

**HELOÍSA HELENA PARO DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO DA ENZIMA COX-2 NO TECIDO TUMORAL DE  
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256,  
SUPLEMENTADOS CRONICAMENTE COM ÁCIDO GRAXO  
POLIINSATURADO ÔMEGA-3.**

**CURITIBA**

**2003**

**HELOÍSA HELENA PARO DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO DA ENZIMA COX-2 NO TECIDO TUMORAL DE  
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256,  
SUPLEMENTADOS CRONICAMENTE COM ÁCIDO GRAXO  
POLIINSATURADO ÔMEGA-3.**

Monografia apresentada para obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio  
Fernandes

**CURITIBA.**

**2003**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores que tive e que me ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador e amigo Luiz Cláudio pelo auxílio, paciência e amizade.

Aos meus colegas de laboratório pelos momentos de descontração, pela colaboração e pela paciência.

Ao pessoal do biotério pela ajuda, atenção e alegria diária.

A toda equipe do raio X do Hospital das Clínicas por serem prestativos e atenciosos.

Aos meus amigos por todos os momentos que passamos juntos e pelos momentos em que, mesmo distantes, pude sentir toda sua energia.

Aos meus irmãos por tudo que eles fizeram por mim para que eu pudesse estar aqui hoje.

À minha mãe por ser uma mulher forte e corajosa e por ter me dado força em todos os momentos de minha vida.

Às minhas sobrinhas que me deram carinho e alegria em todos os momentos.

Ao meu namorado pelo carinho e amizade e por todo auxílio e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao meu pai que com certeza está olhando por mim onde quer que ele esteja.

A Deus por todas as oportunidades e por ter colocado tantas pessoas maravilhosas em meu caminho.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. CÂNCER.....	1
1.2. TUMOR DE WALKER 256.....	2
1.3. CAQUEXIA.....	2
1.3.1. Alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.....	3
1.3.2. Mediadores da caquexia.....	6
1.3.3. Reversão da caquexia.....	8
1.4. EICOSANÓIDES.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. ANIMAIS.....	15
3.2. OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	16
3.3. REAGENTES, ENZIMAS, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS.....	16
3.4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS.....	18
3.4.1. Determinação da glicemia.....	18
3.4.2. Determinação do lactato sérico.....	19
3.4.3. Quantificação protéica.....	20
3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO – (SDS-PAGE).....	22
3.6. "WESTERN BLOTTING":.....	23
3.7. CONTROLE POSITIVO PARA EXPRESSÃO DA COX-2.....	24
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 4.....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

Caracterizada por anorexia, perda de peso e intenso catabolismo do hospedeiro, a síndrome da caquexia induzida pelo câncer é considerada causa primária de 70 % das mortes dos pacientes portadores de tumor. O tumor de Walker 256 tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da caquexia induzida pelo câncer em ratos. A diminuição da secreção de insulina, aumento dos hormônios contrareguladores, alta produção de prostaglandinas  $E_2$  e citocinas pró-inflamatórias são fatores envolvidos no estabelecimento da caquexia em ratos portadores de Walker 256. Estes, somados ao metabolismo tumoral, ávido consumidor de glicose e glutamina, levam à depleção dos estoques energéticos e importante perda de massa muscular do portador, os quais não podem ser restabelecidos através de suporte nutricional. Observação de baixa incidência de câncer em populações com alta ingestão de ácido graxo ômega-3 ( $\omega$ -3) estimulou a investigação em modelos animais. O suprimento com  $\omega$ -3 levou à redução da taxa de crescimento tumoral em diferentes tipos de câncer. O mecanismo pelo qual isso ocorre não é sabido. A COX-2 é uma enzima induzível responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas da série  $E_2$ . Estudos experimentais têm mostrado superexpressão de COX-2 em diversos tipos de cânceres. O presente estudo investigou se a suplementação oral com óleo de peixe é capaz de reduzir a expressão da COX-2 no tumor de Walker 256, restabelecer glicemia e laticidemia e reduzir o peso tumoral. A expressão da enzima determinada por "Western Blotting" no grupo portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PWK) foi 25% menor quando comparada à do grupo portador de tumor (WK) e suplementado com gordura de coco (SWK). O peso do tumor no PWK foi 4 vezes menor quando comparado ao WK e SWK. Isto foi acompanhado pelo retorno da glicemia e laticidemia aos níveis normais. Estes dados sugerem que óleo de peixe foi hábil em reduzir o crescimento tumoral, restabelecendo a glicemia e laticidemia e que, provavelmente, a redução da expressão da COX-2 é um dos mecanismos envolvidos.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER

O câncer tem importância ímpar no contexto da biologia celular pois reflete distúrbios das regras mais fundamentais do comportamento das células em um organismo multicelular. É uma doença na qual células individuais, mutantes, iniciam sua prosperidade às custas de seus vizinhos, destruindo toda sociedade celular, ou seja, reproduzem-se em detrimento de células normais e invadem e colonizam territórios reservados para outras células (ALBERTS *et al.*, 1997).

Denomina-se de tumor ou neoplasma o crescimento incansável de uma massa de células anormais. À medida que células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única, o tumor é dito benigno e pode ser removido cirurgicamente obtendo-se a cura. A denominação câncer é dada somente para tumores malignos, cujas células têm a capacidade de invadir tecidos vizinhos. Essa invasão geralmente ocorre através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos, formando tumores secundários, ou metástases, em outros locais do corpo. Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo celular que lhe dão origem. Cânceres que se originam de células epiteliais são chamados **carcinomas**; aqueles que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados **sarcomas**; e cânceres que não se enquadram nestas categorias incluem as várias **leucemias**, derivadas de células hematopoiéticas e cânceres derivados do sistema nervoso. Em paralelo com o conjunto de nomes para tumores malignos, há um conjunto de nomes relacionados aos tumores benignos: **adenoma**, por exemplo, é tumor epitelial benigno com organização glandular; **condroma** é tumor benigno de cartilagem e seus tipos correspondentes de tumor

maligno são respectivamente **adenocarcinoma** e **condrosarcoma** (ALBERTS *et al.*, 1997).

## 1.2. TUMOR DE WALKER 256

O carcinoma de Walker 256 é um modelo apropriado para estudos sobre interações tumor-hospedeiro, bem como para abordagens de tratamento farmacológico, nutricional e outras terapias antineoplásicas, visando possíveis intervenções contra a anorexia e a caquexia induzida pelo tumor. O tumor ou carcinoma de Walker 256 apresenta dois subtipos: um metastizante, que leva à anorexia terminal dos ratos portadores em aproximadamente 27 dias; e outro que não forma metástase e induz a 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).

## 1.3. CAQUEXIA

A caquexia é um complexo problema metabólico, caracterizado pela perda de peso e depleção tanto do músculo esquelético como da massa de tecido adiposo (TISDALE, 1996). Ela ocorre em mais de dois terços dos pacientes portadores de câncer, levando à diminuição do tempo de sobrevivência assim como da resposta à terapia (DE WYS, 1985). A síndrome de caquexia caracteriza-se por diferentes manifestações clínicas, cujas mais comuns são: astenia, anorexia, perda de peso, e anemia, causando desta maneira a debilidade do organismo hospedeiro. O grau de caquexia está inversamente relacionado com o prognóstico de vida do paciente (ARGILÉS *et al.*, 1997).

A astenia é um dos principais sintomas da caquexia, sendo caracterizada por perda muscular, a qual envolve não somente o músculo esquelético, mas também afeta as proteínas cardíacas, resultando em alterações na performance deste órgão (ARGILÉS *et al.*, 1997).

A anorexia parece ser mais efeito do que causa da perda de peso durante o câncer, podendo ser atribuída a alterações de palatabilidade ou olfato, mudanças na regulação alimentar no hipotálamo, ou distúrbios de digestão e absorção que acompanham alguns tumores (YOUNES e NOGUCHI, 2000). No entanto, é improvável que a perda de peso em indivíduos com câncer surja primariamente da redução da ingestão alimentar, pois a caquexia envolve perda de massa protéica dos músculos esqueléticos, o que não ocorre na anorexia. A suplementação nutricional não é capaz de repor a perda total de massa corporal e, além disso, a perda de músculo e tecido adiposo frequentemente precede a diminuição da ingestão alimentar, ou seja, a caquexia pode ocorrer sem anorexia. (TISDALE, 2001).

Sendo assim, a debilidade do portador não está relacionada apenas com seu comportamento alimentar deficiente, mas também com mudanças no metabolismo intermediário ocasionadas pelo tumor (ARGILÉS *et al.*, 1997; SAKURAI *et al.*, 1998).

### 1.3.1. Alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas

WARBURG, em 1930, demonstrou que tumores consomem grande quantidade de glicose aerobicamente (ARGILÉS *et al.*, 1997), resultando em intensa liberação de lactato para a circulação do hospedeiro. Este lactato é importado pelo fígado, onde seu esqueleto de carbono é utilizado para a síntese de glicose, gerando então o ciclo de Cori (glicose→lactato→glicose). Esta utilização gliconeogênica do lactato derivado do tumor é

um processo metabólico muito ineficiente, consumindo 6 moléculas de ATP por ciclo, mas é essencial para compensar a acidose do tumor (ARGILÉS *et al.*, 1997).

O glicerol, liberado como consequência da lipólise ativada do tecido adiposo, e os aminoácidos, liberados da musculatura esquelética como resultado da proteólise ativada são outros importantes substratos gliconeogênicos e contribuem para a produção aumentada de glicose hepática (WATERHOUSE *et al.*, 1979). Outro fator que leva a esta produção elevada de glicose é a degradação do glicogênio (RIVERA *et al.*, 1988).

No hospedeiro, o metabolismo de carboidratos também está profundamente alterado, havendo intolerância à glicose, que leva a vários estados típicos da diabetes tipo II e resistência à insulina (TAYEK, 1992). Esta resistência à insulina envolve o tecido adiposo, a musculatura esquelética e o fígado. A produção de glicose hepática aumentada é devida, parcialmente, à falta de inibição da gliconeogênese, via insulina, causada por um certo grau de resistência à insulina no fígado. Similarmente, a utilização de glicose pela musculatura esquelética é reduzida em pacientes com câncer, sendo resultado de clara resistência à insulina (ARGILÉS *et al.*, 1997). Esta resistência à insulina na musculatura também afeta a síntese de glicogênio (LUNDHOLM *et al.*, 1978).

A importância das alterações na secreção de insulina para o desenvolvimento do quadro caquético está claramente evidenciada nos animais portadores do tumor de Walker 256, promovendo a ativação das vias catabólicas no organismo hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 1990; COSTELLI *et al.*, 1999).

No metabolismo de lipídios no câncer, há redução no conteúdo de gordura corporal, particularmente do tecido adiposo branco, juntamente com hiperlipidemia (ARGILÉS *et al.*, 1997). A dissolução da massa de gordura é resultado de aumento na atividade lipolítica, que resulta na liberação de glicerol e ácidos graxos. Em adição, há diminuição da atividade

da lipoproteína lipase (LPL), enzima responsável pela clivagem de triacilgliceróis (presentes nas lipoproteínas) endógenos e exógenos em glicerol e ácidos graxos no tecido adiposo marrom e, de reduzida lipogênese *de novo* no tecido adiposo, que resulta numa esterificação diminuída, e conseqüentemente, reduzida deposição lipídica (THOMPSON *et al.*, 1981).

A hiperlipidemia parece ser resultado da elevação do triacilglicerol e do colesterol, sendo a hipertriacilglicerolemia conseqüência da diminuição da atividade da LPL, resultando na redução da remoção plasmática de triacilgliceróis endógenos e exógenos (ARGILÉS *et al.*, 1997) e, a hipercolesterolemia, devida à biosíntese alterada do colesterol, envolvendo também mudanças nos perfis das lipoproteínas (DESSI *et al.*, 1995). Há diminuição na quantidade de colesterol transportado na fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Outro fator que pode contribuir para elevação de triacilgliceróis circulantes é o aumento da lipogênese no fígado (MULLIGAN e TISDALE, 1991).

Fisiologicamente, durante o jejum, aminoácidos são mobilizados do músculo esquelético para o fígado, sendo substratos para a gliconeogênese induzida pela ativação das vias catabólicas. Porém, a redução muito prolongada da ingestão alimentar leva à diminuição da degradação das proteínas musculares, evitando desbalanceamento de nitrogênio e depleção muscular. Este mecanismo de conservação de nitrogênio está ausente em indivíduos portadores de câncer que desenvolvem caquexia, produzindo balanço negativo de nitrogênio (ARGILÉS *et al.*, 1997).

A musculatura esquelética, que corresponde aproximadamente a quase metade da massa protéica corpórea total, é severamente afetada na caquexia do câncer (TISDALE, 1991) e evidências demonstram que o gasto desta proteína muscular está associado com taxas de “turnover” (síntese e catabolismo) aumentadas (BECK e TISDALE, 1989). Estas

mudanças no “turnover” de proteínas musculares são induzidas, presumivelmente, pelas ações combinadas de citocinas (COSTELLI *et al.*, 1993), sozinhas ou combinadas com hormônios do estresse, tais como glucagon, glicocorticóides e catecolaminas (TRACEY *et al.*, 1987).

O resultado da proteólise aumentada é uma grande liberação de aminoácidos do músculo esquelético, especialmente alanina e glutamina. Além disso, a concentração de aminoácidos circulantes eleva-se ainda mais, pela inibição do transporte destes aminoácidos para dentro da musculatura esquelética (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1995). Aminoácidos de cadeia ramificada (ACR: leucina, isoleucina e valina), nutrientes essenciais, são os únicos aminoácidos que são extensivamente degradados no músculo esquelético e parecem estimular a síntese de proteínas e inibir a degradação do músculo esquelético. Durante a caquexia do câncer a resposta de “turnover” da proteína muscular aos ACR está alterada (SMITH e TISDALE, 1993).

### 1.3.2. Mediadores da caquexia

Segundo ARGILÉS *et al.* (1997), os mediadores que têm sido sugeridos, associados à depleção de reservas de gordura e tecido muscular, podem ser divididos em duas categorias: os de origem tumoral (produzido e liberado pelo neoplasma) e os fatores humorais (principalmente citocinas).

O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), sintetizado principalmente por macrófagos em resposta a estímulos invasivos, é um fator pleiotrópico que exerce uma variedade de efeitos tais como promoção do crescimento, inibição do crescimento, angiogênese, citotoxicidade, inflamação e imunomodulação (AGGARWAL e NATARAJAN, 1996). Este fator parece

ter importante papel na caquexia. A presença de TNF diminui a atividade da enzima LPL no tecido adiposo, produzindo hipertriacilglicerolemia por comprometimento da hidrólise de triacilgliceróis, redução da acetil CoA carboxilase (enzima lipogênica) e do transporte de glicose em adipócitos, comprometendo o substrato para a lipogênese (ARGILÉS *et al.*, 1997; TORTI *et al.*, 1985). Entretanto, apesar do TNF ter importante papel como mediador da caquexia em indivíduos portadores de tumor, os desarranjos metabólicos observados nesta síndrome não são provocados somente por este fator (ARGILÉS *et al.*, 1997). O desenvolvimento da caquexia em ratos portadores de tumor foi observado mesmo na ausência do TNF, sugerindo o envolvimento de algumas interleucinas nas alterações produzidas no metabolismo de proteínas. Foi mostrado que IL-2 (NOGUCHI *et al.*, 1996), IL-6 e interferon- $\gamma$  são mediadores da proteólise em alguns tipos de tumores (ALBRECHT, 1996; MATTHYS e BILLIAU, 1997; NELSON *et al.*, 1994). As interleucinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imunitário que têm por função mediar as interações entre leucócitos para a produção da resposta imunitária sem se ligar a antígenos. No entanto, elas podem ter origem e ação em outros tipos celulares, como é o caso das ILs 1 e 6, sendo então chamadas de citocinas (ALBERTS *et al.*, 1997).

A IL-6 possui amplo espectro de ação sobre diferentes células, sendo secretada por monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células-B. Receptor específico de alta afinidade para IL-6 está distribuído em muitas células diferentes por todo o organismo (YOUNES e NOGUCHI, 2000).

A associação de IL-1 e TNF estimula a síntese de prostaglandinas da série E<sub>2</sub> em vários tecidos periféricos (DAYER *et al.*, 1985). Investigações sobre o envolvimento de PGs na indução da caquexia no câncer mostraram que, em ratos portadores de leucemia, o

hipermetabolismo observado é induzido pela produção de PGs periféricas (ROE *et al.*, 1997). Ratos portadores de carcinoma de Walker 256 apresentam elevadas taxas de PGs e vasopressina, os quais foram sugeridos como fatores envolvidos nas alterações metabólicas e hormonais que induzem à caquexia (SIDDIQUI e WILLIANS, 1987).

### 1.3.3. Reversão da caquexia

A síndrome da caquexia no câncer é multifatorial, envolvendo alterações metabólicas, hormonais e imunológicas, as quais induzem à anorexia e ao intenso catabolismo do hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 1991; TRACEY *et al.*, 1987).

As estratégias farmacológicas sugeridas para combater a caquexia são divididas resumidamente em dois grupos, segundo os principais fatores causadores da caquexia: as que combatem a anorexia, portanto estimuladoras do apetite, e as que atuam nos desarranjos metabólicos (ARGILÉS *et al.*, 1997).

Corticóides e progestágenos são administrados com o objetivo de aumentar a ingestão protéico-calórica (ARGILÉS *et al.*, 1997; PUCCIO e NATHANSON, 1997), no entanto, o aumento de peso dos portadores de tumor demonstrados nestes casos foi acompanhado por um aumento da massa tumoral, ou ainda, por retenção líquida e nenhum aumento significativo de massa magra no hospedeiro (ARGILÉS *et al.*, 1997).

Estudos experimentais têm mostrado que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), particularmente os pertencentes à família ômega-3 (presentes no óleo de peixe), possuem papel essencial na regulação do equilíbrio energético do organismo (CLARKE, 2000; PRINCE *et al.*, 2000). Estes ácidos têm a habilidade de diminuir a síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> e podem agir aumentando os mecanismos de defesa contra células tumorais e a

suscetibilidade de células tumorais, através de mudanças na composição da membrana celular (GOGOS *et al.*, 1998). Os possíveis mecanismos de inibição do crescimento tumoral pelo óleo de peixe envolvem seus efeitos na fração fosfolipídica da população de células imunitárias, na alteração da estrutura da membrana e em mudanças na transdução de sinais celulares que influenciam crescimento e proliferação (MARSHALL e JOHNSTON, 1983).

#### 1.4. EICOSANÓIDES

As prostaglandinas são pequenas moléculas lipídicas que regulam numerosos processos corporais, incluindo função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação da função imunitária (GOETZL *et al.*, 1995; PHIPPS *et al.*, 1991). O primeiro passo na síntese de prostaglandinas é a hidrólise dos fosfolípidios para produzir araquidonato livre, numa reação catalisada pela fosfolipase A<sub>2</sub>. O próximo passo nesta via é catalisado pelas cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e 2), que inserem oxigênio molecular no ácido araquidônico. Esta reação produz PGG<sub>2</sub>, um produto instável, que é rapidamente convertido em PGH<sub>2</sub> pela atividade peroxidase das COXs. A PGH<sub>2</sub> é o precursor comum para todos os outros prostanóides que são sintetizados em reações catalisadas por enzimas específicas distintas. Cada um dos produtos derivados de PGH<sub>2</sub> tem suas próprias séries de atividades biológicas (DANNENBERG e ZAKIM, 1999).

É sabido que a cicloxigenase-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos corporais e age para manter os processos homeostáticos, tais como a secreção mucosa. A COX-2, em contraste, é enzima induzível e está envolvida primariamente na regulação da inflamação (SMITH *et al.*, 1994).

O relacionamento entre a expressão aumentada da cicloxigenase e o câncer está tornando-se bem estabelecido, sendo a superexpressão da COX-2 relatada em diversos cânceres, incluindo o de mama, de cólon e de próstata (DEMPKE *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos revelam que a inibição das enzimas cicloxigenases reduzem a incidência de certos cânceres (HARRIS *et al.*, 2002).

Prostaglandinas da série E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que promovem a sobrevivência da célula tumoral, têm sido encontradas em concentrações mais altas em tecidos tumorais do que em tecidos normais (CHULADA *et al.*, 2000). Elas medeiam esta sobrevivência por inibir a apoptose da célula tumoral e induzir sua proliferação (SUMITANI *et al.*, 2001), além de induzirem angiogênese e metástase (CHAN *et al.*, 1999). Além disso, a PGE<sub>2</sub> aumenta a progressão tumoral por alterar a morfologia, motilidade e migração celular (GATELY, 2000).

PRESCOTT *et al.* (2000) afirmam que uma vez que a cicloxigenase-2 seja induzida e catalise a oxidação do ácido araquidônico, são produzidas prostaglandinas e subprodutos altamente reativos que podem acelerar o processo carcinogênico. Entretanto, o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está claro. É possível que a catálise pela COX-2 remova algum agente de proteção e gere um ou mais agentes oncogênicos.

SIDDIQUI e WILLIANS (1990) demonstraram que ratos portadores do tumor de Walker 256 apresentam elevados níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> circulante quando comparados aos de ratos normais e que a principal fonte desta era o tumor. LIU e ROSE (1996) sugerem que níveis elevados de PGs sejam produzidos pela expressão aumentada de COX-2.

Estudos das funções das COXs e trabalhos visando o desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias não esteroidais indicam que as COXs podem também estar envolvidas na proliferação celular e crescimento tumoral (FOSSLIEN, 2000). A COX-2 é

*upregulated* na maioria das células tumorais humanas e as propriedades anti-tumorais dos anti-inflamatórios não esteroidais têm sido demonstradas em estudos epidemiológicos e modelos animais experimentais (THUN *et al.*, 2002). Além da habilidade de induzir a apoptose em células neoplásicas, inibidores da COX-2 podem bloquear a produção de fatores angiogênicos e a migração de células endoteliais vasculares e então, diminuir o crescimento tumoral (IÑIGUEZ *et al.*, 2003).

Até agora, pelo menos cinco mecanismos pelos quais a COX-2 contribui para a tumorigênese e o fenótipo maligno das células tumorais têm sido identificados, incluindo: inibição da apoptose; angiogênese aumentada; invasividade aumentada; modulação da inflamação/imunossupressão; e conversão de procarcinógenos em carcinógenos (DEMPKE *et al.*, 2001).

A regulação da apoptose é específica do tipo celular e dependente do balanço entre fatores pró e anti-apoptóticos. SMITH, HAWCROFT e HULL (2000) demonstraram correlação positiva entre a expressão da COX-2 e a inibição da apoptose em células de câncer coloretal. JONES *et al.* (1999) mostraram que após a exposição de células do carcinoma de cólon humano a PGE<sub>2</sub> *in vitro*, observou-se aumento de 4 a 5 vezes nos níveis da proteína Bcl-2 (anti-apoptótica). Além disso, relataram aumento da apoptose nestas células após o tratamento com inibidor seletivo da COX-2.

Em termos de angiogênese, descobriu-se que a atividade da COX-2 aumenta a expressão de fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) entre outros (MASFERRER *et al.*, 2000). Evidências acumuladas ligam a COX-2 com câncer e angiogênese, sugerindo que drogas que tenham como alvo a COX-2 e a cascata de sinalização relacionada, poderiam ser usadas como agente anti-angiogênico (IÑIGUEZ *et al.*, 2003).

Quanto a invasividade, ATTIGA *et al.* (2000) relataram que a inibição da COX-2 resultou em secreção alterada de MMPs (metaloproteases de matriz), sugerindo que a COX-2 poderia controlar sua atividade. Essas metaloproteases de matriz são enzimas degradativas que têm sido ligadas a várias propriedades malignas das células tumorais, incluindo invasão da célula tumoral na membrana basal e estroma, penetração de vasos sanguíneos e metástase (NELSON *et al.*, 2000).

Outro efeito da superexpressão da COX-2, que pode contribuir para o fenótipo maligno de pacientes com câncer, inclui a diminuição de E-cadherina com conseqüente perda de adesão célula a célula (ZHANG e DUBOIS, 2001).

Segundo SHAO *et al.* (2000), a super expressão da COX-2 parece ser conseqüência da transcrição elevada e do aumento da estabilidade do seu mRNA. Oncogenes, fatores de transcrição, citocinas, quimioterapia e promotores tumorais estimulam a transcrição da COX-2 via proteína quinase C (PKC) e via sinalização mediada por Ras (SMITH *et al.*, 2000). Estes autores também relatam que, dependendo do estímulo e do tipo celular, uma variedade de fatores de transcrição incluindo AP-1 (proteína ativadora 1), NF-IL6 (fator nuclear interleucina-6), NF $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) e NFAT (fator nuclear de células T ativadas) podem modular a transcrição da COX-2. Pouco se sabe sobre os moduladores negativos da COX-2, mas vários estudos recentes de tumores humanos têm realçado a importância do status do p53 (supressor tumoral) como determinante dos níveis de COX-2 (RISTIMAKI *et al.*, 2002), sugerindo que o balanço entre a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor afetam a expressão da COX-2.

Em 1989, KARMALI *et al.* relataram que a dieta rica em AGPIs  $\omega$ -3 estava associada com baixos níveis de PGE<sub>2</sub> em glândulas mamárias cancerosas e normais quando

comparada à dieta rica em  $\omega$ -6. BADAWI *et al.* (1998) sugerem que o efeito inibitório dos AGPIs  $\omega$ -3 na carcinogênese mamária pode ser devido a seus efeitos modulatórios na atividade enzimática da COX-2.

Várias linhas de evidências indicam que dietas com baixo teor de gordura ricas em ácidos graxos  $\omega$ -3 podem prevenir o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata e que dietas com alto teor de gordura ricas em ácidos graxos  $\omega$ -6 podem promover o crescimento de câncer de próstata (NORRISH *et al.*, 1999; GODLEY *et al.*, 1996). Em resposta a uma variedade de estímulos, o ácido graxo  $\omega$ -6 (ácido araquidônico) é liberado dos fosfolípidios de membrana e convertido pela cicloxigenase-2 em prostaglandina  $E_2$ , que tem sido implicada na carcinogênese. Inversamente, uma dieta rica em  $\omega$ -3 pode prevenir o desenvolvimento do câncer de próstata por aumentar a razão de ácidos graxos  $\omega$ 3/ $\omega$ -6 nas membranas celulares. Os ácidos graxos  $\omega$ -3 (EPA e DHA) competem com o  $\omega$ -6 como substratos para a enzima COX-2 e isto resulta na produção de prostaglandinas e leucotrienos das séries 3 e 5, respectivamente, onde a  $PGE_3$  não possui efeito mitogênico (CULP *et al.*, 1979).

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo objetivou investigar a expressão da enzima COX-2 no tecido tumoral de ratos portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe, e determinar os valores de glicemia e laticidemia como parâmetros sanguíneos de caquexia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Ratos albinos machos e fêmeas da linhagem Wistar, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, submetidos a ciclo claro/escuro (12/12) com água e alimentação à vontade, em ambiente com temperatura controlada de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , foram utilizados neste estudo.

Ratas com 21 dias de nascimento foram suplementadas todos os dias com 1 g/kg p.c. de óleo de peixe (PUFA n-3) proveniente de cápsulas de 1g (Scherer) que contém 180 mg de EPA e 120 mg de DHA, ou com 1g/kg p.c. de gordura de coco, até atingirem a maturidade sexual (90 dias). Em seguida, foram colocadas para reprodução com machos não submetidos a esta suplementação. Da prole gerada, os machos foram divididos em três grupos de acordo com a suplementação alimentar: gordura de coco (saturado), óleo de peixe (poliinsaturado) e grupo controle sem suplementação (C), e suplementados da mesma forma que a de suas mães. Quando atingiram a idade adulta (90 dias), foram inoculados com suspensão de células ( $2 \times 10^7$  células/mL) obtidas do tumor ascítico de Walker 256.

A evolução da massa corpórea de todos os grupos foi monitorada a cada dois dias, durante todo o período experimental.

Estes animais foram então divididos em subgrupos explicitados abaixo:

- Saturado (S) = grupo gordura de coco sem tumor
- SWK = grupo gordura de coco com tumor
- Poliinsaturado (P) = grupo óleo de peixe sem tumor

- PWK = grupo óleo de peixe com tumor
- C = grupo controle
- WK = grupo portador de tumor

No 14º dia após a inoculação do tumor, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue e o tumor foram retirados para posterior análise bioquímica e determinação de parâmetros metabólicos (glicemia e laticidemia).

### 3.2. OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS

Em um animal portador do W256 ascítico foi injetado 10 mL de solução salina 0,9% e em seguida, este foi sacrificado por deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta e todo o seu conteúdo ascítico coletado. Uma alíquota desta suspensão foi diluída 1:100 e após a contagem de células em câmara de Neubauer, com corante “Trypan Blue”, 1 mL desta suspensão (contendo  $2 \times 10^7$  células) foi injetado subcutaneamente nos animais (FERNANDES *et al.*, 1991). Os ratos do grupo controle foram inoculados com 1 ml de solução salina 0,9 %.

### 3.3. REAGENTES, ENZIMAS, SOLUÇÕES E ÁCIDOS GRAXOS

Todos os componentes dos tampões e os solventes foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira SA. Lactato desidrogenase e NAD foram provenientes da Sigma Chemical Co. O óleo de peixe foi obtido de uma preparação de lipídios de uma

cápsula de 1g da empresa Scherer e a gordura de coco da Indústria Brasileira Refino de Óleos do Brasil LTDA.

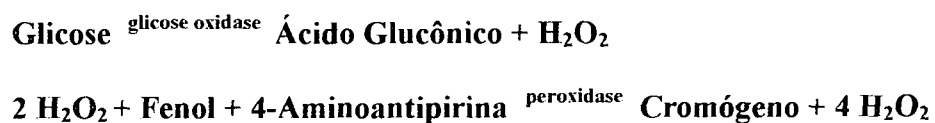
A tabela abaixo mostra a composição, em porcentagem, de ácidos graxos contidos na gordura de coco e dos principais ácidos graxos poliinsaturados contidos em uma cápsula de Scherer (óleo de peixe).

<b>Composição de ácidos graxos (%)</b>	<b>Gordura de coco</b>
Ácido Láurico (12:0)	43.47 ± 0.47
Ácido Mirístico (14:0)	22.93 ± 0.34
Ácido Palmítico (16:0)	8.42 ± 0.18
Ácido Palmitolêico (9-16:1)	0.53 ± 0.07
Ácido Estearico (18:0)	4.39 ± 0.64
Ácido Olêico (9-18:1)	17.03 ± 0.33
Ácido Linolêico (9,12-18:2)	3.33 ± 0.18
Ácido Linolênico (9,12,15-18:3)	0.50 ± 0.17
<b>Composição de AGPIs n-3 (%)</b>	<b>Óleo de peixe</b>
Ácido Eicosapentaenóico (5,8,14,17-20:5)	18
Ácido Docosahexaenóico (4,7,10,13,16,19-22:6)	12

### 3.4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

#### 3.4.1. Determinação da glicemia

Foi realizada pelo método enzimático colorimétrico; utilizando-se Kit Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER (1969). As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante do Kit. A glicose presente na amostra foi dosada segundo a reação:



A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra do soro. A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro ULTROAPEC 2000 (Pharmacia) a 505 nm e, após a medida da absorbância para a glicose, foi calculada a concentração desta em mg/dL, segundo a fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \text{D.O. amostra} / \text{D.O. padrão} \times n$$

- [Glicose] = Concentração de glicose na amostra
- D.O. = Densidade ótica
- n = concentração do padrão

### 3.4.2. Determinação do lactato sérico

Determinado por método enzimático não colorimétrico. Inicialmente foi feita a desproteinização do soro (500  $\mu$ L), adicionando-se 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 25 % e a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm. Em seguida, foi coletado 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionado 2  $\mu$ L de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro por adição de KOH/TRIS (0,5 M/2M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7.0. Após, 100  $\mu$ L do soro neutralizado foi pipetado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão de ensaio, e depois de 45 minutos foi efetuada a leitura no espectrofotômetro a 340 nm.

A medida da absorbância para o lactato sérico foi calculada segundo a fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \text{D.O.} / 6,22 \times V1/V \times V2/V3 \times V4/V5$$

- [Lactato] = Concentração do lactato sérico
- D.O. = Densidade ótica da amostra
- 6,22 = Constante
- V1 = Volume da amostra + tampão de dosagem
- V = Volume da amostra para ensaio
- V2 = Volume do soro + TCA
- V3 = Volume do soro
- V4 = Volume do soro desproteinizado + volume de neutralização
- V5 = Volume do soro desproteinizado

<b>Tampão de Ensaio (para 100 mL)</b>	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 mL
LDH	0,4 mL
NAD <sup>+</sup>	60 mg
pH	8,85

### 3.4.3. Quantificação protéica

Os tumores congelados foram homogeneizados com tampão de lise na proporção 1:7 com o auxílio de um homogeneizador tipo Politron (25.000/min), centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante coletado. A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford. A concentração da proteína da amostra desconhecida foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (o correto é utilizar uma proteína padrão mais próxima da amostra em questão). O preparo da curva padrão está detalhado no ANEXO 1.

#### 3.4.3.1. Preparo da amostra para determinação protéica

Foram diluídos 10  $\mu$ L da amostra na proporção 1:25 com água miliQ. Uma bateria de tubos foi preparada em duplicata para cada amostra mais o tubo branco. Foi colocado então 1 mL da solução de Bradford em cada tubo + 20  $\mu$ L de cada amostra; no tubo branco

foi colocado 1 mL da solução mais 20  $\mu$ L do diluente da amostra. O preparo das soluções encontra-se no ANEXO 2. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do branco. As densidades óticas devem ficar entre 0 e 1 (faixa de sensibilidade da curva padrão).

O cálculo da concentração protéica de cada amostra foi feito a partir da equação da reta ( $y = ax + b$ ), sabendo-se que  $y$  = densidade ótica e  $x$  = concentração da amostra. A partir dos valores de D.O. ( $y$ ) é possível calcular a concentração da amostra, isolando-se o  $x$ . Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em  $\mu$ g/mL.

Após a quantificação protéica das amostras, foi feita diluição com tampão Laemmli de forma que a concentração final ficasse entre 3 ou 4  $\mu$ g/ $\mu$ L (concentração necessária para a eletroforese). É importante que todas as amostras fiquem em uma concentração protéica única para que isso não interfira na análise de suas bandas.

O tampão Laemmli possui SDS para desnaturar a proteína e propiciar carga negativa constante para todas as proteínas; glicerol para dar maior densidade à amostra do que o tampão de corrida; e  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) responsável por quebrar as pontes dissulfeto presentes na amostra, possibilitando a separação das proteínas em subunidades.

### 3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO – (SDS-PAGE)

Quando submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram de acordo com vários fatores, como o peso molecular, carga, formato e a interação com outras moléculas (proteínas e lipídios).

O método "SDS-PAGE" descrito por LAEMMLI em 1970 foi desenvolvido para que esta migração dependa unicamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende unicamente dos seus pesos moleculares.

Usualmente utiliza-se géis de poliacrilamida para esta migração. O gel de empilhamento (*Stacking*) é preparado a 4% e permite que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação (*Resolving*), as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração do gel de separação vai depender da proteína que se pretende analisar; geralmente utilizam-se géis de 7,5 a 10%. Os géis foram preparados a partir de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (30:1); a polimerização química da acrilamida com a bisacrilamida foi, então, iniciada com a adição do persulfato de amônio e do TEMED; o persulfato de amônio gera radicais livres que levam à polimerização, enquanto o TEMED cataliza a formação destes radicais.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDS-Page" na porcentagem de 8 % por cerca de 2 horas (300 V, 25 mA) ou *overnight* (12V,

6mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação das proteínas de interesse pelo “Western Blotting”. A descrição detalhada do preparo do gel encontra-se no ANEXO 3.

### 3.6. "WESTERN BLOTTING"

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por TOWBIN. A idéia geral deste método é a identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais, incluindo a detecção, a quantidade relativa e o peso molecular de proteínas em uma mistura complexa. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde se procedeu o método. Como restaram regiões onde não havia proteínas na membrana, primeiro foi necessário incubá-la em um tampão de bloqueio, que contém leite em pó desnatado; isso evitou que os anticorpos se ligassem inespecificamente a estas regiões. Após bloqueada, a membrana foi, então, incubada em tampão de incubação contendo o anticorpo primário para a proteína que se queria analisar (COX-2). Para visualizar a interação antígeno-anticorpo foi necessário um método de detecção; utilizou-se um segundo anticorpo, conjugado com uma enzima, voltado para o primeiro. Esta enzima permitiu, pela adição de um substrato cromogênico ou quimioluminescente, a visualização da proteína identificada pelo anticorpo em filme Kodak para radiografia. As bandas foram analisadas por densitometria através do programa “Scion Image”. O detalhamento da técnica encontra-se no ANEXO 4.

### 3.7. CONTROLE POSITIVO PARA EXPRESSÃO DA COX-2

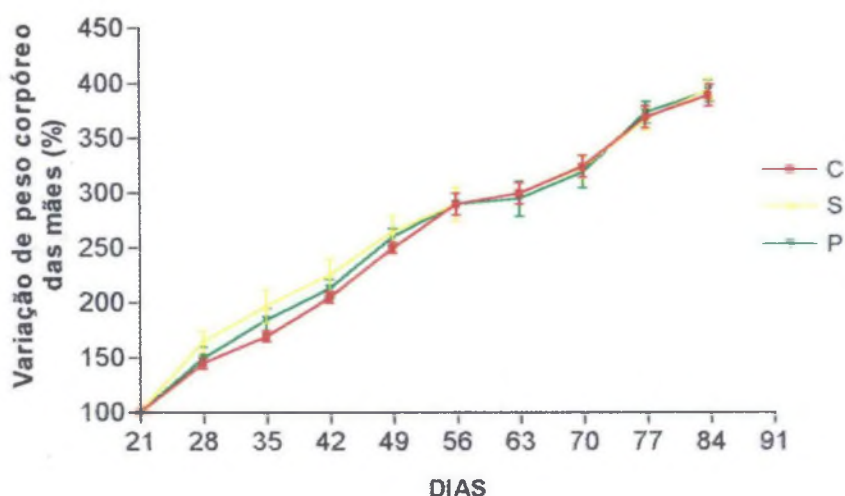
Rato Wistar foi inoculado com 50  $\mu$ l (2mg/mL) de LPS (lipopolissacarídeo) na região central ventral de ambas as patas. Após três horas, o animal foi sacrificado, o tecido da pata homogeneizado e seu conteúdo protéico dosado e sujeito aos protocolos de SDS-PAGE e “Western Blotting”.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à Anova de uma via com pós teste de Tukey com significância para  $p < 0.05$ .

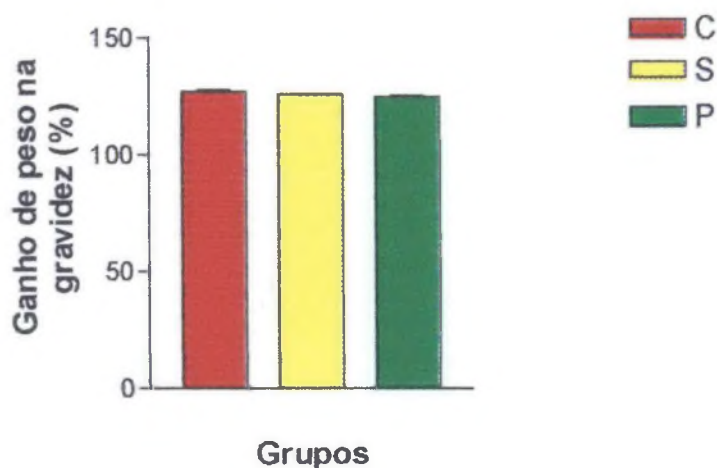
#### 4. RESULTADOS

Na figura 1 estão representados os dados, em porcentagem, da variação do peso corpóreo das mães das proles utilizadas no experimento, desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (90 dias), dos grupos controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P). Animais controle apresentaram ganho de peso de 400% neste período. A suplementação com os diferentes tipos de ácidos graxos não alterou significativamente a porcentagem de variação de peso quando comparados entre si ou com o do grupo controle ( $p>0,05$ ).



**Figura 1.** Porcentagem de variação de peso corpóreo das fêmeas progenitoras das proles estudadas do grupo controle (C), do grupo suplementado com gordura de coco (S) e do grupo suplementado com óleo de peixe (P), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (90 dias), em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 18 animais por grupo.

Na figura 2 estão apresentados os dados de ganho de peso corpóreo (%) das mães durante o período gestacional (21 dias) dos grupos controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P). A suplementação com os diferentes tipos de ácidos graxos não alterou significativamente ( $p>0,05$ ) o ganho de peso quando comparados ao do grupo controle ou entre si.



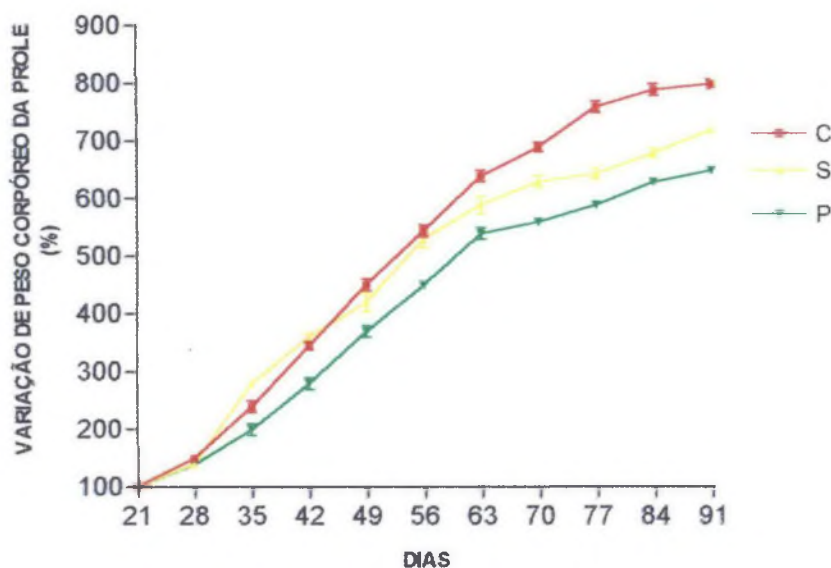
**Figura 2.** Ganho de peso corpóreo das fêmeas (%) do grupo controle (C), do grupo com gordura de coco (S) e do grupo com óleo de peixe (P) durante a gravidez (21 dias). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Na tabela 1 estão expostos os dados de peso (g) da prole gerada pelas fêmeas dos grupos controle (C), suplementadas com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P), no nascimento e no desmame (após 21 dias). As diferentes suplementações administradas nas mães não modificaram significativamente ( $p>0,05$ ) o ganho de peso total da prole quando comparados ao do controle ou entre si.

**TABELA 1:** Peso total (g) das proles, geradas pelas mães pertencentes aos grupos controle, saturado (suplementadas com gordura de coco) e poliinsaturado (suplementadas com óleo de peixe), no nascimento e no desmame (após 21 dias). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média de 3 ninhadas (90 animais) geradas por 6 fêmeas de cada grupo.

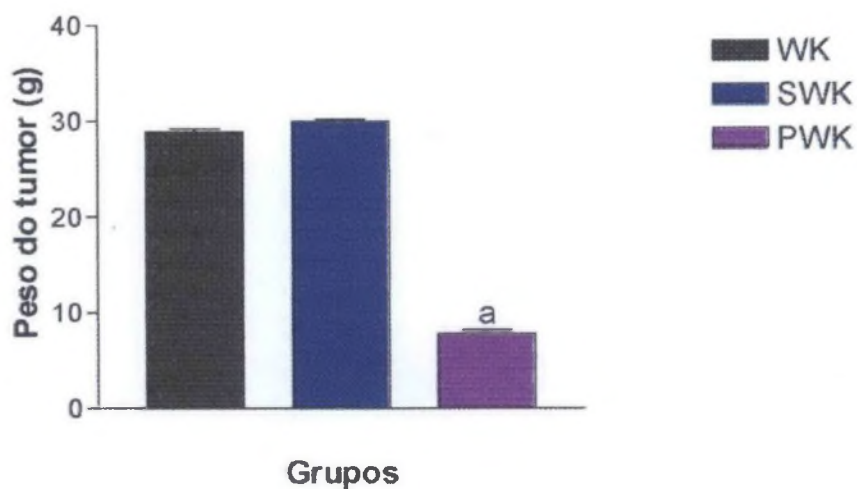
<i>PROLE</i>	<i>GRUPO</i> <i>CONTROLE</i>	<i>GRUPO</i> <i>SATURADO</i>	<i>GRUPO</i> <i>POLIINSATURADO</i>
<i>PESO (g) NO</i> <i>NASCIMENTO</i>	63,44 $\pm$ 5,62	56,90 $\pm$ 4,16	55,20 $\pm$ 4,19
<i>PESO (g) NO</i> <i>DESMAME</i>	315,78 $\pm$ 30,62	293,80 $\pm$ 20,25	281,86 $\pm$ 22,2

Na figura 3 estão representados os dados, em porcentagem, da variação do peso corpóreo da prole, desde o desmame até a fase adulta (período de 70 dias), dos animais dos grupos controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou com óleo de peixe (P). Animais do grupo controle apresentaram ganho de peso de 800 % neste período. As diferentes suplementações não alteraram, significativamente ( $p > 0,05$ ), a porcentagem de variação de peso quando comparadas entre si ou com a do controle.



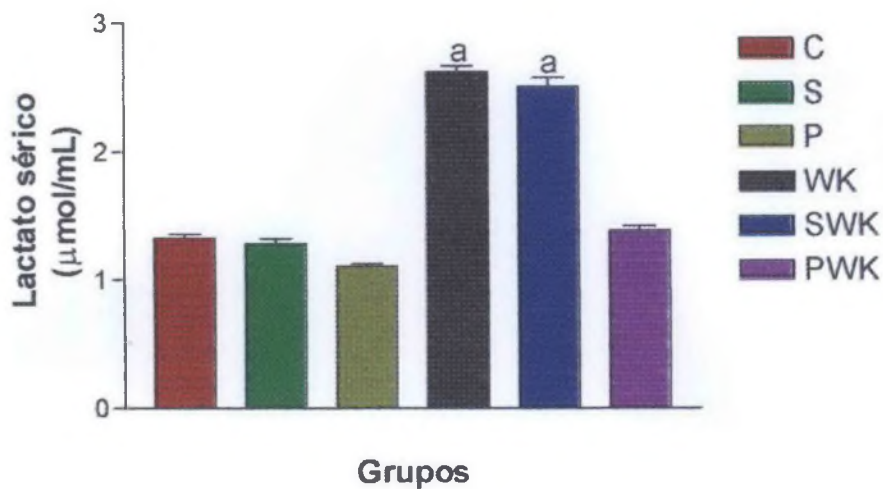
**Figura 3.** Porcentagem da variação de peso corpóreo da prole dos grupos controle (C), saturado (S) e poliinsaturado (P), desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (90 dias), em intervalos de 7 dias. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais por grupo.

A figura 4 mostra os valores do peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor (WK), suplementados com gordura de coco (SWK) ou suplementados com óleo de peixe (PWK), logo após o sacrifício dos mesmos. Houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da massa tumoral no grupo suplementado com óleo de peixe. Os animais suplementados com óleo de peixe (PWK) apresentaram massa tumoral aproximadamente 4 vezes menor quando comparada à dos animais portadores de tumor não suplementados (WK) ou suplementados com gordura de coco (SWK). Não houve diferença estatística entre a massa tumoral dos animais portadores de tumor (WK) e dos portadores de tumor suplementados com gordura de coco (SWK).



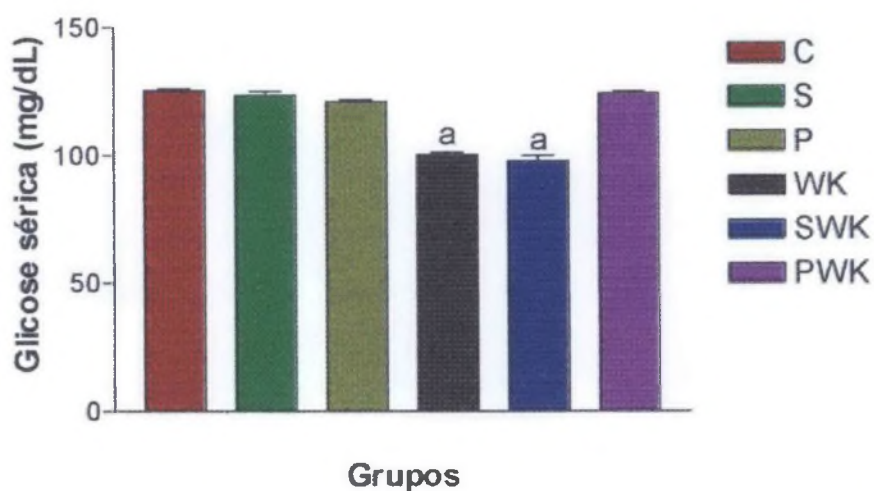
**Figura 4.** Peso fresco do tumor (g) dos animais portadores de tumor (WK), suplementados com gordura de coco (SWK), ou suplementados com óleo de peixe (PWK). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-10 animais por grupo.  $p < 0,01$  quando comparado com WK e SWK.

A concentração de lactato ( $\mu\text{mol/mL}$ ) nos animais portadores de tumor (WK) e suplementados com gordura de coco (SWK) foi significativamente maior quando comparada à de todos os outros grupos (figura 5). A concentração de glicose sanguínea (mg/dL) nos animais do grupo portador de tumor (WK) e suplementados com gordura de coco (SWK) foi estatisticamente menor quando comparada à dos demais grupos (figura 6).



**Figura 5.** Concentração de lactato ( $\mu\text{mol/mL}$ ) nos animais do grupo controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P) e dos ratos portadores de tumor (WK), suplementados com gordura de coco (SWK), ou com óleo de peixe (PWK). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-10 animais por grupo.

a  $p < 0.05$  quando comparado aos demais grupos.



**Figura 6.** Glicemia (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), suplementados com gordura de coco (S) ou óleo de peixe (P) e dos ratos portadores de tumor (WK), suplementados com gordura de coco (SWK), ou com óleo de peixe (PWK). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-10 animais por grupo.

a  $p < 0.01$  quando comparado aos demais grupos.

A expressão de COX-2 foi 25% menor no animal portador de tumor suplementado com óleo de peixe (PWK) quando comparado à do portador de tumor sem suplementação (WK). No animal portador de tumor suplementado com gordura de coco (SWK) o nível de expressão foi similar à do WK (figura 7).



**Figura 7.** “Western Blotting” representativo da expressão da COX-2 em animais portadores de tumor (WK), suplementados com gordura de coco (SWK) ou óleo de peixe (PWK). *Lane 1* → controle positivo da COX-2; *lane 2* → WK; *lane 3* → SWK; *lane 4* → PWK. O peso molecular desta proteína é de 82 Kb.

## 5. DISCUSSÃO

A suplementação com gordura de coco ou óleo de peixe não alterou a variação de peso corpóreo, desde o desmame até a idade adulta, das mães das proles utilizadas no experimento (figura 1), e nem o ganho de peso das mesmas no período gestacional (figura 2). O mesmo foi observado na figura 3, que mostra a variação de peso corpóreo das proles geradas por estas mães e também suplementadas com estes ácidos graxos. Isso demonstra que estes ácidos graxos, em baixas doses (1 g/kg p.c.), não influenciaram o ganho de peso, nem provocaram obesidade nestes animais. STORLIEN e PAN, em 1993, apresentaram resultados que demonstravam que o efeito metabólico de ácidos graxos na dieta é fortemente influenciado pelo perfil de ácidos graxos totais desta dieta. A utilização de diferentes ácidos graxos na dieta altera a composição dos fosfolipídios de membrana e esta composição alterada, em particular com elevados níveis de  $\omega$ -3, resulta em redução do ganho de peso através de taxas metabólicas alteradas e melhora na ação da insulina.

Os dados apresentados na tabela 1 demonstram que a suplementação destas mães, com os diferentes ácidos graxos, também não alterou o peso das proles ao nascimento e desmame, sugerindo novamente que estes ácidos graxos não estariam aumentando o ganho de peso corpóreo destes animais.

O crescimento tumoral depende de contínuo fornecimento de substratos para seu alto metabolismo, os quais, em última análise, são fornecidos pelo portador. Assim, o comportamento “egoísta” do tumor, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, induz ao desenvolvimento da síndrome da caquexia, manifestação clínica mais comum em indivíduos portadores de câncer. Esta é caracterizada por perda

progressiva de peso corpóreo, intenso catabolismo e anorexia, refletindo o efeito potencialmente letal do tumor sobre o portador (TESSITORE *et al.*, 1993).

BECK *et al.* (1991) relataram que o óleo de peixe, o qual é rico em AGPIs, especialmente EPA e DHA, provoca atenuação na caquexia e no crescimento tumoral e que a administração, *in vivo*, de EPA a ratos caquéticos portadores de tumor provoca efetiva reversão do peso e inibição do crescimento tumoral.

Em nosso experimento verificou-se que o peso fresco do tumor (figura 4) dos animais suplementados com óleo de peixe (PWK) foi significativamente menor do que o dos portadores de tumor (WK) e suplementados com gordura de coco (SWK). O principal efeito antitumoral do óleo de peixe parece ser resultado da diminuição da proliferação de células tumorais através da redução dos níveis teciduais de prostaglandinas E<sub>2</sub> e seus metabólitos (GOGOS *et al.*, 1998).

SIDDIQUI e WILLIANS (1990) demonstraram que ratos portadores do tumor de Walker 256 apresentavam elevados níveis de prostaglandina circulante, quando comparados ao de ratos controle e que a principal fonte desta era o tumor. Neste trabalho não mensuramos PGE<sub>2</sub>.

Como observado na figura 5, os ratos portadores de tumor (WK) e suplementados com gordura de coco (SWK) apresentaram concentrações de lactato sérico significativamente mais elevadas quando comparados a de outros grupos. A elevada atividade glicolítica do tumor é, provavelmente, a principal fonte de lactato nestas condições e este, possivelmente, representa o precursor gliconeogênico mais importante nesses ratos. A atividade glicolítica anaeróbica aumentada tem sido relatada em uma variedade de células tumorais (WARBURG, 1930; WATERHOUSE, 1979). O tumor ao captar glicose com maior avidéz produz lactato e o exporta, o que explica a sua maior

concentração sérica no grupo com tumor. FERNANDES *et al.* (1991) mostraram que células do tumor de Walker 256 quando incubadas com glicose produzem níveis elevados de lactato. A suplementação com óleo de peixe foi hábil em reduzir a taxa de crescimento tumoral (figura 4). Isto poderia explicar o achado de recuperação das concentrações séricas de glicose e lactato nos animais portadores de tumor suplementados com óleo de peixe (figuras 5 e 6).

Como relatado por SWEENEY *et al.* (2002), a expressão da COX-2 tem sido mostrada estar elevada em uma variedade de cânceres humanos, incluindo o de cólon (FUJITA *et al.*, 1998), gástrico (RISTIMAKI *et al.*, 1997), esofageal (ZIMMERMANN *et al.*, 1999), pancreático (TUCKER *et al.*, 1999), de bexiga (SHIRAHAMA, 2000) e de pulmão (WOLFF *et al.*, 1998). A expressão desta proteína encontra-se elevada nos animais portadores de tumor de Walker 256 (figura 7). Até o momento não há relato na literatura mostrando este achado. A suplementação com óleo de peixe induziu à redução desta expressão em 25% quando comparada à dos animais portadores de tumor sem suplementação ou suplementados com gordura de coco. ARONSON *et al.* (2001) relataram diminuição da expressão desta enzima em pacientes com câncer de próstata que receberam dieta com baixo teor de gordura rica em ácidos graxos  $\omega$ -3 durante três meses. BADAWI *et al.* (1998) também relataram diminuição da expressão desta enzima em animais com câncer de mama que receberam ácidos graxos  $\omega$ -3 em sua dieta. Estes autores sugerem que isso pode ocorrer devido ao fato de EPA e DHA (ácidos graxos  $\omega$ -3) não serem oxigenados tão rapidamente quando o ácido araquidônico (ácido graxo  $\omega$ -6) e por agirem como inibidores competitivos para atividade de endoperóxido da COX-2. Eles atribuem este efeito de inibição do crescimento tumoral dos AGPIs (ácidos graxos poliinsaturados)  $\omega$ -3 à produção

de prostaglandinas da série E<sub>3</sub>, em contraste à de PGE<sub>2</sub>, e também à habilidade dos metabólitos dos AGPIs ω-3 em inibir o metabolismo de AGPIs ω-6 em vários estágios na cascata do ácido araquidônico.

Em resumo, a COX-2 está relacionada com o fenótipo maligno do animal. A diminuição de sua expressão melhora o estado clínico dos animais portadores de tumor, prolongando sua sobrevivência. Os resultados aqui apresentados sugerem que o óleo de peixe pode estar inibindo a expressão gênica desta enzima, como sugerido por CALDER (1998). Além disso, podem alterar os fosfolípidios de membrana e conseqüentemente os segundos mensageiros por eles gerados e agir sobre fatores de transcrição responsáveis pela expressão do gene que codifica para a COX-2.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a suplementação com óleo de peixe foi hábil em reduzir significativamente a taxa de crescimento tumoral, restaurar a glicemia e as concentrações de lactato sérico nos animais portadores de tumor. Nossos dados sobre a expressão da COX-2 sugerem que esta enzima tem importante papel na carcinogênese do tumor de Walker 256 e que um dos mecanismos pelo qual o óleo de peixe poderia estar inibindo o crescimento tumoral seria através da redução da expressão desta enzima nas células tumorais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, 7: 93, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 1245, 1255-57.

ALBRECHT, J.T. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.** 10(4): 791-800, 1996.

ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, 17(5): 477-98, 1997.

ARONSON, W.J.; GLASPY, J.A.; REDDY, S.T.; REESE, D.; HEBER, D.; BAGGA, D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Urology**, 58(2): 283-8, 2001.

ATTIGA, F.A.; FERNANDEZ, P.M.; MANYAK, M.J.; PATIERNO, S.R. Effect of the cyclooxygenase-2-selective inhibitor NS398 on the secretion of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) from human prostate tumor cells. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, 41: 131-132, 2000.

BADAWI, A.F.; EL-SOHEMY, A.; STEPHEN, L.L.; GHOSHAL, K.; ARCHER, M.C. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on expression of cyclooxygenase 1 and 2 levels of p21<sup>ras</sup> in rat mammary glands. **Carcinogenesis**, **19** (5): 905-910, 1998.

BECK, S.A.; TISDALE, M.J. Nitrogen excretion in cancer cachexia and its modification by a high fat diet in mice. **Cancer Res.**, **49** (14): 3800-4, 1989.

BECK, S.A.; SMITH, K.L.; TISDALE, M. J. Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effects on protein turnover. **Cancer Res.**, **51**: 6089, 1991.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**(4): 467-90, 1998.

CHAN, G.; BOYLE, J.O.; YANG, E.K.; ZHANG, F.; SACKS, P.G.; SHAH, J.P.; EDELSTEIN, D.; SOSLOW, R.A.; KOKI, A.T.; WOERNER, B.M.; MASFERRER, J.L.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Res.**, **59**(5): 991-4, 1999.

CHULADA, P. C.; THOMPSON, M. B.; MAHLER, J. F.; DOYLE, C. M.; GAUL, B. W.; LEE, C.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; SMITHIES, O.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. **Cancer Res.**, **60**: 4705-4708, 2000.

CLARKE, S.D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **Br. J. Nutr.**, **83** (Suppl.1): S59-66, 2000.

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.**, **92** (6): 2783-9, 1993.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M.F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F.M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr.**, **129** (3): 700-6, 1999.

CULP, B.R.; TITUS, B.G.; LANDS, W.E. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. **Prostaglandins Med.**, **3** (5): 269-78, 1979.

DANNENBERG, A.J.; ZAKIM, D. Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. **Sem. Oncol.**, **26**: 499-504.

DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, **162**:2163-8,1985.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **127**: 411-417, 2001.

DESSI, S.; BATETTA, B.; SPANO, O.; BAGBY, G.J.; TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F.M.; PANI, P.; ARGILÉS, J.M. Perturbations of triglycerides but not of cholesterol metabolism are prevented by anti-tumour necrosis factor treatment in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). **Br. J. Cancer**, **72**(5):1138-43, 1995.

DE WYS, W. D. Management of cancer cachexia. **Semin. Oncol.**, **12**: 452, 1985.

FERNANDES, L.C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.**, **258**: E1033-E36, 1990.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.R.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control**, **1**: 259-68, 1991.

FOSSLIEN, E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, **37**: 431-502, 2000.

FUJITA, T.; MATSUI, M.; TAKAKU, K.; UETAKE, H.; ICHIKAWA, W.; TAKETO, M.M.; SUGIHARA, K. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. **Cancer Res.**, **58**(21): 4823-6, 1998.

GARCIA-MARTINEZ, C.; LLOVERA, M.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; DEL SANTO, B.; ARGILÉS, J.M. Lipopolysaccharide (LPS) increases the in vivo oxidation of branched-chain aminoacids in the rat: a cytokine-mediated effect. **Mol. Cell Biochem.**, **148**(1):9-15,1995.

GATELY, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, **19**: 19-27, 2000.

GODLEY, P.A.; CAMPBELL, M.K.; GALLAGHER, P.; MARTINSON, F.E.; MOHLER, J.L.; SANDLER, R.S. Biomarkers of essential fatty acid consumption and risk of prostatic carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, **5** (11): 889-95, 1996.

GOETZL, E.J.; NA, S.; SMITH, W.L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. **FASEB J.**, **9**: 1051-1058, 1995.

GOGOS, C.; GINOPOULOS, P.; SALSA, B.; APOSTOLIDOU, E.; ZOUMBOS, N.; KALFARENTZOS, F. Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids plus Vitamin E Restore Immunodeficiency and Prolong Survival for Severely III Patients with Generalized Malignancy. **Cancer**, **82** (2): 395-402, 1998.

GUAITANI, A.; TORRE, P.D.; MORASKA, L.; PINTUS, C.; BARTOSCK, I. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, **69**: 1-9, 1983.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, **23**(3):144-50, 2002.

IÑIGUEZ, M.A.; RODRÍGUEZ, A.; VOLPERT, O.V.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends Mol. Med.**, **9**(2): 73-8, 2003.

JONES, M.K.; WANG, H.; PESKAR, B.M.; LEVIN, E.; ITANI, R.M.; SARFEH, I.J.; TARNAWSKI, A.S. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat. Med.**, **5**: 1418-1423, 1999.

KARMALI, R.A.; CHAO, C-C.; BASU, A.; MODAK, M. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on mammary H-*ras* expression and PGE<sub>2</sub> levels in DMBA-treated rats. **Anticancer Res.**, **9**: 1169-1174, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.

LIU, X.H.; ROSE, D.P. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. **Cancer Res.**, **56**(22):5125-7, 1996

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHÉRSTEN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Res.**, **38**: 4665-70, 1978.

MARSHALL, L.A.; JONHSTON, P.V. Effect of dietary  $\alpha$ -linolenic acid in the rat on fatty acid profiles of immunocompetent cell populations. **Lipids**, **18**: 737-42, 1983.

MASFERRER, J.L.; LEAHY, K.M.; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; SETTLE, S.L.; WOERNER, B.M.; EDWARDS, D.A.; FLICKINGER, A.G.; MOORE, R.J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Res.**,**60**(5): 1306-11, 2000.

MATTHYS, P; BILLIAU, A. Citokines and cachexia. **Nutr.**, **13**(9):763-70, 1997.

MULLIGAN, H.D.; TISDALE, M.J. Lipogenesis in tumor host tissues in mice bearing colonic adenocarcinomas. **Br. J. Cancer**, **63** (5): 719-22, 1991.

NELSON, A.R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M.L.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J. Clin. Oncol.**, **18**: 1135-1149, 2000.

NELSON, K.A; WALSH, D; SHEHANN, F.A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. **J. Clin. Oncol.**, **12**:213-25, 1994.

NOGUCHI, Y; MAKINO, T; YOSHIKAWA, T; NOMURA, K; FUKUZAWA, K; MATSUMOTO, A; YAMADA, T. The possible role of TNF- $\alpha$  and IL-2 in inducing tumor-associated metabolic alterations. **Surg. Today**, **26**(1):36-41, 1996.

NORRISH, A.E.; SKEAFF, C.M.; ARRIBAS, G.L.; SHARPE, S.J.; JACKSON, R.T. Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study. **Br. J. Cancer**, **81** (7): 1238-42, 1999.

PAN, D.; STORLIEN, L.H. Effect of dietary lipid profile on the metabolism of  $\omega$ 3 fatty acids: implications for obesity prevention. **Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1993.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin-E regulation of the immune response. **Immunol. Today**, **12**: 319-352, 1991.

PRESCOTT, S.M; FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1470**:M69-M78, 2000.

PRINCE, P.T.; NELSON, C.M.; CLARKE, S.D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Curr. Opin. Lipidol.**, **11**(1): 3-7, 2000.

PUCCIO, M; NATHANSON, L. The cancer cachexia syndrome. **Semin. Oncol.** **24**(3): 277-87, 1997.

RISTIMAKI, A.; HONKANEN, N.; JANKALA, H.; SIPPONEN, P.; HARKONEN, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Res.**, **57**(7): 1276-80, 1997.

RISTIMAKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; LUNDIN, M.; SALMINEN, T.; HAGLUND, C.; JOENSUU, H.; ISOLA, J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Res.**, **62**(3): 632-5, 2002.

RIVERA, S.; AZCÓN-BIETO, J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; MIRALPEIX, M.; ARGILÉS, J.M. Amino acid metabolism in tumor-bearing mice. **Biochem. J.**, **249**: 443-49, 1988.

ROE, S.Y; COOPER, A; MORRIS, I.D; ROTHWELL, N.J. Involvement of prostaglandins in cachexia induced by T-cell leukemia in the rat. **Metabolism**, **46**(4):359-65, 1997.

SAKURAI, Y; KLEIN, S. Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. **Surg. Today**, **28** (3): 24757, 1998.

SHAO, J.; SHENG, H.; INOUE, H.; MORROW, J.D.; DUBOIS, R.N. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. **J. Biol. Chem.**, **275**(43): 33951-6, 2000.

SHIRAHAMA, T. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. **Clin. Cancer Res.**, **6**(6): 2424-30, 2000.

SIDDIQUI, R.A; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin E<sub>2</sub> in the development of cancer cachexia. **Med. Sci.**, **15**:45-6, 1987.

SIDDIQUI, R.A.; WILLIAMS, J.F. Tentative identification of the toxohormones of cancer cachexia: roles of vasopressin prostaglandin E<sub>2</sub> and cachectin-TNF. **Biochem. Int.**, **20**: 787-97, 1990.

SMITH, K.L.; TISDALE, M.J. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. **Br. J. Cancer**, **67**: 680-85, 1993.

SMITH, M.L.; HAWCROFT, G.; HULL, M.A. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. **Eur. J. Cancer**, **36**(5):664-74, 2000.

SMITH, W.L.; MEADE, E.A.; DEWITT, D.L. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes 1 and 2. **Ann. New York Acad.**, **714**: 136-142, 1994.

SMITH, W. L.; DE WITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, **69**: 145-82, 2000.

SUMITANI, K.; KAMIJO, R.; TOYOSHIMA, T.; NAKANISHI, Y.; TAKIZAWA, K.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E<sub>2</sub> production. **J. Oral Pathol. Med.**, **30**: 41-47, 2001.

SWEENEY, C.J.; MARSHALL, M.S.; BARNARD, D.S.; HEILMAN, D.K.; BILLINGS, S.D.; CHENG, L.; MARSHALL, S.J.; YIP-SCHNEIDER, M.T. Cyclo-oxygenase-2 expression in primary cancers of the lung and bladder compared to normal adjacent tissue. **Cancer Detect Prev.**, **26**(3): 238-44, . 2002.

TAYEK, A. J. A Review of Cancer Cachexia and Anormal Glucose Metabolism in Humans with Cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, **44**: 445-6, 1992.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F.M. Humoral mediation for cachexia in tumor-bearing rats. **Br. J. Cancer**, **67**(1): 15-23, 1993.

THOMPSON, M.P; KOONS, J.E; TAN, E.T.H; GRIGOR, M.R. Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factors leading to lipid depletion in C57BL mice bearing preputial gland tumor ESR-586. **Cancer Res.**, **41**:3228-32, 1981.

THUN, M.J.; HENLEY, S.J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. **J. Natl. Cancer Inst.**, **94** (4): 252-66, 2002.

TISDALE, M.J. Cancercachexia. **Br. J. Cancer**, **63**(3):337-42, 1991.

TISDALE, M.J. Inhibition of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, **12** (suppl): 531-33, 1996.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**,**17**:438-42, 2001.

TORTI, F.M; DIEKMANN, B; BEUTLER, B; CERAMI, A; RINGOLD, G.M.  
Macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: na “in vitro” model of cachexia.  
**Science**, **229**:867-9, 1985.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **76**(9): 4350-4354, 1979.

TRACEY, K.J.; LOWRY, S.F.; FALEI, III T.J.; ALBERT J.D.; FONG, Y; HESSE,D.; BEUTLER, D.; MANOGHE, K.R.; CALVANO, S.; WEI, H.; CERAMI, A.; SHIRES, G.T.  
Cachectin/Tumor Necrosis Factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **164**: 415-22, 1987.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, **22**(2):158-61, 1969.

TUCKER, O.N.; DANNENBERG, A.J.; YANG, E.K.; ZHANG, F.; TENG, L.; DALY, J.M.; SOSLOW, R.A.; MASFERRER, J.L.; WOERNER, B.M.; KOKI, A.T.; FAHEY, T.J.  
3RD. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. **Cancer Res.**, **59**(5): 987-90, 1999.

WARBURG, O. **Metabolism of tumors**. London: Arnold Constable, 1930.

WATERHOUSE, D.; JEANPETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Res.**, **39**: 1968-72, 1979.

WOLFF, H.; SAUKKONEN, K.; ANTTILA, S.; KARJALAINEN, A.; VAINIO, H.; RISTIMAKI, A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. **Cancer Res.**, **58**(22): 4997-5001, 1998.

YOUNES, R.N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, **55** (5): 181-93, 2000.

ZHANG, Z.; DUBOIS, R.N. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells. **Gastroenterology**, **118**: 1012-1017, 2000.

ZIMMERMANN, K.C.; SARBIA, M.; WEBER, A.A.; BORCHARD, F.; GABBERT, H.E.; SCHROR, K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. **Cancer Res.**, **59**(1): 198-204, 1999.

## ANEXO 1

### Preparo da curva padrão:

- Pesa-se 10 mg de albumina sérica bovina (BSA) e dilui-se em 10 mL de água destilada;
- Lê-se no espectrofotômetro a 280 nm, contra referência de água destilada;
- Divide-se a densidade ótica por 0.66 (fator de correção para concentração) e tem-se a concentração da solução-mãe em mg/mL;  
Obs.: a densidade ótica deve estar entre 0.1 e 0.8; caso seja menor que 0.1 e maior que 0.8, adicionar mais BSA ou água destilada, respectivamente.
- Faz-se a diluição da "solução-mãe" de BSA para a curva padrão, com valores decrescentes de albumina para um volume total de 500  $\mu$ L;
- Prepara-se uma bateria de 21 tubos, coloca-se 1 mL da solução de Bradford mais 20  $\mu$ L de cada diluição em cada tubo (faz-se em duplicata para cada diluição); no tubo branco, coloca-se 1 mL da solução de Bradford mais 20  $\mu$ L de água destilada;  
Obs.: antes de usar a solução de Bradford, agitar bem; transferir o volume que será usado em um béquer e descartar a sobra.
- Agitam-se os tubos e lê-se no espectrofotômetro a 595 nm, contra referência do tubo branco.  
Obs.: a leitura deve ser imediatamente após a adição das diluições, pois as proteínas ficam estáveis por pouco tempo.
- Monta-se o gráfico da curva padrão (concentração de BSA em  $\mu$ g/mL x densidade ótica) e acha-se a equação da reta ( $y = ax + b$ , sabendo que  $a = \text{coeficiente angular} = \text{tg } \alpha = (y_2 - y_1) : (x_2 - x_1)$  e  $b = \text{coeficiente linear} = \text{ponto do eixo da ordenada por onde a reta passa}$ ).
- A partir dos valores de DO ( $y$ ) é possível calcular a concentração da amostra, isolando-se o  $x$ . Este valor deve ser multiplicado pela diluição para se obter a concentração de proteína da amostra em  $\mu$ g/mL.



Tampão de Laemmli:

Tris HCl 62,5 mM

Beta-mercaptoetanol 1% (v/v)

SDS 2%

Glicerol 10% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,01%

*Ajustar o pH a 6,8% com Tris-HCl ou Tris-base e armazenar a -20° C*

Solução de Acrilamida 40%

Acrilamida 750 g

Bis 20 g

- Homogeneizar com água destilada;
- Completar para 2 litros;
- Filtrar em funil com papel de filtro;
- Manter estoque na geladeira.
- Usar luvas e máscara.

$$\text{mL} = \frac{\text{mL desejado} \cdot \text{mM desejado}}{\text{mM estoque}}$$

Solução descorante de géis:

Metanol 30 %

Ácido Acético 7,5 %

Completar com água desionizada

Tampão de Corrida (10X):

Trisma base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Água desionizada	completar para 1 litro

Tampão de transferência:

Trisma base	3 g
Glicina	14,4 g
Metanol 20%	200 mL
SDS	1g
Água desionizada	completar para 1 litro

Tampão de extração para Extrato Total (Tampão de Lise – 1:7):

Trisma base 100 mM pH 7,5	5 mL do 1M
EDTA 10 mM	2,5 mL do 0,2 M
SDS 10%	5 mL do 10% (0,500 g)
Fluoreto de Na 100 mM	0,21 g
Pirofosfato de Na 10 mM	0,225 g
Ortovanadato de Na 10 mM	0,0945 g **
Água desionizada	completar 50 mL

\*\* colocar somente no momento do experimento

Solução Basal:

Trisma base	10 mL do 1M
NaCl	30 mL do 5M
Tween 20	500 $\mu$ L
Água desionizada	completar para 1 litro

Solução Bloqueadora (por membrana):

Solução basal	10 mL
Leite em pó desnatado Molico	0,5 g
* Azida sódica 0,02%	0,002 g

Solução para anticorpo (por membrana):

Solução basal	10 mL
Leite em pó desnatado Molico	0,3 g
* Azida sódica	0,002 g
<i>* usada somente quando deixar overnight</i>	

Tampão para gel de resolução:

EDTA 4 mM	40 mL do 200 mM
SDS 2%	40 mL do 10%
Trisma base 750 mM	181,6 g
Água desionizada	completar 2 litros
<i>Ajusta-se o pH para 8,9 co HCl</i>	

Tampão para Stacking:

EDTA 4 mM	20 mL do 200 mM
SDS 2%	20 mL do 10%
Trisma base 50 mM	12,1 g
Água desionizada	completar 1 litro

*Ajusta-se o pH para 6,7 com  $H_3PO_4$*

### ANEXO 3

#### **Preparo do gel de SDS – Poliacrilamida:**

- Monta-se a base de vidro com separadores, tomando cuidado para evitar regiões passíveis de vazamento (colocar um pouco de vaselina ou parafilme nos separadores);
- Coloca-se o pente, marca-se cerca de 1 cm abaixo dele e depois retira-se o mesmo
- Em um béquer, prepara-se o gel de separação na porcentagem desejada e coloca-se entre as placas, até a marca (trabalhar com certa velocidade já que, após a adição do persulfato de amônio e do TEMED, a reação de polimerização já se inicia);
- Adiciona-se uma camada de álcool isoamílico ou isobutílico (cerca de meio cm) para a retirada de bolhas, nivelamento do gel e isolamento do gel do ar (o oxigênio impede a polimerização); aguarda-se a polimerização por 30 min;
- Lava-se a superfície do gel com água destilada 3 vezes e seca-se com uma pedaço de papel-filtro (cuidar para não danificá-la);
- Prepara-se o gel de empilhamento e coloca-se sobre o gel de corrida; adiciona-se o pente e aguarda-se a polimerização;
- Retira-se o pente, coloca-se o gel na cuba de eletroforese e lavam-se os poços com água e/ou tampão de corrida.

#### **Corrida das amostras**

- Colocam-se as amostras a serem corridas (20 a 100 µg de proteínas totais) e o marcador nos lanes, enche-se a cuba com tampão de corrida e inicia-se a corrida a 300 V, 25-50 mA, por cerca de 3-5h ou *overnight* (12V, 6mA).

## ANEXO 4

### Montagem do gel de empilhamento de transferência:

- Após a corrida eletroforética, retira-se um dos vidros com auxílio de uma espátula, extrai-se o gel de empilhamento e recorta-se um dos cantos para dar idéia de orientação;  
Obs.: usar luvas para evitar manchas com gordura e proteínas da pele.
- Equilibra-se o gel em tampão de transferência por 10 min para permitir que ele aumente ou encolha antes do contato com a membrana de nitrocelulose e para remover o excesso de sais de tampão e detergentes;
- Recorta-se a membrana de nitrocelulose e dois papéis-filtro do tamanho do gel, com máximo 0,5 cm maior (material excedente pode dobrar durante a transferência, gerando um curto circuito);
- Pré-umedece-se a membrana de nitrocelulose em água destilada, cuidando para não formar bolhas (mergulhar uma das bordas e submergir lentamente);
- Mergulha-se a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência por 2-5 min;
- Umedecem-se os dois papéis-filtro em tampão de transferência.

### “Stack” de transferência:

- Centraliza-se uma camada de esponja sobre o lado catódico do módulo;
- Coloca-se um dos papéis-filtro sobre a esponja;
- Posiciona-se o gel equilibrado sobre o papel-filtro, umedecendo-se a superfície do gel com gotas de tampão de transferência;
- Coloca-se membrana de nitrocelulose sobre o gel;  
Obs.: não reposicionar a membrana após ela entrar em contato com o gel (há transferência de proteínas pelo simples contato)
- Coloca-se o outro papel-filtro sobre a membrana de nitrocelulose;
- Colocam-se mais 2 camadas de esponjas sobre o papel-filtro;  
Obs.: um segundo “stack” de transferência pode ser executado entre estas outras duas camadas de esponjas.

- Verifica-se a posição do “stack” de transferência que deve estar centralizado sobre a placa de eletrodo (nenhuma camada deve ser "beliscada" quando o módulo for fechado) e fecha-se o módulo.

#### **Eletrotransferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose:**

- Entorna-se 300-350 ml de tampão de transferência dentro do módulo; bate-se de leve o jogo de blotting para expulsar quaisquer bolhas de ar das esponjas;
- Posiciona-se o módulo no tanque com os "plugs" voltados ao centro;
- Adiciona-se 1,7 litros de água deionizada a 4° C no tanque;
- Coloca-se a tampa de segurança sobre o tanque;
- Inicia-se a eletrotransferência a 25 V e 300-400 mA por 1-2 hrs;
- Após a eletrotransferência, retira-se o módulo do tanque e joga-se fora o tampão de transferência; marca-se cada membrana, caso sejam feitas duas, e indica-se o lado das amostras; suspende-se a membrana com uma pinça e deixa-se secar ao ar.

#### **Bloqueio de sítios não específicos:**

- Incuba-se a membrana com tampão de bloqueio por 2 h à temperatura ambiente ou *overnight* a 4 - 8° C, com agitação;
- Incuba-se a membrana em solução de incubação com anticorpo primário (anti-COX 2) na diluição de 1:400, com volume suficiente para cobrir a membrana de nitrocelulose por 3h ou *overnight* a 4-8° C, com agitação;
- Lava-se a membrana com tampão de lavagem 3 vezes de 10 min com agitação e volumes de tampão apropriados (suficientes para cobrir completamente a membrana de nitrocelulose).

**Incubação com o anticorpo secundário conjugado ao HRP**

- Incuba-se a membrana em solução de incubação contendo o anticorpo secundário conjugado ao HRP na diluição 1:5000, por 3 h à temperatura ambiente ou *overnight*, com agitação;
- Lava-se a membrana com tampão de lavagem 3 vezes de 10 min com agitação e volumes de tampão apropriados.

**Incubação com o substrato quimioluminescente/acentuador**

- Incuba-se a membrana em solução de trabalho por 5 min com agitação; usa-se volume suficiente para cobrir completamente a membrana;
- Remove-se a membrana da solução de trabalho e deixa-se que o excesso da solução escorra dela; coloca-se um protetor de membrana, tal como um protetor plástico, sobre a membrana de nitrocelulose e retira-se quaisquer bolhas de ar.

**Revelação:**

- Coloca-se a membrana em cassete, sobrepondo-a com um filme e expondo-a por tempo apropriado (uma primeira exposição de 30 s é recomendada e, conforme resultado, ajusta-se o tempo de exposição inicial);
- Revela-se o filme.