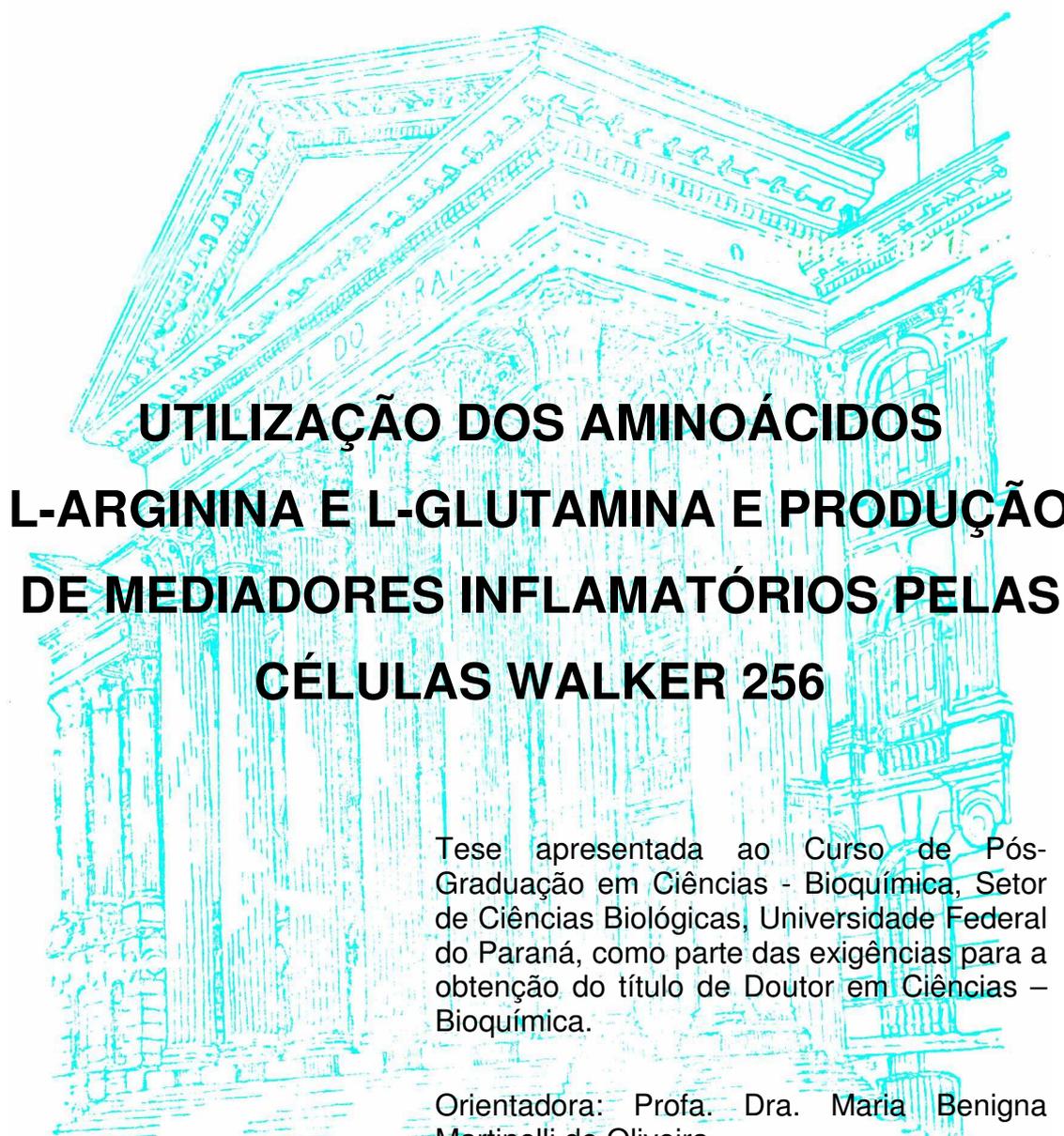


**ROSILENE REBECA**



**UTILIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS  
L-ARGININA E L-GLUTAMINA E PRODUÇÃO  
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PELAS  
CÉLULAS WALKER 256**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

**Curitiba  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ROSILENE REBECA**

**UTILIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS  
L-ARGININA E L-GLUTAMINA E PRODUÇÃO  
DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PELAS  
CÉLULAS WALKER 256**

**Curitiba  
2008**

Dedico esse trabalho ao filósofo Cláudio Ulpiano (*in memoriam*), pela beleza e generosidade de seus ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira (*in memoriam*), pela qual tenho grande admiração e afeto.

À minha orientadora Dra. Maria Eliane Merlin Rocha pelo apoio, determinação e paciência para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

Aos meus pais, Lauro e Nair, pelo carinho, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu filho, Celso, pela compreensão e corajoso companheirismo durante o período em que me aventurei para o mestrado e o doutorado.

À Prof. Dra. Glaucia Regina Martinez, pela orientação nos ensaios realizados em HPLC e pela amizade e dedicação.

À Prof. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto, pela amizade, orientação, carinho e por me ajudar a vencer a ansiedade e a enfrentar minhas deficiências, valorizando generosamente minhas qualidades. Muito Obrigada!

Aos professores do laboratório de Oxidações Biológicas, Eva e Silvia que me ajudaram rotineiramente a solucionar problemas.

Ao meu colega de trabalho, Wellington Luciano Braguini, pela orientação, paciência e respeito durante o estágio no laboratório.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que de alguma maneira trabalharam para o desenvolvimento desse estudo, seja em conhecimento teórico ou prático.

Aos amigos do laboratório de Oxidações Biológicas: Priscila, André, Gerusa, Ana Paula, Carol, Gláucio, Paulo Worfel, Amanda, Vivi, Paulinho, Tati e Fabiana. A Silvia Romão e a Lívia pela colaboração e troca de idéias para melhorar os experimentos.

A Stelia e Tatiana, meu eterno afeto pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos que encontrei durante as disciplinas Lívia Bracht, Mariana Maia, Rafael Eto e André Dedecek pelo carinho e amizade.

Aos colegas Juliana, Lú, Marco, Ricardo e Diogo, vizinhos do laboratório de Carboidratos, pelos diversos empréstimos e troca de gentilezas.

À Silvana, técnica do laboratório, pela amizade e participação no bom andamento da rotina do laboratório.

À D. Marilza, pela amizade e gentileza que me recebeu em todas as vezes que precisei da Secretaria.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela obtenção das micrografias eletrônicas.

À Profa. Dr. Lucélia Donatti, pela análise das imagens e preparo das micrografias eletrônicas.

Ao suporte financiamento do CNPq (bolsa), CNPq – PRONEX e UNICENTRO.

*“Um escritor não deve considerar a pátria como uma coisa pronta. Pelo contrário, deve admitir que sua obra colabora para dar consistência, força e beleza à Pátria - e que esta, se distingue pelos trabalhos de seus artistas e cientistas, de seus pensadores.”*

**Cláudio Ulpiano**

## RESUMO

A caquexia neoplásica envolve uma complexa rede de variáveis metabólicas, nas quais estão implicados diversos mediadores químicos que podem atuar como iniciadores ou perpetuadores deste processo. As células Walker 256 são utilizadas como modelo para o estudo desta síndrome. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização dos aminoácidos L-glutamina e L-arginina como substratos metabólicos, assim como a produção de alguns mediadores inflamatórios secretados por estas células que podem contribuir para a progressão do estado caquético. Algumas características morfológicas do tumor ascítico de Walker foram descritas. Foram analisadas a produção de L-lactato, espectrofotometricamente pela produção de NADH e a atividade das glutaminases (dependente de fosfato e independente de fosfato) em um ensaio acoplado com a glutamato desidrogenase, como índices da efetividade desta via nas células do tumor ascítico de Walker 256. Desde que os mediadores inflamatórios estão envolvidos na manifestação desta síndrome, a produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela produção de nitrito. Além disso, as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) (kit Amersham Bioscience) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (kit Cayman Chemical) foram avaliadas por nas células Walker 256 isoladas a partir do tumor ascítico. Após 4 ou 5 horas, um aumento significativo na produção de NO foi observada. Quando isoladas a partir do tumor ascítico 6 dias após o implante, foi detectada uma menor produção de IL-6 e maior produção de TNF- $\alpha$  em relação ao tumor com 4 dias após o implante, indicando uma relação entre a produção de citocinas e o tempo de desenvolvimento do tumor. Foi também observada uma produção aumentada de PGE<sub>2</sub> pelas células Walker 256 isoladas do tumor com seis dias após o implante. As poliaminas também foram determinadas por HPLC nas células Walker 256. Os níveis de putrescina, espermidina e espermina não mostraram diferenças significativas ao longo do desenvolvimento do tumor com 4 ou 6 dias após o implante. Evidências diretas da liberação de citocinas pró-inflamatórias e de PGE<sub>2</sub> pelas células Walker 256 sugerem que esses mediadores podem dirigir a síndrome caquética no hospedeiro, sendo este efeito dependente do tempo de desenvolvimento do tumor.

Palavras-chave: Tumor de Walker 256, caquexia, mediadores pró-inflamatórios, poliaminas.

## ABSTRACT

The neoplastic cachexia evolve the complex net of metabolic variables, which are concerned several chemical mediators seem to act as initiators or perpetuators of this process. Walker 256 cells are used as model for the study of this syndrome. The objective of this research was to evaluate the utilization of L-glutamine and L-arginine as metabolic substrates and the production of substances secreted by these cells that may contribute to the progression of the cachectic state. The L-lactate production was detected spectrophotometricly by NADH production and the glutaminase activities (Pi-dependent and Pi-Independent of phosphate) by assay coupled to glutamate desidrogenase to denote the effectivity of glutaminolitic pathway in cells of Walker 256 ascitic tumor. Since inflammatory mediators seem to be involved in the manifestation of this syndrome, the *in vitro* production of nitric oxide (NO) was detected by nitrite production. Therefore the cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) (kit Amersham Bioscience) and prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) (kit Cayman Chemical) were evaluated in Walker 256 cells isolated from ascitic tumors. After 4 or 5 h, a significant increase in NO production was observed. When isolated from a 6-day-old tumor, a significantly lower production of IL-6 and higher production of TNF- $\alpha$  than cells from a 4-day-old tumor were observed, indicating a relationship between the production of cytokines and the time of tumor development after implantation. Considerable production of PGE<sub>2</sub> by Walker 256 cells isolated from the 6-day-old tumor was also observed. Polyamines were also determined by HPLC in Walker 256 cells. Levels of putrescine, spermidine and spermine did not show significant differences in tumors developed during four or six days. Direct evidence of the release of proinflammatory cytokines and PGE<sub>2</sub> by Walker 256 cells suggests that these mediators can drive the cachectic syndrome in the host, the effect being dependent on tumor development time.

**Key words:** Walker 256 tumor; cachexia, pro-inflammatory mediators, polyamines.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GLUTAMINÓLISE E O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO TRUNCADO	28
FIGURA 2 - VIAS RELACIONADAS À UTILIZAÇÃO DA L-ARGININA E DA BIOSÍNTESE DE POLIAMINAS EM MAMÍFEROS	31
FIGURA 3 - VIA DE SÍNTESE DA ESPERMINA	33
FIGURA 4 – CÉLULAS WALKER 256 ISOLADAS A PARTIR DO FLUÍDO ASCÍTICO	69
FIGURA 5 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS WALKER 256	71
FIGURA 6 – CÉLULAS WALKER 256 EM PROCESSO APOPTÓTICO	72
FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE L-LACTATO PELAS CÉLULAS WALKER 256	75
FIGURA 8 - ATIVIDADE DA GLUTAMINASE EM EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS WALKER 256	78
FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE URÉIA PELA ARGINASE EM FUNÇÃO DO TEMPO	81
FIGURA 10 - ATIVIDADE DA ARGINASE EM EXTRATOS DE CÉLULAS WALKER 256	84
FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE NO PELAS CÉLULAS WALKER 256	87
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DAS POLIAMINAS (PUTRESCINA, ESPERMIDINA E ESPERMINA)	91
FIGURA 13- PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR.	99
FIGURA 14 - PRODUÇÃO DE PGE <sub>2</sub> PELO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256	102

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA GLUTAMINASE INDEPENDENTE DE FOSFATO	79
TABELA 2 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ARGINASE EM EXTRATOS DE CÉLULAS WALKER 256 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR ASCÍTICO COM 4 E 6 DIAS APÓS O IMPLANTE	83
TABELA 3 - PRODUÇÃO DAS POLIAMINAS PUTRESCINA, ESPERMIDINA E ESPERMINA PELAS CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256 OBTIDAS DE TUMORES COM 4 E 6 DIAS APÓS O IMPLANTE	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC - Adenosina monofosfato cíclica

BSA - Albumina bovina

cGMP - Guanosina monofosfato cíclica

CAT – Transportador de aminoácido catiônico

COX – Ciclooxigenase

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FADD - FAS-associated death domain

GDH – Glutamato desidrogenase

GLA - Ácido  $\gamma$ -linolênico

GSH – Glutaciona reduzida

HBSS - Solução balanceada de Hanks

HEPES - N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 2-etano sulfônico)

HRP - Horsedish peroxidase

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

INF- $\gamma$  Interferon gama

JAK2 - Janus activation kinases

LIF - Fator inibidor de leucemia

LMF - Fator de mobilização de lipídios

L-NAME - NG-nitro-L-arginine methyl ester

LPS – Lipopolissacarídeo

M2PK - piruvato quinase do tipo M2

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida

NF- $\kappa$ B – Fator transcricional nuclear kappa B  
NO - Óxido nítrico  
NOS - Óxido nítrico sintase (NOS I)  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível (NOS II)  
eNOS - Óxido nítrico sintase (NOS III)  
NTPDases- Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases  
ODC – Ornitina descarboxilase  
PBS - Solução salina fosfato tamponada  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PIF - Fator indutor de proteólise  
RNS - Espécies reativas de nitrogênio  
ROS - Espécies reativas de oxigênio  
SFB - Soro fetal bovino  
SSAT - S-adenosiltransferase  
STAT (1 e 3) – Signal Transducers and Activators of Transcription  
TMB - Tetramethylbenzidine  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
TNFR – Receptor para TNF- $\alpha$   
TRIS - Tris (hidroximetil) amino metano  
TRADD - TNFR-associated death domain  
YAH – Hepatoma ascítico de Yoshida

## **ÍNDICE**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>22</b>
<b>2.1. SÍNDROME DE CAQUEXIA</b>	<b>22</b>
<b>2.2. ASPECTOS GERAIS DE CÉLULAS TUMORAIS</b>	<b>23</b>
2.2.1. Utilização dos aminoácidos L-glutamina e L-arginina pelas células tumorais	24
2.2.1.1. L-Glutamina	25
2.2.1.2. L-Arginina	29
<b>2.3. FATORES MEDIADORES DA CAQUEXIA DO CÂNCER</b>	<b>33</b>
2.3.1. Fatores Humorais	34
2.3.2. Fatores Tumorais	34
<b>2.4. CARCINOMA DE WALKER 256</b>	<b>36</b>
<b>2.5. BIOSÍNTESE DE POLIAMINAS</b>	<b>40</b>
<b>2.6. SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO</b>	<b>41</b>
<b>2.7. CITOCINAS</b>	<b>44</b>
2.7.1. Interleucina 6 (IL-6)	44
2.7.2. Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	45
<b>2.8. PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)</b>	<b>46</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>52</b>
<b>5 MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>5.1. ANIMAIS</b>	<b>53</b>
<b>5.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS WALKER 256</b>	<b>52</b>
<b>5.3. MORFOLOGIA DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER</b>	<b>54</b>

5.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura.	54
5.3.2. Microscopia Eletrônica de transmissão	55
<b>5.4. UTILIZAÇÃO DA L-GLUTAMINA PELAS CÉLULAS WALKER 256</b>	<b>56</b>
5.4.1. Produção de L-lactato pelas células Walker 256	56
5.4.2. Preparação das Células Walker 256 para determinação da atividade da glutaminase (E.C. 3.5.1.2.)	56
5.4.2.1. Determinação da Atividade da Glutaminase dependente de Fosfato	56
5.4.2.2. Determinação da Atividade da Glutaminase independente de Fosfato	58
<b>5.5. UTILIZAÇÃO DA L-ARGININA PELAS CÉLULAS WALKER 256</b>	<b>60</b>
5.5.1. Determinação da produção de uréia pelas células Walker 256 íntegras	60
5.5.1.1. Dosagem de uréia	60
5.5.2. Determinação da Atividade da Arginase em Extratos de Células Walker 256	61
5.5.3. Determinação da Produção de Óxido Nítrico pelas Células Walker 256	62
5.5.4. Atividade da Agmatinase	63
5.5.5. Determinação da Ocorrência das Poliaminas Putrescina, Espermidina e Espermina em células Walker 256	64
<b>5.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO IN VITRO DAS CITOCINAS IL-6 E TNF-<math>\alpha</math> PELAS CÉLULAS WALKER 256</b>	<b>65</b>
<b>5.7. PRODUÇÃO IN VITRO DE PGE<sub>2</sub></b>	<b>66</b>
<b>5.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS</b>	<b>66</b>
<b>5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>67</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>6.1. MORFOLOGIA DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256</b>	<b>70</b>
<b>6.2. UTILIZAÇÃO DA L-GLUTAMINA PELAS CÉLULAS WALKER 256</b>	<b>73</b>

6.2.1. Produção de L-Lactato	73
6.2.2. Glutaminase Dependente de Fosfato	75
6.2.3. Glutaminase Independente de Fosfato	78
<b>6.3. UTILIZAÇÃO DA L-ARGININA PELAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE POLIAMINAS – ARGINASE E AGMATINASE E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA NOS</b>	<b>80</b>
6.3.1. Atividade da Arginase em Células Walker 256 Inteiras	80
6.3.2. Atividade da Arginase em Extratos de Células Walker 256	82
6.3.3. Produção de Óxido Nítrico pelas Células Walker 256	85
6.3.4. Atividade da Agmatinase	88
6.3.5. Detecção de Poliaminas produzidas pelas Células do Tumor Ascítico de Walker 256	89
<b>6.4. PRODUÇÃO DE CITOCINAS</b>	<b>93</b>
6.4.1. Produção <i>in vitro</i> de IL-6	94
6.4.2. Produção <i>in vitro</i> de TNF- $\alpha$	96
<b>6.5. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PGE<sub>2</sub></b>	<b>100</b>
<b>7 DISCUSSÃO FINAL</b>	<b>103</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b>	<b>107</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>109</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Dados estatísticos demonstram que pacientes portadores de câncer avançado desenvolvem graves distúrbios metabólicos, que são decorrentes da competição por nutrientes estabelecida entre o tumor e o organismo hospedeiro (ARGILÉS *et al.*, 2006). Os pacientes perdem peso, apresentam lipólise acentuada, perda de proteínas musculares e viscerais, anorexia, náusea crônica e fraqueza (MARTIGNONI *et al.*, 2003). Tais sintomas conhecidos por caquexia associada ao câncer, têm considerável importância, já que existe uma clara correlação inversa entre o grau de caquexia e o índice de sobrevivência dos pacientes. A caquexia é descrita em 70% dos pacientes portadores de câncer avançado e via de regra, é *causa mortis* de até 25% dos casos observados para esta condição (KOTLER, 2000).

O jejum intenso decorrente da anorexia, própria desta síndrome, desencadeia importantes desvios metabólicos no hospedeiro, os quais estão associados à presença de diferentes fatores circulantes, tanto humorais como de origem tumoral. Dentre as substâncias humorais que possuem papel chave no estabelecimento da síndrome caquética estão as citocinas. Estes mediadores são produzidos pela maioria das células do organismo, sendo que os macrófagos constituem a principal fonte destas moléculas (SAINI *et al.*, 2006). É bem estabelecido que os macrófagos possuem um alto potencial secretório, sendo responsáveis pela liberação de centenas de substâncias que incluem as citocinas e o óxido nítrico, porém, pouco se tem investigado sobre o potencial de produção destas moléculas sinalizadoras pelas próprias células tumorais (BEN-BARUCH, 2006).

Estudos recentes indicam que as citocinas imunossupressoras secretadas pelas células tumorais podem comprometer a resposta do hospedeiro, enquanto que aquelas que ativam as células T e mediam a atividade imunológica podem induzir ou aumentar a imunidade contra os tumores (BELARDELLI *et al.*, 2002). Vários trabalhos têm investigado o papel das citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da síndrome de caquexia, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (ARGILÉS *et al.*, 2005).

As células do tumor de Walker 256 vêm sendo utilizadas em vários estudos sobre a patofisiologia do câncer e a síndrome de caquexia (GUAITANI *et al.*, 1983; HE *et al.*, 2003; IKEDA *et al.*, 2004) e mais recentemente, também vêm sendo utilizadas em modelos para o estudo da dor característica do câncer (MAO-YING *et al.*, 2006; ROSSY *et al.*, 2007; BRIGATTE *et al.*, 2007). Em ratos inoculados com estas células o tumor cresce em um período curto (5 a 8 dias), aparentemente sem causar distúrbios fisiológicos. Este período subitamente é interrompido pelo período de crescimento rápido do tumor, que é concomitante a mudanças metabólicas intensas no hospedeiro (BUFFON *et al.*, 2006). Embora estas células sejam muito utilizadas como modelo de estudo do processo caquético, pouco se conhece sobre o metabolismo de aminoácidos das mesmas e tampouco sobre a produção de compostos que participam do estabelecimento do quadro de caquexia, característico dos animais portadores do tumor ascítico.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a operacionalidade de algumas vias metabólicas e quais substâncias seriam secretadas por essas células que poderiam contribuir com o desenvolvimento e ou progressão para o

estado caquético. Em tumores Walker 256 na forma ascítica foram investigadas algumas vias de utilização dos aminoácidos L-glutamina e L-arginina e a produção das poliaminas putrescina, espermidina e espermina, bem como a liberação de mediadores tais como o óxido nítrico (NO), as citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A avaliação da produção destes mediadores neste modelo de estudo para essa síndrome, disponibilizará um melhor entendimento que contribuirá para o desenvolvimento de novas drogas e tratamento para tumores em que a caquexia ocorre, como uma manifestação paraneoplásica em organismos hospedeiros.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. SÍNDROME DE CAQUEXIA

O termo “cachexia” etimologicamente é originário do grego e tem o seguinte significado “kakos = ruim” e “hexis = estado, condição”. A caquexia consiste de um complexo estado metabólico de grande debilidade do organismo que se caracteriza por perda de peso involuntária e progressiva, depleção da maioria das reservas do tecido adiposo e músculo esquelético que contribuem significativamente para a mortalidade dos pacientes (YOUNES e NOGUCHI, 2000; MARTIGNONI *et al.*, 2003). Pelo menos a metade dos pacientes com câncer, especialmente aqueles que apresentam tumores sólidos como os tumores pulmonares e gastrointestinais, dentre outros, são portadores da síndrome caquexia-anorexia (INUI, 1999).

A síndrome da caquexia envolve uma complexa rede de variáveis metabólicas e comportamentais levando ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer (TISDALE, 1997). Embora a etiologia desta síndrome ainda não esteja totalmente definida, esta parece estar relacionada aos níveis de hormônios circulantes, à produção de neuropeptídeos e neurotransmissores, à produção de citocinas por células da defesa imunológica e a fatores secretados pelo próprio tumor (PLATA-SALAMAN, 1991; SCHWARTZ *et al.*, 1995, TISDALE, 2002).

A caquexia pode ser visualizada como uma manifestação clínica crônica em resposta a um processo inflamatório sistêmico (RUBIN, 2003a), com alta taxa de síntese hepática de proteínas resultando na depleção de aminoácidos

essenciais e no aumento do metabolismo de gorduras, levando o organismo à perda significativa de massa corporal (KOTLER, 2000).

## **2.2. ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS**

As complexas adaptações no metabolismo intermediário das células tumorais caracterizam-se por um desequilíbrio que favorece a proliferação celular. Estas células podem utilizar virtualmente qualquer substrato como glucose, lipídios ou aminoácidos, cuja importância relativa varia de acordo como o tipo e estágio de desenvolvimento de um determinado tumor. A utilização dos carboidratos como substrato das células tumorais é, entre as vias metabólicas, a mais compreendida (WILLIAMS e SIDIQI, 1990).

Um dos mecanismos básicos envolvidos no desequilíbrio metabólico referente ao metabolismo de carboidratos das células tumorais e daquelas normais, porém, sujeitas à rápida proliferação, refere-se ao Efeito Crabtree, que se caracteriza por uma atividade respiratória diminuída durante a utilização da glucose. O mecanismo molecular envolve a presença de um tipo de isoenzima da piruvato quinase que, nas células tumorais é do tipo M2 (ou K), a qual é estimulada por frutose-1,6-bisfosfato (F-1,6-bisfosfato) e fortemente inibida por L-aminoácidos como alanina, fenilalanina, cisteína e leucina (GOSALVEZ *et al.*, 1975; MELO *et al.*, 1998; MAZUREK e EIGENBRODT, 2003). Essa enzima é inativada por fosforilação via proteína quinase independente de adenosina monofosfato cíclica (AMPc).

Outras enzimas da célula tumoral com características peculiares quanto a sua regulação seriam a hexoquinase e a fosfofrutoquinase 1 (EINGEBRODT e GOSSMANN, 1980). Devido à rápida utilização da glucose, os níveis desse

monossacarídeo detectados nos tumores em si e no seu meio circundante em relação às células normais são extremamente baixos, beneficiando o tumor e sua competição pela glucose com os demais tecidos (ARGILÉS e AZCÓN-BIETO, 1988).

As células em proliferação demandam intermediários supridos pelo desvio do fluxo de carbonos da glucose em direção à síntese de ácidos nucléicos através da produção de intermediários da via das pentose-fosfato, bem como de fosforibosilpirofosfato (fosforibosilPP). Outras características são: a baixa relação NADPH/NADP<sup>+</sup>, a baixa capacidade de regenerar NADPH e glutathiona reduzida (GSH) e níveis elevados de F-1,6-bisfosfato. (EINGEBRODT e GOSSMANN, 1980). Nas células tumorais, as mitocôndrias apresentam-se em número reduzido (PEDERSEN, 1978). Em diferentes modelos de tumores animais, como por exemplo, o Carcinoma de Walker 256, a extensão da dissociação entre a respiração e a fosforilação aumenta com o estágio do crescimento do tumor e o grau de malignidade (MAZUREK *et al.*, 2005).

Em relação aos lipídios, em particular os ácidos graxos, podem ser captados pela célula tumoral com um destino energético. Em relação à possibilidade de utilização de corpos cetônicos, existem poucas informações na literatura.

### **2.2.1. UTILIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS L-GLUTAMINA E L-ARGININA PELAS CÉLULAS TUMORAIS**

Quanto à utilização de aminoácidos, os tumores também apresentam características que lhes são peculiares. Certos aminoácidos são essenciais para o crescimento de tumores, sendo este o caso da asparagina e da glutamina, e em condições de estresse da L-arginina.

### 2.2.1.1. L-GLUTAMINA

A glutamina tem sido considerada o principal combustível e fonte de nitrogênio para as células tumorais, visto ser esta um importante precursor na síntese de purinas. Além disso, sabe-se que os aminoácidos isoleucina e valina são oxidados por alguns tipos de hepatomas de Morris (EINGEBRODT e GOSSMANN, 1980).

A glutamina é o combustível energético das células sujeitas à proliferação tais como linfócitos, enterócitos e células tumorais. Além da síntese protéica, o aminoácido é utilizado como precursor da síntese de DNA e de glutathione. Segundo YOSHIDA *et al.* (2001), a administração suplementar de glutamina poderia atenuar a perda de proteína muscular em animais portadores de tumor de mama e colaborar com a proteção imune. Porém, tal procedimento tem sido questionado porque poderia potencialmente contribuir para o aumento do crescimento tumoral.

Segundo BODE *et al.* (1995), a expressão de transportadores de L-glutamina de alta afinidade e dependentes de Na<sup>+</sup> é responsável pelo aumento de 10 a 30 vezes na velocidade do transporte de L-glutamina em células de hepatoma quando comparada com a captação de L-glutamina em hepatócitos normais.

A conversão de L-glutamina em L-lactato por algumas células tumorais é designada glutaminólise, em analogia à glicólise (Figura 1). O principal papel da via glutaminolítica nas células tumorais é a geração de energia. A maioria das células tumorais caracteriza-se por apresentar alta capacidade glutaminolítica (REITZER *et al.*, 1979; MAZUREK *et al.*, 1997; LOBO *et al.*, 2000). Esta capacidade para a obtenção de energia a partir da L-glutamina deve-se ao

fato de as células tumorais serem capazes de sobreviver em um ambiente cujas variações no suprimento de nutrientes e oxigênio são constantes, dependendo da distância em que se encontrem dos vasos sanguíneos. Tais circunstâncias configuram uma demanda metabólica particular, dotada de características metabólicas que incluem o desvio do fluxo de carbonos da glucose em direção à síntese de ácidos nucléicos e à baixa disponibilidade de potencial redutor.

O metabolismo da glutamina é dependente de condições especiais de regulação. As principais enzimas envolvidas na utilização desse aminoácido são a glutamato desidrogenase, a transaminase glutâmico-oxaloacética mitocondrial e citosólica, a malato desidrogenase (medida na direção oxaloacetato-malato-MDH-ox), a malato descarboxilase (enzima málica – ME) em ambas as formas citosólica e mitocondrial (Figura 1) (MAZUREK *et al.*, 1997).

No caso da glutaminólise, a presença da piruvato quinase do tipo M2 (M2-PK) e a superexpressão das glutaminases mitocondriais e da enzima málica, compõem essas condições especiais de regulação, garantindo a obtenção de energia a partir da L-glutamina com concomitante geração de L-lactato. O desvio dos esqueletos carbonados da glucose em direção às vias de síntese dos ácidos nucléicos caracteriza o metaboloma das células tumorais como nucleogênico, em distinção a outros tecidos diferenciados como, por exemplo, o metaboloma gluconeogênico dos hepatócitos (MEDINA, 2001; MAZUREK *et al.*, 2005).

A glutaminólise contém parte do ciclo do ácido cítrico e parte da lançadeira malato-aspartato. O destino dessas vias metabólicas é em grande parte dependente da regulação da enzima piruvato quinase (M2-PK). Quando

esta enzima, que pode ser um tetrâmero ou um dímero, está na forma dimérica que é inativa, apresenta baixa afinidade pelo fosfoenolpiruvato. Então, os carbonos da glucose são direcionados para as vias biossintéticas e, portanto, não estarão mais disponíveis para a via glicolítica. Sendo assim, outras fontes de energia tais como os aminoácidos serina e glutamina, tornam-se necessários. Nas células tumorais, o ciclo do ácido cítrico é truncado devido à inativação seletiva da  $\text{Fe}^{2+}$ -aconitase e dos complexos I e III da cadeia respiratória por espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como o ânion superóxido (BOITIER *et al.*, 1995). Além disso, as células tumorais superexpressam as glutaminases mitocondriais e a enzima málica, abrindo a possibilidade de uma nova fonte de geração de energia, a degradação do aminoácido L-glutamina para L-lactato (MAZUREK *et al.*, 1997; MAZUREK *et al.*, 2005).

O controle alterado da glicólise pela expressão de certas isoenzimas (MAZUREK *et al.*, 2002) e a predominância da atividade da lançadeira glicerol-3-fostato sobre a lançadeira do malato-aspartato resulta em diminuição dos equivalentes redutores do citosol para a mitocôndria, exigindo que as células tumorais reoxidem NADH pela lactato desidrogenase (LOPEZ-ALARCÓN e EBOLI, 1986).

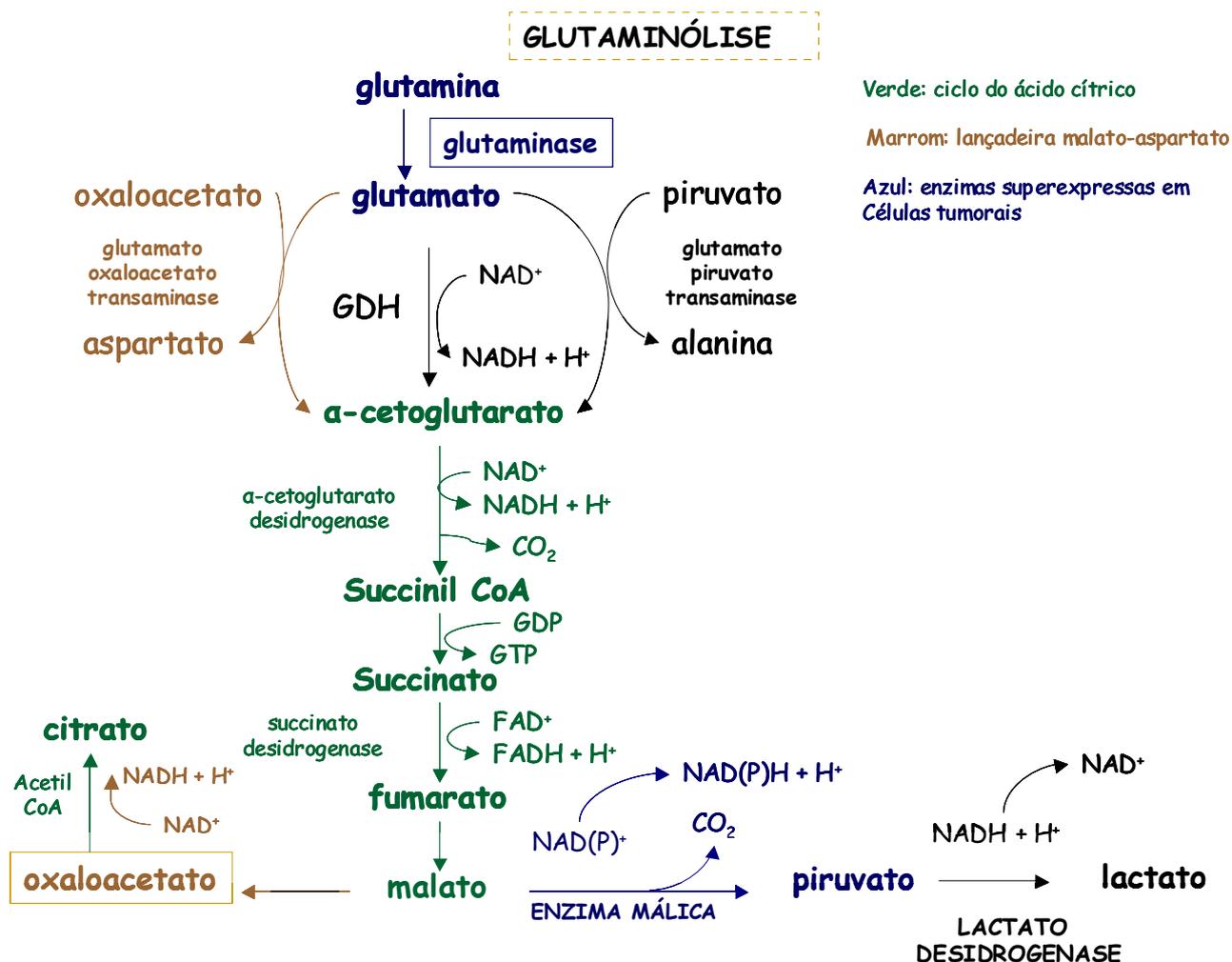


FIGURA 1. GLUTAMINÓLISE E O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO TRUNCADO.

FONTE: adaptado de:

[http://www.metabolic-database.com/html/body\\_glutaminolysis\\_weiter.html](http://www.metabolic-database.com/html/body_glutaminolysis_weiter.html)

Adicionalmente, a oxidação de piruvato pelo ciclo do ácido cítrico é reduzida em favor da oxidação de glutamina e, devido à expressão da forma mitocondrial da malato descarboxilase (NAD dependente), o malato é convertido em piruvato e lactato (MOREADITH e LEHNINGER, 1984). Por esta razão, a produção do lactato pelas células tumorais é significativa, mesmo em

condições aeróbicas. A produção de L-lactato foi um dos parâmetros analisados neste estudo nas células do tumor ascítico de Walker 256.

A existência de duas isoformas para a glutaminase é bem documentada. Além de apresentarem características diferentes quanto à estabilidade, estas isoformas atuam em condições experimentais e pHs diferentes (CURTHOYS *et al.*, 1973; CURTHOYS *et al.*, 1974). Neste estudo, foram avaliadas as atividades das glutaminases dependente de fosfato e independente de fosfato, como um índice da operacionalidade da via glutaminolítica.

#### **2.2.1.2. L-Arginina**

A L-arginina é um aminoácido não essencial, e em condições fisiológicas tem importante papel para a síntese protéica, é precursora na síntese de uréia, ornitina, poliaminas e de óxido nítrico. Sob trauma, estresse ou jejum prolongado, a L-arginina torna-se um aminoácido essencial. Duas vias bem estabelecidas do metabolismo da L-arginina em processos inflamatórios crônicos, como é o caso do câncer, incluem a conversão de L-arginina a NO e citrulina pela NOS ou pela ação da arginase a L-arginina é convertida em uréia e ornitina (SATRIANO, 2004).

A L-arginina é um aminoácido chave quando se consideram as inter-relações metabólicas entre diferentes tipos de células. Este aminoácido é convertido pela arginase em L-ornitina (uma precursora de poliaminas) e uréia. Além destes, a arginina é precursora da creatina, a qual exerce uma função essencial no metabolismo energético do músculo, nervos e testículos (TAPIERO *et al.*, 2002). Em algumas células, a arginina é transportada do espaço extracelular via transportador de aminoácido catiônico (CAT) e, pela ação da

óxido nítrico sintase (NOS), gera NO e citrulina (Figura 2). Pelo ciclo NO-citrulina, ocorre a regeneração da arginina (KOGA *et al.*, 2003). Inicialmente, a L-arginina foi considerada um aminoácido não prontamente utilizável pelas células tumorais (TAPIERO *et al.*, 2002), porém, esta observação tem sido reconsiderada.

Existem duas isoformas de arginase distintas em mamíferos: a arginase citosólica tipo I, normalmente expressa no fígado, que está envolvida na detoxificação da amônia e síntese de uréia e a arginase do tipo II mitocondrial que é expressa em tecidos extra-hepáticos e que está envolvida com as funções biossintéticas, tais como, a síntese de ornitina, prolina e glutamato (CEDERBAUM, *et al.*, 2004). A arginase (Tipos I e II) tem sido detectada em tecidos de outros órgãos tais como os rins, as mamas, os testículos e a pele e, como nenhum desses tecidos tem um ciclo da uréia completo, a função da arginase nos tecidos extra-hepáticos não é clara. É provável que esteja mais relacionada ao metabolismo de poliaminas do que propriamente à síntese de uréia (PEGG, 1986; PEGG *et al.*, 2006). Essa função da arginase na modulação da biossíntese de poliaminas também tem sido proposta como uma característica importante para o crescimento de diferentes tipos de tumores (GOKMEN *et al.*, 2001), onde, aparentemente, uma das funções seria suprir a célula com ornitina, o aminoácido não protéico e precursor da síntese de poliaminas.

A figura 2 mostra os principais destinos metabólicos da L-arginina e também a síntese de poliaminas.

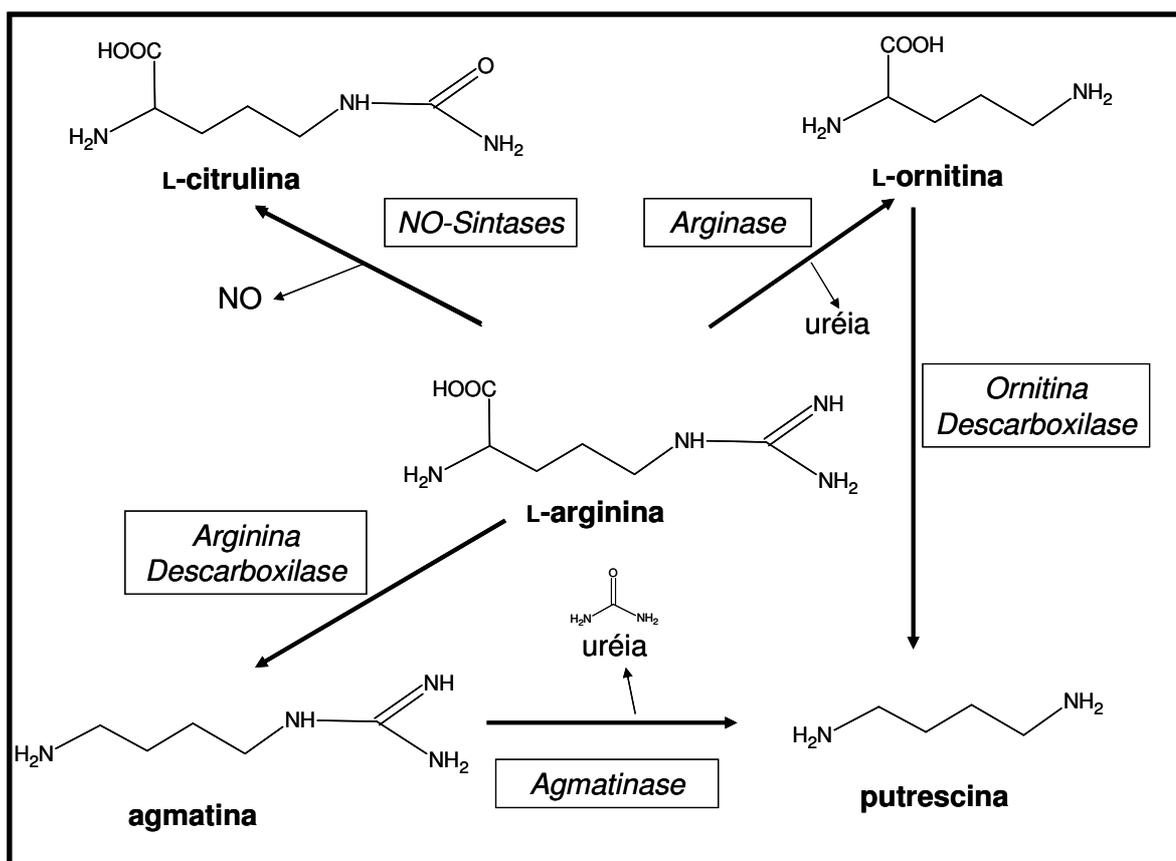


FIGURA 2. VIAS RELACIONADAS À UTILIZAÇÃO DA L-ARGININA E DA BIOSÍNTESE DE POLIAMINAS EM MAMÍFEROS.

FONTE: Modificado de RAASCH *et al.*, 2001

Outro importante produto associado à utilização de L-arginina é a agmatina, um produto da ação da arginina descarboxilase, cuja síntese, inicialmente, acreditava-se estar confinada a bactérias, plantas e invertebrados (Figura 3) (TABOR e TABOR, 1984).

Atualmente, sabe-se que esta amina biogênica é produzida também por mamíferos (LI *et al.*, 1994; RAASCH *et al.*, 1995; RAASCH *et al.*, 2001), sendo responsável por uma gama de efeitos patofisiológicos como a liberação de catecolaminas (SENER *et al.*, 1989) e inibição da óxido nítrico sintase induzível

(iNOS) (GÁLEA *et al.*, 1996). Por sua vez, a agmatina é convertida em putrescina e uréia pela agmatinase (agmatina ureohidrolase), uma enzima já bem caracterizada em células humanas (MISTRY *et al.*, 2002), mas com poucas informações em células tumorais. Através da atividade da arginase e agmatinase seria possível avaliar a produção de uréia por células não hepáticas. Ainda, referente à utilização de L-arginina, é interessante observar que os macrófagos também expressam arginase, a qual converte L-arginina a L-ornitina que, como já mencionado, pode ser usada pela ODC para formar poliaminas, requeridas para a proliferação, diferenciação e transformação neoplásica em células de mamíferos. Assim, o metabolismo da L-arginina por macrófagos no sítio do tumor pode ter influências benéficas ou não ao crescimento do tumor, dependendo se a iNOS ou a via da arginase prevalece (TAPIERO *et al.*, 2002).

A ornitina descarboxilase (ODC) é uma enzima chave na síntese de poliaminas e catalisa a conversão de ornitina em putrescina podendo originar as demais poliaminas (AUVINEN *et al.*, 1992; PEGG, 2006), conforme descrito na figura 3 (KHUHAWAR e QURESHI, 2001).

A expressão desta enzima é aumentada de forma transitória sob a ação estimulatória de fatores de crescimento, mas torna-se continuamente ativada durante a transformação celular induzida por carcinógenos, vírus ou oncogenes (MANNI *et al.*, 2002; BACHRACH, 2004; WALLACE e FRASER, 2004; PEGG, 2006).

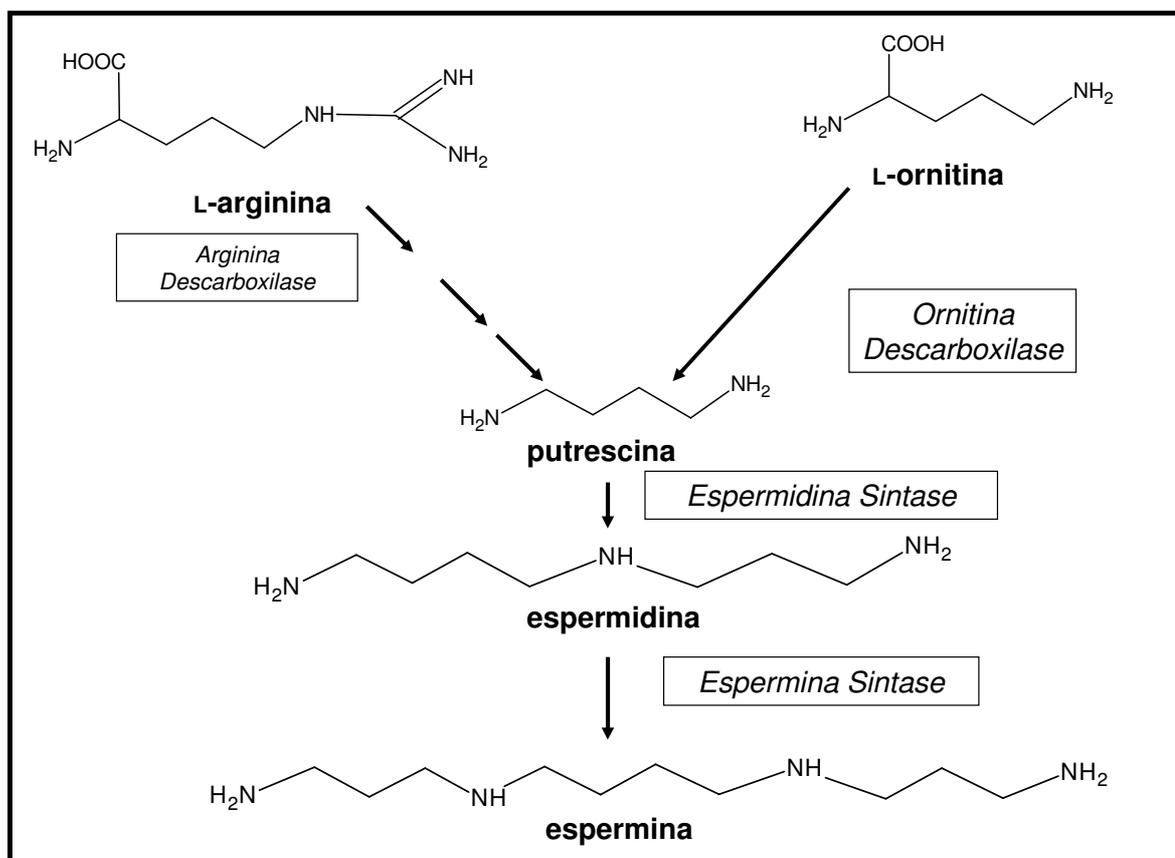


FIGURA 3. VIA DE SÍNTESE DA ESPERMINA

FONTE: Modificado de HANFREY *et al.*, 2001

### 2.3. FATORES MEDIADORES DA CAQUEXIA DO CÂNCER

Os fatores postulados como mediadores da caquexia do câncer podem ser divididos em dois grupos:

I) Humorais - são compostos com características semelhantes a hormônios, que agem diretamente sobre o catabolismo do hospedeiro;

II) Tumorais - compreendem as citocinas e quimiocinas que afetam o metabolismo do hospedeiro indiretamente.

### **2.3.1. FATORES HUMORAIS**

Neste grupo estão incluídos pequenos peptídeos descritos como tóxicos – toxohormônios – produzidos por células tumorais, incluindo as células Walker 256, os quais parecem estar relacionados aos efeitos da caquexia, muito embora seu papel não esteja precisamente determinado (RUBIN, 2003a,b). Além destes, os hormônios catabólicos convencionais e o fator de mobilização de lipídios (LMF), que é produzido por tumores e degrada diretamente o tecido adiposo (TISDALE, 1993) parecem ser importantes no processo.

### **2.3.2. FATORES TUMORAIS**

Dentre os fatores tumorais mais importantes estão o interferon gama (INF- $\gamma$ ) e o fator inibitório de leucemia (LIF) e as citocinas tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) (LANGSTEIN e NORTON, 1991; TISDALE, 1993). Além das citocinas, a infusão de hormônios, tais como, cortisol, glucagon e adrenalina em humanos, produz algumas características da caquexia. Este fato pode ser importante, pois a produção ectópica de hormônios por tumores também pode ser observada. Portanto, possivelmente, um complexo sistema de citocinas em combinação a outros fatores pode estar envolvido na caquexia.

A reversão da caquexia tem sido alcançada por dois grupos de agentes: i) estimuladores de apetite (megestrol acetate) e, ii) inibidores de LMF como o ácido eicosapentaeóico, cujo potencial como nova possibilidade de intervenção quimioterápica vem sendo considerado (TISDALE, 1993). Em relação ao ácido eicosapentaeóico, verificou-se que sua administração pode ter papel relevante

na caquexia induzida por certos tumores. A administração do fator indutor de proteólise (PIF) a camundongos portadores da síndrome de caquexia promove uma acentuada perda de peso no período de 24 horas após o tratamento. Este efeito foi totalmente abolido quando foram administrados anticorpos contra este fator ou quando os animais foram submetidos a um pré-tratamento com 500 mg.Kg<sup>-1</sup> de ácido eicosapentaéico (HUSSEY e TISDALE, 1999).

Outro composto possivelmente envolvido na caquexia associada ao câncer é uma proteoglicana encontrada na urina de pacientes com caquexia, mas ausente em indivíduos normais (TODOROV *et al.*, 1996). Neste aspecto, uma proteoglicana contendo condroitina sulfato (Azafitg) administrada a camundongos causou perda dos depósitos lipídicos por aumentar a lipólise e desdiferenciação dos adipócitos, e por diminuir a lipogênese e adipogênese ou ainda uma combinação dos dois mecanismos (FIGUEROA *et al.*, 2002). Macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumores sólidos de Walker 256 apresentaram um aumento na produção de proteoglicanas liberadas para o meio e associadas às células. As proteoglicanas constituídas por cadeias de heparana sulfato predominaram na fração liberada para o meio circundante dessas células. Na fração associada à célula, os macrófagos de ratos portadores de tumor produziram uma maior quantidade de proteoglicanas constituídos de condroitina e dermatana sulfato do que células de ratos sadios. Em ambas as frações, porém, a heparana sulfato constituiu a principal glicosaminoglicana produzida (BRACHT *et al.*, 2006).

Do fluido livre de células ascíticas de Ehrlich foi isolado o fator indutor da ornitina decarboxilase (ODC), o qual foi inicialmente descrito por Noguchi e cols. (1976). Este fator quando injetado em animais promove alterações do

metabolismo hepático. A ODC é uma enzima importante na síntese de poliaminas. As alterações hepáticas que são freqüentemente observadas em hospedeiros portadores de tumor, pelo fator indutor de ODC, incluem a alteração do padrão de expressão da piruvato quinase hepática e a indução da expressão da ODC, sendo observada também uma hipertrofia do pâncreas (NOGUCHI *et al.*, 1976; SASAKI *et al.*, 1983, IMAMURA *et al.*, 1991). Os autores sugeriram que o fator indutor da ODC e as citocinas IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  poderiam atuar em função sinérgica nas perturbações metabólicas observadas em hospedeiros de tumores Ehrlich (KOKEKANE *et al.*, 2003).

#### **2.4. CARCINOMA DE WALKER 256**

O tumor ou carcinoma de Walker 256 foi originariamente encontrado como um tumor de mama em ratas grávidas. O carcinoma de Walker pode se desenvolver como tumor sólido ou como um tumor ascítico. A sua habilidade para crescer em diferentes ambientes e desenvolver metástases é dependente da adaptabilidade da superfície celular em relação a alterações em seu meio (WEISS e HARLOS, 1983; SCHANOSKI, *et al.*, 2004). Este tumor apresenta dois subtipos: tipo A, metastático, que leva à anorexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e o tipo B, que não forma metástase e induz à caquexia precoce do portador, levando à morte em 15 dias. Este último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (GUAITANI, *et al.*, 1983). Recentemente, o tumor de Walker 256 também foi utilizado como modelo de estudo da dor associada ao câncer (MAO-YING *et al.*, 2006; BRIGATTE *et al.*, 2007).

Em relação às características morfológicas descritas até o presente, as células do tumor de Walker 256 quando visualizadas ao microscópio ótico são classificadas em dois tipos: I) As células apresentam núcleo central, grande e redondo ou ligeiramente ovalado. Apresentam uma alta razão núcleo/citoplasma. A superfície nuclear é relativamente lisa, com ocasionais indentações. O nucléolo é proeminente e a cromatina aparece dispersa com pequenas dobras de heterocromatina. No citosol aparecem numerosos polissomos livres, numerosas mitocôndrias arredondadas ou ovais e pode-se constatar a escassez de outras organelas membranosas. II) Os núcleos têm localização excêntrica, forma alongada ou oval. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vacúolos são abundantes e o aparato de Golgi, evidente. O citosol apresenta filamentos finos entre essas organelas. As demais características assemelham-se às células do tipo I (MATTOS *et al.*, 1980; SIMPKINS *et al.*, 1991).

CLARK e GOODLARD (1993) demonstraram que embora as proteínas da membrana plasmática do tumor sólido e ascítico apresentem uma grande similaridade, existem diferenças no conteúdo protéico entre as mesmas. Além disso, as atividades das ecto-enzimas ( $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ,  $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ , fosfodiesterase, 5'-nucleotidase e fosfatase alcalina) mostraram-se aumentadas quando da transição da forma ascítica em relação à forma sólida. Esses dados confirmaram a afirmação de que a adaptação da forma ascítica para a de tumor sólido envolve a participação das ecto-enzimas 5'-nucleotidase e  $\text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ , as quais, exercem um duplo papel funcional como ecto-enzimas, bem como moléculas de adesão. Recentemente, foram identificados dois membros da família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

(NTPDases 2 e 5) e 5'-nucleotidase em células do tumor ascítico de Walker do tipo A, através da produção do mRNA. A presença concomitante das NTPDases e da 5'-nucleotidase nessas células, indica que essas enzimas podem ser importantes para a regulação da razão extracelular adenina nucleotídeo/adenina nucleosídeo (BUFFON *et al.*, 2006), induzindo o crescimento tumoral, uma vez que a adenosina tem ação estimuladora no crescimento de tumores (MUJOOMDAR *et al.*, 2003; SPYCHALA *et al.*, 2004).

As células Walker 256 do tipo A desenvolvem espontaneamente uma cauda frontal polarizada e são capazes de migrar sem estímulos adicionais. A polarização e migração destas células estão associadas a uma cascata de sinalização que envolve a participação das proteínas PI 3-quinase, Rho, Rac e Rho-quinase, que são expressas constitutivamente nestas células (GUTJAHR *et al.*, 2005) e estão relacionadas aos processos de fosforilação das proteínas responsáveis pela polarização das células (ROSSY *et al.*, 2007).

Foi verificado que um toxohormônio obtido de carcinoma de Walker 256 em rato foi capaz de inibir a incorporação de aminoácidos em proteínas de miofibrila de músculo diafragma (GOODLAD e RAYMOND, 1973). Também já foram detectadas alterações no conteúdo de proteínas e aminoácidos livres por ocasião da transição da forma ascítica do tumor para o cultivo *in vitro*. Durante a fase *lag* observou-se que as proteínas apresentaram-se ricas em ligações peptídicas, enquanto que, uma grande quantidade de aminoácidos livres foi observada durante a fase de proliferação. Quando as células começaram a entrar na fase estacionária, foi observada a presença de ligações peptídicas em proteínas (KRUSE JR *et al.*, 1960).

A deprivação de aminoácidos específicos do meio de cultura revelou que o tumor de Walker 256 necessita de doze aminoácidos essenciais, além de L-glutamina e L-asparagina para crescer *in vitro*. Quando os aminoácidos não essenciais foram retirados do meio de cultura, observou-se um crescimento médio em relação ao meio basal. Uma pronunciada redução na taxa de crescimento foi observada quando aminoácidos L-glutamina e L-arginina foram retirados do meio de cultura (McCOY *et al.*, 1956).

Em células Walker 256, o ácido eicosapentaeóico e o ácido  $\gamma$ -linolênico promoveram, *in vitro*, em condições controladas, a inibição do crescimento tumoral por redução da proliferação celular e aumento no índice apoptótico. Causaram ainda um estímulo na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações de complexos enzimáticos da cadeia respiratória, além da liberação do citocromo c da mitocôndria, sugerindo uma via mitocondrial para a apoptose (COLQUHOUN e SCHUMACHER, 2001).

A produção de radicais de oxigênio para células Walker 256 também foi observada após estimulação quimioterápica pelo peptídeo N-formil-Met-Leu-Phe, o qual estimula a metástase por um mecanismo mediado por receptor, sendo o efeito reduzido, mas não abolido, pela ausência de cálcio no meio externo e desencadeado pelo ionóforo A23187. A produção de radicais de oxigênio foi também diminuída por inibidores da ciclooxigenase (COX), como o flurbiprofeno (LEROYER *et al.*, 1987). Nesse aspecto, os níveis séricos de PGE<sub>2</sub> e a expressão da COX-2 pelo tumor sólido de Walker já foram demonstrados. Animais portadores do tumor sólido de Walker apresentaram níveis séricos elevados de PGE<sub>2</sub> ( $\approx$  1700 pg/mL) e pronunciada expressão da COX-2 (MUND *et al.*, 2007).

Em relação às citocinas, o TNF- $\alpha$  quando administrado a ratos portadores do tumor de Walker, promove a redução no crescimento tumoral. Essa redução está associada a um aumento dose dependente na proteólise, sem alterações da síntese protéica tumoral (TAYEK e BRASEL, 1990). Os níveis séricos de IL-6 em ratos portadores de tumor de Walker foram medidos por SHAO e cols. (2006). Estes níveis são mais elevados nos animais portadores de tumor em relação aos controles (SHAO *et al.*, 2006).

## **2.5. BIOSÍNTESE DE POLIAMINAS**

As poliaminas (Fig. 3) são essenciais para que todos os tipos de células atinjam condições de crescimento ótimas. Na maioria das vezes, a diminuição nos níveis de poliaminas resulta em inibição da proliferação e diferenciação celular e, algumas vezes pode acarretar a morte celular por necrose ou apoptose (CRISS, 2003). A ativação das vias de síntese e regulação das poliaminas ocorre universalmente em células tumorais podendo contribuir para o desenvolvimento do câncer e o estabelecimento de suas características fenotípicas (PEGG, 1988; MANNI *et al.*, 2002).

Os níveis de poliaminas (os produtos secundários da ação da arginase) são de duas a três vezes maiores nos tecidos de tumor de mama que no tecido normal adjacente, sugerindo que este pode ser um importante fator na carcinogênese. De fato, as medidas da atividade da arginase e dos níveis de ornitina parecem ser úteis para distinguir tipos histológicos de tumores cutâneos como os tumores de células escamosas daqueles de células basais (GOKMEN *et al.*, 2001), bem como o grau de malignidade de tumores de mama (CHOWDHURY *et al.*, 1994).

A maioria dos estudos com células de mamíferos indica que quando células quiescentes são estimuladas a crescer, os níveis de ODC e das poliaminas aumentam mesmo antes de ocorrer aumento na síntese de DNA, RNA e proteínas (PEGG, 1988; MANNI *et al.*, 2002; CLIFFORD *et al.*, 1995). Observou-se que a poliamina espermina é capaz de proteger a mitocôndria atuando como seqüestradora de radicais livres (HÁ *et al.*, 1998; MADSEN *et al.*, 1996; SAVA *et al.*, 2006), bem como atua como inibidora da indução da NO sintase (SZABÓ *et al.*, 1994).

## 2.6. SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

Em relação ao NO que é produzido a partir de L-arginina, enzimas distintas estão envolvidas na sua formação em diferentes tipos de células, sendo que todas elas utilizam NADPH como cofator. A óxido nítrico sintase-I (NOS-I) é primariamente encontrada em células neuronais centrais e periféricas, é constitutiva e  $Ca^{+2}$ -calmodulina-dependente (SATRIANO, 2004). A óxido nítrico sintase-II (NOS-II ou iNOS) é induzida em macrófagos e outras células pelas endotoxinas. Ela é  $Ca^{+2}$ -independente e requer, além de NADPH, a tetrahydrobiopterina. Esta isoforma induzível da NOS (iNOS) é encontrada também em hepatócitos, células do músculo liso vascular e endotelial em resposta a endotoxinas, citocinas e outros fatores pró-inflamatórios. Uma terceira isoenzima, a óxido nítrico sintase – III (NOS-III ou eNOS), tem sido descrita como similar à NOS-I. Anticorpos contra NOS-III mostraram que esta expressão é relativamente específica das células endoteliais (SATRIANO, 2004).

A expressão da iNOS em muitos tipos celulares, é induzida pela presença de bactérias e/ou produtos do seu metabolismo ou por citocinas

associadas aos processos inflamatórios e sua ativação resulta na produção de altas concentrações de NO (LALA e CHAKRABORTY, 2001; SATRIANO, 2004). As elevadas concentrações de NO, resultantes da indução da iNOS durante a inflamação crônica podem ter um papel ativo no estabelecimento do câncer (LIND, 2004). LOIBL e cols. (2002) demonstraram que as enzimas iNOS e eNOS são expressas em tecidos de câncer de mama invasivo, porém esta expressão não foi detectada em lesões benignas (LOIBL *et al.*, 2002). Em pacientes portadores de câncer de mama, a expressão da iNOS foi positivamente correlacionada com o tamanho do tumor, o grau de diferenciação e a um mau prognóstico (LOIBL *et al.*, 2005). Em contraste, alterações pré-neoplásicas induzidas pelo carcinógeno azoximetano são potencializadas pela inibição da atividade da iNOS por L-nitro-arginina (L-NAME), com concomitante estimulação das enzimas envolvidas na síntese de poliaminas (SCHLEIFFER *et al.*, 2000). Em células de carcinoma escamoso o NO pode promover um aumento na atividade das vias da ciclooxigenase 2 (COX-2) e esse efeito é mediado pelos níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (GALLO *et al.*, 2002).

A produção mitocondrial de NO já é reconhecida (TATOYAN e GIULIVI, 1998) e sua presença está relacionada aos danos promovidos à organela. Observou-se, também a proteção mitocondrial por agentes antioxidantes como a glutatona reduzida (GSH) (MEISTER, 1995). A produção excessiva de NO em tecidos tumorais está relacionada à progressão do tumor sugerindo que o excesso de NO produzido por macrófagos em tecidos inflamados poderia contribuir com a nitração da proteína p53 supressora de tumor (COBBS *et al.*, 2003).

O envolvimento do NO na caquexia já foi demonstrado em modelos experimentais (BUCK e CHOJKIER, 1996). Em um modelo murino para o estudo da caquexia, a citocina TNF- $\alpha$  foi capaz de induzir o estresse oxidativo e a expressão da iNOS. O processo de atrofia muscular característico da síndrome de caquexia é dependente da ativação do fator transcricional NF- $\kappa$ B (CAI *et al.*, 2004), o qual é ativado principalmente pelo TNF- $\alpha$  (BUCK e CHOJKIER, 1996; ZALETOK *et al.*, 2004). A caquexia induzida pelo TNF- $\alpha$  pode ser prevenida com uso do antioxidante D- $\alpha$ -tocoferol ou pelo inibidor da iNOS L-nitro-arginina (BUCK e CHOJKIER, 1996).

DI MARCO e cols. (2005) demonstraram que o gene para a proteína iNOS (iNos) é um alvo *downstream* do fator transcricional NF- $\kappa$ B. A produção de NO que depende da ativação do fator NF- $\kappa$ B é mediada por citocinas e também é capaz de estimular a perda de tecido muscular, característica da caquexia. De fato, em camundongos nocauteados para iNOS, a administração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ativou o fator NF- $\kappa$ B, mas não desencadeou degeneração muscular. Esse fato indica que a degeneração de tecido muscular mediada por NF- $\kappa$ B é dependente da via de síntese de NO.

Sendo assim, esclarecer se as células Walker 256 podem produzir NO e citocinas atuando como uma fonte adicional destes mediadores é relevante para o entendimento da gênese e do estabelecimento da síndrome de caquexia.

## 2.7. CITOCINAS

### 2.7.1. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos celulares tais como os monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e linfócitos B em resposta a estímulos inflamatórios incluindo lipopolissacarídeo, viroses, trauma e câncer (YOUNES e NOGUCHI, 2000). Esta glicoproteína de 26 kD liga-se a um receptor formado por uma cadeia alfa de 80 kD que é o sítio de ligação ao ligante, e uma cadeia beta de 130 kD que é responsável pela transdução do sinal. A ativação do receptor para IL-6 desencadeia uma cascata de sinalização que inclui a autofosforilação de JAK2 (Janus activation kinases). A proteína JAK2 por sua vez, pode ativar as proteínas STAT1 ou STAT3 promovendo a fosforilação de outras quinases ou a migração das STATs para o núcleo para que atuem como fator de transcrição nuclear (BARTON *et al.*, 2001).

A IL-6 atua como fator de crescimento parácrino em diversos tipos de mielomas, linfomas, câncer de bexiga, câncer coloretal e carcinomas das células renais (OKAMOTO *et al.*, 1995; VOORZANGER *et al.*, 1996; ANGELO *et al.*, 2002).

Muitos trabalhos têm salientado a participação desta citocina na gênese do processo caquético (ARGILÉS *et al.*, 2005; AGGARWAL *et al.*, 2006; BEN-BARUCH, 2006). No entanto, os resultados obtidos mostram-se contraditórios. A administração de anticorpos contra a IL-6 a ratos portadores de adenocarcinoma de colon parece reverter os parâmetros associados ao processo caquético (STRASSMANN *et al.*, 1992), porém, estudos similares não têm corroborado estes resultados (ARGILÉS *et al.*, 2006). Camundongos nus,

inoculados com células ovarianas de hamster, transfectadas com o gene para IL-6 murino demonstraram uma série de síndromes paraneoplásicas tais como hipercalcemia, leucocitose, trombocitose e caquexia (BLACK *et al.*, 1991).

Considerando que os níveis séricos de IL-6 em ratos portadores de tumor de Walker são maiores que nos animais controle (SHAO *et al.*, 2006) a determinação da produção desta citocina pelas células do tumor ascítico de Walker torna-se relevante.

### **2.7.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

Das citocinas, o TNF- $\alpha$  é o mais estudado. O TNF- $\alpha$  (caquectina) é uma proteína de 17 kD constituída de 157 aminoácidos e é produzida pelas células reticuloendoteliais quando ativadas, principalmente macrófagos e monócitos (OLIFF, 1988). Esta citocina foi a primeira a ser associada com a caquexia quando se observou sua secreção por linhagens celulares de macrófagos em resposta a endotoxinas (BEUTLER *et al.*, 1985). O TNF- $\alpha$  exerce a conhecida função de fator de crescimento em muitas células normais (SUGARMAN *et al.*, 1985) estimulando a produção de muitas moléculas incluindo a colagenase, o fator ativador de plaquetas (PAF), a IL-1, IL-6 e a PGE<sub>2</sub> (VAN DAMME *et al.*, 1987).

Verificou-se também que o TNF- $\alpha$  suprime a lipoproteína lipase em culturas de pré-adipócitos, sendo esta alteração também associada à caquexia (PORAT, 1989). Além disso, a administração aguda desta citocina a ratos aumenta de modo tempo-dependente a taxa de proteólise de músculo esquelético, por uma via dependente de ubiquitina (GARCIA-MARTÍNEZ *et al.*, 1993). Dentre seus efeitos nas células Walker 256, a redução no crescimento

tumoral foi associada a um aumento dose-dependente na proteólise, sem modificação da síntese protéica tumoral. Assim, o TNF- $\alpha$  estimula a degradação protéica das células tumorais em maior grau que a síntese, justificando a diminuição no crescimento do tumor (TAYEK e BRASEL, 1990). Adicionalmente, ratos portadores do tumor de Walker 256 submetidos à infusão contínua de TNF- $\alpha$  por um período de 6 horas apresentaram um significativo decréscimo da fração de células tumorais capazes de captar a bromodesoxiuridina indicando uma menor taxa de proliferação celular (WAN *et al.*, 1993).

O TNF- $\alpha$  é conhecido como um potente indutor da síntese de prostaglandina- $E_2$  (PGE $_2$ ). Em ratos saudáveis, a administração sistêmica de PGE $_2$  diminui a ingestão de alimentos e a mobilidade gástrica (MCCARTHY e DAUN, 1993). O hepatoma ascítico de Yoshida (YAH) é um tumor produtor de PGE $_2$  e seu desenvolvimento promove drástica perda da musculatura esquelética no hospedeiro. O tratamento com naproxeno, um inibidor da síntese de PGE $_2$ , inibiu a perda de tecido muscular em ratos portadores de YAH, indicando que a PGE $_2$  contribui para a progressão da síndrome de caquexia no hospedeiro (STRELKOV *et al.*, 2006). Sendo assim, a verificação da produção desta molécula pelo tumor de Walker 256 é apropriada, uma vez que, a determinação da produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  também foram realizadas neste estudo.

## **2.8. PROSTAGLANDINA $E_2$ (PGE $_2$ )**

A PGE $_2$  é um lipídio de baixo peso molecular, membro-chave da família dos prostanóides, que atua como efetora e reguladora dos processos

inflamatórios. A molécula é sintetizada a partir do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases I e II (COX-1 e COX-2), sendo a última, COX-2, uma enzima induzível relacionada à resposta inflamatória (AGGARWAL *et al.*, 2006; BEN-BARUCH, 2006). A PGE<sub>2</sub> é secretada por muitos tipos celulares incluindo monócitos, macrófagos e células tumorais (KLIMP *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2002; CASTELLONE *et al.*, 2005). Sua participação no estabelecimento e progressão da síndrome de caquexia tem sido investigada em estudos que utilizam um clássico inibidor da prostaglandina sintase, a indometacina (CAHLIN *et al.*, 2000a). Nesses estudos, foram testados animais nocauteados para os genes que codificam para citocinas tais como IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e os receptores tipos 1 e 2 para TNF- $\alpha$ , ou foram utilizados anticorpos contra estas citocinas, visando investigar a produção destas moléculas tanto pelas células tumorais, como pelas células do hospedeiro. Todavia, acredita-se que estas citocinas tenham ação sinérgica com a PGE<sub>2</sub> no estabelecimento do processo caquético. Os autores demonstraram que as citocinas do hospedeiro são quantitativamente menos importantes que as derivadas do próprio tumor no estabelecimento do quadro de caquexia dependente da PGE<sub>2</sub> (CAHLIN *et al.*, 2000b).

Os níveis séricos de PGE<sub>2</sub> em ratos portadores de tumor Walker 256 e a expressão da COX-2 pelo tumor sólido de Walker já foram demonstrados em experimentos utilizando ratos tratados com nutrientes suplementados com óleo de peixe. Os animais apresentaram uma menor expressão da COX-2 em relação aos animais suplementados com óleo de côco. As alterações na expressão da COX-2 relacionadas à dieta foram concomitantes às alterações nos níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> ( $\approx$  1700 pg/mL nos animais suplementados

com óleo de côco) (MUND *et al.*, 2007). No entanto, esses experimentos não permitem comparações com animais saudáveis, não portadores do tumor, nem permitem distinguir se essa produção sistêmica provém do tumor ou do hospedeiro. Sendo assim, a determinação da produção de PGE<sub>2</sub> pelo tumor ascítico de Walker torna-se de fundamental importância.

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Em um estudo sistemático deste laboratório, Bracht (2006) demonstrou que os macrófagos peritoneais de animais caquéticos portadores do tumor de Walker 256 possuem características de células ativadas de acordo com sua morfologia, com o aumento na capacidade fagocítica e com o aumento na produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Além disso, a produção de proteoglicanas liberadas para o meio e associadas à célula mostrou-se aumentada nesses macrófagos peritoneais. Foi verificado o aumento considerável de proteoglicanas constituídas por cadeias de heparana sulfato na fração liberada para o meio em macrófagos peritoneais de ratos com tumor. Na fração associada à célula, os macrófagos de ratos portadores de tumor produziram uma maior quantidade de proteoglicanas constituídas de condroitina e dermatana sulfato do que células de ratos saudáveis. Em ambas as frações, porém, a heparana sulfato constituiu a principal glicosaminoglicana produzida. O condroitin 4-sulfato foi capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos de animais saudáveis, mas não em células de animais portadores do tumor de Walker 256. Esta glicosaminoglicana também estimulou a via de produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de ratos saudáveis e em células de ratos portadores de tumor.

Considerando que o uso preferencial de alguns aminoácidos como fonte de energia, tem sido demonstrado em diferentes tipos de tumores (EINGEBRODT e GOSSMANN, 1980; SATRIANO, 2004), a continuidade dos estudos com tumor de Walker 256 foi realizada pela avaliação da produção de L-lactato e pela atividade das glutaminases, quando a L-glutamina foi utilizada como fonte de energia. Previamente, concentrações elevadas de L-lactato e uréia no fígado de animais portadores de tumor de Walker já haviam sido demonstradas (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004), indicando que potencialmente as células Walker 256 poderiam realizar a glutaminólise.

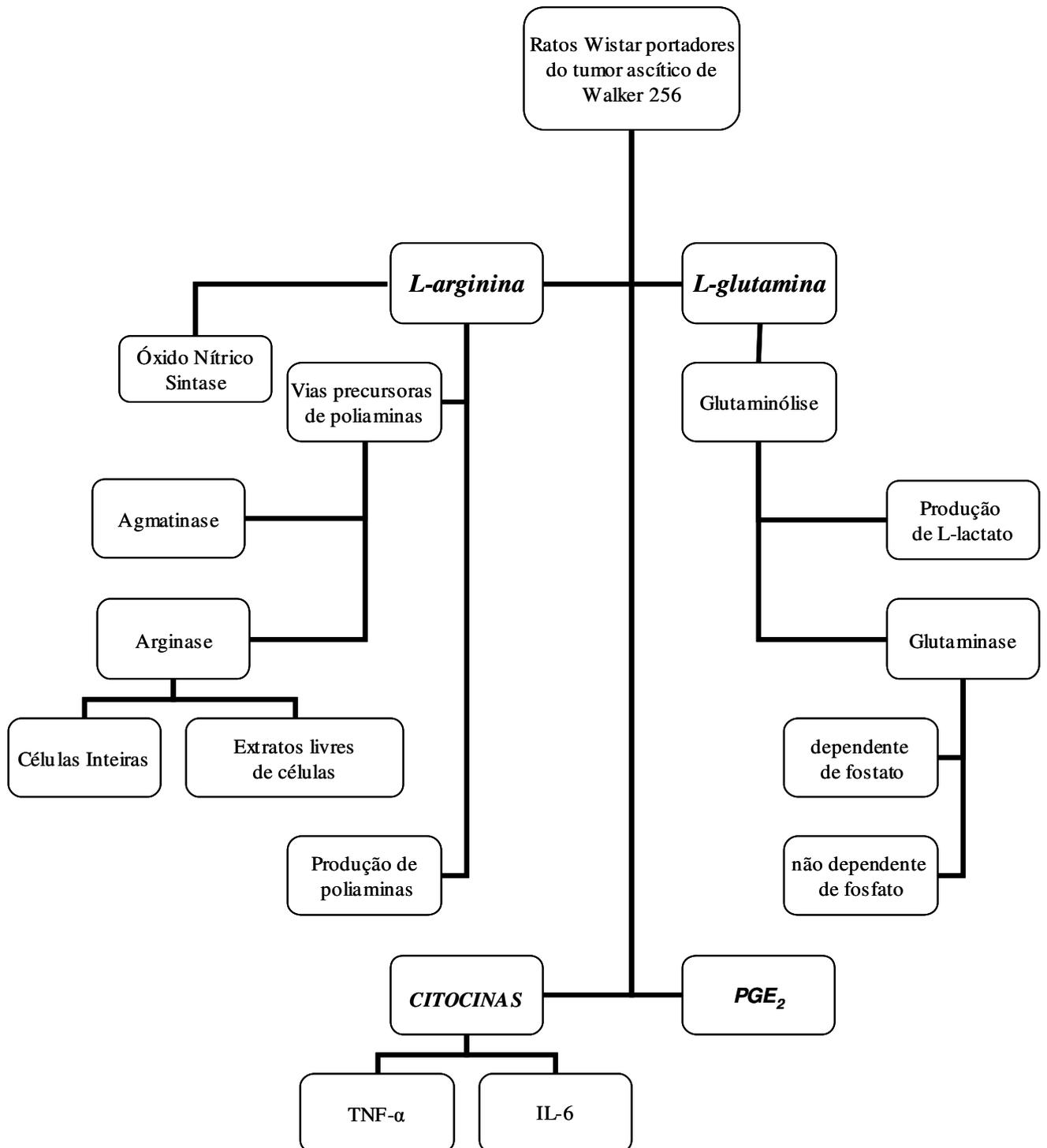
Uma avaliação direcionada para as vias de síntese de poliaminas a partir do aminoácido L-arginina compõe um caminho interessante para a compreensão do comportamento metabólico das células Walker 256, uma vez que, a L-arginina é conhecida como precursora das vias de síntese das poliaminas, com concomitante produção de uréia e NO.

Estudos recentes têm apontado para a importância deste modelo, o tumor de Walker 256, no estudo da dor característica do câncer (MAO-YING *et al.*, 2006; BRIGATTE *et al.*, 2007) e da síndrome de caquexia (VICENTINO *et al.*, 2004; MUND *et al.*, 2007). O conhecimento das vias metabólicas envolvidas no estabelecimento desta síndrome, a produção de moléculas sinalizadoras e das possíveis variações nesta produção ao longo do tempo de desenvolvimento do tumor são fatores que poderão contribuir para a intervenção e para o uso de drogas anticaquéticas.

Especificamente, nossos objetivos foram avaliar:

- 1) a produção de L-lactato pelas células Walker 256 a partir da glutamina e determinar os parâmetros da atividade da glutaminase dependente e independente de fosfato nestas células;
- 2) algumas características morfológicas do tumor ascítico de Walker;
- 3) a utilização de L-arginina determinando parâmetros da atividade da arginase tanto em extratos celulares quanto em células íntegras isoladas de tumores ascíticos com diferentes tempos de crescimento;
- 4) a possibilidade da existência de atividade da agmatinase em células Walker 256;
- 5) a produção de NO;
- 6) os níveis das poliaminas putrescina, espermidina e espermina;
- 7) a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6;
- 8) a produção de PGE<sub>2</sub>.

## 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## **5 MÉTODOS**

### **5.1. ANIMAIS**

Foram utilizados nos experimentos, ratos Wistar albinos (200 a 250 g) com dois meses de idade. Os ratos foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com água e ração a vontade. Os procedimentos de manipulação e eutanásia dos animais estão de acordo com os princípios éticos exigidos pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da UFPR (CEEAA) conforme certificado nº 84/2004. A linhagem Walker 256 foi obtida do laboratório de Metabolismo Hepático do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e foi mantida por passagens semanais. Nos experimentos, um *pool* de células foi obtido a partir de 4 ratos inoculados.

### **5.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS WALKER 256**

Os animais foram eutanasiados no quarto ou sexto dia após a inoculação do tumor na forma ascítica. Para tal, foram anestesiados com éter dietílico até a parada cardíaca ou por deslocamento cervical. Esse período foi assim definido, porque após esse tempo de desenvolvimento do tumor, o animal apresentava o peritônio hemorrágico, dificultando o isolamento das células. Para a obtenção das células a pele que recobre o peritônio foi retirada com cuidado para não perfurá-lo, e foram injetados 40 mL de solução salina tamponada (PBS). Essa injeção foi seguida de leve massagem na região abdominal visando homogeneizar a suspensão peritoneal. Então, o líquido peritoneal foi aspirado com seringa e em seguida, centrifugado a 570 g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Hitachi modelo CR21E). As

células foram ressuspensas em solução a  $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl, incubadas durante 2 minutos para promover hemólise, lavadas com 20 mL de PBS e centrifugadas a 570 g por 15 minutos. Esse procedimento de lavagem foi repetido até que a preparação estivesse livre de hemácias. As células foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS e quantificadas por contagem em câmara de Neubauer. Nos experimentos em que foram utilizadas células íntegras a viabilidade celular foi avaliada através do método que utiliza como o princípio, a exclusão do corante vital Azul de Trypan (PHILLIPS, 1995).

Para separação das células Walker 256 dos demais tipos celulares contidos no peritônio a suspensão peritoneal livre de hemácias, foi pré-incubada a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em estufa (Sanyo) em atmosfera contendo 2,5% de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos para a adesão dos macrófagos e depleção do *pool* endógeno de aminoácidos. Em todos os experimentos as preparações utilizadas continham apenas células Walker 256. Em todos os experimentos foram utilizadas preparações de células que apresentaram viabilidade  $\geq$  a 95% quando íntegras.

### **5.3. MORFOLOGIA DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256**

Para a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, as células foram coletadas conforme o item 5.3.2. Foram utilizadas células de tumores ascíticos com 4 dias após o implante.

#### **5.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

As células foram fixadas em solução de Karnowski constituída de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,2) e mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A seguir o material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Balzers CPD – 010 com gás carbônico. Em seguida foi realizada a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

### **5.3.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Após a fixação em solução de Karnowski constituída de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) a 4°C, as peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) a 4°C. Em seguida o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) durante 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida foi imerso em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante.

Os cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

## **5.4. UTILIZAÇÃO DA L-GLUTAMINA PELAS CÉLULAS WALKER 256**

### **5.4.1. PRODUÇÃO DE L-LACTATO PELAS CÉLULAS WALKER 256**

A obtenção das células Walker 256 foi realizada do modo descrito no item 5.2. As células foram então suspensas em PBS ajustando-se o número de células para a quantidade de  $4,1 \times 10^7$  células/mL. O sistema de incubação em volume final de 0,6 mL foi constituído de  $2,5 \times 10^7$  células em PBS ao qual se adicionou L-glutamina na concentração final de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . As células foram mantidas sob leve agitação à  $25^\circ \text{C}$  e as coletas das alíquotas foram feitas nos tempos zero e trinta minutos da incubação. A reação foi parada com  $30 \mu\text{L}$  de ácido perclórico  $11,64 \text{ mol.L}^{-1}$ . A amostra foi então neutralizada na presença de  $30 \mu\text{L}$  de HEPES  $5 \text{ mol.L}^{-1}$ , utilizando-se de volumes adequados de KOH  $5 \text{ mol.L}^{-1}$ . A suspensão neutralizada foi centrifugada a  $7.740 \text{ g}$  durante 5 minutos em microcentrífuga (Centaur – Sanyo) e o lactato produzido foi dosado no sobrenadante. Nesta dosagem,  $200 \mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados a um meio constituído de tampão Glicina  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 9,5), hidrazina  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{NAD}^+$   $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $2,4 \text{ U}$  de Lactato desidrogenase (E.C. 2.7.1.40). A mistura de reação foi incubada durante 90 minutos a  $30^\circ \text{C}$  e a leitura realizada a  $340 \text{ nm}$  em espectrofotômetro (Hitachi modelo U 2001) em um volume final de  $1 \text{ mL}$ .

#### **5.4.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS WALKER 256 PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTAMINASE (E. C. 3.5.1.2.)**

Para a determinação da atividade da glutaminase as células Walker 256 foram obtidas como descrito no item 5.2. A suspensão celular foi pré-incubada a  $37^\circ \text{C}$  em estufa (Sanyo) em atmosfera contendo 2,5% de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos para a adesão dos macrófagos e depleção do *pool* endógeno de

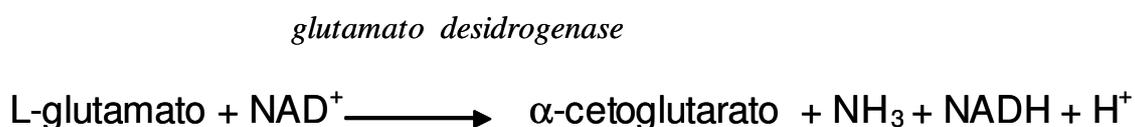
aminoácidos. As células não aderentes foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da realização dos ensaios.

A atividade das glutaminases foi avaliada segundo o método de CURTHOYS e WEISS, (1974), utilizando-se o ensaio acoplado com a glutamato desidrogenase (E. C. 1.4.1.4.), detectando-se a presença de NADH através da leitura da absorbância em 340 nm na etapa final das reações abaixo descritas:

1ª Etapa:



2ª Etapa:



A atividade da glutaminase foi expressa em  $\mu\text{moles de NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ .

As atividades das glutaminases fosfato dependente e independente são distinguíveis pelas condições experimentais que incluem pHs diferentes. A primeira atua em pH 8,5 e é dependente de fosfato. A segunda atua em pH 6,6; e sua atividade é independente de fosfato, porém é dependente de maleato para a sua ativação. Além disso, a glutaminase dependente de fosfato é mais instável, sendo inativada a 50 °C (CURTHOYS *et al.*, 1973; CURTHOYS *et al.*, 1974).

#### **5.4.2.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTAMINASE DEPENDENTE DE FOSFATO**

Após o descongelamento das células, o volume da suspensão foi diluído 1:2 em tampão Tris-HCl 130 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,6), homogeneizado em Van Potter Elvehjen e sonicado em 4 ciclos de 15 segundos numa freqüência de 20 KHz em aparelho de ultra-som (Sonics & Material Inc). A preparação foi centrifugada a 1.450 g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Hitachi modelo CR21E) e o sobrenadante (extrato livre) foi utilizado no ensaio. Nestes experimentos, o extrato livre (100 µL) foi utilizado, conforme descrição abaixo:

1ª Etapa: A mistura de reação foi constituída de: Tris 63 mmol.L<sup>-1</sup> – Fosfato 206 mmol.L<sup>-1</sup> – EDTA 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,6), L-glutamina 18 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão fosfato de potássio 36 mmol.L<sup>-1</sup> – ácido bórico 0,9 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e incubados a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi interrompida com 100 µL de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> e a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos.

2ª Etapa - A mistura da 1ª etapa foi adicionada ao seguinte meio de reação: Tris-HCl 130 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 9,4), NAD<sup>+</sup> 2 mmol.L<sup>-1</sup>, ADP 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%, 70 U de glutamato desidrogenase (E.C. 1.4.1.3). A leitura da absorbância em 340 nm em espectrofotômetro (Hitachi modelo U 2001) foi feita nos tempos 0 e 30 minutos de incubação a 37 °C. Para determinação do Km da enzima foram utilizados 1300 a 1600 µg/mL de proteína e 2,5 a 100 mmol.L<sup>-1</sup> de L-glutamina. O Km foi expresso em µmoles de NADH.min<sup>-1</sup> e a atividade em µmoles de NADH.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína.

#### **5.4.2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTAMINASE INDEPENDENTE DE FOSFATO**

As células foram armazenadas em nitrogênio líquido e quando do descongelamento, o volume da suspensão foi diluído 1:2 em tampão maleato  $60 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 6,6), homogeneizado em Van Potter Elvehjen e sonicado numa frequência de 20 KHz durante 15 segundos por 4 vezes em aparelho de ultrassom (Sonics & Material Inc). A preparação foi centrifugada a  $1.450 \text{ g}$  durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hitachi modelo CR21E), e o sobrenadante (extrato livre) foi utilizado no ensaio. Esse extrato foi então aquecido a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  visando inativar a glutaminase dependente de fosfato que é instável a essa temperatura (CURTHOYS *et al.*, 1973; CURTHOYS *et al.*, 1974). Nestes experimentos, o extrato livre ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) foi utilizado, conforme descrição abaixo:

1ª Etapa: A mistura de reação foi constituída de Maleato  $60 \text{ mmol.L}^{-1}$ – EDTA  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 6,6), L-glutamina  $18 \text{ mmol.L}^{-1}$ , e incubados a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. A reação foi interrompida com  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de HCl  $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos.

2ª Etapa - A mistura da 1ª etapa foi adicionada ao seguinte meio de reação: Tris-HCl  $130 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 9,4),  $\text{NAD}^+$   $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , ADP  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03%, 70 U de glutamato desidrogenase (E.C. 1.4.1.3). A leitura da absorbância em 340 nm em espectrofotômetro (Hitachi modelo U 2001) foi feita nos tempos 0 e 30 minutos de incubação a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A atividade foi expressa em  $\mu\text{moles de NADH.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{proteína}$

## 5.5. UTILIZAÇÃO DE L-ARGININA PELAS CÉLULAS WALKER 256

### 5.5.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE URÉIA PELAS CÉLULAS WALKER 256

#### ÍNTEGRAS

Células coletadas como descrito anteriormente (item 5.2.) foram suspensas em tampão maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  –  $\text{MnSO}_4$   $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  na proporção de  $4,1 \times 10^7$  células para cada 1,0 mL de suspensão e mantidas sob agitação constante a  $37^\circ\text{C}$ . Adicionou-se então  $25 \text{ mmol.L}^{-1}$  de L-arginina e nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos após a adição de L-arginina, foram coletados 1,0 mL da suspensão celular. Imediatamente após a coleta da alíquota da suspensão, esta alíquota foi centrifugada a  $6.150 \text{ g}$  durante 5 minutos em microcentrífuga (Centaur – Sanyo). Após a adição de ácido acético 87% para interromper a reação, os sobrenadantes foram mantidos em banho de gelo até o momento da dosagem de uréia. Em todos os tempos foram realizados controles na ausência de L-arginina.

#### 5.5.1.1. DOSAGEM DE URÉIA

Com o intuito de retirar o excedente de aminoácidos da mistura de reação, foram adicionados 1,5 mL de Hidróxido de Bário  $0,073 \text{ mol.L}^{-1}$ ; 0,4 mL de Sulfato de Zinco  $0,275 \text{ mol.L}^{-1}$  (GREENBERG, 1955). A suspensão foi centrifugada a  $1.510 \text{ g}$  em centrífuga clínica (FANEN – Excelsa 2) por 10 minutos e ao sobrenadante foram adicionados:  $540 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$  – 3:1 e  $75 \mu\text{L}$  de solução de diacetilmonoxima 3% em etanol absoluto. Os tubos contendo a mistura de reação foram colocados em banho de água fervente durante uma hora e a leitura da absorvância realizada a  $490 \text{ nm}$  (SATOH e ITO, 1967). A atividade da arginase foi expressa em  $\mu\text{moles}$  de uréia  $\times 10^7$  células.

### **5.5.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM EXTRATOS DAS CÉLULAS WALKER 256**

Ao volume de suspensão celular descongelada, foi adicionado o tampão maleato 10 mmol.L<sup>-1</sup> - MnSO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) numa proporção de 1:1. O extrato foi então homogeneizado em homogeneizador Van Potter Elvehjen (pistilo apertado 20 x), submetido a 4 ciclos de sonicação de 15 segundos em uma frequência de 20 KHz em aparelho de ultra-som (Sonics & Material Inc.) e centrifugado a 1.450 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Hitachi modelo CR21E). O sobrenadante foi incubado a 55 °C durante 10 minutos para promover a ativação da enzima (SCHIMKE, 1962).

A atividade enzimática foi determinada em volume final de 1 mL utilizando-se o seguinte sistema de reação: Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,0), 25 mmol.L<sup>-1</sup> de L-arginina. Nos experimentos a concentração de proteína variou de 1200 até 2000 µg de proteína. Esse sistema foi incubado a 37 °C durante 10 minutos. A reação foi interrompida com 1,0 mL de ácido acético 87% e em seguida foi feita a dosagem de uréia conforme descrito anteriormente no item 5.51.1. Para a determinação do Km foram utilizados 10 a 70 mmol.L<sup>-1</sup> de L-arginina. A atividade da arginase foi expressa em µmoles de uréia.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína e o Km em µmoles de uréia.min<sup>-1</sup>.

### **5.5.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS WALKER 256**

Para a determinação da produção de NO, as células de Walker 256 foram coletadas como já descrito anteriormente. Após a remoção das células aderentes, o número de células da suspensão foi ajustado para  $4,1 \times 10^7$  células/mL. A um volume de 0,6 mL de suspensão celular adicionou-se  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de L-arginina e a suspensão foi mantida sob agitação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram coletadas alíquotas de 0,6 mL da suspensão celular nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a adição de L-arginina. Imediatamente após a coleta, as alíquotas foram centrifugadas a 550 g em microcentrífuga (Centaur - Sanyo) durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram separados em microtubos que foram mantidos em banho de gelo até o momento da dosagem de NO, pela reação de Griess. Para tal, à 400  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes das alíquotas obtidas em cada tempo foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  do reativo de Griess (GREEN et al., 1982). Este é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A solução A é constituída de naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v). Decorrido o tempo de 10 minutos, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da mistura reativa acima foi colocada em uma placa de 96 poços e a absorbância determinada em leitor de microplacas (Micro-Elisa Reader, Bio-Rad) utilizando-se um filtro de 550 nm. A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ . A produção de NO foi expressa em  $\text{nmols.L}^{-1}$  de nitrito  $\times 10^7$  células. Foram realizados controles na ausência de L-arginina para todos os tempos em que transcorreu o experimento.

#### **5.5.4. ATIVIDADE DA AGMATINASE**

A determinação da atividade da agmatinase foi desenvolvida segundo o método de CARVAJAL e cols. (1999) modificado por IYER e cols. (2002), utilizando a detecção colorimétrica da uréia em extratos de células. Ao volume de células descongelado foi adicionado o tampão Tris 50 mmol.L<sup>-1</sup> - (pH 8,5) em uma proporção de 1:2. A preparação foi homogeneizada em homogeneizador Van Potter Elvehjen (pistilo apertado 20 x), submetido a 4 ciclos de sonicação de 15 segundos em uma frequência de 20 KHz em aparelho de ultra-som (Sonics & Material Inc.) e centrifugado a 5.800 g por 10 minutos centrífuga refrigerada a 4 °C (Hitachi modelo CR21E).

O sistema de incubação em volume final de 650 µL foi constituído de: Tris 46 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,5), 1,84 mmol.L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub> e 92,3 mmol.L<sup>-1</sup> de Sulfato de Agmatina e um volume de extrato livre de células que corresponda a 700 até 1500 µg de proteína. Após a incubação a 37 °C por uma hora, a dosagem de uréia foi realizada conforme descrito no item 5.5.1.1. A atividade foi expressa em mmols de uréia.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>proteína. Alternativamente, utilizou-se também um kit para determinação enzimática de uréia utilizando-se urease e glutamato desidrogenase UV (Bioclin, Brasil), procedendo-se então de acordo com as instruções do fabricante. Nesta reação, após a hidrólise da uréia a amônia e gás carbônico pela urease, a glutamato desidrogenase (GDH) na presença de amônia e α-cetoglutarato oxida o NADH a NAD<sup>+</sup>. Esta oxidação é medida pela queda na absorbância que é proporcional a concentração de uréia na amostra. A atividade foi expressa em nmols de NADH.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>proteína. A reação é linear para amostras com até 50 mmol.L<sup>-1</sup>.

#### 5.5.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DAS POLIAMINAS PUTRESCINA, ESPERMINA E ESPERMIDINA EM CÉLULAS WALKER 256

As células foram obtidas conforme descrição no item 5.2. a suspensão foi ajustada para  $2,5 \times 10^7$  células para cada 2 mL. A esta suspensão foi adicionado 6 mL de solução de albumina 4% preparada em água. Esta suspensão foi então centrifugada a 570 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de ácido perclórico 6%. O tubo foi agitado vigorosamente em vórtex e a mistura foi novamente centrifugada a 570 g por 10 minutos. O sobrenadante que continha as poliaminas foi então designado como amostra. A amostra sofreu então um processo de derivatização pré-coluna com cloreto de benzoíla, segundo o método de SCHENKEL e cols. (1995). A 1 mL dos padrões ou amostra foram adicionados 2 mL de NaOH  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 5  $\mu\text{L}$  de cloreto de benzoíla. Após a incubação foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl e 2 mL de clorofórmio. A mistura foi centrifugada a 780 g por 10 minutos. Foram coletados 1,5 mL do líquido depositado na parte inferior do tudo. Esse volume foi evaporado em  $\text{N}_2$  e ao tubo foram adicionados 0,5 mL de fase móvel (metanol/água 55:45 v/v) seguidos de incubação a 35 °C durante 15 horas *overnight*. Após a incubação foram adicionados 0,2 mL de NaOH  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 2 mL de clorofórmio. O volume foi evaporado em  $\text{N}_2$  e os tubos foram armazenados a -20 °C até a passagem das amostras no HPLC (Sistema Prominence da Shimadzu (Tóquio, Japão) equipado com bomba LC-20AD, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A, forno de coluna CTO-10ASVP e detector "diode array" SPD-M20A - Software LC-Solution Multi). A coluna utilizada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) da Metachem mantida à temperatura de 30°C. A separação dos

produtos foi feita com fluxo de 1 mL/minuto. Soluções padrões de poliaminas foram submetidas ao mesmo tratamento das amostras a fim de garantir a eficácia dos procedimentos.

#### **5.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DAS CITOCINAS IL-6 E TNF- $\alpha$ PELAS CÉLULAS WALKER 256**

Para a determinação da produção *in vitro* das citocinas foram utilizados kits específicos (Amersham Biosciences) e as dosagens foram realizadas conforme instruções do fabricante.

As sensibilidades dos métodos foram de 31-2000 pg/mL para IL-6 e 31-2500 pg/mL para TNF- $\alpha$ , respectivamente. Em uma placa de 96 poços 2,5 x 10<sup>7</sup> células por poço foram incubadas em 500  $\mu$ L meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50  $\mu$ g/mL) por 5 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Então a suspensão celular foi centrifugada a 7.740 g por 10 minutos e os sobrenadantes (amostras) de cada poço da triplicata foram colocados em tubos de 1,5 mL e congelados a -80°C até o momento da análise. As amostras foram diluídas 2 vezes para a dosagem de IL-6 e 7 vezes para a dosagem de TNF- $\alpha$ .

Os kits eram compostos de placas de 96 poços que continham os anticorpos onde foram adicionados as amostras ou padrões. Após incubação e lavagem dos poços foi adicionado o reagente contendo estreptoavidina conjugada a HRP (Horsedish peroxidase). Após lavagens sucessivas foi adicionado o anticorpo biotinilado seguido de incubação e lavagens e da adição do reagente TMB (Tetramethylbenzidine). A reação foi interrompida pela adição

de ácido sulfúrico e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplaca. As concentrações foram expressas em ng/mL/2,5 x 10<sup>7</sup> células.

### **5.7. PRODUÇÃO *in vitro* DE PGE<sub>2</sub> PELAS CÉLULAS WALKER 256**

As suspensões celulares contendo 2,5 x 10<sup>7</sup> células foram incubadas na presença ou ausência de 60 µmol.L<sup>-1</sup> de ácido araquidônico durante 1 hora e então foram centrifugadas a 7.740 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram estocados a -80 °C até o ensaio. A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um produto primário do metabolismo do ácido araquidônico em muitas células. A PGE<sub>2</sub> não é pré-sintetizada nas células e é formada quando as células são estimuladas pelo ácido araquidônico. O ensaio é baseado na competitividade pela ligação a uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal para PGE<sub>2</sub>, entre a PGE<sub>2</sub> produzida e um traçador (AChE conjugada a PGE<sub>2</sub>). A concentração de PGE<sub>2</sub> foi determinada por imunoenálise enzimática (PGE<sub>2</sub> EIA kit, Cayman Chemical). A leitura foi realizada a 420 nm em um leitor de microplacas (Bio-RAD, Benchmark) e a concentração de PGE<sub>2</sub> foi expressa em ng de PGE<sub>2</sub>/2,5 x 10<sup>7</sup> células.

### **5.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se espectrofotômetro (Hitachi modelo U 2001) e albumina de soro bovino como padrão.

### **5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA). Para localizar diferenças obtidas na ANOVA foram

empregados os testes de Teste de Tukey ou Newman Keuls. Foram utilizados os pacotes de estatística para microcomputadores Statistic 5.5 (StatSoft, Inc.) para a ANOVA e Prisma versão 3.3 para a determinação do Km da arginase e da glutaminase.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os experimentos, foram utilizadas suspensões celulares homogêneas, constituídas apenas de células do tumor ascítico de Walker 256. O procedimento de obtenção das preparações celulares livres de hemácias e macrófagos mostrou-se eficiente. A figura 4 mostra imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura com aumento de 500 x (4A) e 3000 x (4B) indicando que as preparações celulares utilizadas estavam destituídas de macrófagos e outros tipos celulares que poderiam estar contidos no fluido ascítico. Portanto, eram compostas apenas das células do tumor de Walker 256, garantindo desta forma, que os resultados apresentados em todos os experimentos são procedentes apenas das células tumorais, incluindo a atividade das enzimas, a produção de poliaminas e dos mediadores do processo caquético tais como as citocinas e a PGE<sub>2</sub>.

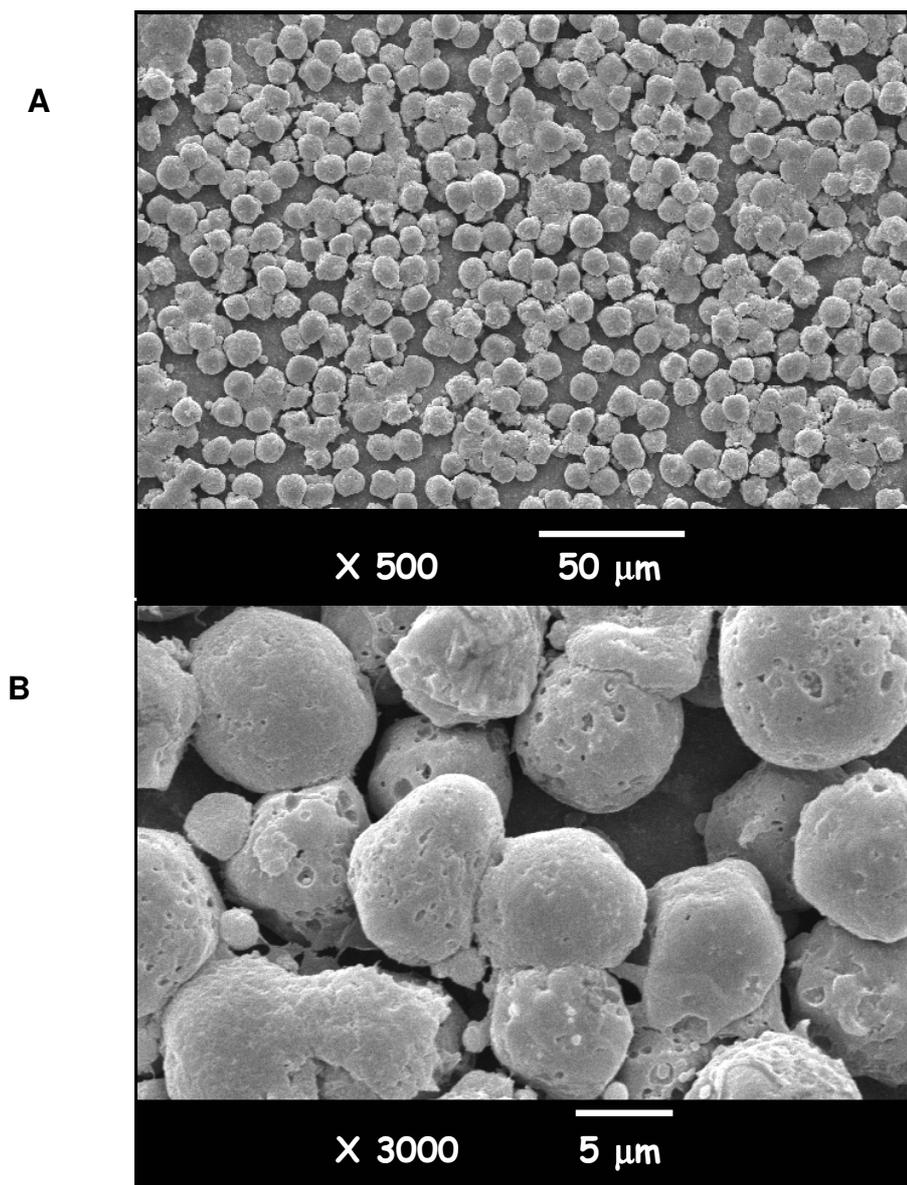


FIGURA 4. CÉLULAS WALKER 256 ISOLADAS A PARTIR DO FLUÍDO ASCÍTICO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: As imagens demonstram a eficiência do processo de separação dos macrófagos das células Walker 256 colhidas do líquido ascítico por microscopia eletrônica de varredura. A) aumento original de 500x; B) aumento original de 3000 x. As amostras foram preparadas conforme descrição no item 3.1.

### **6.1. MORFOLOGIA DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256**

A maioria dos estudos morfológicos das células Walker 256 são referentes aos tumores sólidos. Considerando essa escassez de dados um estudo por microscopia eletrônica de transmissão foi desenvolvido utilizando-se as células do tumor ascítico de Walker 256 com 4 dias de desenvolvimento. Estas apresentaram núcleo arredondado com nucléolo evidente. No núcleo, destacam-se regiões de heterocromatina e eucromatina e o envelope nuclear apresenta poros. No citosol foram visualizados autofagossomos, corpos lipídicos, mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi (CG) (Figura 5). As características morfológicas do tumor ascítico de Walker 256 assemelham-se àquelas descritas por MATTOS e cols. (1980) e por SIMPKINS e cols. (1991) para o tumor sólido, onde apareceram o nucléolo proeminente e a cromatina dispersa com pequenas dobras de heterocromatina. No citosol foram vistos numerosos ribossomos complexados, mitocôndrias arredondadas ou ovais. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vacúolos são abundantes e o aparato de Golgi evidente.

Na suspensão celular obtida do tumor ascítico com 4 dias após o implante foram também encontradas algumas células em processo de apoptose (Figuras 6). A figura 6 mostra as células Walker 256 no início do processo de apoptose onde podem ser visualizados os fenômenos de vacuolização citoplasmática e heterocromatização nuclear (Figura 6 A-F).

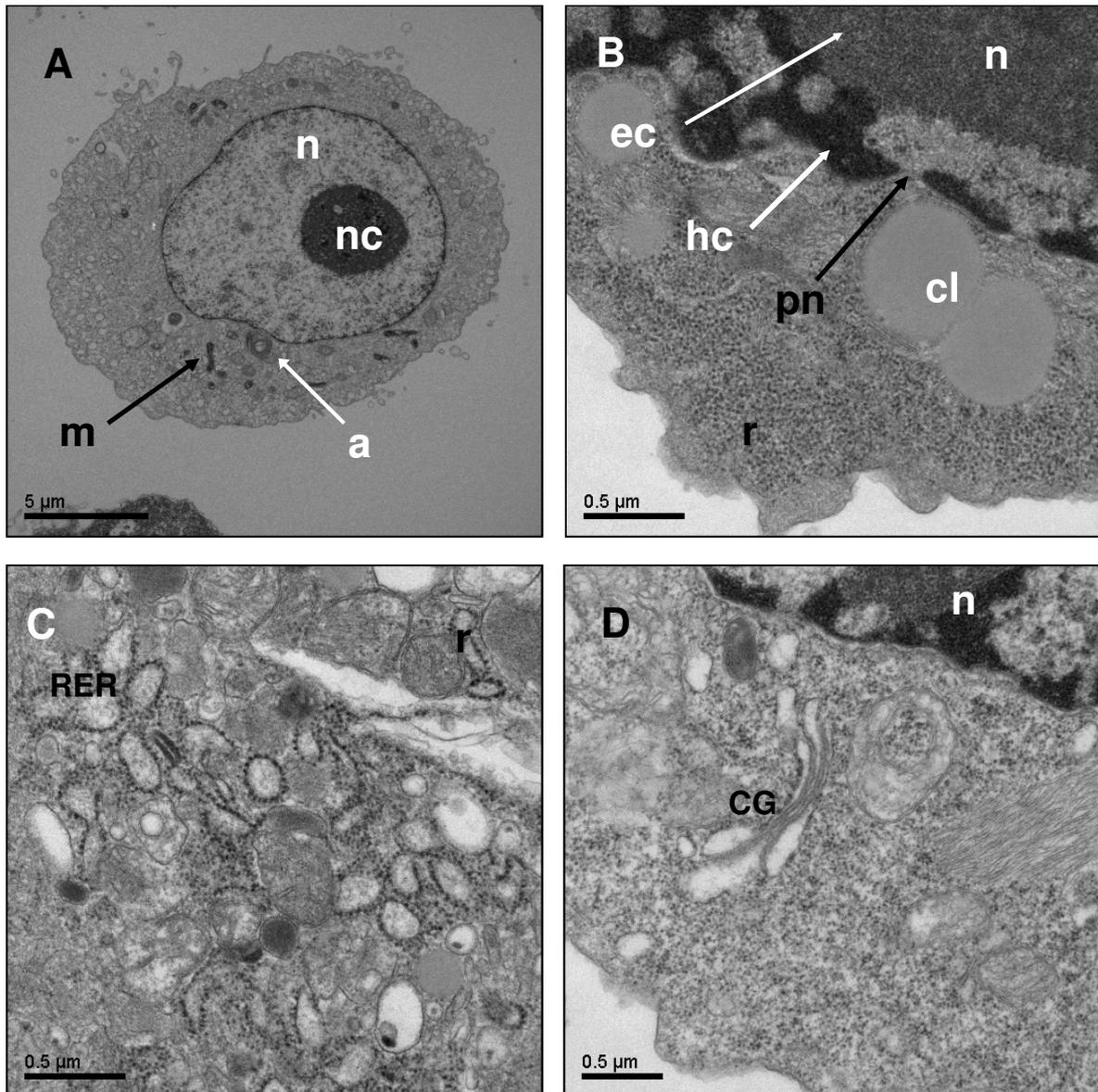


FIGURA 5. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: A-D: Células x controle. Em A, observar o núcleo eucromatizado (n), nucléolo evidente (nc), citoplasma contendo mitocôndrias (m) e autofagossomos (a). Em B, C e D aparecem detalhes do citoplasma da célula visualizada em A. Observar: retículo endoplasmático rugoso (RER), corpos lipídicos (cl), núcleo (n), eucromatina (ec), heterocromatina (hc), poro nuclear (pn) e o complexo de golgi (CG). As amostras foram preparadas conforme descrição no item 3.2.

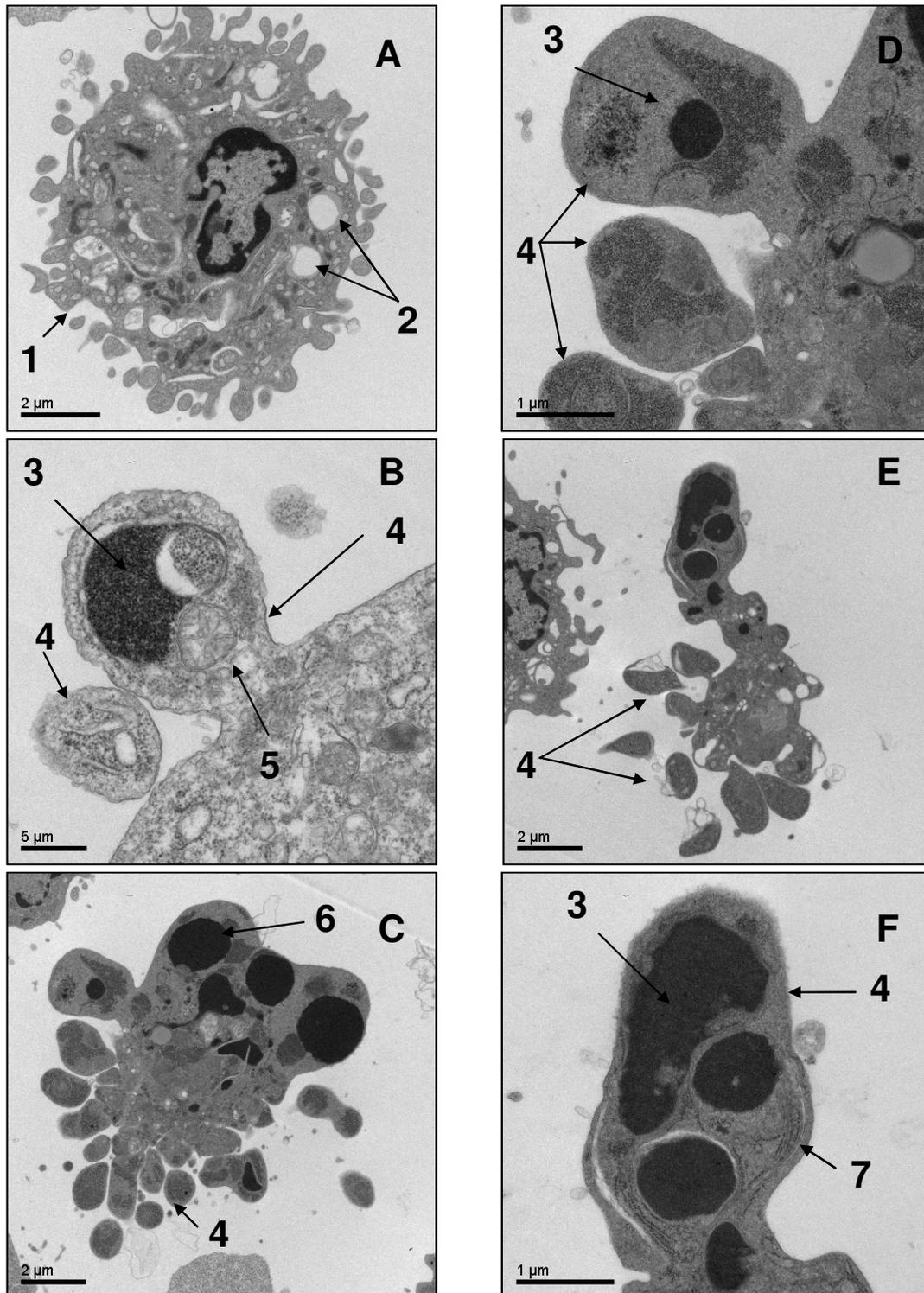


FIGURA 6. CÉLULAS WALKER 256 EM PROCESSO APOPTÓTICO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: A-F: Células em processo apoptótico avançado. Em A, observar as alterações de membrana (1) e a vacuolização citoplasmática (2). Em B-F observar os corpos apoptóticos (4) contendo organelas como mitocôndrias (5), RER (7), fragmentos do DNA condensados (3) e a heterocromatização nuclear (6).

## 6.2. UTILIZAÇÃO DA L-GLUTAMINA PELAS CÉLULAS WALKER 256

O estudo da via de utilização da glutamina em células Walker 256 através da produção de L-lactato e da atividade das glutaminases tem relevância porque entre outras finalidades a L-glutamina exerce importante papel sobre a regulação do equilíbrio redox celular, incluindo o metabolismo oxidativo, com conseqüente geração de ROS, sobre os processos de apoptose, atuando nas vias de sinalização celular, e sobre a regulação da proliferação de células tumorais, promovendo a síntese de glutathione (MATÉS *et al.*, 2002).

### 6.2.1. PRODUÇÃO DE L-LACTATO

Os experimentos cujos resultados são mostrados na Figura 7 foram planejados com a finalidade de avaliar a utilização de L-glutamina por células Walker 256. Verifica-se na figura 7 que células do tumor ascítico possuem uma expressiva produção de L-lactato a partir de substratos endógenos. A produção de L-lactato foi 43,4% superior na presença de L-glutamina em relação aos controles. Aos 30 minutos de incubação os controles produziram em média 31,3  $\mu\text{moles}$  de L-lactato /  $10^7$  células enquanto que nos sistemas incubados com L-glutamina essa produção foi de aproximadamente 45  $\mu\text{moles}$  de L-lactato /  $10^7$  células.

A produção de L-lactato por tumores de Walker 256 na forma sólida já havia sido demonstrada *in vivo* (SAUER e DAUCHY, 1985) e *in vitro* (HEMLINGER *et al.*, 2002). SAUER e DAUCHY (1983) demonstraram através das medidas das diferenças arteriovenosas das concentrações de metabólitos que o ácido láctico foi produzido ou utilizado pelo tumor dependendo de sua concentração no sangue arterial. A produção ou utilização ocorreu, respectivamente, quando a

concentração de lactato no sangue arterial foi menor que 1 ou maior que 3 mmol.L<sup>-1</sup>. Em um trabalho posterior, os autores demonstraram que no sangue venoso e arterial de ratos portadores de tumor sólido e nos vasos sangüíneos do próprio tumor, a produção e utilização de L-lactato pelas células Walker 256 são reguladas pelas concentrações de L-lactato no sangue arterial independentemente das diferenças do estado redox ([lactato]/[piruvato]) do tumor e do sangue do hospedeiro. O estado redox ([lactato]/[piruvato]) do hospedeiro varia, enquanto que o estado redox do tumor permanece constante. A concentração intracelular de L-lactato variou de 1-4 mmol.L<sup>-1</sup>, com média igual a 2,3 mmol.L<sup>-1</sup> (SAUER e DAUCHY, 1985).

Na utilização da L-glutamina, a glutaminase é de fundamental importância, pois representa a primeira enzima da via. Células tumorais podem apresentar uma acentuada expressão das enzimas glutaminase fosfato-dependente, glutaminase fosfato-independente e malato descarboxilase NADP-dependente, dando a possibilidade de uma via alternativa de produção de energia, a glutaminólise (MAZUREK *et al.*, 2005).

As atividades das isoenzimas glutaminases são perfeitamente distinguíveis pelas condições experimentais, pois podem depender ou não de fosfato e possuem atividades máximas em diferentes valores de pH. Para a glutaminase fosfato dependente observa-se uma atividade máxima em pH 8,5 e na presença de fosfato. Para a glutaminase fosfato independente o pH ótimo é observado em pH 6,6, na presença de maleato, o qual é necessário para sua ativação. Além disso, a glutaminase dependente de fosfato é mais instável, sendo inativada a 50 °C (CURTHOYS *et al.*, 1973; CURTHOYS *et al.*, 1974). Tais

características foram exploradas no presente estudo com a finalidade de se caracterizar o tipo de glutaminase presente nestas células.

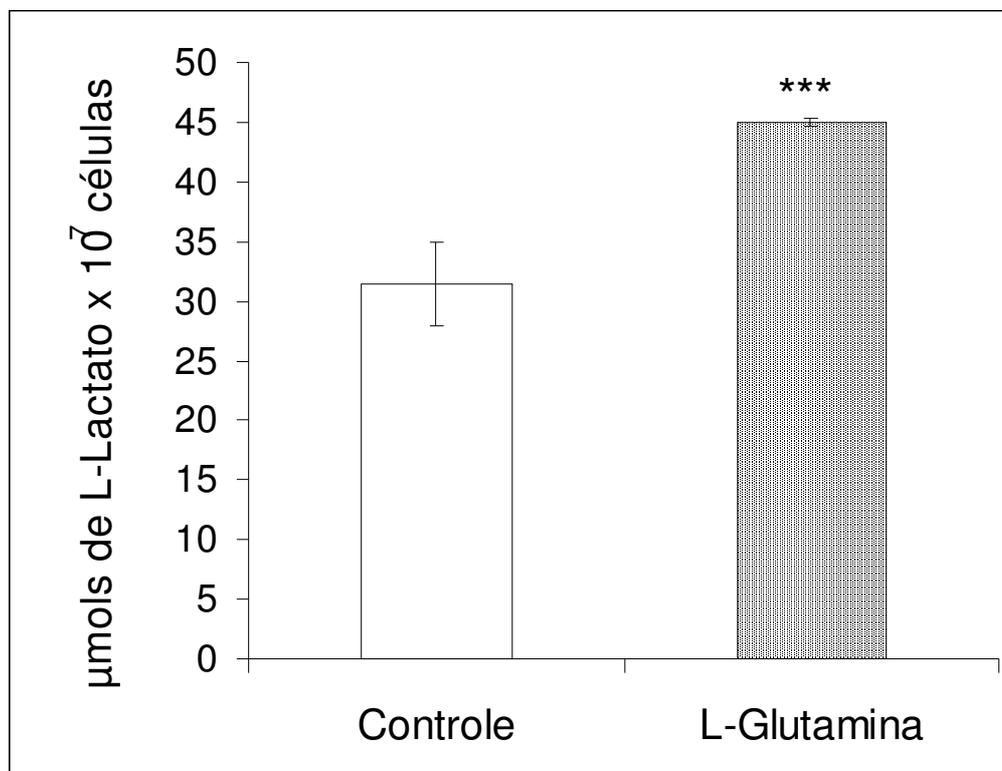


FIGURA 7. PRODUÇÃO DE L-LACTATO PELAS CÉLULAS WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: A amostra foi preparada conforme descrito na seção Materiais e Métodos (item 5.4.1). A alíquota obtida aos 30 minutos de incubação foi neutralizada, centrifugada e 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado a um meio de reação constituído de tampão Glicina  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 9,5), Hidrazina  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{NAD}^+$   $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 2,4 U de Lactato Desidrogenase. A mistura de reação foi incubada durante 90 minutos a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  em um volume final de 1 mL. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

\*\*\*:indica  $p < 0,001$ .

### 6.2.2. GLUTAMINASE DEPENDENTE DE FOSFATO

Nas condições experimentais utilizadas, foi detectada a presença da enzima dependente de fosfato, com uma atividade de

$11,7 \pm 6,5 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína. O  $K_m$  encontrado para a glutaminase nos extratos celulares do tumor ascítico de Walker 256 foi  $4,7 \pm 0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (figura 8). Esse valor é semelhante ao valor relatado por SHAPIRO e cols. (1982) quando utilizaram elevadas concentrações de fosfato ( $206 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para a glutaminase obtida de mitocôndrias isoladas de rim de rato. O  $K_m$  da enzima diminuiu de 36 para  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  quando a concentração de fosfato foi aumentada de 5 para  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , garantindo desse modo, condições saturantes de fosfato.

É amplamente reconhecido que a atividade da glutaminase é elevada em células tumorais (BOARD *et al.*, 1990) e já foi purificada a partir do líquido ascítico de pacientes portadores de câncer ovariano (BHATTACHARYA e MAITY, 2000) bem como, determinada em tumores sólidos de Walker 256 (KNOX *et al.*, 1967; KNOX *et al.*, 1969). Além da atividade elevada  $10,7 (\mu\text{moles}/\text{minuto}) \times \text{mg}$  de tecido para a isoforma do tipo L (liver), independente de fosfato, e de  $8,8 (\mu\text{moles}/\text{minuto}) \times \text{mg}$  de tecido para a isoforma do tipo K (kidney), dependente de fosfato) os autores estabeleceram uma correlação entre o conteúdo da glutaminase, o crescimento e o grau de diferenciação celular em 4 linhagens de tumores de origem mamária, incluindo o tumor de Walker 256. Em uma escala de intervalo de 1 a 5 em ordem decrescente quanto ao grau de diferenciação, o tumor de Walker 256, o qual apresenta células altamente indiferenciadas, recebeu o escore 4,9.

A figura 8 mostra um comportamento hiperbólico quanto à concentração de substrato. Estudos sobre a caracterização e descrição das propriedades cinéticas da glutaminase dependente de fosfato em células tumorais são escassos. WILLIAMS e MANSON (1957) e KOVACEVIC *et al.*, (1974) descreveram

as características da glutaminase utilizando-se mitocôndrias isoladas de células HeLa e de células do tumor ascítico de Ehrlich, respectivamente. Entretanto, o  $K_m$  da enzima não foi determinado nesses estudos. Posteriormente, QUESADA e cols. (1988) purificaram a glutaminase dependente de fosfato de mitocôndrias isoladas do tumor ascítico de Ehrlich e verificaram que a mesma se assemelhava a isoforma do tipo K, uma vez que, a do tipo L não precipitaria com anticorpos contra a enzima do tipo renal. As curvas de saturação para fosfato e L-glutamina foram sigmoidais quando analisadas em pH 8. Os valores de  $S_{0,5}$  foram  $48 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $7,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ , quando analisadas em condições saturantes, para fosfato e L-glutamina, respectivamente.

Diferentes propriedades cinéticas foram constatadas para a enzima purificada (QUESADA *et al.*, 1988) e a enzima obtida de células ou mitocôndrias isoladas (MCGIVAN e BRADFORD, 1983). A cooperatividade positiva para fosfato e L-glutamina foi somente observada quando se utilizou a enzima purificada, indicando que o processo de extração pode ter acarretado mudanças conformacionais capazes de alterar o comportamento cinético da enzima.

GOOSSENS e cols. (1996) investigaram o papel das vias bioenergéticas envolvidas na oxidação da L-glutamina sobre o efeito citotóxico do  $\text{TNF-}\alpha$ . Os autores demonstraram que as células de fibrosarcoma L929 utilizam preferencialmente a L-glutamina e não a glucose como substrato energético e que esse metabolismo energético é capaz de promover uma resposta citotóxica das células ao  $\text{TNF-}\alpha$ . A dependência entre a citotoxicidade do  $\text{TNF-}\alpha$  e a utilização da L-glutamina não é atribuída à taxa de respiração mitocondrial em si. As vias enzimáticas especificamente utilizadas na oxidação mitocondrial da

L-glutamina sensibilizam a mitocôndria aos efeitos citotóxicos do TNF- $\alpha$ , e sua atividade, além disso, amplificando a produção das ROS.

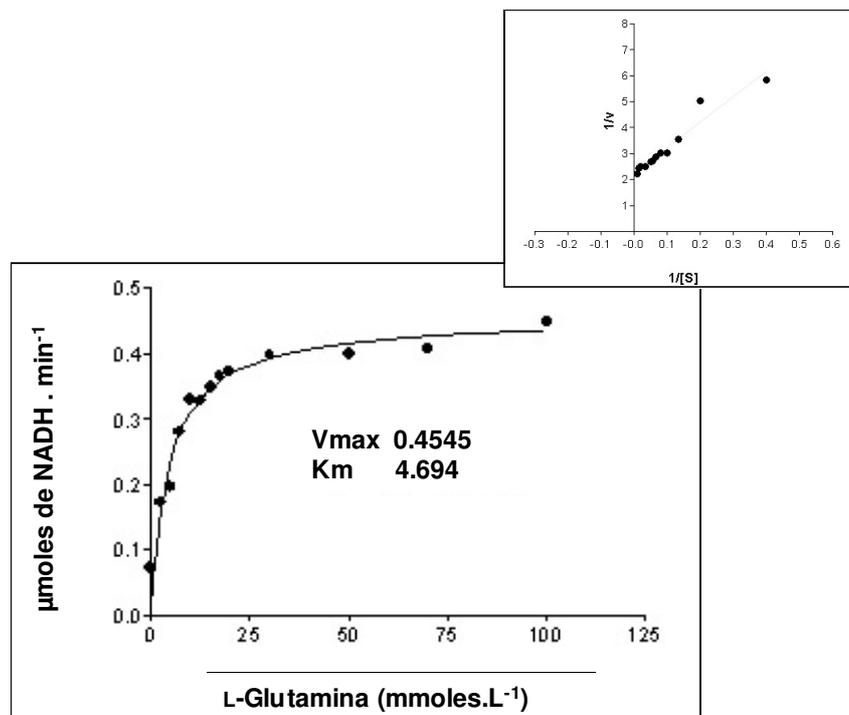


FIGURA 8. ATIVIDADE DA GLUTAMINASE EM EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Foram utilizados 1300 a 1600  $\mu\text{g/mL}$  de proteína e 2,5 a 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de L-glutamina. O inserto mostra o gráfico de Lineweaver-Burk. A amostra foi preparada conforme descrito na seção Materiais e Métodos (item 5.4.2.1).

### 6.2.3. GLUTAMINASE INDEPENDENTE DE FOSFATO

A atividade específica da glutaminase determinada quando as condições experimentais, tais como o pH e o cofator maleato foram utilizados para a isoenzima glutaminase independente de fosfato, foi  $3,0 \pm 1,2 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína (Tabela 1) quando o extrato celular não foi aquecido a  $50^\circ\text{C}$ . Esse

valor pode ser considerado o somatório das atividades das duas isoenzimas, levando-se em conta o fato de que é possível a permanência de uma atividade residual da glutaminase dependente de fosfato mesmo distante do seu pH ótimo, que é 8,6. Quando o extrato foi submetido ao aquecimento a 50 °C a atividade determinada foi  $1,1 \pm 0,6 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$  (Tabela 1). Mesmo assim, a presença da atividade da glutaminase reforça a hipótese de que as células Walker 256 realizam a glutaminólise.

TABELA 1. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA GLUTAMINASE INDEPENDENTE DE FOSFATO.

<b>Atividade Específica da Glutaminase</b> ( $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$ )	
<i>com incubação a 50 °C</i>	<i>sem incubação a 50 °C</i>
$1.1 \pm 0.6$	$3.0 \pm 1.2$

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: A amostra foi preparada conforme item 5.4.2.2. da Seção Materiais e Métodos. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi transferida para o seguinte meio de reação: Maleato 60  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  - EDTA 0,2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 6,6) - 18  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-glutamina e incubada a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi interrompida com HCl 0,3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O volume total de 1 mL foi transferido para um segundo meio de reação contendo Tris 130  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 9,4),  $\text{NAD}^+$  0,2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ATP 0,2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 70 U de GDH. Essa mistura foi incubada durante 30 minutos a 37 °C e a leitura da absorbância realizada a 340 nm. Os dados representam as médias  $\pm$  EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### **6.3. UTILIZAÇÃO DE L-ARGININA PELAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE POLIAMINAS - ARGINASE E AGMATINASE E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA NOS**

Dando seqüência aos estudos referentes à utilização de aminoácidos pelas células Walker 256, foi também avaliada a utilização de L-arginina. Este aminoácido pode ser utilizado via arginase, óxido nítrico sintase e via arginina descarboxilase (Figura 2).

No primeiro caso, isto é, da utilização da L-arginina na via da arginase, o produto metabólico é a uréia. No segundo caso, o produto é o NO e no terceiro é a agmatina. Inicialmente, foi avaliada a atividade da arginase.

#### **6.3.1. ATIVIDADE DA ARGINASE EM CÉLULAS WALKER 256 INTEIRAS**

A atividade da arginase nas células do tumor ascítico de Walker foi avaliada pelo método de SATOH e ITO (1967). Na presença e na ausência de 25 mmol.L<sup>-1</sup> de L-arginina, em função do tempo de incubação. A figura 9 mostra a produção de uréia pelas células Walker 256 intactas, ao longo dos 45 minutos. Na presença de L-arginina, as células produziram  $\approx 334 \mu\text{mols.L}^{-1} / 10^7$  células aos 30 minutos de incubação e  $\approx 505 \mu\text{mols.L}^{-1} / 10^7$  células aos 45 minutos de incubação (Figura 9). Esses valores correspondem a uma quantidade 17 vezes maior que os controles aos 30 minutos de incubação e 25 vezes maior que os controles aos 45 minutos de incubação. Embora este resultado não signifique a operacionalidade de um ciclo da uréia completo, a arginase tem sido encontrada em tecidos que não dispõem desse ciclo e sua função em tecidos extra-hepáticos não é clara. Provavelmente esta enzima está relacionada à

síntese de poliaminas e sua função na modulação da biossíntese dessas moléculas e o crescimento de tumores têm sido relatados (GOKMEN et al., 2001).

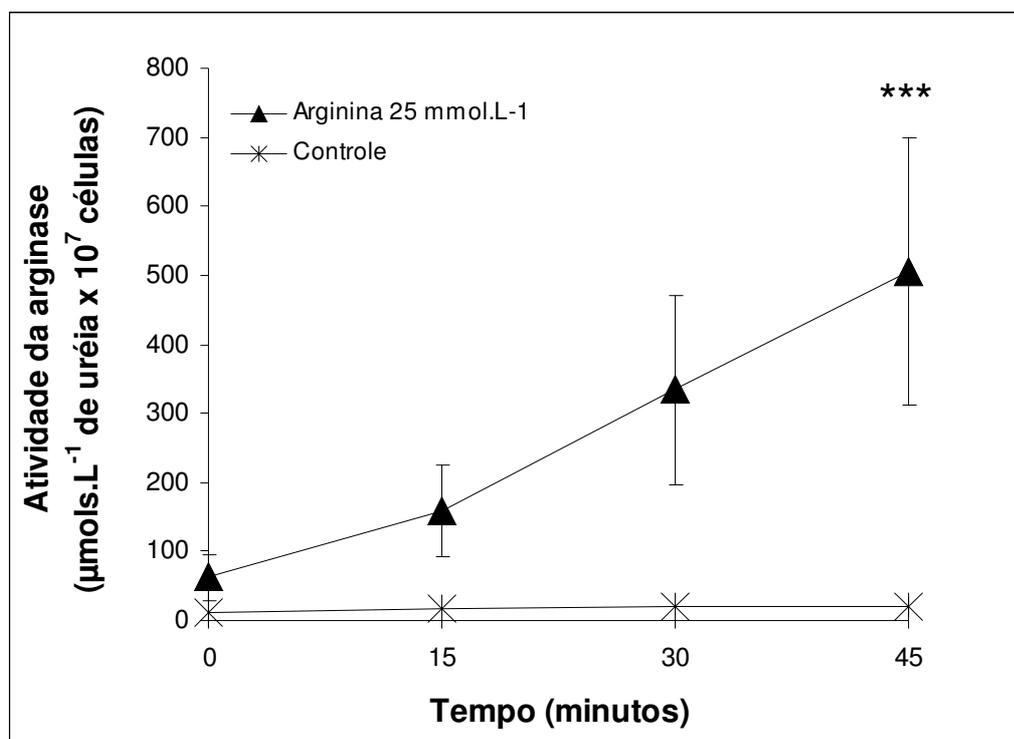


FIGURA 9. PRODUÇÃO DE URÉIA PELA ARGINASE EM FUNÇÃO DO TEMPO.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: As células foram diluídas em tampão Maleato 10 mmol.L<sup>-1</sup> – MnSO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup> - 25 mmol.L<sup>-1</sup> de L-arginina obtendo-se 4,1 x 10<sup>7</sup> células para cada 1,0 mL de suspensão e mantidas sob agitação constante a 37 °C. Nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos após a adição de L-arginina, foram coletados 1,0 mL da suspensão celular. A suspensão foi centrifugada a 1510 g por 10 minutos e ao sobrenadante foram adicionados: 540 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3:1 e 75 µL de solução de diacetilmonoxima 3% em etanol absoluto. Os tubos foram submetidos a banho de fervura (100 °C) durante uma hora e a leitura da absorbância realizada a 490 nm. Os dados representam as médias ± EPM em relação ao controle no mesmo tempo, e três experimentos independentes utilizando o tumor ascítico com 6 dias após o implante. p < 0,001.

### 6.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM EXTRATOS DE CÉLULAS WALKER 256

Nesses experimentos foram utilizados extratos celulares submetidos ao aquecimento a 50 °C para promover a ativação da enzima (SCHIMKE, 1962). Os resultados indicaram a capacidade de síntese de uréia pela via da arginase quando foram utilizados os extratos das células Walker 256. A atividade da arginase revelou-se dependente do tempo de desenvolvimento do tumor ascítico. Os extratos obtidos dos tumores ascíticos com 4 dias de desenvolvimento após o implante apresentaram um terço (35,7 %) da atividade em relação ao tumor com 6 dias de desenvolvimento (Tabela 2). Esse fato poderia sugerir uma indução da atividade desta enzima por fatores dependentes do tempo de desenvolvimento do tumor ou ainda, secretados pelo hospedeiro. O Km apresentado pela arginase foi de  $\approx 9,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,39 \cdot 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> (figura 10). Este valor é aproximadamente duas vezes maior que aquele encontrado para a arginase presente em frações mitocôndriais de homogeneizados de glândulas mamárias bovinas ( $4,95 \cdot 10^{-2} \pm 0,98 \cdot 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>) (BASCH *et al.*, 1997).

Pacientes com câncer de mama apresentaram elevada atividade da arginase em relação aos tecidos-controle adjacentes aos tumores (POREMBSKA *et al.*, 2003). O papel das arginases em várias linhagens celulares de câncer de mama humano foi investigado por SINGH e cols. (2000). As linhagens celulares que apresentaram altos níveis de expressão da arginase continham naturalmente altas taxas de crescimento em relação àquelas que apresentaram níveis de expressão da arginase imensuráveis ou baixos. Além disso, as

linhagens celulares que continham atividade e expressão da arginase apresentaram crescimento mais rápido e níveis significativamente mais altos de poliaminas. Sendo assim, é importante destacar que o tumor de Walker 256, o qual originariamente foi detectado como um tumor de mama em ratas, apresenta atividade para a arginase e essa atividade varia ao longo do desenvolvimento do tumor, sugerindo um papel determinante em sua progressão. As atividades constatadas por SINGH e cols. (2000) foram de  $\approx 0,5$  nmoles de uréia/30 min/ $\mu\text{g}$  proteína para as linhagens celulares de câncer de mama (BT-474 e MDA-MB-468), enquanto que, para os extratos celulares do tumor ascítico de Walker 256 esta atividade foi de  $30 \mu\text{moles de uréia} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ , demonstrando uma atividade muito superior às linhagens celulares estudadas por aqueles autores.

TABELA 2. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ARGINASE

<b>Atividade Específica da Arginase em extratos de células Walker 256 ao longo do desenvolvimento do tumor ascítico</b>	
<b>Tempo de desenvolvimento</b> (em dias a partir da inoculação)	<b>Atividade Específica</b> ( $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ )
4 dias	$11,04 \pm 2,98$
6 dias	$30,96 \pm 6,26^*$

FONTE: o autor (2008)

NOTA: A obtenção das amostras foi feita conforme o item 5.5.2 da seção Materiais e Métodos. A dosagem de uréia foi feita utilizando-se diacetilmonoxima 3% em etanol e a acidificação foi feita com  $\text{H}_3\text{PO}_2:\text{H}_2\text{SO}_4 - 3:1$ . As amostras foram submetidas a banho de fervura ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante uma hora e a leitura da absorbância realizada a 490 nm. Os dados representam as médias  $\pm$  EPM de cinco e três experimentos independentes em triplicata, para o tumor com 6 e 4 dias, respectivamente. \*  $p < 0,05$ .

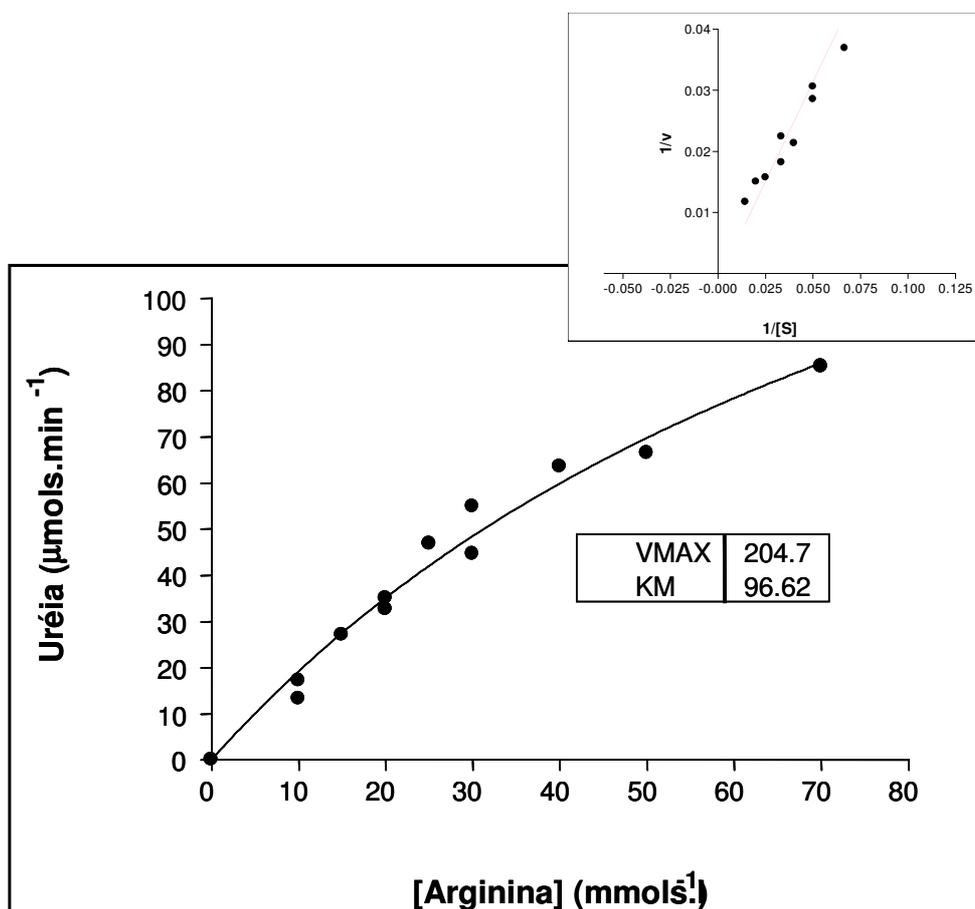


FIGURA 10. ATIVIDADE DA ARGINASE EM EXTRATOS DE CÉLULAS WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Foram utilizados 1200 a 2000  $\mu\text{g}$  de proteína e 10 a 70  $\text{mmol.L}^{-1}$  de L-arginina. O inserto mostra o gráfico de Lineaweaver-Burk. O preparo das amostras foi realizado conforme a descrição apresentada no item 5.5.2. da Seção Materiais e Métodos.

### 6.3.3. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS CÉLULAS WALKER 256

A L-arginina possui múltiplas funções. Além de ser um aminoácido necessário para a síntese protéica e precursora na síntese de L-ornitina e uréia, como já descrito, ele serve também como precursor na síntese de NO, podendo ser convertida pela NOS a NO e citrulina. Neste trabalho, a produção de NO, expressa em concentração de nitrito, foi demonstrada em células do tumor ascítico de Walker 256 íntegras. Os resultados indicaram a síntese significativa de NO pelas células Walker 256, decorridas 4 e 5 horas ( $2,55 \pm 1,56$  e  $4,05 \pm 1,99$  nmoles.L<sup>-1</sup> de NO x 10<sup>7</sup> células, respectivamente) após incubação com L-arginina 10 mmol.L<sup>-1</sup> (Figura 11). Isso seria sugestivo de que nos períodos iniciais de incubação (30 e 40 minutos) a L-arginina é metabolizada pela arginase (Figura 9), enquanto que nos períodos mais tardios (4 e 5 horas) a produção de NO é observada.

Vale destacar que a produção de NO em células tumorais tem sido descrita (TAPIERO *et al.*, 2002), porém, em relação à produção de NO pelas células Walker 256, não havia relatos anteriores para a forma sólida e ascítica.

O envolvimento do NO na caquexia já foi anteriormente demonstrado em modelos experimentais. Neste aspecto, os efeitos do NO sobre a perda muscular e desdiferenciação celular foram investigados em camundongos tratados com TNF- $\alpha$ . Neste modelo de perda muscular murina, o TNF- $\alpha$  induziu estresse oxidativo e a síntese da óxido nítrico sintase (NOS) no músculo esquelético. O tratamento adicional com antioxidantes,  $\alpha$ -tocoferol, BW755c ou com um inibidor da NOS (nitro-L-arginina) diminuiu significativamente a perda de peso e a degradação das proteínas musculares nos animais tratados,

prevenindo desta forma a perda muscular e as anormalidades moleculares do músculo esquelético (BUCK e CHOJKIER, 1996).

O aumento na produção de NO parece estar correlacionado com o desenvolvimento da massa tumoral e, com o desenvolvimento das manifestações da caquexia. Além disso, níveis plasmáticos aumentados de NO já foram descritos para pacientes com câncer gástrico e carcinoma coloretal (BAKAN *et al.*, 2002; SZALECZKY *et al.*, 2000). Ao NO atribui-se papéis contrastantes. Embora este radical seja considerado importante efector da atividade antitumoral (HIBBS *et al.*, 1988), a produção exacerbada de NO pode levar a danos no DNA, resultando em morte celular, mutações e câncer (AMBS *et al.*, 1997).

A produção de NO por macrófagos de animais portadores de tumor sólido de Walker 256 por períodos prolongados, foi demonstrada anteriormente por BRACHT (2006). O excesso de NO em tecidos inflamados pode também ocasionar a nitração da proteína p53 supressora de tumor (AMBS *et al.*, 1997; TAPIERO *et al.*, 2002), contribuindo com a carcinogênese e a progressão tumoral. Adicionalmente, esta espécie radicalar pode estar envolvida com a perda de massa muscular. Em um modelo de câncer de cólon induzido por carcinógenos em ratos, a inibição da NOS promove alterações pré-neoplásicas através da diminuição da produção de NO e da indução da ODC e da síntese de poliaminas (SCHLEIFFER *et al.*, 2000).

Estas evidências em associação com os resultados obtidos no presente estudo reforçam a sugestão de que esta espécie radicalar contribui de alguma maneira para os processos que levam à caquexia.

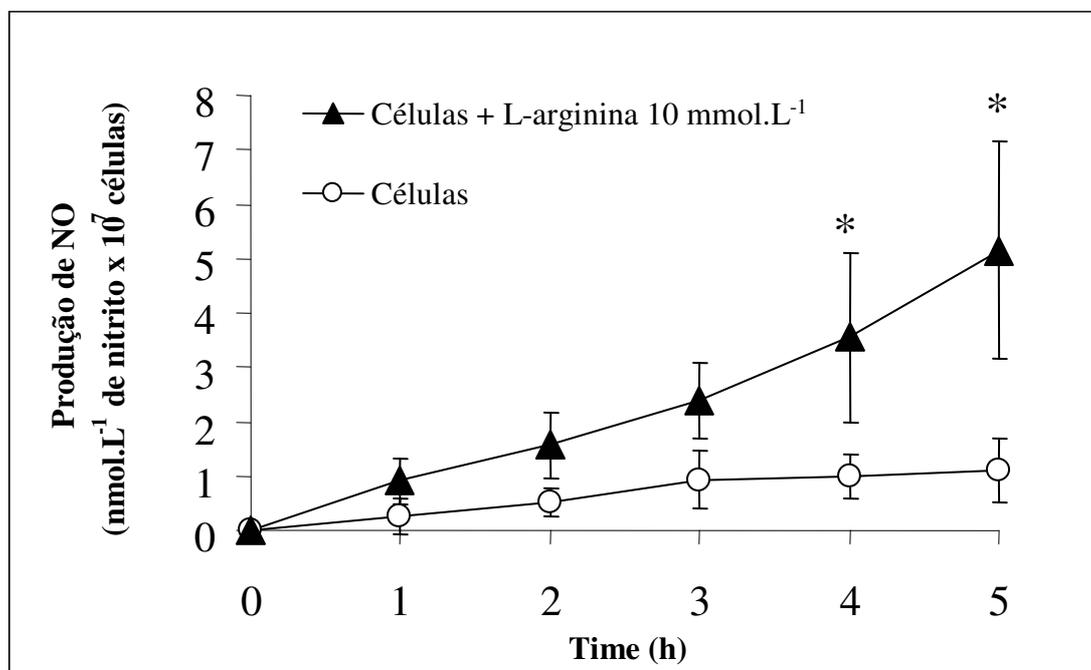


FIGURA 11. PRODUÇÃO DE NO PELAS CÉLULAS WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Após pré-incubação durante 30 minutos a suspensão celular foi mantida sob agitação a 37 °C. Foram coletadas alíquotas de 0,6 mL nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a adição de 10 mM de L-arginina. Para a dosagem de NO, uma alíquota de 200 µL da mistura reativa foi colocada em uma placa de 96 poços e a leitura feita em leitor de ELISA em 550 nm. Os valores apresentados representam as médias ± EPM de quatro experimentos independentes.

\* p<0,05.

#### 6.3.4. ATIVIDADE DA AGMATINASE

Além da arginase e da NOS, a L-arginina pode ser utilizada pela arginina descarboxilase, gerando uma amina catiônica conhecida por agmatina. A ocorrência deste metabólito está relacionada com a síntese de putrescina, precursora da espermina e de outras poliaminas. A agmatina pode gerar putrescina pela ação da agmatinase (agmatina ureohidrolase), a qual é capaz de converter a agmatina em putrescina e uréia (Figura 2). Esta enzima foi descrita em tecidos de mamíferos, tais como cérebro, rins, glândula adrenal e fígado (VARGIU *et al.*, 1999), mas sua existência em células tumorais ainda não foi descrita. Portanto, torna-se relevante a avaliação da possibilidade da ocorrência desta, em células Walker 256.

Neste estudo, a atividade específica da agmatinase foi avaliada visando a detecção da produção de uréia na presença do substrato agmatina. Utilizando-se o método da detecção colorimétrica da uréia com diacetilmonoxima, os resultados demonstraram a existência da agmatinase com atividade específica de  $19,9 \pm 1,23 \mu\text{moles de uréia} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ . No entanto, a dosagem enzimática com o kit contendo urease e glutamato desidrogenase (Bioclin, Brasil) a produção detectada foi muito baixa, de  $1,0 \pm 0,29 \text{ nmoles de NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ , indicando a presença de interferentes capazes de reagir igualmente com a diacetilmonoxima, atuando de modo inespecífico (CARVAJAL *et al.*, 1999; IYER *et al.* 2002).

A atividade da enzima arginase pode estar relacionada ao aumento de produção da uréia verificado em animais portadores do tumor de Walker (CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2003), justificando dessa forma a produção de uréia por tecidos extra-hepáticos em animais caquéticos. De fato, os resultados

indicaram que esta produção pode ser atribuída, em maior grau, à atividade da arginase, uma vez que a atividade detectada para a agmatinase, não foi conclusiva de sua existência nestas células, sendo necessário experimentos complementares para esclarecer esta questão.

#### **6.3.5. DETECÇÃO DE POLIAMINAS PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256**

Utilizando-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC) segundo a metodologia descrita por SCHENKEL e cols. (1995), determinou-se a produção de putrescina, espermina e espermidina. A figura 12 ilustra através de um cromatograma representativo, os picos relativos aos padrões (Figura 12 A) e ao tumor com 6 dias de desenvolvimento (Figura 12 B) com seus respectivos tempos de retenção.

Demonstrou-se nesta etapa de crescimento do tumor que as células Walker 256 são capazes de produzir poliaminas. Apesar dos conhecidos efeitos das poliaminas sobre o crescimento celular não foram detectadas diferenças significativas entre a produção das poliaminas putrescina, espermidina e espermina entre os tumores com 4 e 6 dias de desenvolvimento (Tabela 3).

Neste estudo, as concentrações de putrescina foram menores que os níveis das poliaminas espermidina e espermina (Tabela 3). Este resultado está de acordo com os resultados descritos por outros pesquisadores que utilizaram outros tipos de células tumorais, embora as concentrações relatadas fossem superiores aquelas encontradas para o tumor ascítico de Walker 256. Nesse aspecto é importante salientar que a inibição da ODC diminui os níveis de

putrescina e promove o aumento dos níveis de espermina e espermidina. Esse aumento é positivamente correlacionado com a ativação do fator NF- $\kappa$ B (WILLIAMS-ASHMAN *et al.*, 1972; BJELAKOVIC *et al.*, 2006). Nas células do tumor sólido de Walker 256, a ativação deste fator nuclear ocorre concomitante ao aumento do conteúdo da subunidade p50 de NF- $\kappa$ B no núcleo celular (ZALETOK *et al.*, 2004).

Além disso, o conteúdo de poliaminas é uma consequência do equilíbrio entre as vias de biossíntese e degradação. A atividade da S-adenosiltransferase (SSAT), a enzima responsável pela degradação das poliaminas, é altamente regulada e rapidamente induzida em resposta a um grande número de estímulos, incluindo drogas, hormônios, citocinas e as próprias poliaminas (PEGG e HU, 1995; BABBAR *et al.*, 2006; BJELAKOVIC *et al.*, 2006). Entretanto, a atividade dessa enzima não foi avaliada no presente trabalho. Se sua atividade estivesse aumentada, seriam justificados os baixos níveis de poliaminas detectados.

Em Células de tumores pulmonares (non-small cell lung cancer) foi observada a expressão de SSAT em resposta à ação do TNF- $\alpha$  através do fator nuclear NF- $\kappa$ B (BABBAR *et al.*, 2006).

Diante das observações acerca das diferentes funções das poliaminas e seu papel na regulação e modulação dos processos de crescimento celular, a produção das poliaminas pelas células Walker 256 é relevante e pode estar associada a uma complexa rede de interações entre essas moléculas e outros mediadores metabólicos tais como as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) e a PGE<sub>2</sub>, sendo tais mediadores, determinantes no estabelecimento e evolução do processo caquético.

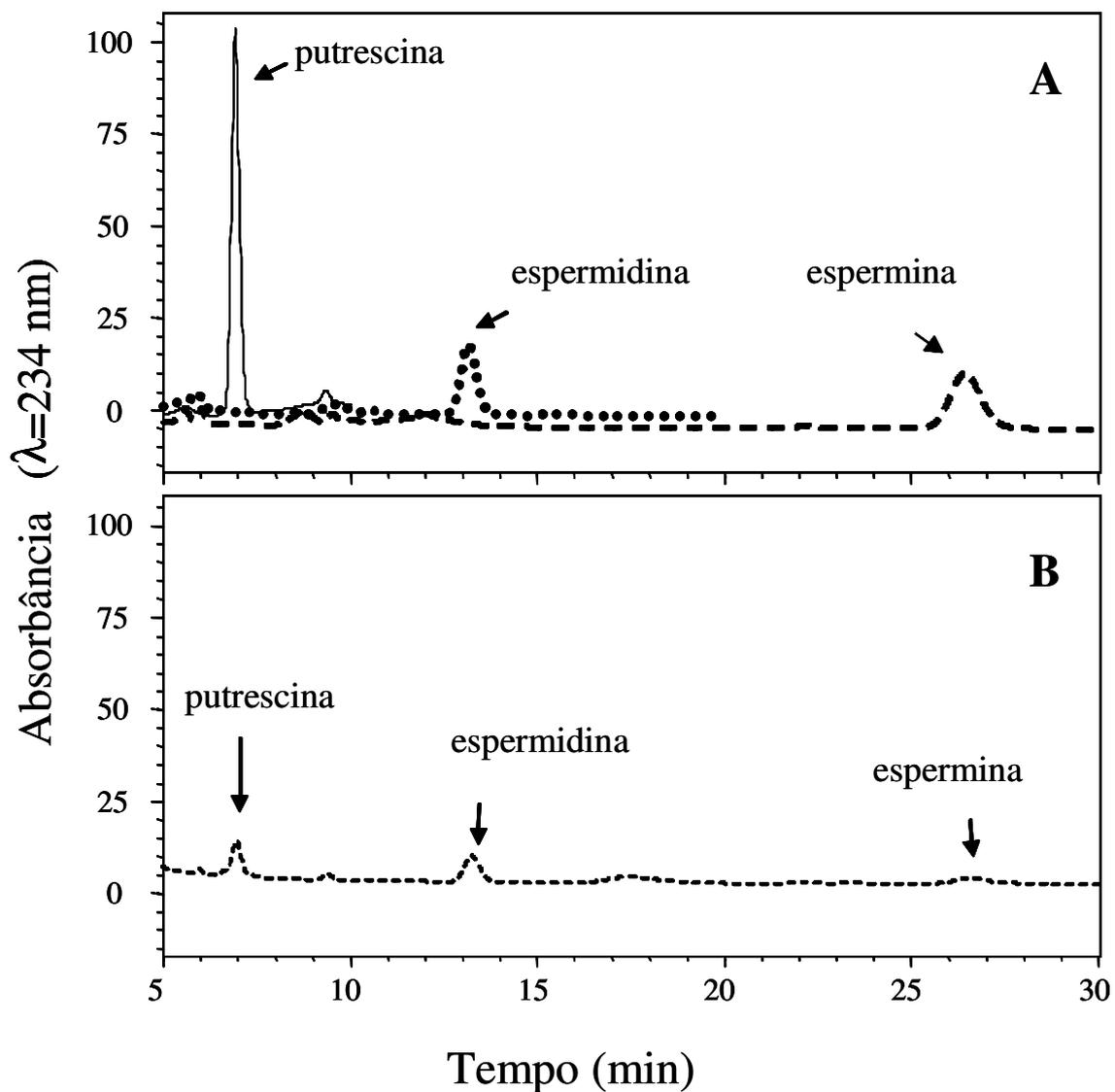


FIGURA 12. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DAS POLIAMINAS (PUTRESCINA, ESPERMIDINA E ESPERMINA).

FONTE: o autor (2008)

NOTA: A) Os picos representam os padrões de putrescina 2 nmol, espermidina 20 nmol e espermidina 20 nmol. B) Os picos representam as poliaminas produzidas pelo tumor de Walker 256 com 6 dias de desenvolvimento.

TABELA 3. PRODUÇÃO DAS POLIAMINAS PUTRESCINA, ESPERMIDINA E ESPERMINA PELAS CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256 OBTIDAS DE TUMORES COM 4 E 6 DIAS APÓS O IMPLANTE

<i>Poliaminas</i>	<i>Poliaminas produzidas (nmoles/2,5 x 10<sup>7</sup> células)</i>	
	<i>4 dias</i>	<i>6 dias</i>
<b>Putrescina</b>	<b>1,19 ± 0,14</b>	<b>0,96 ± 0,05</b>
<b>Espermidina</b>	<b>3,63 ± 0,28</b>	<b>4,05 ± 0,44</b>
<b>Espermina</b>	<b>4,79 ± 0,84</b>	<b>3,62 ± 0,11</b>

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: As células foram coletadas e a suspensão ajustada para  $2,5 \times 10^7$  células/mL. Esta suspensão foi desproteïnizada e o e a mistura foi novamente centrifugada a 570 g por 10 minutos. O sobrenadante que continha as poliaminas sofreu então um processo de derivatização pré-coluna segundo o método de SCHENKEL e cols. (1995) e as amostras analisadas em HPLC. Os resultados representam as médias  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

#### 6.4. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , estão diretamente envolvidas na promoção e no desenvolvimento da Síndrome de Caquexia em modelos experimentais (MOLOTKOV *et al.*, 1998; ARGILÉS *et al.*, 1999). Quando administradas a animais portadores de câncer, promovem perda de peso, atrofia muscular e a diminuição da ingestão de alimentos mimetizando os sintomas do processo caquético (MCNAMARA *et al.*, 1992). O tratamento de animais portadores de cânceres com anticorpos anti-IL-6 ou contra seu receptor, reverte os sintomas da síndrome (TSUJINAKA *et al.*, 1996). Todavia, a IL-6 é conhecida por exercer um duplo papel na interação entre o tumor e o hospedeiro, porque a produção aumentada desta molécula pelas células tumorais ou pelos tecidos adjacentes, pode promover uma inibição no crescimento tumoral, mas por outro lado, também pode promover o desenvolvimento da caquexia do câncer (SAINI *et al.*, 2006).

O TNF- $\alpha$  pode ser considerado o mediador mais importante no estabelecimento da caquexia do câncer, embora sua atividade possa estar associada a outras citocinas tais como a IL-6 (VOORZANGER *et al.*, 1996; ALVAREZ *et al.*, 2002). Acredita-se que o TNF- $\alpha$  atue como um segundo estimulador ("*second wave*") das demais citocinas, incluindo as quimiocinas e a IL-6. A exposição crônica de animais experimentais ao TNF- $\alpha$  resulta em uma sustentada perda de peso, associada aos sintomas patológicos da caquexia (OLLIFF *et al.*, 1987; TAYEK e BRASEL, 1990). O aumento nas taxas de degradação de proteínas musculares em modelos experimentais de caquexia está correlacionado aos níveis de TNF- $\alpha$  (BUCK E CHOJKIER, 1996; LLOVERA *et al.*, 1998). Diferentes abordagens experimentais tais como a imunização

passiva com anticorpos, o uso de animais nocauteados para os receptores dessas moléculas ou animais superexpressando as formas solúveis desses receptores, têm sido utilizadas para investigar o papel dessas citocinas na caquexia (ARGILES *et al.*, 2005).

#### **6.4.1. PRODUÇÃO *in vitro* DE IL-6**

A produção *in vitro* de IL-6 pelas células do tumor ascítico de Walker 256 com 4 dias após o implante do tumor foi de  $2,64 \pm 0,09$  ng/mL/ $2,5 \times 10^7$  e de  $0,02 \pm 0,01$  ng/mL/ $2,5 \times 10^7$  células no tumor com 6 dias após o implante. Para o tumor de 4 dias de desenvolvimento a produção IL-6 foi 124x maior que para o tumor de 6 dias de desenvolvimento (Figura 13 A). Esses resultados demonstraram a produção *in vitro* de IL-6 pelas células do tumor ascítico de Walker 256 e que esta produção varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do tumor.

A produção de altos níveis de IL-6 pelo tumor ascítico de Walker 256 com 4 dias após o implante é concomitante à hiperproliferação celular sendo a IL-6 um inibidor de apoptose e o TNF- $\alpha$  um indutor (SHARMA e ANKER, 2002).

As citocinas e seus receptores são conhecidos por atuarem como reguladores nos processos de morte celular. A demonstração de que as citocinas produzidas pelo tumor têm papel determinante no estabelecimento do processo caquético em relação às citocinas produzidas pelo hospedeiro foi feita por CAHLIN e cols. (2000a,b). Para esse propósito os autores realizaram experimentos que combinavam animais nocauteados para as citocinas e o uso de anticorpos que neutralizavam essas moléculas quando secretadas pelas células tumorais que eram do tipo selvagem (CAHLIN *et al.*, 2000b). A produção

de IL-6 pelo hospedeiro contribuiu significativamente para o estabelecimento do quadro de caquexia dependente de PGE<sub>2</sub>, enquanto que para as outras citocinas estudadas esse efeito foi insignificante.

A IL-6 é um fator de crescimento autócrino secretado por indução de células normais e constitutivamente em diferentes tipos de tumores e linhagens celulares malignas (VOORZANGER *et al.*, 1996; ANGELO *et al.*, 2002; SAINI *et al.*, 2006; KURODA *et al.*, 2007). Em linhagens de carcinoma renal os níveis de expressão da IL-6 são dependentes da expressão da proteína supressora de tumor p53. Nas células que contêm o gene p53<sup>+/+</sup> do tipo selvagem os níveis de IL-6 são baixos em relação às aquelas que contêm o gene p53<sup>-/-</sup> mutante. A proteína p53 do tipo selvagem suprime a atividade do promotor para a IL-6 enquanto que a p53 do tipo mutante atua como estimulador ("*enhancer*") deste promotor. A supressão da atividade do promotor para a IL-6 é mediada pela interferência de vários fatores de transcrição nuclear tais como o C/EBP, CREB e NF-κB (ANGELO *et al.*, 2002).

A proteína p53 tem papel fundamental em certos processos de apoptose, sendo que a deleção do gene ou inativação de seus produtos, presumivelmente resulta em diminuição da taxa de apoptose. Desta forma, sugere-se que os níveis de expressão da IL-6 podem mediar, pelo menos em parte, a capacidade de sobrevivência das células tumorais. Em células de leucemia mielóide murina que originariamente apresentavam deleção de p53, a reintrodução desse gene promoveu a perda da viabilidade celular nessas células, as quais mostravam características de apoptose. A administração de IL-6 foi capaz de reverter esse efeito indicando um papel anti-apoptótico para esta citocina (YONISH-ROUACH *et al.*, 1991). A IL-6 também é capaz de prevenir

a apoptose em uma variedade de linhagens celulares, em células linfóides e também em células do epitélio intestinal através da ativação do proto-oncogene Bcl2 (ROLLWAGEN *et al.*, 1998). Desse modo, a proteína p53 e a citocina IL-6 parecem atuar de modo antagônico. A p53 é responsável por manter baixos níveis de IL-6 enquanto que a IL-6 inibe a apoptose mediada por p53 e também atua como estímulo proliferativo. As células do tumor ascítico de Walker 256 superexpressam naturalmente o gene Bcl2 (MILANI *et al.*, 2001). Embora a expressão da p53 pelo tumor ascítico de Walker 256 ainda não tenha sido documentada, a produção de altos níveis de IL-6 pelas células do tumor ascítico, concomitante a hiperproliferação característica do tumor com 4 dias de desenvolvimento estão de acordo com a hipótese de que a IL-6 desempenha um duplo papel na modulação dos processos de proliferação e apoptose. A regulação dos níveis desta citocina está sujeita a um complexo mecanismo que envolve diferentes fatores reguladores de transcrição e no caso do tumor de Walker 256, esses níveis variam ao longo de desenvolvimento do tumor.

#### **6.4.2. PRODUÇÃO *in vitro* DE TNF- $\alpha$**

A produção de TNF- $\alpha$  foi também determinada utilizando-se o método de ELISA para TNF- $\alpha$  (Amersham Bioscience). A produção desta citocina diferiu estatisticamente entre os tumores com 4 ou 6 dias após o implante. As células do tumor ascítico de Walker 256 com 4 dias após o implante produziram  $6,7 \pm 0,31$  ng/mL/ $2,5 \times 10^7$  células, aumentando esta produção para  $7,9 \pm 0,13$  ng/mL/ $2,5 \times 10^7$  células para o tumor com 6 dias de desenvolvimento (Figura 13 B).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica amplamente conhecida como um mediador do processo caquético (SHARMA e ANKER, 2002; SAINI *et al.*, 2006; BEN-BARUCH, 2006). Quanto ao papel patofisiológico do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento de tumores associados à Síndrome de Caquexia, nossas observações podem indicar uma relação com os mecanismos de resistência do hospedeiro aos tumores. Esses mecanismos são modulados pelas células do sistema imune e por fatores solúveis, incluindo as citocinas (BANYER *et al.*, 2000). De fato, ao TNF- $\alpha$  tem sido atribuído o papel de modulador pró-inflamatório nos processos de inibição da eritropoese, devido a sua habilidade para induzir a produção de NO. O NO, por sua vez, é capaz de inibir a proliferação das células progenitoras eritróides na medula óssea (FUCHS *et al.*, 1991). Além de produtoras de TNF- $\alpha$ , as células do tumor ascítico de Walker 256 produzem também grandes quantidades de NO (Figura 11). Esses resultados vêm de encontro à hipótese de que a produção de TNF- $\alpha$  e NO pelas células Walker 256 possa contribuir para os mecanismos de resistência do hospedeiro ao tumor.

Níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  ( $\approx 30$  pg/mL) já haviam sido encontrados em ratos portadores de tumores sólidos com 7 dias de desenvolvimento em relação aos animais saudáveis ( $\approx 10$  pg/mL) (WAKI *et al.*, 1999). Recentemente, foi demonstrada a expressão do TNF- $\alpha$  em tumores sólidos de Walker 256 ao longo de seu desenvolvimento (PERROUD *et al.*, 2006). Como os resultados aqui apresentados mostraram uma elevada produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes dos tumores ascíticos com 6 dias de desenvolvimento ( $7,88 \pm 0,13$  ng/mL/ $2,5 \times 10^7$  células), é pertinente propor que

os níveis séricos elevados nos animais portadores de tumores podem ser atribuídos à produção desta citocina pelas próprias células tumorais.

A administração crônica de TNF- $\alpha$  a animais experimentais promove a diminuição no conteúdo de proteínas e desencadeia a ativação da proteólise ATP-dependente em células musculares (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1993). Também já foi demonstrado que tecidos musculares de rato inoculados com o tumor de Yoshida apresentaram o conteúdo de mRNA aumentado para os dois tipos de receptores para TNF- $\alpha$  (TNFR<sub>1</sub> e TNFR<sub>2</sub>) quatro dias após a inoculação (FIGUERAS *et al.*, 2005). Considerando que o TNF- $\alpha$  interfere no “turnover” de proteínas nos tecidos, contribuindo desse modo com a caquexia do câncer (COSTELLI *et al.*, 1993), a elevada produção de TNF- $\alpha$  pelas células do tumor ascítico de Walker 256 reforça a proposição de que a caquexia resultante do implante de tumores decorre, pelo menos em parte, da produção de TNF- $\alpha$  pelas próprias células tumorais.

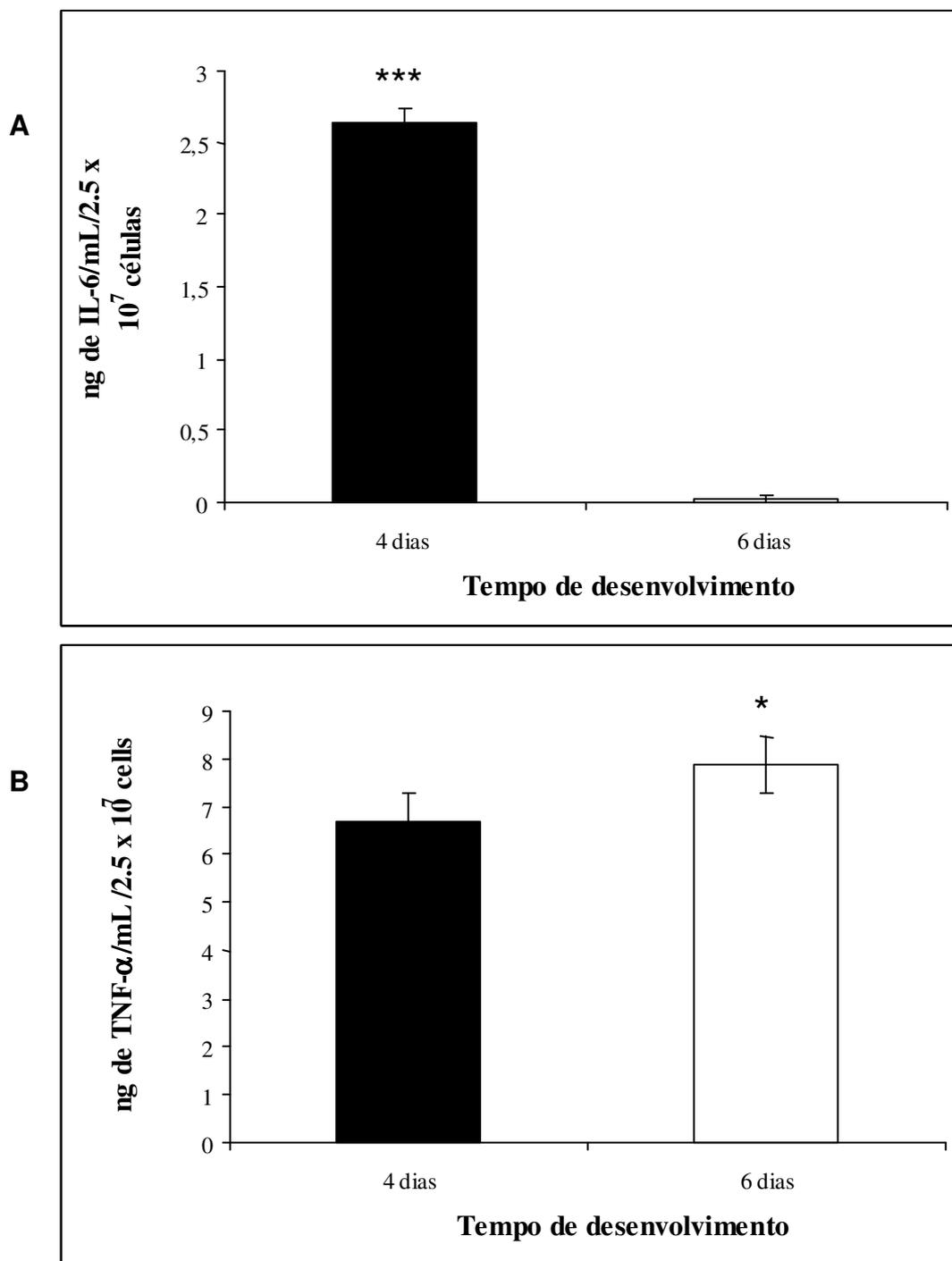


FIGURA 13. PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO DO TUMOR.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: O preparo das amostras foi realizado conforme a descrição apresentada no item 5.6. da Seção Materiais e Métodos. Os níveis de IL-6 (A) e TNF- $\alpha$  (B) foram medidos por ELISA no tumor ascítico de Walker com 4 ou 6 dias após o implante. Os resultados representam as médias  $\pm$  EPM obtidos de triplicatas dos sobrenadantes procedentes de um *pool* de células coletadas de 4 animais portadores do tumor ascítico de Walker. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ .

### 6.5. PRODUÇÃO *in vitro* DE PGE<sub>2</sub>

As células do tumor ascítico de Walker 256 produziram PGE<sub>2</sub> e esta produção variou em função do tempo de desenvolvimento do tumor (Figura 14). Quando incubadas na presença de ácido araquidônico, as células Walker 256 com 6 dias após o implante produziram 5,5 vezes mais PGE<sub>2</sub> (2,41 ng/mL/2,5 x 10<sup>7</sup> células) que as células do tumor de 4 dias de desenvolvimento, que produziram 0,43 ng/mL de PGE<sub>2</sub> / 2,5 x 10<sup>7</sup> incubadas na mesma condição. Quando as células foram incubadas na ausência de ácido araquidônico, as concentrações de PGE<sub>2</sub> foram 0,18 e 0,32 ng/mL/2,5 x 10<sup>7</sup> células para o tumor com 4 e 6 dias, respectivamente. Embora os valores na ausência do ácido araquidônico não tenham sido diferentes estatisticamente, observou-se uma tendência de acréscimo na produção de PGE<sub>2</sub> no tumor com 6 dias de desenvolvimento (Figura 14).

O crescimento tumoral e o estabelecimento do processo caquético são mediados por complexas interações entre as citocinas e fatores de crescimento, que de modo parcial se comunicam através da produção de eicosanóides (LONNROTH *et al.*, 1995). A utilização de indometacina, um inibidor clássico da prostaglandina sintase, promove a atenuação dos sintomas da caquexia e a diminuição no crescimento do tumor de modo proporcional aos efeitos da neutralização da produção das citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 por anticorpos contra estas citocinas (SHERRY *et al.*, 1989; CAHLIN *et al.*, 2000a). A concentração de NO e das prostaglandinas tem sido associada aos processos inflamatórios e à progressão dos tumores. Vários estudos em modelos experimentais para a inflamação têm mostrado interações recíprocas entre a NOS e as vias da COX, sendo que a mais importante é a estimulação da COX-

2 pelo NO, embora a inibição também tenha sido documentada em alguns casos (LALA e CHAKRABORTY, 2001).

A COX-2 e a NOS são co-expressas em tumores ovarianos (KLIMP *et al.*, 2001) e em tumores de cabeça e pescoço humanos (GALLO *et al.*, 2002). O NO também pode estar envolvido na progressão dos tumores pela estimulação da COX-2, a enzima passo limitante para a produção de prostanóides (GALLO *et al.*, 2002). A produção de PGE<sub>2</sub> pelo tumor ascítico de Yoshida, um modelo animal para o estudo da caquexia, contribuiu para a progressão do processo caquético no hospedeiro (STRELKOV *et al.*, 1989).

A expressão da proteína COX-2 pelas células do tumor sólido de Walker 256 foi demonstrada por MUND e cols. (2007). Os autores também observaram alterações relacionadas à suplementação da dieta nos níveis séricos de PGE<sub>2</sub> nos animais portadores de tumores. Os níveis séricos de PGE<sub>2</sub> encontrados nos animais portadores do tumor sólido de Walker 256 alimentados com uma dieta padrão foram de  $\approx 0,18$  ng/mL.

Nossos resultados avaliam a produção *in vitro* de PGE<sub>2</sub> pelo tumor ascítico de Walker 256 em animais não suplementados, porém, em células estimuladas com ácido araquidônico, atingem valores de concentração muito superiores aos níveis séricos encontrados por MUND e cols. (2007). As células do tumor ascítico de Walker 256, quando na presença de ácido araquidônico produzem PGE<sub>2</sub> em diferentes concentrações dependendo do tempo de desenvolvimento do tumor. Nossos resultados indicam que a produção de PGE<sub>2</sub> pode estar sujeita a mecanismos de estímulo dependentes da produção de citocinas e outros mediadores celulares relacionados à progressão do tumor e à manifestação da síndrome de caquexia, tais como o NO.

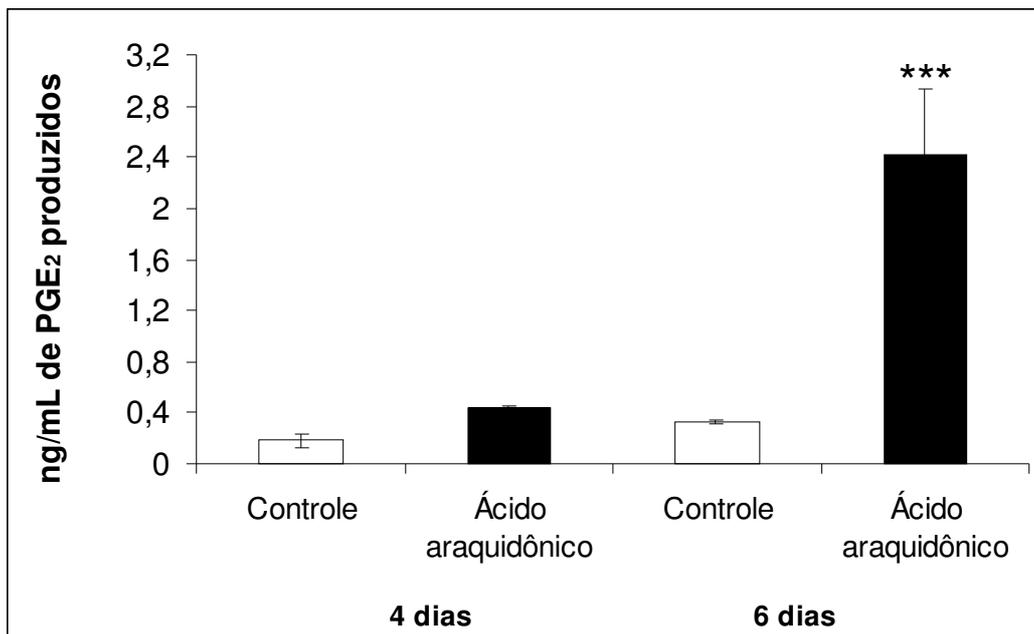


FIGURA 14. PRODUÇÃO DE PGE<sub>2</sub> PELO TUMOR ASCÍTICO DE WALKER 256.

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Os resultados representam as médias  $\pm$  EPM a partir de triplicatas dos sobrenadantes obtidos de um "pool" de células coletadas de 4 animais portadores de tumores ascíticos com 4 ou 6 dias após o implante. Estes sobrenadantes foram incubados na presença ou ausência de  $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de ácido araquidônico. Uma alíquota de 0,5 mL de meio RPMI-1640 contendo  $2,5 \times 10^7$  células foi incubada com ou sem ácido araquidônico durante 1 hora em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. \*\*\* $p < 0,001$ . Os valores estão expressos como ng/mL de PGE<sub>2</sub> produzidos e representam as médias  $\pm$  EPM.

## 7 DISCUSSÃO FINAL

Este trabalho se propõe a explorar algumas vias metabólicas das células do tumor ascítico de Walker 256, um modelo clássico para o estudo da caquexia. A caquexia é uma síndrome que resulta em desgaste sistemático de tecidos tais como o adiposo e o muscular esquelético. Os eventos patofisiológicos encontrados em doenças sistêmicas crônico-inflamatórias como AIDS, DPOC ou câncer configuram o sistema energético permitindo desvios nas rotas metabólicas. Os indivíduos acometidos por esta síndrome sofrem de enfraquecimento progressivo. Este estado geral de débito no organismo em função da demanda de energia mobiliza uma trama de sinais mediadores de respostas. Os estímulos para a ativação destas vias desencadeiam a liberação ("*upregulation*") de moléculas sinalizadoras que atuam como mediadores de processos como o desvio das rotas metabólicas em direção à síntese de DNA e glutathione, o crescimento e a proliferação celular (MARTIGNONI *et al.* 2003).

O mais conhecido mediador da caquexia do câncer é o TNF- $\alpha$ , cuja síntese é estimulada por trauma, sepsis e febre, caracterizando uma inflamação massiva com concomitante produção das proteínas de choque térmico. A regulação das vias envolvidas na expressão da proteína TNF- $\alpha$  e seus receptores e a concentração das formas solúveis destes, somente pode ser explicada em termos de mecanismo multifatorial. O TNF- $\alpha$  age através de dois tipos de receptores (TNF-R1 e TNF-R2 ou CD120a e CD120b, respectivamente) (SHARMA e ANKER, 2002). O primeiro contém o chamado "domínio de morte" por estar ligado às proteínas TRADD e FADD, indutoras de apoptose e atua na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B,

enquanto que o segundo não contém aquele domínio mas pode ativar o NF- $\kappa$ B. O fator NF- $\kappa$ B pode ser ativado quando as células são expostas a LPS, a citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a IL-6), à infecção viral, à expressão de certos produtos de oncogenes, à irradiação UV, à ativação de células B ou T e ainda por outros estímulos não fisiológicos e fisiológicos (JANSSEN e SEN, 1998). Os desvios metabólicos característicos das células tumorais culminam muitas vezes com o acionamento de outras vias, cujas enzimas chave são superexpressas ou sujeitas à regulação mediada pela geração de ROS. Um bom exemplo é a glutaminólise. A regulação da piruvato quinase do tipo M2 (PK-M2) favorece a utilização de L-glutamina resultando em elevadas concentrações de L-lactato nos tumores e tecidos adjacentes (MAZUREK *et al.*, 2005). A utilização preferencial de certos aminoácidos pelas células tumorais pode ser entendida avaliando-se a importância dos produtos destas vias. A L-arginina é precursora de NO e das poliaminas, sendo a participação desta última, bem conhecida nos processos de crescimento e proliferação celular.

O metaboloma do tumor tem papel determinante na Síndrome de Caquexia. Diferentes tipos de tumores são capazes de produzir citocinas e prostanóides. Em tecidos normais e tumorais, as células do sistema imune encarregam-se sob certos estímulos, de produzi-las. No entanto, a interação entre o tumor e o hospedeiro retro-alimenta a produção desses mediadores (KOTLER, 2000). Estudos epidemiológicos revelam que os indivíduos portadores de tumores apresentam elevados níveis séricos dessas moléculas inflamatórias (MAZUREK *et al.*, 2006).

A determinação das atividades específicas das enzimas que participam da síntese das citocinas, da PGE<sub>2</sub>, das poliaminas, do NO e dos produtos destas

reações tais como a uréia, fornece elementos para a descrição parcial das vias de síntese que podem estar potencialmente operando na maquinaria celular do tumor. Os níveis séricos destas moléculas detectados no hospedeiro podem refletir o grau de ativação destas vias, uma vez que, o estado patofisiológico produzido pela interação entre o tumor e o hospedeiro é que caracteriza a condição do indivíduo no processo caquético ("kakos = ruim" e "hexis = estado, condição"). Os mecanismos pelos quais esses mediadores atuam para produzir o quadro de caquexia são até o presente, muito pouco compreendidos. A participação desses mediadores no estabelecimento e progressão do processo caquético vem sendo demonstrada, na maioria dos casos de modo indireto. As estratégias metodológicas adotadas para tal fim, são conflitantes. No caso do tumor de Walker 256, os dados da literatura apontam uma ampla utilização de cortes histológicos de tumores sólidos. No entanto, o tumor sólido de Walker 256 contém além das células tumorais, um estroma, tecido epitelial e muscular e monócitos e macrófagos infiltrados (GOODLAD e RAYMOND, 1973), dificultando a determinação da origem desses mediadores e das atividades enzimáticas. Essa questão foi resolvida neste estudo utilizando a forma ascítica do tumor, uma vez que, a suspensão celular obtida do peritônio permite o isolamento das células Walker 256 de modo eficiente, através da hemólise e adesão dos macrófagos (Figura 4) facilitando a realização de experimentos *in vitro* com maior segurança sobre a origem dos parâmetros investigados.

O tumor ascítico de Walker 256 tem crescimento rápido, levando o animal a óbito em 7 a 10 dias após o implante. Variações nas vias metabólicas estudadas foram encontradas ao longo do desenvolvimento do tumor tanto para a atividade

enzimática, como é o caso da arginase, como para a produção de mediadores como as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) e a PGE<sub>2</sub>. Estas diferenças encontradas ao longo do desenvolvimento do tumor, ainda não haviam sido consideradas nos estudos envolvendo as vias metabólicas do tumor de Walker 256, nem mesmo nos níveis séricos do hospedeiro. Essas variações poderiam explicar a inconsistência dos dados acumulados até o presente, para a compreensão dos mecanismos de ação das moléculas estudadas. A compreensão desses mecanismos facilitaria a intervenção clínica ampliando os recursos disponíveis para o tratamento da Síndrome de Caquexia.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

1) As células do tumor ascítico de Walker 256 são capazes de produzir L-lactato e apresentam atividade para as glutaminases;

2) As células do tumor ascítico de Walker apresentam o nucléolo proeminente e a cromatina dispersa com pequenas dobras de heterocromatina. No citosol foram vistos numerosos ribossomos complexados, mitocôndrias arredondadas ou ovais. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e vacúolos são abundantes e o aparato de Golgi evidente;

3) Na suspensão celular obtida do tumor ascítico com 4 dias após o implante foram também encontradas algumas células em processo apoptose;

4) As células do tumor ascítico de Walker 256 são produtoras de uréia e ornitina a partir da L-arginina pela via da arginase e a atividade específica dessa enzima varia ao longo do desenvolvimento do tumor;

5) As células do tumor ascítico de Walker 256 produzem NO a partir da L-arginina;

6) As células do tumor ascítico de Walker 256 produzem as poliaminas putrescina, espermidina e espermina, mas seu conteúdo não e altera ao longo do desenvolvimento do tumor;

7) As células do tumor ascítico de Walker 256 são produtoras das citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) e essa produção varia ao longo do desenvolvimento do tumor obedecendo a padrões diferentes entre o TNF- $\alpha$  e IL-6;

8) As células do tumor ascítico de Walker 256 são produtoras de  $PGE_2$  e quando incubadas na presença de ácido araquidônico, diferem em relação a esta produção no tumor com 4 ou 6 dias após o implante.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 72, p. 1605-1621, 2006.
- ALVAREZ, B.; QUINN, L.S.; BUSQUETS, S.; QUILES, M.T.; LÓPEZ-SORIANO, J.; ARGILÉS, J.M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  exerts interleukin-6-dependent and -independent effects on cultured skeletal muscle cells. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1542, p. 66-72, 2002.
- AMBS, S.; HUSSAIN, P.; HARRIS, C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB J.**, Bethesda, v. 11, p. 443-448, 1997.
- ANGELO, L.S.; TALPAZ, M.; KURZROCK, R. Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of p53. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 62, 932-940, 2002.
- ARGILÉS, J.M.,; BUSQUETS, S., LÓPEZ-SORIANO, F.J., FIGUERAS, M. Pathophysiology of neoplastic cachexia. **Nutr. Hosp.**, Madrid, S 3, p.4-9, 2006.
- ARGILÉS J. M. Cancer-associated malnutrition. **Eur. J. Oncol. Nurs.** London, v. 9, p. 539-550, 2005.
- ARGILÉS, J.M.; AZCÓN – BIETO, J. The metabolic environment of cancer. **Mol. Cell. Biochem.**, The Netherlands, v. 81, 3-17, 1988.
- ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Mechanism for the increased skeletal muscle protein degradation in the obese Zucker rat. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v. 10(4), p. 244-248, 1999.
- AUVINEN, M.; PAASINEN, A.; ANDERSSON, L.C.; HÖLTTÄ, E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. **Nature**, London, v. 360(6402), p. 355-358, 1992.
- BABBAR, N.; HACKER, A.; HUANG, Y.; CASERO JR, R.A. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase through nuclear factor kB in non-small cell lung cancer cells. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 281 (34), 24182-24192, 2006.

- BAKAN, E.; TAYSI, S.; POLAT, M.F.; DALGA, S.; UMUDUM, Z.; BAKAN, N.; GUMUS, M. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v. 32(5), 162-166, 2002.
- BARTON, B.E.; MURPHY, T.F.; ADEM, P.; WATSON, R.A.; IRWIN, R.J.; HUANG, H.F. IL-6 signaling by STAT3 participates in the change from hyperplasia to neoplasia in NRP-152 and NRP-154 rat prostatic epithelial cells. **BMC Cancer**, London, p. 1-19, 2001.
- BASCH, J. J.; WICKHAM, E. D.; FARREL, H. M. Arginase in Lactating Bovine Mammary Glands: Implications in Proline Synthesis. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v. 80, 3241-3248, 1997.
- BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino acids**, Wien, v. 26, p. 307-309, 2004.
- BLACK, K.; GARRETT, I.R.; MUNDY G.R.; Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice. **Endocrinology**. Baltimore, v. 128(5), 2657-2659, 1991.
- BANYER, J.L.; HAMILTON, N.H.; RAMSHAW, I.A.; RAMSAY, A.J. Cytokines in innate and adaptive immunity. **Rev. Immunogenet.**, New Jersey, v. 2(3), p. 359-373, 2000.
- BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M.; PROIETTI, E.; KIRKWOOD, J.M. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. **Cytok. Grow. Fact. Rev.**, New York, v. 13 (2), p. 119-134, 2002.

- BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Sem. Can. Biol.**, Montreal, v. 16, 38-52, 2006.
- BEUTLER, B. A.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135(6), p. 3972-3977, 1985.
- BHATTACHARYA, P.; MAITY, P. Localization of Phosphate Dependent Glutaminase in Ascites Fluid of Ovarian Cancer Patient. **Pathol. Oncol. Res.**, Budapest, v. 6, 217-223, 2000.
- BJELAKOVIC, G.; PAVLOVIC, D.; STOJANOVIC, I.; JEVTOVIC, T.; NIKOLIC, J.; KOCIC, G. Effects of glucocorticoids on polyamine metabolism in liver and spleen of guinea pig during sensitization. **Amino Acids**, Wien, v. 4, p. 457-462, 2006.
- BOARD, M.; HUMM, S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathways and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. **Biochem. J.**, London, v. 265, p. 503-509, 1990.
- BODE, B.P.; KAMINSKI, D.L.; SOUBA, W.W.; LI, A.P. Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. **Hepatol.**, Baltimore, v. 21 (2), 511-520, 1995.
- BOITIER, E.; MERAD-BOUDIA, M.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; DEFER, N.; CEBALLOS-PICOT, I.; LEROUX, J.P.; MARSAC, C. Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 1555(14), 3028-3035, 1995.

- BORDEN, E.C.; CHIN, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. **J. Lab. Clin. Med.**, Cape Town, v. 123(6), p. 824-829, 1994.
- BRACHT, L. Aspectos Morfofisiológicos e Funcionais de Macrófagos Peritoneais de animais portadores de Tumor de Walker 256. UFPR, Curitiba, 97 p., 2006.
- BRIGATTE, P.; SAMPAIO, S.C.; GUTIERREZ, V.P.; GUERRA, J.L.; SINHORINI, I.L.; CURI, R., CURY, Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J. Pain.**, New York, v. 8(5), p. 412-421, 2007.
- 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 J.**, Oxford, v. 15, p. 1753-1765, 1996.
- BUFFON, A.; RIBEIRO, V.B.; WINK, M.R.; CASALI, E.A.; SARKIS, J.J. Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. **Life Sci.**, Elmsford, v. 80(10), 950-958, 2006.
- CAHLIN, C.; KÖRNER, A.; AXELSSON, H.; WANG, W.; LUNDHOLM, K.; SVANBERG, E. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-dependent cachexia. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 60, p. 5488-5493, 2000.
- CAHLIN, C.; GELIN, J.; DELBRO, D.; LÖNNROTH, C.; DOI, C.; LUNDHOLM, K. Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with and without cancer cachexia related to prostanoids. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 60, p. 1742-1749, 2000.

- CAI, D. ; FRANTZ, J.D. ; TAWA, N.E.JR. ; MELENDEZ, P.A. ; OH, B.C. ; LIDOV, H.G. ; HASSELGREN, P.O. ; FRONTERA, W.R. ; LEE, J. ; GLASS, D.J. ; SHOELSON, S.E. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, Cambridge, v. 119(2), p. 285-298, 2004.
- CARVAJAL, N. ; LOPEZ, V. ; SALAS, M. ; URIBE, E. ; HERRERA, P. ; CERPA, J. Manganese is essential for catalytic activity of Escherichia coli agmatinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 258(3), p.808-811, 1999.
- CARSON, D.A. ; RIBEIRO, J.M. Apoptosis and disease. **Lancet**, London, v. 341(8855), p. 1251-1254, 1993.
- CASTELLONE, M.D. ; TERAMOTO, H. ; WILLIAMS, B.O. ; DRUEY, K.M. ; GUTKIND, J.S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. **Science**, Washington, v. 310(5753), p. 1504-1510, 2005.
- CEDERBAUM, S.D.; YU, H.; GRODY, W.W.; KERN, R.M.; YOO, P.; IYER, R. K. Arginases I and II: do their functions overlap? **Mol. Genet. Metabol.**, San Diego, v. 81, p. 538-544, 2004.
- CLARK, C.M.; GOODLAD, G.A. Protein and enzyme content of plasma membranes derived from Walker 256 carcinoma cells grown as ascitic or solid tumours. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 68(2-3), p. 91-94, 1993.
- CLIFFORD, A.; MORGAN, D.; YUSPA, S.H.; SOLER, A.P.; GILMOUR, S. Role of ornithine decarboxylase in epidermal tumorigenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55(8), p.1680-1686, 1995.

- CHOWDHURY, S.R.; GUHA, S.; SEN, U. The role of alpha-difluoromethyl ornithine as an adjuvant to immunotherapy in mice bearing transplantable tumors. **Neoplasma**, Bratislava, v. 41(3), 159-161, 1994.
- COBBS, C.S.; WHISENHUNT, T.R.; WESEMANN, D.R.; HARKINS, L.E.; VAN MEIR, E.G.; SAMANTA, M. Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 63(24), p. 8670-8673, 2003.
- COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R.I. Gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochim. Biophys. Acta**, The Netherlands, v. 1533(3), p. 207-219, 2001.
- CORBELLO PEREIRA, S.R.; DARRONGUI, E.; CONSTANTIN, J.; ALVES DA SILVA, M.H.R.; YAMAMOTO, N.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker -256 tumor bearing rats. **Biochim. Biophys. Acta**, The Netherlands, v. 1688, p. 187-196, 2004.
- COSTELLI, P.; CARBÓ, N.; TESSITORE, L.; BAGBY, G.J.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M.; BACCINO, F.M. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. **J. Clin. Invest.**, Oxford, v. 92(6), p. 2783-2789, 1993.
- CRISS, W.E. A review of Polyamines and Cancer. **Turk. J. Med. Sci.**, Tübitak, v. 33, p. 195-205, 2003.

- CURTHOYS, N. P.; LOWRY, O. H. The Distribution of Glutaminase isoenzymes in the Various Structures of the Nephron in Normal, Acidotic and alkalotic Rat Kidney. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 1, p. 162-168, 1973.
- CURTHOYS, N. P.; WEISS, R. Regulation of Renal Ammoniogenesis: Subcellular localization of rat kidney glutaminase isoenzymes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 10, p. 3261-3266, 1974.
- DI MARCO, S.; MAZZOUI, R.; DALLAIRE, P.; CHITUR, S.; TENERBAUM, S. A.; RADZIOCH, D.; MARETTE, A.; GALLOUZI, I. E. NF- $\kappa$ B-Mediated MyoD Decay during Muscle Wasting Requires Nitric Oxide Synthase mRNA Stabilization, HuR Protein and Nitric Oxide Release. **Mol. Cellular Biol.**, Washington, v. 25(15), p. 6533-6545, 2005.
- EINGEBRODT, E.; GOSSMANN, H. Glycolysis – one of the keys to cancer? **Trends Pharmacol. Sci.**, Kiddington, Oxon, v. 1, p. 240-245, 1980.
- FIGUERAS, M.; BUSQUETS, S.; CARBO, N.; ALMENDRO, V.; ARGILES, J.M.; LOPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia results in an increase in TNF- $\alpha$  receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. **Int. J. Oncol.**, Heraklion, v. 27, p. 855-860, 2005.
- FIGUEROA, J.E. 2<sup>ND</sup>. ; VIJAYAGOPAL, P. ; PRASAD, C. Azatifig stimulates in vitro lipolysis by rodent and human adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 293(2), p. 847-849, 2002.
- FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G. ; WERNER, E.R. ; WERNER-FELMAYER, G.; DIERICH, M.P.; WACHTER, H. Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v. 46(2), p. 65-70, 1991.

- GALEA, E.; REGUNATHAN, S.; ELIOPOULOS, V.; FEINSTEIN, D. L.; REIS, D. J. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. **Biochem. J.**, London, v. 316, p. 247-249, 1996.
- GALLO, O.; FABBRONI, V.; SARDI, I.; MAGNELLI, L.; BODDI, V.; FRANCHI, A. Correlation between nitric oxide and cyclooxygenase-2 pathways in head and neck squamous cell carcinomas. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 299, p. 517-524, 2002.
- GARCIA-MARTÍNEZ, C.; AGELL, N.; LLOVERA, M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the ubiquitination of rat skeletal muscle protein. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 323(3), p. 211-214, 1993.
- GOKMEN, S.S.; AYGIT, C.A.; AYHAN, M.S.; YORULMAZ, F.; GULEN, S. Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. **Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, v. 137(5), p. 340-344, 2001.
- GOOSSENS, V.; GROOTEN, J.; FIERS, W. The Oxidative Metabolism of Glutamine. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271(1), p. 192-196, 1996.
- GOODLAD, G.A.; RAYMOND, M.J. The action of the Walker 256 carcinoma and toxohormone on amino acid incorporation into diaphragm protein. **Eur. J. Cancer**, New York, v. 9(2), p. 139-145, 1973.
- GOSALVEZ, M.; LÓPEZ – ALARCÓN, L.; GARCIA-SUAREZ, S.; MONTALIO, A.; WEINHOUSE, S. Stimulation of tumor-cell respiration by inhibitors of pyruvate kinase. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 55, p. 315-321, 1975.

- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GUAITANI, A.; DELLA TORRE, P.; MORASCA, L.; PINTUS, C.; BARTOSEK, I. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, Milano, v. 69 (1), p. 1-9, 1983.
- GUTJAHR, M.C.; ROSSY, J.; NIGGLI, V. Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 308(2), p. 422-438, 2005.
- HÁ, H. C.; SIRISOMA, N. S.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L.; WOSTER, P. M.; CASERO JR, R. A. The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 95, p. 11140-11145, 1998.
- HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, London, v. 23(3), p. 144-150, 2002.
- HANFREY, C.; SOMMER, S.; MAYER, M.J.; BURTIN, D.; MICHAEL, A.J. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. **Plant J.**, London, v. 27(6), p. 551-560, 2001.
- HE, Y.C.; WANG, Y.H.; CAO, J.; CHEN, J.W.; PAN, D.Y.; ZHOU, Y.K. Effect of complex amino acid imbalance on growth of tumor in tumor-bearing rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 9(12), p. 2772-2775, 2003.

- HEMLINGER, G.; SCKELL, A.; DELLIAN, M.; FORBES, N. S.; RAKESH, K. J. Acid Production in Glycolysis-impaired Tumors Provides New Insights into Tumor Metabolism. **Clin. Canc. Res.**, Philadelphia, v. 8, p. 1284-1291, 2002.
- HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 157(1), p. 87-94, 1988. Erratum in: **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, 158(2), p. 624, 1989.
- HUSSEY, H.J.; TISDALE, M.J. Effect of a cachectic factor on carbohydrate metabolism and attenuation by eicosapentaenoic acid. **Br. J. Cancer.**, London, v. 80(8), p. 1231-1235, 1999.
- IKEDA, Y.; HAYASHI, I.; KAMOSHITA, E.; YAMAZAKI, A.; ENDO, H.; ISHIHARA, K.; YAMASHINA, S.; TSUTSUMI, Y.; MATSUBARA, H.; MAJIMA, M. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 64(15), p. 5178-5185, 2004.
- IMAMURA, K.; WANG, Z.Y.; MURAYAMA-ODA, K.; KIM, H.K.; TSUJI, T.; TANAKA, T. Purification of ornithine decarboxylase-inducing factor from cell-free ascites fluid of Ehrlich ascites tumor and its characteristics. **Jpn. J. Cancer. Res.**, Tokyo, v. 82(3), p. 315-324, 1991.
- INUI, A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Are Neuropeptides the Key? **Cancer Res.**, Baltimore, v. 59, p. 4493-4501, 1999.
- IYER, R. K.; KIM, H. K.; TSOA, R. W.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Cloning and Characterization of Human Agmatinase. **Mol. Genet. Metabol.**, New York, v. 75, p. 209-218, 2002.

- JANSSEN, Y.M.; SEN, C.K. Nuclear factor kappa B activity in response to oxidants and antioxidants. **Methods Enzymol.**, New York, v. 300, p. 363-374, 1999.
- KAUFMANN, Y.; KORNBLUTH, J.; FENG, Z.; FAHR, M.; SCHAEFER, R.F.; KLIMBERG, V.S. Effect of glutamine on the initiation and promotion phases of DMBA-induced mammary tumor development. **JPEN.**, Silver Spring, v. 27(6), p. 411-418, 2003.
- KHUHAWAR, M. Y.; QUERESHI, G. A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **J. Chromat. B.**, Amsterdam, v. 764, p. 385-407, 2001.
- KLIMP, A.H.; HOLLEMA, H.; KEMPINGA, C.; VAN DER ZEE, A.G.J.; VRIES, E.G.E.; DAEMEN, T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages, **Cancer Res.**, Baltimore, v. 61, p. 7305-7309, 2001.
- KNOX, W. E.; HOROWITZ, M. L.; FRIEDEL G. H. The proportionality of glutaminase content to growth rate and morphology of rat neoplasm. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 29, p. 669-680, 1969.
- KNOX, W. E.; TREMBLAY, G. C.; SPANIER, B. B.; FRIEDEL G. H. Glutaminase Activities in Normal and Neoplastic Tissues of the Rat. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 27(1), p. 1456-1458, 1967.
- KOGA, T.; ZHANG, W. Y.; GOTOH, T.; OYADOMARI, S.; TANIHARA, H.; MORI, M. Induction of citrulline-nitric oxide (NO) cycle enzymes and NO production in immunostimulated rat RPE-J cells. **Experimental Eye Res.**, London, v. 76, p. 15-21, 2003.
- KOKEKANE, H.; NISHIKAWA, A.; IMAMURA, K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 412(2), p. 216-222, 2003.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 133, p. 622-634, 2000.

KRUSE JR, P.F.; SCHOOLAR JR, E.J.; WHITE, P.B. Changes in protein-bound acid-amide ratios during culture of Walker carcinosarcoma 256 cells in vitro. **Biochim. Biophys. Acta.**, The Netherlands, v. 41, p. 375-376, 1960.

KOVACEVIC, Z. Properties and intracellular localization of Ehrlich ascites tumor cell glutaminase. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 34(12), p. 3403-3407, 1974.

KURODA, K.; NAKASHIMA, J.; KANAO, K.; KIKUCHI, E.; MIYAJIMA, A.; HORIGUCHI, Y.; NAKAGAWA, K.; OYA, M.; OHIGASHI, T.; MURAI, M. Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer. **Urology**, Secaucus, v. 69 (1), p. 113-117, 2007.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncology**, London, v. 2, p. 149-156, 2001.

LANGSTEIN, H.N.; NORTON, J.A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, 5(1), p. 103-123, 1991.

LEROYER, V.; WERNER, L.; SHAUGHNESSY, S.; GODDARD, G.J.; ORR, F.W. Chemiluminescence and oxygen radical generation by Walker carcinosarcoma cells following chemotactic stimulation. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 47(18), p. 4771-4775, 1987.

LI, G.; REGUNATHAN, S.; BARROW, C. J.; ESHRAGI, J.; COOPER, R.; REIS, D. J. Agmatine: an endogenous clonidine displacing substance in the brain. **Science**. Washington, v. 263, p. 966-969, 1994.

LIN, M.T.; JUAN, C.Y.; CHANG, K.J.; CHEN, W.J.; KUO, M.L. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-

- regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. **Carcinogenesis.**, Oxford, v. 22(12), p. 1947-1953, 2001.
- LIND, D. S. Arginine Metabolism: Enzymology, Nutrition, and Clinical Significance. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 134, p. 2837S-2841S, 2004.
- LLOVERA, M.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; AGELL, N.; COSTELLI, P.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; CELADA, A.; ARGILÉS, J.M. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 133(1), p. 83-87, 1998.
- LOBO, C.; RUIZ-BELLIDO, M. A.; ALEDO, J. C.; MÁRQUEZ, J.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. **Biochem. J.**, London, v. 348, p. 257-261, 2000.
- LOIBL, S.; BUCK, A.; STRANK, C.; MINKWITZ, G.; ROLLER, M.; SINN, H. P.; SCHINI-KERTH, V.; SOLBACH, C.; STREBHARDT, K.; KAUFMANN, M. The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. **Eur. J. Cancer**, New York, v. 41, p. 265-271, 2005.
- LOIBL, S.; VON MINCKWITZ, G.; WEBER, S.; SINN, H.P.; SCHINI-KERTH, V.B.; LOBYSHEVA, I.; NEPVEU, F.; WOLF, G.; STREBHARDT, K.; KAUFMANN, M. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Cancer**, Philadelphia, v. 95(6), p. 1191-1198, 2002.
- LÖNNROTH, P.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. **Am. J. Physiol.**, New York, v. 267(6 Pt 1), p. E1035-1036, 1994.

- LOPES-ALARCÓN, L.; EBOLI, M.L. Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 human leukemia cell line. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 46 (11), p. 5589-5591, 1986.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 193, n° 1, p. 265-275, 1951.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, New York, v. 9, p. 409-414, 1961.
- MADSEN, K.L. ; BROCKWAY, P.D. ; JOHNSON, L.R. ; HARDIN, J.A. ; GALL, D.G. Role of ornithine decarboxylase in enterocyte mitochondrial function and integrity. **Am. J. Physiol.**, New York, v. 270(5 Pt 1), p. G789-797, 1996.
- MANNI, A.; WASHINGTON, S.; GRIFFITH, J.W.; VERDERAME, M.F.; MAUGER, D.; DEMERS, L.M.; SAMANT, R.S.; WELCH, D.R. Influence of polyamines on *in vitro* and *in vivo* features of aggressive and metastatic behavior by human breast cancer cells. **Clin. Experim. Metastasis**, The Netherlands, v. 19, p. 95-105, 2002.
- MAO-YING, Q.L.; ZHAO, J.; DONG, Z.Q.; WANG, J.; YU, J.; YAN, M.F.; ZHANG, Y.Q.; WU, G.C.; WANG, Y.Q. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, Orlando, v. 345(4), p. 1292-1298, 2006.
- MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer Cachexia. **Mol. Cancer**, Philadelphia, v. 2, p. 36-39 2003.
- MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUÑEZ DE CASTRO, I.; ASENJO, M.; MARQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter, v. 34, p. 439-458, 2002.

- MATTOS, M. C. F. I.; MONTENEGRO, M. R.; VIEIRA E SILVA, C. R. Walker 256 Carcinossarcoma: Pathology, microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32(7), p. 849-857, 1980.
- MAZUREK, S.; BOSCHEK, C. B.; HUGO, F.; EINGEBRODT, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. **Sem. Cancer Biol.**, London, v. 15(4), p. 300-308, 2005.
- MAZUREK, S.; EIGNBRODT, E. The tumor metabolome. **Anticancer Res.**, Kapandriti, v. 23 (2A), p. 1149-1154, 2003.
- MAZUREK, S.; GRIMM, H.; BOSCHEK, C.B.; VAUPEL, P.; EIGENBRODT, E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 87 (1), p. 23-29, 2002.
- MAZUREK, S.; MICHEL, A.; EINGEBRODT, E. Effect of Extracellular AMP on Cell Proliferation and Metabolism of Breast Cancer Cells Lines with High and Low Glycolytic Rates. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 272, p. 4941-4951, 1997.
- MCCARTHY, D.O.; DAUN, J.M. The effects of cyclooxygenase inhibitors on tumor-induced anorexia in rats. **Cancer.**, Philadelphia, v. 71(2), p. 486-492, 1993.
- MCCOY, T. A.; MAXWELL, M.; NEUMAN, R. E. The Amino Acid Requirement of the Walker Carcinossarcoma 256 in vitro. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 16, p. 979-984, 1956.
- MCGIVAN, J.D.; BRADFORD, N.M. Influence of phospholipids on the activity of phosphate-dependent glutaminase in extracts of rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 214(2), p. 649-652, 1983.

- McNAMARA, M. J.; RICHARD ALEXANDER, H.; NORTON, J. A. Cytokines and Their Role in the Pathophysiology of Cancer Cachexia. **J. Par. Ent. Nutr.**, Silver Spring, v. 16(6), p. 50S-55S, 1992.
- MEDINA, M. Á. Glutamine metabolism: Nutritional and Clinical Significance. **J. Nutrition.**, Champaign, 2539S-2542S, 2001
- MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Biochim. Biophys. Acta.**, The Netherlands, v. 1271, p. 35-42, 1995.
- MELO, R. R.; STEVAN, F. R.; CAMPELLO, A. P.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Occurrence of Crabtree effect in HeLa cells. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 16, p. 99-105, 1998.
- MISTRY, S.; BURWELL, T.J.; CHAMBERS R.M.; RUDOLPH-OWEN, L.; SPALTMANN, F.; COOK, W.J.; MORRIS, S.M. JR. Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 282(2), p. G375-381, 2002.
- MOLOTKOV, A.; SATOH, M.; TOHYAMA, C. Tumor growth and food intake in interleukin-6 gene knock-out mice. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 132, p. 187-192, 1998.
- MUJOOMDAR, M.; HOSKIN, D.; BLAY, J. Adenosine stimulation of the proliferation of colorectal carcinoma cell lines. Roles of cell density and adenosine metabolism. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 66(9), p. 1737-1747, 2003.
- MOREADITH, R. W.; LEHNINGER, A. L. The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 259(10), p. 6215-6221, 1984.

- MOREAUX, J.; LEGOUFFE, E.; JOURDAN, E.; QUITTET, P.; RÈME, T.; LUGAGNE, C.; MOINE, P.; ROSSI, J.F.; KLEIN, B.; TARTE, K. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. **Blood**, Whashington, v. 103(8), p. 3148-3157, 2004.
- MUND, R. C.; PIZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E. A.; VICENZI, T.; TANHOFER, R.; OLIVEIRA, H. H. P.; CURI, R.; CALDER, P.; FERNANDES, L. C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE<sub>2</sub> reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostag. Leukotr. Ess. Fatty Acids**, Oxford, v. 76, p. 113-120, 2007.
- NOGUCHI, T.; KASHIWAGI, A.; TANAKA, T. Changes in ornithine decarboxylase activity in normal tissues of tumor-bearing mice during tumor growth. **J. Biochem.** Tokyo, v. 79(2), p. 451-454, 1976.
- OKAMOTO, M.; KAWAMATA, H.; KAWAI, K.; OYASU, R. Enhancement of transformation *in vitro* of a nontumorigenic rat urothelial cell line by interleukin 6. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55(20), p. 4581-4585, 1995.
- OLIFF, A. The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. **Cell**, Cambridge, v. 54(2), p. 141-142, 1988.
- PEDERSEN, P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. **Prog. Exp. Tumor Res.**, Basel, v. 22, p. 190-227, 1978.
- PEGG, A. E. Regulation of Ornithine Decarboxylase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 281(21), p. 14529-14532, 2006.

- PEGG, A. E.; HU, R. H. Effect of polyamine analogues and inhibition of polyamine oxidase on spermidine/spermine  $N^1$ -acetyltransferase activity and cell proliferation. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 95, p. 247-252, 1995.
- PEGG, A.E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. **Biochem. J.**, London, v. 234, p. 249-262, 1986.
- PEGG, A.E.; SECRIST, J.A. 3<sup>RD</sup>.; MADHUBALA, R. Properties of L1210 cells resistant to alpha-difluoromethylornithine. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 48(10), p. 2678-2682, 1988.
- PERROUD, A.P.A.S.; ASHIMINE, R.; CASTRO, G.M.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA, K.P.; VILELLA, C. A.; CAVALCANTI, T. C. S.; ZOLLNER, R. L. Cytokine gene expression in Walker 256: A comparison of variants A (agressive) and AR (regressive). **Cytokine**, Bethesda, v. 36(4), p. 123-133, 2006.
- PHILLIPS, H. J. Dye exclusions tests for cell viability. In: Tissue culture, methods and applications, Kruse, J. R.; Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: New York, v. 47, p. 89-91, 1995.
- PLATA-SALAMÁN, C.R. Dexamethasone inhibits food intake suppression induced by low doses of interleukin-1 beta administered intracerebroventricularly. **Brain Res. Bull.**, New York, v. 27(5), p. 737-8, 1991.
- PORAT, O. The effect of tumor necrosis factor alpha on the activity of lipoprotein lipase in adipose tissue. **Lymphokine Res.**, v. 8(4), p. 459-469, 1989.
- POREMBSKA, Z.; LUBOINSKI, G.; CHRZANOWSKA, A.; MIELCZAREK, M.; MAGNUSKA, J.; BARANCZYK-KUZMA, A. Arginase in patients with breast cancer. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 328, p. 105-111, 2003.

- QUESADA, R.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; PEREZ-RODRIGUEZ, J.; MARQUEZ, J.; MEDINA, M. A.; NUÑEZ-DE-CASTRO, I. Purification of phosphate-dependent glutaminase from isolated mitochondria of Ehrlich ascites-tumour cells. **Biochem. J.**, London, v. 255, p. 1031-1036, 1988.
- RAASCH, W.; REGUNATHAN, S.; LI, G.; REIS, D. J. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci.**, New York, v. 56, p. 2310-2330, 1995.
- RAASCH, W.; SCHÄFER, U.; CHUN, J.; DOMINIAK, P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **British J. Pharm.**, Baskingstoke, v. 133, p. 755-780, 2001.
- REITZER, L. J.; WICE, B. M.; KENNEL, D. Evidence that Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 254(8), p. 2669-2676, 1979.
- REYNOLDS E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.
- ROLLWAGEN, F.M.; YU, Z.Y.; LI, Y.Y.; PACHECO, N.D. IL-6 rescues enterocytes from hemorrhage induced apoptosis in vivo and in vitro by a bcl-2 mediated mechanism. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, New York, v. 89(3), p. 205-213, 1998.
- ROSSY, J.; GUTJAHR, M.C.; BLASER, N.; SCHLICHT, D.; NIGGLI, V. Ezrin/moesin in motile Walker 256 carcinosarcoma cells: signal-dependent relocalization and role in migration. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 313(6), p. 1106-1120, 2007.
- RUBIN, H. Cancer Cachexia: Its correlations and causes. **PNAS**, Washington, v. 100(9), p. 5384-5389, 2003.

- RUBIN, H. Complementary approaches to understanding the role of proteases and their natural inhibitors in neoplastic development: retrospect ad prospect. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 24(5), p. 803-816, 2003.
- SAINI, A.; NASSER, A.S.; STEWART, C.E.H. Waste management-cytokines, growth factors and cachexia. **Cytokine Growth. Factor Rev.**, New York, v. 17, p. 475-486, 2006.
- SASAKI, K.; IMAMURA, K.; TANAKA, T. Mechanism of hepatic ornithine decarboxylase induction by the ornithine decarboxylase-inducing factor isolated from tumor ascites fluid: determination of target cells for the factor in the liver. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 94(3), p. 949-959, 1983.
- SATOH, P. S.; ITO, Y. Quantitative Rapid Microassay of Arginase. **Anal. Bioch.**, New York, v. 23, p. 219-229, 1968.
- SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. **Amino Acids**, Wien, v. 26, p. 321-329, 2004.
- SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T. Ketone Body, Glucose, Lactic Acid, and amino Acid Utilization by Tumors *in vivo* Fasted rats. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 43, p. 3497-3503, 1983.
- SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T. Regulation of Lactate Production and Utilization in Rat Tumors *in Vivo*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 280(12), p. 7496-7501, 1985.
- SAVA, I. G.; BATTAGLIA, V.; ROSSI, C. A.; SALVI, M.; TONINELLO, A. Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 41, p. 1272-1281, 2006.
- SCHENKEL, E.; BERLAIMONT, J.; DUBOIS, M.; HELSON-CAMBIER, M.; HANOCQ, M. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of

- polyamines as their benzoylated derivatives: application to P388 cancer cells. **J. Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 668, p. 189-197, 1995.
- SCHLEIFFER, R.; DURANTON, B.; GOSSÉ, F.; BERGMANN, C.; RAUL, F. Nitric Oxide Synthase Inhibition Promotes Carcinogen-Induced Preneoplastic Changes in the Colon of Rats. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 4(6), p. 583-589, 2000.
- SCHWARTZ, G.K.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; DHUPAR, S.K.; EHLEITER, D.; MASLAK, P.; LAI, L.; LOGANZO, F.JR.; KELSEN, D.P.; FUKS, Z.; ALBINO, A.P. Potentiation of apoptosis by treatment with the protein kinase C-specific inhibitor safinol in mitomycin C-treated gastric cancer cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 87(18), p. 1394-1399, 1995.
- SCHANOSKI, A.S.; CAVALCANTI, T.C.; CAMPOS, C.B.; VIERA-MATOS, A.N.; RETTORI, O.; GUIMARÃES, F. Walker 256 tumor MHC class I expression during the shift from A variant to the immunogenic AR variant. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 211(1), p. 119-127, 2004.
- SENER, A.; OWEN, A.; MALAISSE-LAGAE, F.; MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Effect of 2-aminoisobutyric acid upon ornithine decarboxylase activity and insulin secretion. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, Westbury, v. 65(1), p. 65-80, 1989.
- SHAO, C. W.; TIAN, J. M.; WANG, P. J.; ZUO, C. J.; ZHANG, H. J. Eletrochemotherapy for rat implanted liver tumor. **Clin. Med. J.**, Peking, v. 119(8), p. 696-700, 2006.

- SHAPIRO, R. A.; MOREHOUSE, R. F.; CURTHOYS, N. P. Inhibition by glutamate of phosphate-dependent glutaminase of rat kidney. **Biochem. J.**, London, v. 207, p. 561-566, 1982.
- SHARMA, R.; ANKER, S.F. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v. 85, p. 161-171, 2002.
- SHERRY, B.A.; GELIN, J.; FONG, Y.; MARANO, M.; WEI, H.; CERAMI, A.; LOWRY, S.F.; LUNDHOLM, K.G.; MOLDAWER, L.L. Anticachectin/tumor necrosis factor-alpha antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. **FASEB J.**, Bethesda, 3(8), p. 1956-1962, 1989.
- SHIMKE, T.T. Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 237, p. 459, 1962.
- SIMPKINS, H.; LEHMAN, J. M.; MAZURKIEWICZ, J. E.; DAVIS, B. H. A Morphological and Phenotypic Analysis of Walker 256 Cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 51, p. 1334-1338, 1991.
- SINGH, R.; PERVIN, S.; KARINI, A.; CEDERBAUM, S.; CHAUDHURI, G. Arginase Activity in Human Breast Cancer Cell Lines: N $\omega$ -Hydroxy-L-arginine Selectively Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-468 Cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 60, p. 3305-3312, 2000.
- SPYCHALA, J.; LAZAROWSKI, E.; OSTAPKOWICZ, A.; AYSCUE, L.H.; JIN, A.; MITCHELL B.S. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 10(2), p. 708-717, 2004.
- STRASSMANN, G.; JACOB, C.O.; EVANS, R.; BEALL, D.; FONG, M. Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and

- colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 148(11), p. 3674-3678, 1992.
- STRELKOV, A. B.; FIELDS, A. L. A.; BARACOS, V. E. Effects of systemic inhibition of prostaglandin production on production on protein metabolism in tumor bearing-rats. **AJP-Cell Physiol.**, Baltimore, v. 257(26), p. C261-C269, 1989.
- SUGARMAN B. J. ; AGGARWAL B. B. ; HASS P. E. ; FIGARI I. S. ; PALLADINO M. A. JR. ; SHEPARD H. M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, Whashington, v. 230(4728), p. 943-5, 1985.
- SUNG, J.Y. ; HONG, J.H. ; KANG, H.S. ; CHOI, I. ; LIM, S.D. ; LEE, J.K. ; SEOK, J.H. ; LEE, J.H. ; HUR, G.M. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. **Immunopharmacology**, New York, v. 47(1), p. 35-44, 2000.
- SZABÓ, C.; SOUTHAN, G. J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric synthase: role of aldehyde metabolites . **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 113, p. 757-766, 1994.
- SZALECZKY, E.; PRÓNAI, L.; NAKAZAWA, H.; TULASSAY, Z. Evidence of in vivo peroxynitrite formation in patients with colorectal carcinoma, higher plasma nitrate/nitrite levels, and lower protection against oxygen free radicals. **J. Clin. Gastroenterol.**, New York, v. 30(1), p. 47-51, 2000.
- TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 749-790, 1984.

- TAPIEIRO, H.; MATHE, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. I. Arginine. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 56, p. 439-445, 2002a.
- TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies, II. Glutamine and Glutamate. **Biomed. Pharmacoth.**, Paris, v. 56, p. 446-457, 2002b.
- TARKOWSKI E, ROSENGREN L, BLOMSTRAND C, JENSEN C, EKHOLM S, TARKOWSKI A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. **Stroke**, Dallas, v. 30(2), p. 321-327, 1999.
- TAYEL, J.A.; BRASEL, J.A. Effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  on skeletal muscle and walker 256 carcinosarcoma protein metabolism studied *in vivo*. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 90, p. 2765-2768, 1990.
- TATOYAN, A.; GIULIVI,C. Purification and characterization of a nitric- oxide synthase from rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 273, p. 11044-11048, 1998.
- TISDALE, M.J., Cachexia in cancer patients. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2(11), p. 862-871, 2002.
- TISDALE, M.J., Cancer cachexia:metabolic alteration and clinical manifestation, **Nutrition**, New York, v. 13, p. 1-7, 1997.
- TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Anticancer Drugs**, The Netherlands, v. 4(2), p. 115-125, 1993.
- TODOROV, P.; CARIUK, P.; MCDEVITT, T.; COLES, B.; FEARON, K.; TISDALE, M. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, London, v. 379(6567), p. 739-742, 1996.

- TSUJINAKA, T.; FUJITA, J.; EBISUI, C.; YANO, M.; KOMINAMI, E.; SUZUKI, K.; TANAKA, K.; KATSUME, A.; OHSUGI, Y.; SHIOZAKI, H.; MONDEN, M. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. **J. Clin. Invest.**, Michigan, v. 97 (1), p. 244-249, 1996.
- VAN DAMME, J.; DE LEY, M.; VAN SNICK, J.; DINARELLO, C.A.; BILLIAU, A. The role of interferon-beta 1 and the 26-kDa protein (interferon-beta 2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 139(6), p. 1867-1872, 1987.
- VARGIU, C.; CABELLA, C. BELLIARDO, S.; CRAVANZOLA, C.; GRILLO, M. A.; COLOMBATTO, S. Agmatina modulates polyamine content in hepatocytes by inducing spermidine/spermine acetyltransferase. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 259, p. 933-938, 1999.
- VICENTINO C, CONSTANTIN J, BRACHT A, YAMAMOTO NS. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, Copenhagen, v. 22(4), p. 341-349, 2002.
- VOORZANGER, N.; TOUITOU, R.; GARCIA, E.; DELECLUSE, H.J.; ROUSSET, F.; JOAB, I.; FAVROT, M.C.; BLAY, J.Y. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced *in vivo* by non-hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, p. 5499-5505, 1996.
- WAKI, Y.; NOMURA, M; KASUGAI, S.; OHYA, K.; MIYAMOTO, K. Walker 256/S Carcinosarcoma Causes Osteoporosis-like Changes through Ectopical Secretion of Luteinizing Hormone-releasing Hormone. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 59, p. 1219-1224, 1999.

- WALLACE, H. M.; FRASER, A. V. Inhibitors of polyamine metabolism: Review article. **Amino Acids**, Wien, v. 26, p. 353-365, 2004.
- WAN, J. M.; FOGT, F.; BISTRAN, B. R.; ISTFAN, N. W. Evaluation of antitumor effect of tumor necrosis factor in terms of protein metabolism and cell cycle kinetics. **Am. J. Physiol.** v. 265, p. 365-374, 1993.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, Bethesda, v. 4(6), p. 727-730, 1958.
- WEISS, L.; HARLOS, J.P. Differences in the peripheries of Walker Cancer cells growing in different sites in the rat. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 39, p. 2481-2485, 1983.
- WILLIAMS, J. F.; SIDDIQUI, R. A. Biochemistry of Cancer Cachexia: review of results, a new hypothesis and a proposal for treatment. **Med. Sci. Res.**, Hagerstown, v. 18, p. 3-10, 1990.
- WILLIAMS, W. J.; MANSON, L. A. Glutaminase of the human malignant cell, strain HeLa. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 232, p. 229-36, 1957.
- WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; COPPOC, G. L.; WEBER, G. Imbalance in Ornithine Metabolism in Hepatomas of Different Growth Rates as Expressed in Formation of Putrescine, Spermidine, and Spermine. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 32, p. 1924-1932, 1972.
- YONISH-ROUACH, E.; RESNITZKY, D.; LOTEM, J.; SACHS, L.; KIMCHI, A.; OREN, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. **Nature**, London, v. 352(6333), p. 345-347, 1991.
- YOSHIDA, S.; KAIBARA, A.; ISHIBASHI, N.; SHIROUZU, K. Glutamine supplementation in cancer patients. **Nutrition**, New York, v. 17(9), p. 766-768, 2001.

YOUNES, R.N.; S.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Rev. Hosp. Clin.**

**Fac. Med. S. Paulo.** São Paulo, v. 55(5), p. 181-193, 2000.

ZALETOK, S.; ALEXANDROVA, N.; BERDYNKYKH, N.; IGNATENKO, N.; GOGOL, S. ORLOWSKY,

O.; TREGUBOVA, N.; GERNER, E.; CHEKHUN, V. Role of Polyamines in the function of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in breast cancer cells. **Exp. Oncol.**, Kyiv, v. 26,

p. 221-225, 2004.

**10 ANEXOS**