, M., URSINI, F. Kinetic analysis of lipid-hydroperoxides in plasma. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 29, 397 – 402, 2000.

PAYNE, S. L., FOGELGREN, B., HESS, A. R., SEFTOR, E. A., WILEY, E. L., FONG, S. F., CSISZAR, K.,HENDRIX, M. J. AND KIRSCHMANN, D. A. Lysyl oxidase regulates

breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. **Cancer Res.** v.65, 11429–11436. Chicago 2005.

PELICANO, H., CARNEY, D. AND HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist. Updates**, v.7, 97–110. Edinburgh, april (2004)

PRIOR, R. L. & CAO, G. In vivo antioxidant total capacity: comparison of different analytical methods. **Free radical biology & medicine**, v. 27, nos.11/12 p. 1173-1181. New York, december 1999.

PUSTOVIDKO, A. V.; PODSELUEVA, M.M.; EVTODINKO, Y. V. Generation of reactive oxygen species by polimorfonuclear leukocytes and its modulation by calcium ions during tumor growth. **JUBMB Life**, v. 50, p. 256-268. London, july 2000.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. G. C.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clínica Química Acta**, v. 255: p. 107-117. Amsterdam, november 1996.

SAMIR, M; KHOLY, E. N. M. Tiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. **Clin Otolaryngol** 24, n 3, p 232-234. Oxford, june 1999.

SEM, C. K.; SIES, H.; BAURELE, P. A. **Antioxidant and redox regulation of genes reactive oxygen species as costimulatory signal of cytokine-induced NF-κB activation pathways.** pp 181-198. Academic Press. San Diego. California, USA 2000.

SENTÜRKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MÜSLÜMANOĞLU, H.; GEDIKOĞLU, G.; DIZDAROĞLU, M. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. **FEBS Letters**, v. 416, n 3, p. 286-290, Amsterdam, october 1997.

SEYITHAN, T.; CELIL, U.; FATIH A. ; MEHMET Y. S. Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. **Surgery today**, v.33, p. 651-654. Tokyo, september 2003.

SUBAPRIYA, R.; KUMARAGURUPARAN, R. RAMACHANDRAN, C. R.; NAGINI, S. Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. **Clin Biochem**, v. 35, n 6, p. 489-493. Toronto, september 2002.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer res**, v. 51, p. 794-798. Baltimore, 1991.

SZUSTER -CIESIELSKA, A.; HRYCIUK-UMER, E.; STEPULAK A.; KUPISZ, K.; KANDEFER-SZERSZEN. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. **Acta oncologica**, v.43, n.3, p. 252-258 Madrid, april 2004.

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

TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **J. Natl. Cancer Inst.** v.89, p. 1763-1773, Bethesda, december 1997.

TISDALE, M. J.; Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v.17, n.5, p. 438-442. Burbank, may, 2001.

TISDALE, M. J.; Metabolic abnormalities in aquaria and anorexia. **Nutrition**. v.16 p. 1013-1014. Bumbank, october 2000.

TISDALE, M. J. The 'cancer cachetic factor'. **Supportive care in cancer**, v. 11, n 2, p. 73-78, Berlim 2004.

TORSONI, M. A.; OGO S. H. Hemoglobin-sulfhydryls from tortoise (*Geochelone carbonaria*) can reduce oxidative damage induced by organic hydroperoxide I erythrocyte membrane. **Comparative Biochemystry and Physiology**, Part B.v.126, p. 571-577. Oxford, august 2000.

UPADHYA, Sh.; UPADHYA, Su.; MOHAN, K.; VANAJAKSHAMMA, M. K.; KUNDER, M.; MATHIAS, S. Oxidant-antioxidant status in colorretal câncer patients-before and after treatment. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 80-83. Chandirgarh, 2004.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J. BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumor bearing rats. **Liver**, v. 22, n 4, p. 342-350. Oxford, august 2002

ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; BARBERA, P.; PASTORINO A. M.; ROVERI, A.; COMINACINI, L.; URSINI. F. Measurement of lipids hydroperoxides in plasma lipoproteins by a new high- sensitive "sonle photon couting" luminometer. **Biochim Biophys Acta** v. 1256, p. 233-240. Amsterdam, 1995.

ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES, G.L.. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical inhibitor AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture . **Life Science**, v. 69, p.75-86. Oxford, 2001