

1. INTRODUÇÃO

A caquexia é uma síndrome associada à perda de massa celular, reduzida ingestão de alimento, diminuição de atividade física e acelerada degradação de proteínas (LANGSTEIN; NORTON, 1991; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Esta disfunção metabólica ocorre em muitas doenças crônicas tais como AIDS, câncer, insuficiência crônica do coração, falência crônica dos pulmões, cirrose hepática, deficiência renal, artrite reumatóide e sepse. Embora a caquexia sempre inclua um componente de redução na ingestão de alimentos, ela difere da "semi-inanição" pelo fato de que há também alterações metabólicas que diferem da resposta normal à reduzida ingestão de alimentos (EMERY, 1999). Isto significa que a perda de massa corporal pode ocorrer mais rapidamente do que seria de se esperar de uma redução da ingestão de alimentos de igual magnitude ou ainda, que a composição desta perda pode devido a uma maior proporção de perda de tecido não-gorduroso em relação ao adiposo (EMERY, 1999).

Apesar dos substanciais esforços científicos e econômicos empregados na busca por fatores causadores da caquexia, o entendimento completo sobre as suas causas e as formas de tratamento não são completamente conhecidos. Tais conhecimentos somente terão efetivo êxito em função de uma colaboração entre especialistas de várias áreas da clínica médica, da patofisiologia e da ciência básica.

Entre as substâncias humorais que possuem papel chave no estabelecimento da síndrome caquética estão as citocinas. Estes mediadores representam uma linguagem universal e são produzidos pela maioria das células do organismo. Entretanto, os macrófagos constituem a principal fonte destas moléculas (CAVAILLON, 1994). De fato, estas células exercem um papel fundamental na imunocompetência e possuem um alto potencial secretório, sendo responsáveis pela liberação de mais de cem substâncias (NATHAN, 1987), incluindo as citocinas, o óxido nítrico e o ânion superóxido e macromoléculas como os proteoglicanos.

O envolvimento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na caquexia e na progressão tumoral também tem sido demonstrado em alguns modelos experimentais (BUCK; CHOJKIER, 1996). Adicionalmente, fatores purificados da urina de pacientes caquéticos e caracterizados como proteoglicanos (fator indutor de proteólise—PIF— e azaftig) mostraram-se capazes de induzir acentuada perda de

peso em animais (TODOROV *et al.*, 1996a; FIGUEROA *et al.*, 1999a). Estas moléculas foram inicialmente isoladas apenas de pacientes com câncer e, por este motivo, postulou-se que seriam de origem tumoral. No entanto, a evidência de que uma destas moléculas, o azaftig, está também presente na urina de pacientes caquéticos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (FIGUEROA *et al.*, 1999b), sugere que estes proteoglicanos possam ser derivados de células não cancerosas.

Com base nestas informações, este trabalho teve como objetivo caracterizar as alterações morfológicas e funcionais de macrófagos de animais portadores do tumor de Walker-256, um importante modelo de estudo da caquexia (GUAITANI *et al.*, 1982). Os aspectos funcionais investigados incluem tanto os que estão intimamente relacionados com a ativação, como fagocitose e produção de espécies radicalares, como também uma característica pouco investigada cuja função biológica na caquexia é ainda pouco compreendida: a produção e liberação de proteoglicanas. O estudo destes aspectos contribui não somente com a melhor compreensão do estado funcional de macrófagos de animais caquéticos portadores de tumor, como também com o melhor esclarecimento sobre a função biológica dos proteoglicanos no estabelecimento do processo inflamatório e da caquexia associados ao câncer. Quanto a este último aspecto ainda, experimentos para avaliar o efeito *in vitro* do glicosaminoglicano condroitim 4-sulfato sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por macrófagos de ratos saudáveis e caquéticos foram também desenvolvidos no presente estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAQUEXIA

A caquexia representa a consequência clínica de uma resposta inflamatória sistêmica crônica, sendo que suas manifestações diferem consideravelmente do estado de “semi-inanição”, embora, na maioria dos casos a anorexia esteja presente. Esta severa condição patológica ocorre na maioria dos pacientes com câncer em estágio terminal e é responsável por 22% das mortes (ARGILÉS *et al.*, 2005a). O grau de caquexia está inversamente correlacionado com o tempo de sobrevivência dos pacientes e sempre implica em prognósticos ruins (DE WYS, 1985). As alterações observadas na caquexia associada ao câncer incluem anorexia, perda de peso, perda e atrofia da massa muscular, anemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (ARGILÉS *et al.*, 1997). A depleção da proteína muscular constitui um aspecto de grande relevância, pois envolve não apenas o tecido muscular esquelético como também proteínas cardíacas, o que resulta em alterações importantes no desempenho cardíaco dos pacientes (ARGILÉS *et al.*, 2005b). Atualmente, considera-se a caquexia como reunindo potencial epidêmico para as próximas décadas.

2.1.1 Fisiopatologia de animais portadores de tumor

As alterações metabólicas que geram um estado hipermetabólico desempenham um papel muito importante. O organismo portador de um tumor é energeticamente mais ineficiente o que leva a um aumento do gasto energético. Este fato, aliado à diminuição da ingestão de alimentos, possui papel preponderante no estabelecimento do processo caquético (TISDALE, 2000; ARGILÉS *et al.*, 2005b).

As células tumorais atuam como um escoadouro metabólico, drenando nutrientes do organismo hospedeiro e gerando uma carência de compostos vitais para este, impondo ao hospedeiro um significativo custo energético. A manutenção de ciclos fúteis existentes entre tumor e hospedeiro, como o ciclo de Cori e a utilização gliconeogênica do lactato produzido pelas células tumorais, sem dúvida geram um

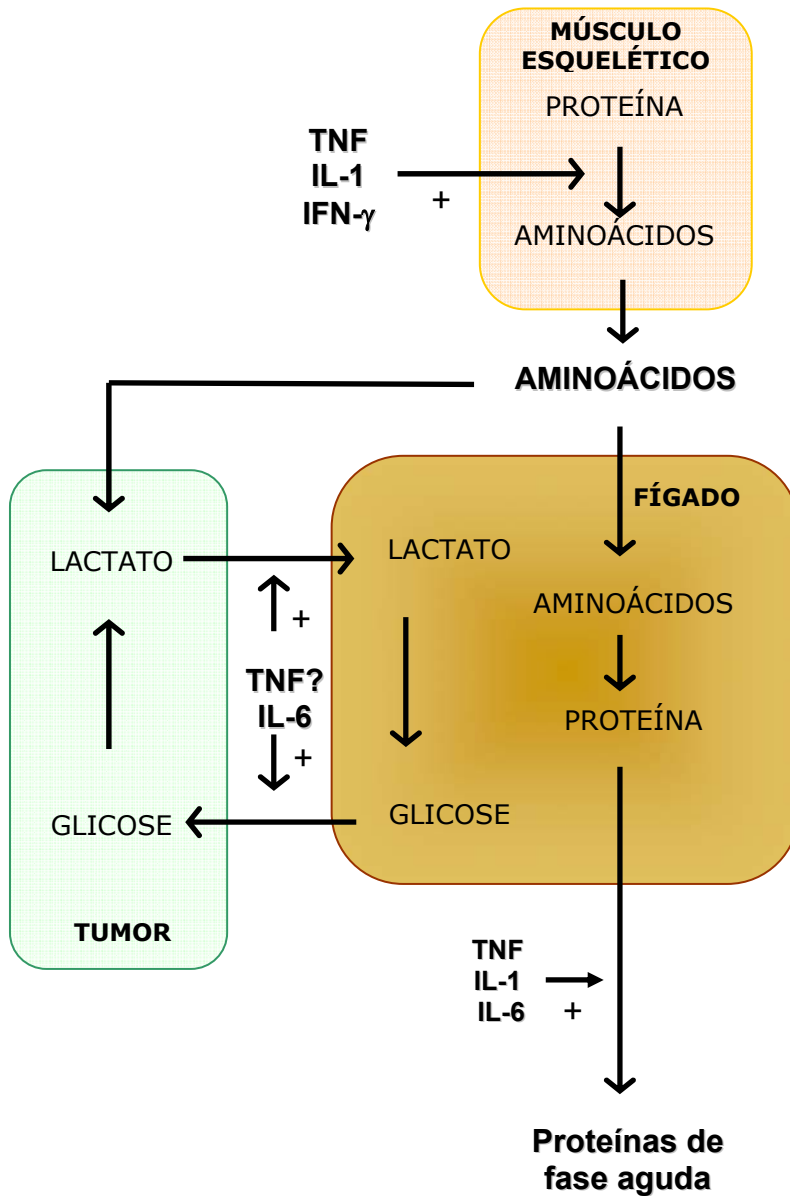
processo de ineficiência energética (KOTLER, 2000). Adicionalmente, a presença do tumor direciona o fluxo de nitrogênio do músculo esquelético para o fígado, onde os aminoácidos resultantes da degradação de proteína muscular são utilizados para síntese de proteínas de fase aguda e produção de glicose (ARGILÉS *et al.*, 2005b). Além da depleção da proteína muscular e da gliconeogênese, a depleção de lipídeos e o desacoplamento da fosforilação oxidativa parecem compor outras importantes respostas do hospedeiro como resultado da invasão tumoral, muitas vezes direcionadas por mediadores catabólicos, como ilustrado na figura 1 e descrito em detalhes a seguir.

2.1.2 Mediadores da caquexia

Os fatores postulados como mediadores da caquexia do câncer podem ser divididos em dois grupos (LANGSTEIN; NORTON, 1991; KOREKANE *et al.*, 2003): a) compostos com características semelhantes a hormônios e que exercem seus efeitos diretamente sobre o catabolismo do hospedeiro; b) as citocinas, que afetam o metabolismo do hospedeiro indiretamente.

No primeiro grupo estão incluídos pequenos peptídeos descritos como tóxicos – toxohormônios – produzidos por células tumorais, incluindo as células Walker-256, os quais têm sido relacionados aos efeitos da caquexia, embora seu papel não esteja precisamente determinado (RUBIN, 2003). GOODLAD & RAYMOND (1973) verificaram que um toxohormônio obtido do carcinoma Walker-256 em ratos foi capaz de inibir a incorporação de aminoácidos em proteínas de miofibrila de músculo do diafragma. Já TISDALE (1993; 2000) isolou e caracterizou um fator de mobilização de lipídios (LMF), produzido pelo adenocarcinoma de cólon (MAC16) e também encontrado na urina de pacientes com câncer, capaz de degradar tecido adiposo. O LMF é uma glicoproteína de 43 kDa cuja ação parece estar associada ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc, possivelmente em resposta à ativação da adenilato ciclase. TODOROV *et al.* (1996a; 1996b) purificaram um proteoglicano de 24 kDa, presente em modelos animais e na urina de pacientes com câncer, que parece estar relacionado com o aumento da degradação protéica e diminuição da

FIGURA 1: DIRECIONAMENTO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA CAQUEXIA POR CITOCINAS



Fonte: ARGILÉS *et al.*, 2005a.

síntese de proteínas. Este composto, conhecido como fator indutor de proteólise (PIF), mostrou-se capaz de ativar a degradação de proteínas especificamente através da via dependente de ubiquitina e proteossomo. Estudos *in vitro* utilizando mioblastos C2C12 mostram que o ácido eicosapentanóico (EPA) é capaz de bloquear a ação do PIF, sugerindo que este proteoglicano age intracelularmente via produção do metabólito do ácido araquidônico, o ácido 15-hidroxeicosatetranóico (15-HETE) (SMITH *et al.*, 1993). Considerando que este fator não foi encontrado em pacientes ou animais com caquexia causada por outras patologias (TISDALE, 2000), postulou-se a sua origem tumoral. Outro proteoglicano de 24 kDa isolado da urina de pacientes caquéticos, denominado azaftig, também foi capaz de promover perda de peso quando administrado em animais (FIGUEROA *et al.*, 1999a). Entretanto, o azaftig não promove proteólise como o PIF, mas sim degradação de tecido adiposo. Estes dois proteoglicanos diferem ainda em mais dois aspectos: primeiramente, possuem estrutura de núcleo protéico diferente. Em segundo lugar, o azaftig foi encontrado não somente na urina de pacientes caquéticos com câncer, mas também em pacientes com AIDS (FIGUEROA *et al.*, 1999b). Esta última observação sugere que este proteoglicano possa ser derivado de células não cancerosas.

Entre as citocinas, que perfazem o segundo grupo, estão o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-1 e -6 (IL-1 e IL-6), o interferon gama (INF- γ) e o fator inibitório de leucemia (LIF) (LANGSTEIN; NORTON, 1991; TISDALE, 1993; TISDALE, 2000; KOREKANE *et al.*, 2003). Estas substâncias, liberadas principalmente pelas células do sistema imune, exercem efeitos sobre inúmeras células do organismo (células da medula óssea, miócitos, hepatócitos, adipócitos, células endoteliais e neurônios), onde produzem uma complexa cascata de respostas biológicas, responsáveis pela maioria das alterações metabólicas associadas à caquexia.

O TNF- α é a citocina mais estudada. Este fator foi caracterizado por CARSWELL *et al.* (1975) como uma proteína derivada de macrófagos induzidos por endotoxina, ao estudarem os efeitos tumorocidas de fatores derivados do soro. Subseqüentemente, KAWAKAMI *et al.* (1982) identificaram um “hormônio” produzido por macrófagos de animais tratados com endotoxina capaz de suprimir a lipoproteína lipase e mediar a caquexia. Este “hormônio”, uma proteína que foi

nomeada caquetina, após ser purificado e ter seu DNA complementar clonado, mostrou-se idêntico ao TNF- α . Portanto, a identificação e caracterização do TNF- α ocorreram através de duas linhas de investigação diferentes, e os termos TNF- α e caquetina referem-se ao mesmo composto. Estudos mostram que a administração episódica de TNF- α em animais não é capaz de causar caquexia. Administrações repetidas inicialmente induzem um efeito caquético, mas o organismo logo desenvolve tolerância à citocina, fazendo com que a ingestão de alimentos e o peso corporal retornem ao normal. Na realidade, a administração de doses progressivamente maiores de TNF- α são necessárias para manter os efeitos da caquexia (ARGILÉS *et al.*, 2005a).

A perda do tecido adiposo típica da caquexia associada ao câncer está em parte relacionada com a supressão da atividade da lipoproteína lipase pelo TNF- α , (KAWAKAMI *et al.* 1982), levando a uma captação diminuída de lipídeos exógenos pelos adipócitos e a um aumento dos níveis de triacilgliceróis circulantes. O IFN- γ também se mostrou capaz de suprimir a atividade da lipoproteína lipase em adipócitos da linhagem 3T3-L1 e provocar diminuição na síntese de lipídeos de cadeia longa (ARGILÉS *et al.*, 2005a). O aumento dos níveis de triacilgliceróis circulantes parece ser influenciado também pelo estímulo da lipogênese hepática e subsequente produção de VLDL. As interleucinas-1 e -6, o IFN- γ e o TNF- α parecem ser responsáveis por este fenômeno (KOTLER, 2000).

Inúmeras evidências sugerem que o TNF- α está também correlacionado com a perda de massa muscular verificada em pacientes caquéticos. Através da infusão de ^{14}C -leucina, FLORES *et al.* (1989) mostraram que a administração crônica de TNF aumenta significativamente a degradação de proteína muscular. Este fenômeno está associado, ao menos durante o desenvolvimento do tumor, à ativação de proteases não lisossomais dependentes de ubiquitina (LLOVERA *et al.*, 1994) sendo esta ativação aparentemente mediada por TNF (GARCÍA-MARTINEZ *et al.*, 1994). A ubiquitina é uma molécula que pode ser encontrada livre ou conjugada, através de uma ligação isopeptídica, a outras proteínas celulares. As proteínas marcadas com várias moléculas de ubiquitinas são direcionadas para a degradação em uma estrutura supramolecular denominada proteossomo, em um processo dependente de ATP (HASSELGREN *et al.*, 2002). A administração *in vivo* de TNF- α em ratos

resulta em um aumento da proteólise muscular associado a um aumento na expressão dos genes e nos níveis de ubiquitina. Outras citocinas como a IL-1 ou o IFN- γ também são capazes de ativar a expressão dos genes para ubiquitina (ARGILÉS *et al.*, 2005a). Em adição à massiva perda de massa muscular, estudos mostram que as células musculares de animais caquéticos apresentam conteúdo diminuído de material genético, o que pode levar a fragmentação do DNA e apoptose. O TNF mimetiza esta resposta apoptótica em células musculares de animais saudáveis (CARBÓ *et al.*, 2002).

Outra descoberta de grande interesse foi a de que citocinas, como IL-6, IL-1, IFN- γ e TNF- α são responsáveis pela indução da resposta de fase aguda (MOSHAGE, 1997). Essa reação envolve uma alteração nas proteínas secretadas pelo fígado no plasma sanguíneo, sendo que os níveis de algumas proteínas plasmáticas como albumina e transferrina caem, ao passo que os de outras aumentam marcadamente. As proteínas cuja síntese é induzida pelas citocinas são chamadas de proteínas de fase aguda e entre elas se encontram a proteína C reativa, a proteína ligadora de manose, a proteína amilóide sérica A, entre outras (JANEWAY, 2002). Sugere-se que o aumento da produção hepática destas proteínas também seja responsável pelo catabolismo das proteínas musculares (ARGILÉS *et al.*, 2005a).

A degradação das proteínas musculares através do mecanismo que envolve a ativação do sistema ATP-ubiquitina-dependente, juntamente com o direcionamento da síntese de proteínas de fase aguda, constituem processos desperdiçadores de energia estimulados por citocinas. Da mesma maneira, a IL-6 estimula a conversão do lactato proveniente das células tumorais em glucose através da via gliconeogênica em hepatócitos isolados (ARGILÉS *et al.*, 2005a), que consome seis moléculas de ATP por ciclo. Entretanto, este estímulo da via gliconeogênica não foi observado em ratos portadores do tumor Walker-256 (VEIGA, 2005). Na verdade, fígados isolados de ratos portadores deste modelo de caquexia associada ao câncer apresentaram gliconeogênese a partir de lactato/piruvato menor do que em ratos controle. Somente altas concentrações de lactato/piruvato, combinadas com altas concentrações de oleato (condições usualmente observadas em ratos portadores de tumor) foram efetivas em normalizar a resposta gliconeogênica de fígados de ratos caquéticos portadores desta linhagem tumoral. Estes resultados contraditórios

comprovam a heterogeneidade e o caráter multifatorial da síndrome da caquexia. Ainda com relação aos processos desperdiçadores de energia, recentemente BUSQUETS *et al.* (2003) mostraram que o TNF- α é capaz de induzir o desacoplamento da fosforilação oxidativa. A expressão dos RNAs mensageiros das proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3 está aumentada no músculo esquelético de ratos portadores de tumor e a administração de TNF- α mimetiza este aumento.

O TNF- α e a IL-1 podem estar envolvidos ainda com a anorexia relacionada ao câncer, possivelmente por aumentarem os níveis do hormônio liberador de corticotrofina, um neurotransmissor do sistema nervoso central que suprime a fome. Neste mesmo sentido, a IL-1 parece bloquear a ação do neuropeptídeo-Y, um estimulador do apetite no sistema nervoso central. Receptores para TNF- α e IL-1 foram encontrados nas áreas reguladoras da fome no hipotálamo e a infusão de IL-1 em ratos saudáveis causa alterações na ingestão de alimentos e no número e volume das refeições (TISDALE, 2001).

2.1.3 O estresse oxidativo na caquexia

O estresse oxidativo é um fenômeno que ocorre quando há um aumento líquido dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), gerado por um desequilíbrio entre a produção destas espécies e as defesas antioxidantes do organismo. O envolvimento de ROS e também RNS nos mecanismos patogênicos da carcinogênese têm sido amplamente documentado. Exposição de organismos à radiação ionizante leva à ativação de oncogenes e à inativação de genes supressores de tumor como, por exemplo, o p53. Parte dos danos no DNA é mediada pela ionização da água e pela formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). Este radical promove a modificação de bases púricas e pirimídicas, muitas das quais são mutagênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Que as espécies reativas de oxigênio exercem um importante papel no processo de iniciação, expansão de clones de células e o desenvolvimento de propriedades malignas está amplamente documentado (DREHER; JUNOD, 1996). O estresse oxidativo como mecanismo patogênico da carcinogênese tem sido também investigado experimentalmente (ATHAR, 2002). Fatores nutricionais podem aumentar ou diminuir a carcinogênese

mediada por ROS (FANG *et al.*, 2002). ROS/RNS são também capazes de atuar como substâncias sinalizadoras na rede de regulação celular (MIKHAILOV *et al.*, 2003), determinando assim a forma de resposta a diferentes condições fisiológicas ou de estresse (SHACKELFORD *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2002).

Já foi mencionado que existe uma coincidência de eventos biológicos que apresentam um papel de destaque nas patologias que envolvem a caquexia, que é a ativação de uma complexa cadeia das citocinas, particularmente, TNF- α e IL-1, que atuam como mediadores dos mecanismos de lesões celulares e teciduais, de modificações de vias metabólicas e de mensageiros secundários. A relação entre aquelas citocinas e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), aparentemente está na propriedade que ambas têm de ativar uma proteína reguladora de transcrição chamada NF- κ B, responsável pela síntese de mais de 50 proteínas envolvidas na regulação da resposta imune e inflamatória (BAEUEERLE, 2000).

Os estudos envolvendo as ROS/RNS no mecanismo da caquexia induzida pelo câncer são, em sua maioria, limitados à perda de massa muscular, uma das características essenciais da caquexia, conforme já foi ressaltado. De acordo com TISDALE (2001), a degradação de músculo esquelético de camundongos tratados com TNF- α é mediada por estresse oxidativo. Em um modelo de perda muscular murina, o TNF- α induziu o estresse oxidativo e a síntese de óxido nítrico sintase (NOS) no músculo esquelético. O tratamento com antioxidantes, α -tocoferol, BW755c ou inibidor da óxido nítrico sintase previniu a perda muscular e as anormalidades moleculares do músculo esquelético (BUCK; CHOJKIER, 1996). A inatividade, com subsequente atrofia tem sido implicada na perda de massa muscular esquelética e aumento da degradação de proteínas, na caquexia. Em um modelo de atrofia por inatividade foi demonstrado aumento de hidróperóxidos e de lipoperoxidação, com concomitante redução das atividades da catalase e da glutathiona peroxidase e aumento da superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (LAWLER *et al.*, 2003). A ativação do sistema ubiquitina- ATP dependente pelo estresse oxidativo tem sido sugerido neste modelo (BOOT; CRISWELL, 1997). A geração de radical hidroxila (\cdot OH) no músculo soleus de rato no modelo de atrofia

por inatividade foi demonstrado *in vivo* por medidas dos derivados hidroxilados do salicilato (KONDO *et al.*, 1994).

O envolvimento do óxido nítrico (NO[•]) na caquexia tem sido demonstrado em modelos experimentais (BUCK; CHOJKIER, 1996). A produção mitocondrial de NO[•] tem sido reconhecida (TAYOAN; GIULIVI, 1998) e esta atividade tem sido implicada nos danos que ocorrem na organela. A proteção mitocondrial por agentes antioxidantes como a glutathione (MEISTER, 1995) e por sequestradores de radicais, como a poliamina espermina (HA *et al.*, 1998), foi descrita, bem como a inibição da indução da óxido nítrico sintase por esta poliamina (SZABÓ *et al.*, 1994). A produção excessiva de NO[•] em tecidos tumorais tem sido relacionada à progressão do tumor sendo que o excesso de NO[•] produzido em tecidos inflamados poderia contribuir com a nitração da proteína p53 supressora de tumor (TAPIEIRO *et al.*, 2002).

2.2 MACRÓFAGOS

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e constituem uma linha de defesa contra elementos estranhos no organismo. Estas células amadurecem continuamente a partir dos monócitos circulantes e abandonam a circulação para migrar aos tecidos em todo corpo. São especialmente encontrados em grande número nos tecidos conectivos, em associação com trato gastrointestinal, nos pulmões (onde são encontrados no interstício e nos alvéolos), no fígado (onde são chamados de células de Kupffer), na pele (células de Langerhans) e por todo baço, onde removem as células senescentes do sangue. Estas células podem ainda ser encontradas na cavidade peritoneal. Neste local, pode-se classificá-las em três grupos funcionais, que refletem os estágios funcionais de ativação dos macrófagos: 1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo; 2) macrófagos elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não-específico, como o tioglicolato de sódio e 3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção por *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o qual produz um exudato rico em linfocinas (COHN, 1978; CRAWFORD *et al.*, 1987). Cada um destes estágios é acompanhado pela expressão específica de proteínas de membrana e produtos de secreção.

No estado funcional ativado o macrófago irá apresentar alterações morfológicas e funcionais além de apresentar em sua membrana vários marcadores específicos. Durante a ativação, ocorre um aumento de volume citoplasmático do macrófago, sua forma torna-se mais irregular, apresentando inúmeras projeções e maior aderência. As células ativadas demonstram número aumentado de mitocôndrias e de lisossomos bem como expressão e secreção de enzimas lisossomais e fatores de crescimento aumentados (GORDON, 1996). Os macrófagos estão intimamente envolvidos na resposta imune. Suas principais funções estão relacionadas ao processo inflamatório, processamento e apresentação de antígenos, à co-ativação de linfócitos T e B, fagocitose, hematopoiese e reparo tecidual, angiogênese, além da capacidade citotóxica, como por exemplo, contra células tumorais e microorganismos (CAVAILLON, 1994; POPOV *et al.* 1999; VADIVELLOO *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2001).

Os macrófagos reconhecem elementos estranhos, como bactérias, leveduras, células tumorais e células senescentes através de receptores de superfície. A ligação de muitos receptores de superfície que reconhecem elementos estranhos leva à fagocitose, um processo no qual a partícula estranha é primeiramente envolvida pela membrana fagocítica e logo internalizada em uma vesícula membranosa chamada fagossoma, que se acidifica. O fagossoma funde-se com um ou mais lisossomas para gerar o fagolisossoma, onde o conteúdo lisossomal é liberado para destruir o patógeno (JANEWAY *et al.*, 2002).

Entre os receptores de superfície celular que reconhecem diretamente a superfície de partículas estranhas, estão os receptores de manose, que reconhecem especificamente unidades de carboidratos, permitindo a internalização de glicoproteínas terminadas em manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (SHEPHERD *et al.*, 1981). Este receptor possui duas regiões distintas: a região amino terminal, que possui domínio rico em cisteína, cujo papel é crítico na ligação de glicoproteínas sulfatadas e outra que é constituída por um domínio tipo lectina tipo C. Por ser um receptor de superfície celular transmembrânico, pode atuar diretamente como receptor de fagócito. Um segundo tipo de receptores de fagócitos, chamados de receptores de varredura, reconhece certos polímeros aniônicos e lipoproteínas acetiladas de baixa densidade. Esses receptores são um grupo de moléculas estruturalmente heterogêneas de, pelo menos, seis formas moleculares distintas.

Alguns receptores de varredura reconhecem estruturas que são protegidas pelo ácido siálico nas células normais do hospedeiro. Esses receptores estão envolvidos na remoção de hemácias velhas que perderam o ácido siálico, bem como no reconhecimento e remoção de patógenos (JANEWAY et al, 2002). Outro tipo de receptor que vem recebendo atenção especial nas últimas décadas é o receptor para β -glucanas. Segundo GOLDMAN (1988), este receptor reconhece e fagocita polímeros de carboidratos livres como β -glucanas, que são fagocitadas ocasionando a ativação dos macrófagos, caracterizada principalmente pela secreção de IL-1, IL-6, TNF- α além da secreção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e aumento da capacidade fagocítica. Inúmeros estudos têm relatado efeitos de polissacarídeos de diferentes origens sobre a ativação de macrófagos (NOLETO et al, 2002; STUELP et al., 2002; MORETÃO et al., 2003; MORETÃO et al., 2004).

Os receptores de Fc e de complemento também constituem importantes sítios de reconhecimento dos macrófagos. Ao contrário dos receptores já citados, esses não reconhecem diretamente estruturas estranhas na superfície celular, mas sim a porção Fc dos anticorpos e de componentes do sistema complemento que neutralizam toxinas, vírus ou patógenos. Por meio destes mecanismos, os macrófagos podem eliminar microorganismos neutralizados e atacar os patógenos extracelulares resistentes (JANEWAY et al, 2002).

Os macrófagos são importantes mediadores da atividade antitumoral (WHITWORTH, 1990). Seu papel é em grande parte inferido pela demonstração de que macrófagos ativados podem preferencialmente lisar células tumorais e não células normais *in vitro*. Provavelmente as diferenças na composição da membrana celular são responsáveis por tal reconhecimento específico (KLIMP et al, 2002). Os diversos mecanismos de morte das células-alvo dos tumores pelos macrófagos são essencialmente os mesmos envolvidos na morte de microorganismos infecciosos. Este mecanismo envolve a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (JOHNSON et al., 1986; KLASSEN ; SAGONE, 1980), liberação de TNF- α e IL-1 (PULLYBLANK et al., 1995), proteases e componentes do complemento (LEU et al., 1991).

2.2.1 Produtos secretados pelos macrófagos

Os macrófagos são células com alto poder secretório. Suas respostas incluem a secreção de mais de cem substâncias, incluindo moléculas muito pequenas (ânion superóxido) e macromoléculas (proteoglicanos ou a fibronectina), com atividades biológicas tão distintas quanto a indução do crescimento e a morte celular (NATHAN, 1987). Este vasto repertório de produtos secretados é uma característica quase exclusiva destas células. Portanto, devido à sua distribuição, abundância, motilidade, responsividade e versatilidade, os macrófagos podem influenciar quase todos os aspectos das respostas inflamatória e imune. Muitas das substâncias secretadas pelos macrófagos são capazes de provocar alterações em diversos níveis do metabolismo, sendo responsáveis por diversas manifestações clínicas, como a caquexia. A relação de inúmeras destas moléculas com o estabelecimento do processo caquético associado ao câncer já foi descrita em detalhes no item 2.1 e está resumida na figura 2. Os aspectos relacionados com a produção das substâncias mais relevantes neste contexto pelos macrófagos serão descritos a seguir.

2.2.1.1 Espécies radicalares

Uma variedade de produtos tóxicos são secretados pelos macrófagos e, entre os mais importantes estão as espécies radicalares de oxigênio e nitrogênio. O processo de produção das espécies reativas de oxigênio nos macrófagos é acompanhado por um aumento transitório no consumo de oxigênio e este fenômeno se denomina “*burst*” respiratório. A formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é catalisada por um complexo NADPH oxidase de membrana como representado na equação abaixo. Em seguida o $O_2^{\bullet-}$ é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) (KLEBANOFF, 1992):

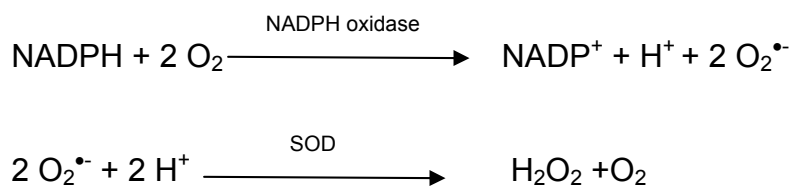
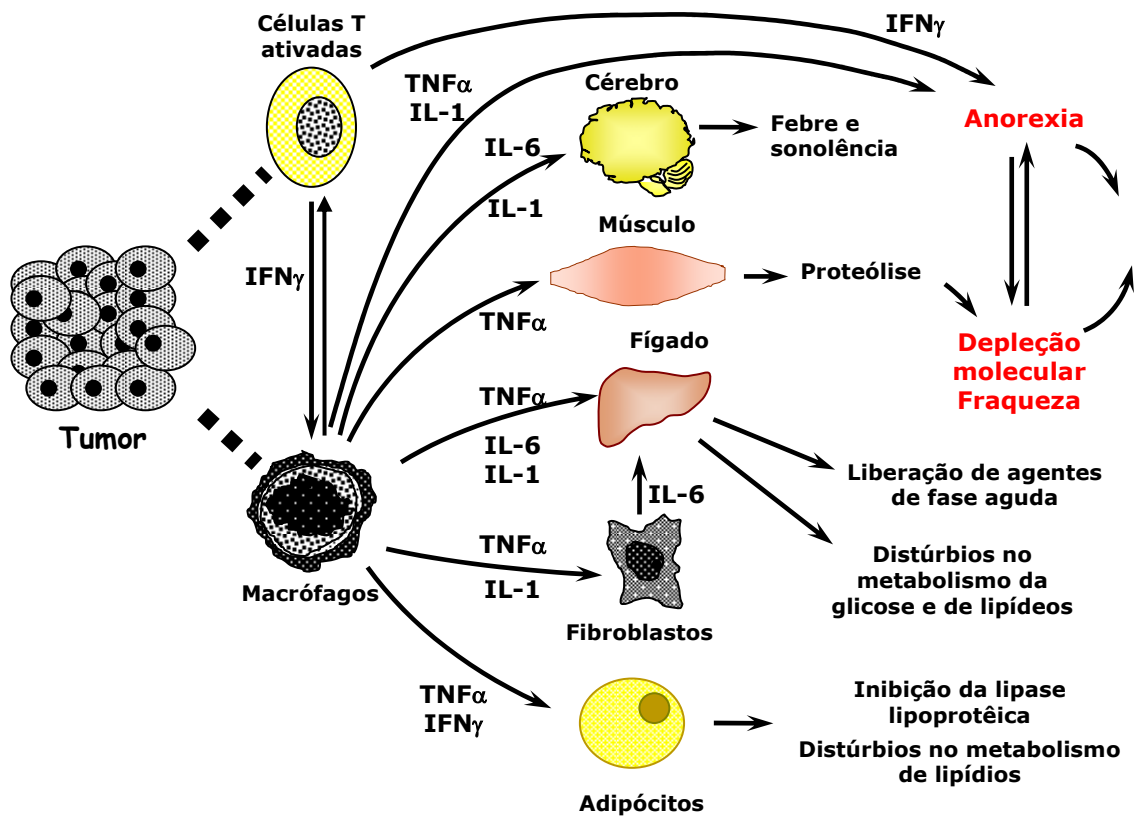
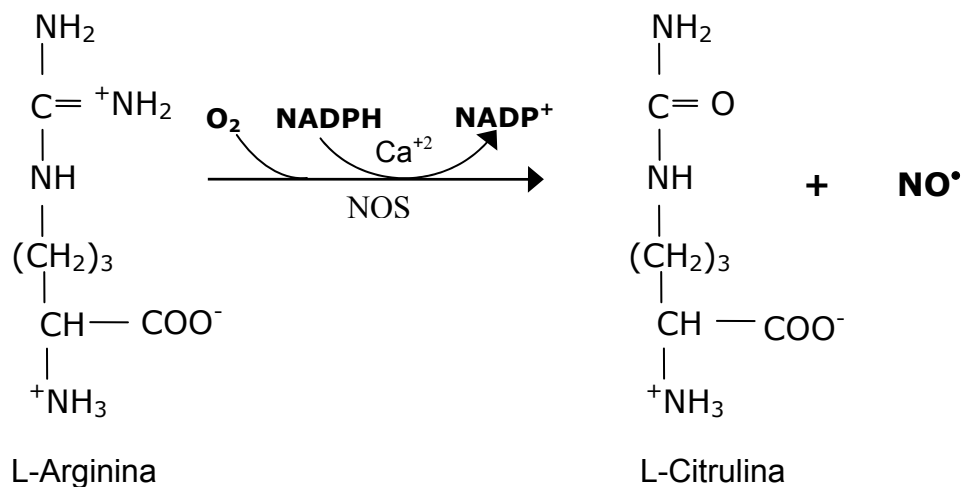


FIGURA 2: SUBSTÂNCIAS LIBERADAS PELOS MACRÓFAGOS E SUA RELAÇÃO COM A CAQUEXIA



A NADPH oxidase é constituída por componentes citosólicos e por uma flavoproteína ligada à membrana de vesículas secretoras que, sob estímulo, se fundem à membrana plasmática. Nos fagócitos a NADPH oxidase encontra-se normalmente inativa, porém, quando estas células são estimuladas com agentes apropriados como, por exemplo, as cadeias peptídicas de microrganismos como o N-formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP²), ou o éster de forbol 12-meristato 13-acetato (PMA), ocorre a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam com o citocromo b₅₅₈, formando a NADPH oxidase ativa (YAMAGUCHI; KANEDA, 1998).

Entre as espécies reativas de nitrogênio os macrófagos secretam o óxido nítrico, um gás radical livre que possui papel importante em processos patológicos e como mediador da atividade antitumoral. Esta espécie radicalar é produzida pela ação de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), presentes em vários tecidos em diferentes isoformas, que convertem o aminoácido L-arginina em NO• e outro aminoácido, a L-citrulina, como na reação descrita abaixo:



Esta reação requer oxigênio e as NOSs que possuem quatro cofatores: FAD, FMN, tetrahydrobiopterina e um grupamento heme. Ainda, a conversão da L-arginina em NO• envolve a oxidação de cinco elétrons, supridos pelo NADPH. Duas isoformas das NOSs, a NOS endotelial e a NOS neuronal, são expressas constitutivamente em mamíferos e sintetizam NO• de maneira dependente dos níveis intracelulares de cálcio e da ligação da calmodulina. Os macrófagos possuem a forma induzível da NOS (iNOS). Esta isoforma é capaz de se ligar fortemente à

molécula de calmodulina mesmo em concentrações muito baixas de cálcio intracelular. Conseqüentemente, a atividade da iNOS não responde às mudanças nos níveis intracelulares de cálcio. A iNOS catalisa a produção rápida de NO^{*}, em concentrações bem maiores que as outras isoformas da enzima, alcançando a ordem de micromoles (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003). O aumento na transcrição do gene para esta forma da enzima é observado em resposta a diferentes estímulos como citocinas (ex: IL-1, IFN- γ , TNF- α), bactérias (ex: BCG) ou produtos bacterianos (ex: LPS) (MONCADA *et al.*, 1994; JAMES, 1995), além de cAMP e prostaglandina E2 (IMAI *et al.*, 1994). A iNOS tem sido considerada como molécula central na regulação da resposta imune contra tumores (SONG *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Citocinas

Além das funções descritas, os macrófagos secretam moléculas sinalizadoras chamadas citocinas e quimiocinas, envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento da resposta imune (ABBAS *et al.*, 2000). A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células. Apesar de estas proteínas sinalizadoras serem produzidas pela maioria das células do organismo, os macrófagos constituem sua principal fonte de secreção. Além de apresentarem um importante nível de produção, os macrófagos, ao serem estimulados, se caracterizam por uma síntese e liberação muito rápida destas moléculas (CAVAILLON, 1994).

As citocinas são proteínas de baixa massa molecular liberadas normalmente em resposta a um estímulo ativador e induzem respostas por meio da ligação a receptores específicos. Estas moléculas são capazes de orquestrar a resposta do organismo à injúria, infecção, tumores e provavelmente à maioria das doenças inflamatórias. Elas podem atuar de forma autócrina, afetando o comportamento das células que liberam citocinas, ou de forma parácrina, afetando o comportamento das células adjacentes. Algumas citocinas podem atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isto dependa de sua capacidade de entrar na circulação e de sua meia-vida (JANEWAY *et al.*, 2002). As citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator

estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF). As quimiocinas são uma classe de citocinas que apresentam propriedades quimioatraentes, induzindo células com receptores apropriados a migrarem através da fonte de quimiocina. O repertório de citocinas e quimiocinas secretadas pelos macrófagos inclui: IL-1, IL-6, IL-1ra, L-8, IL-10, IL-12; TNF- α , IFN- α e IFN- γ , MCP-1, MCP-3, MIF, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1, MIP-2, LIF, OSM e TGF- β (CAVAILLON, 1994).

Entre aquelas relacionadas com a caquexia, a IL-1 e a IL-6 são citocinas pró-inflamatórias e parecem estar envolvidas com a ativação do ciclo celular das células tronco em repouso e com a ativação de linfócitos (JANEWAY, 2002). A IL-1 é capaz de ativar o endotélio vascular, aumentando o acesso das células efectoras ao local de infecção e foi identificada como o pirogênio endógeno, mediador da febre através da síntese de prostaglandinas no hipotálamo (ENDRES *et al.*, 1987; DINARELLO; BERNHEIM, 1981). A IL-1 induz muitos dos mesmos efeitos biológicos do TNF e estas duas citocinas parecem agir de maneira sinérgica. A IL-6 direciona a síntese de proteínas agudas no fígado sendo o mediador final comum resultante das atividades de uma cascata de citocinas elicítadas pela presença de células tumorais, endotoxina, TNF e IL-1 (SOUBA, 1994).

O TNF- α , outro importante mediador da caquexia, é reconhecido como uma importante molécula de defesa do organismo, que age inclusive sobre células tumorais. A ligação do TNF- α a seus receptores induz toxicidade, atividade antiviral, proliferação de fibroblastos, linfócitos T citotóxicos e timócitos além da indução do fator de transcrição NF- κ B, eventos que normalmente resultam na ativação de caspases e apoptose (CURTIN *et al.*, 2002; TARTAGLIA; GOEDDEL, 1992; TARTAGLIA *et al.*, 1993). O TNF- α é capaz de induzir necrose em certos tumores experimentais (CARSWELL *et al.*, 1975) e exercer efeitos citotóxicos e citostáticos em várias linhagens tumorais *in vitro* (WATANABE *et al.*, 1985; HARANAKA; SATOMI, 1981). Além dos efeitos já citados, O TNF participa do aumento de citotoxicidade mediada por monócitos (SMITH *et al.*, 1990) e da atividade citolítica de células “natural killer” (OSTENSEN *et al.*, 1987). Quando produzido em pequenas quantidades, o TNF exerce um grande número de atividades pleiotrópicas que estão relacionadas com o controle da proliferação e diferenciação celular, regulação da

interação das citocinas, interação com outros mediadores da resposta ao estresse, incluindo prostaglandinas e corticosteróides, e mediação da resposta à injúria tecidual (SOUBA, 1984).

Inúmeros fatores podem desencadear a produção de citocinas. Estes incluem o estímulo imunológico como o que ocorre durante a apresentação do antígeno associado com o contato com células T, a fagocitose de partículas ou a adesão. O exercício é um estímulo fisiológico que pode também acarretar na produção de certas citocinas. Finalmente, componentes solúveis de bactérias como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas são capazes de induzir a produção de citocinas por macrófagos. O LPS, um lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas é um potente sinalizador para a síntese de várias destas moléculas (CAVAILLON, 1994).

O entendimento sobre todas as atividades biológicas resultantes do vasto repertório de secreção dos macrófagos torna-se mais complexo ainda ao considerarmos que os produtos podem afetar uns aos outros. Existem moléculas que afetam a secreção de outras. Por exemplo, o TNF estimula a liberação de espécies reativas de oxigênio (NATHAN; TSUNAWAKI, 1986), intensificando a atividade antitumoral. O IFN- γ estimula a produção de TNF- α e também de ROS. IL-1 e TNF- α estimulam a produção de IL-8, outra citocina com atividade pró-inflamatória. Por outro lado, IFN- α é capaz de bloquear o estímulo do INF- γ sobre a produção de H₂O₂. O TNF pode induzir células-alvo a liberar outras citocinas que mediam ou antagonizam algumas das ações atribuídas às citocinas liberadas pelos macrófagos (NATHAN *et al.*, 1987).

2.3 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Outra classe de moléculas produzidas pelos macrófagos que parecem constituir uma propriedade importante de células ativadas são os proteoglicanos (ELLIOTT-BRYANT *et al.*, 1999). Os macrófagos são capazes de sintetizar, expressar em sua superfície ou liberar para o meio proteoglicanos constituídos de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (PETRICEVICH; MICHELACCI, 1990). Apesar da função biológica destas macromoléculas no estabelecimento do processo inflamatório ainda não estar bem estabelecida, os proteoglicanos e

glicosaminoglicanos parecem atuar como importantes moduladores da resposta imune (XAUS *et al*, 2001). Vários destes polissacarídeos sulfatados são capazes de interagir com diversas citocinas e fatores de crescimento, além de estarem relacionados com a caquexia (descrito no item 2.1.2) e com a progressão tumoral. As características mais importantes destas macromoléculas e sua relação com o câncer serão abordadas em detalhes nesta revisão, como descrito a seguir.

2.3.1 Conceitos e estrutura

Proteoglicanos são macromoléculas constituídas de um esqueleto protéico ao qual se ligam, covalentemente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos.

Glicosaminoglicanos, por sua vez, são heteropolissacarídeos lineares que apresentam como estrutura básica unidades dissacarídicas repetitivas. Essas unidades dissacarídicas são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e por um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou ainda um açúcar neutro (D-galactose), unidas entre si por ligações glicosídicas. Aos monossacarídeos podem estar esterificados grupos sulfatos, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos, conferem alta densidade de cargas negativas a esses polímeros (JACKSON *et al.*, 1991; KJÉLEEN; LINDAHL, 1991).

Embora essa definição seja simples, ela oculta uma grande variedade de estruturas, envolvendo diferentes tipos de esqueletos protéicos, diferentes classes de glicosaminoglicanos e diferentes quantidades e tamanhos do mesmo glicosaminoglicano.

Os glicosaminoglicanos mais comuns em tecidos de mamíferos são os galactosaminoglicanos, que incluem o condroitim sulfato e o dermatam sulfato e os glucosaminoglicanos, que incluem heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico. A distinção entre os diversos tipos de glicosaminoglicanos, conforme mostra a tabela I, pode ser feita pelos seguintes parâmetros: 1) tipo de hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina); 2) açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose); 3) presença e posição dos grupamentos sulfatos e 4) tipo de ligação glicosídica intradissacarídica e interdissacarídica.

TABELA I: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS GLICOSAMI-NOGLICANOS

Glicosaminoglicanos	P.M. (Da)	Monossacarídeos	Posição do Sulfato	Ligação Glicosídica
Condroitim 4-sulfato	$2,5 \times 10^4$	β -D-N-acetilgalactosamina ácido β -D-glucurônico	4 -	β (1-3) β (1-4)
Dermatan sulfato	$2,5 \times 10^4$	β -D-N-acetilgalactosamina ácido β -D-glucurônico ácido α -L-idurônico	4 - -	β (1-3) β (1-4) α (1-4)
Condroitim 6-sulfato	$2-7 \times 10^4$	β -D-N-acetilgalactosamina ácido β -D-glucurônico	6 -	β (1-3) β (1-4)
Ácido hialurônico	$5-50 \times 10^4$	β -D-N-acetilglucosamina ácido β -D-glucurônico	- -	β (1-3) β (1-4)
Queratam sulfato	$1-3 \times 10^4$	β -D-N-acetilglucosamina β -D-galactose	6 -/6	β (1-3) β (1-4)
Heparam sulfato	$1-6 \times 10^4$	α -D-glucosamina β -D-N-acetilglucosamina ácido β -D-glucurônico ácido α -L-idurônico	2/6 -/6 - -/2	α (1-4) α (1-4) β 1-4) α (1-4)
Heparina	$0,5-5 \times 10^4$	α -D-glucosamina ácido β -D-glucurônico ácido α -L-idurônico	2/6 - -/2	α (1-4) β 1-4) α (1-4)

A principal propriedade dos glicosaminoglicanos é seu caráter ácido, que pode ser definido como o número de resíduos negativamente carregados por molécula de açúcar. Unidades negativamente carregadas podem atrair proteínas e peptídeos que possuam aminoácidos básicos expostos em suas superfícies e, conseqüentemente, induzir mudanças conformacionais, podendo assim interferir na atividade biológica de inúmeras moléculas. Uma interação específica entre um glicosaminoglicano e uma proteína pode ser demonstrada pela ativação do fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) pelo heparam sulfato (WEGROWSKI; MAQUART, 2004). O decassacarídeo de heparam sulfato forma um complexo com o FGF-2, resultando numa mudança conformacional da proteína necessária para que esta se ligue a seu receptor. Apenas o complexo ternário FGF-receptor-heparam sulfato permite a transdução de sinal (PELLEGRINI *et al.*, 2000).

Nos tecidos, os glicosaminoglicanos encontram-se covalentemente ligados a proteínas, formando os proteoglicanos que, por sua vez, podem conter ainda oligossacarídeos *N*- e/ou *O*-ligados. O ácido hialurônico se constitui uma exceção, pois é o único glicosaminoglicano que ocorre nos tecidos como cadeia polissacarídica livre (THONAR; SWEET, 1997; LOHMANDER *et al.*, 1980; NILSSON *et al.*, 1982).

A ligação dos glicosaminoglicanos ao esqueleto protéico, com exceção do queratam sulfato, se faz por meio do tetrassacarídeo ácido glucurônico-galactosil-galactosil-xilose (GlcUA-Gal-Gal-Xil), onde a extremidade redutora se une à proteína por uma ligação do tipo *O*-glicosídica entre a xilose do tetrassacarídeo e a hidroxila de um resíduo de serina. A extremidade não redutora se liga à cadeia de glicosaminoglicano. Tal região de ligação foi descrita para heparina (LINDAHL, 1966), condroitim sulfato de cartilagem e aorta de coelho, dermatan sulfato e heparam sulfato (RÓDEN; SCHWARTZ, 1975).

Dois tipos de queratam sulfato são definidos com base em sua região de ligação à proteína. O queratam sulfato tipo I, presente em córnea (BLOCHBERGER *et al.*, 1992), apresenta-se ligado à proteína por um oligossacarídeo tipo *N*-ligado ao grupamento amino de um resíduo de asparagina. Já o queratam sulfato tipo II, presente em cartilagem e núcleo pulposo, liga-se à proteína por um oligossacarídeo tipo *O*-ligado, unido por ligação *O*-glicosídica a um resíduo de serina ou treonina do esqueleto protéico (BRAY *et al.*, 1967).

O núcleo protéico pode, muitas vezes, encobrir parte da cadeia de glicosaminoglicano e torná-la mais rígida. Por exemplo, duas famílias de proteoglicanos de membrana, os sindecans e os glipicans, são constituídas por cadeias de heparam sulfato. Entretanto, nos sindecans os glicosaminoglicanos estão localizados principalmente na extremidade N-terminal do núcleo protéico enquanto nos glipicans se encontram no domínio próximo à membrana celular. Neste último caso, o polissacarídeo pode ser encoberto pelo domínio N-terminal globular da proteína. Este fenômeno explica as diferentes conformações do heparam sulfato nestas duas classes de proteoglicanos e também o distinto potencial de reatividade com componentes do ambiente. As cadeias de heparam sulfato dos glipicans interagem potencialmente com moléculas da superfície celular, enquanto os sindecans são excelentes candidatos para reagirem com fatores solúveis no espaço pericelular (SATOH *et al.*, 2000).

Devido à grande heterogeneidade, a classificação dos proteoglicanos é bastante difícil. A forma mais comum é uma classificação baseada na localização dos proteoglicanos e na estrutura do esqueleto protéico. Os proteoglicanos são encontrados na matriz extracelular, tanto na matriz intersticial como na membrana basal, na superfície celular e em grânulos citoplasmáticos (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Os proteoglicanos de matriz extracelular, como mencionado, são encontrados na membrana basal e matriz intersticial. Na matriz intersticial existem duas classes de compostos com estruturas bastante diferentes: proteoglicanos de baixo peso molecular ou da família das proteínas ricas em leucina (ex: biglicam, decorin, fibromodulim e luminicam) e proteoglicanos de alto peso molecular ou da família dos hialectans, que são proteoglicanos que interagem com o ácido hialurônico e apresentam principalmente cadeias de condroitim sulfato (ex: agrecam, versicam, neurocam e brevicam) (BANDTLOW; ZIMMERMANN, 2000). Entre aqueles encontrados na membrana basal, três proteoglicanos são característicos: perlecam, agrim e bamacam. Os dois primeiros possuem cadeias de heparam sulfato enquanto o último, cadeias de condroitim sulfato (IOZZO, 1998). Adicionalmente, vários tipos de colágeno (IX, XII, XIV, XVIII) podem existir na forma de proteoglicanos de matriz extracelular.

Os proteoglicanos transmembrânicos que estão localizados na superfície celular incluem a família dos sindecans e uma lista crescente de outros proteoglicanos, como o betaglicam, o CD44, a trombomodulina, o NG2 e o neuroglicam (BERNFELD *et al.*, 1992; DAVID *et al.*, 1992; KOJIMA *et al.*, 1992). Os sindecans, a principal família, são proteoglicanos obrigatoriamente híbridos, isto é, possuem cadeias de condroitim, dermatam e heparam sulfato. Outra classe de proteoglicanos de superfície celular são os que se ligam à membrana plasmática por uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol e que incluem o glicicam, o cerebroglicam e o OCI-5, proteoglicanos que possuem cadeias de heparam sulfato (STIPP *et al.*, 1994; FILMUS *et al.*, 1995).

2.3.2 Envolvimento dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos na progressão tumoral

A heterogeneidade das cadeias de glicosaminoglicanos e a existência de mais de 50 genes associados aos proteoglicanos fornecem uma superabundância de propriedades moleculares para estas macromoléculas. As interações imunológicas entre as células transformadas em disseminação e as células de defesa do hospedeiro constituem um passo importante no processo de progressão tumoral, onde inúmeros proteoglicanos e glicosaminoglicanos foram identificados como possíveis elementos regulatórios (WEGROWSKI; MAQUART, 2004).

As células transformadas induzem uma reação estromal, seja *per se* ou por ativação das células mesenquimais. O estroma tumoral, um tecido adjacente ao tumor sólido, contém fibrilas de colágeno, estruturas de membrana basal, células mesenquimais, células do sistema imune, células tumorais invasoras além de ser ricamente vascularizado. A síntese dos proteoglicanos é fundamental para qualquer tecido, incluindo o estroma peritumoral (WEGROWSKI; MAQUART, 2004). Este tecido contém proteoglicanos e glicosaminoglicanos, normalmente numa proporção maior que o tecido adjacente normal (TÍMÁR *et al.*, 2002). Inúmeros estudos relatam a presença aumentada de condroitim sulfato no estroma de tumores de diferentes origens (SAMPAIO *et al.*, 1977; JERÔNIMO *et al.*, 1994). Adicionalmente, este glicosaminoglicano apresentou atividade promotora do crescimento em tumores ascíticos de Ehrlich (TAKEUCHI, 1968) e, juntamente com outros glicosaminoglicanos sulfatados, parece possuir um papel importante nos processos

reconhecimento e adesão celular (DIETRICH *et al.*, 1976; TOLEDO *et al.*, 1977). Contudo, o aumento na concentração de condroitim nos tumores não se reflete na urina dos pacientes com câncer, onde uma diminuição na razão condroitim sulfato/heparam sulfato é observada (MARTINS *et al.*, 2000; JERÔNIMO, *et al.*, 1994).

Diferentes proteoglicanos foram isolados e caracterizados do estroma tumoral. A expressão dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP) foi também estudada em tumores de diferentes origens. O decorim, o SLRP mais abundante, é superexpresso em diferentes tumores malignos como o tumor de Walker-256, carcinoma coloretal, adenocarcinoma de cólon, carcinoma de células basais, melanoma ou osteosarcoma (OBA-SHINJO *et al.*, 2003; SODERSTROM *et al.*, 2002). A superexpressão do decorim é normalmente acompanhada de alterações na estrutura de sua cadeia de glicosaminoglicano, que muda do tipo dermatam sulfato, para condroitim sulfato (DAIDOUJI, *et al.* 2002).

A implicação dos SLRPs no desenvolvimento do câncer tem sido estudada extensivamente desde o descobrimento dos efeitos anti-oncogênicos do decorim. A expressão ectópica deste SLRP retarda o crescimento de muitas linhagens cancerígenas e tumores implantados (SANTRA *et al.*, 1995; SANTRA *et al.*, 1997). Expressão ectópica de decorim pelo lado oposto do tumor inibiu seu crescimento (TRALHAO *et al.*, 2003). Esta molécula é capaz de se ligar ao fator de crescimento TGF- β , inibindo sua ação. O TGF- β é produzido por uma grande variedade de células tumorais e é responsável por induzir resistência química e imunológica, assim como promover o fenótipo angiogênico. O fato de o decorim apresentar expressão diminuída em inúmeras linhagens de células tumorais (IOZZO; COHEN, 1993), mas secreção aumentada nas células do estroma peritumoral (ADANY *et al.*, 1990) pode representar um mecanismo de defesa do estroma tumoral designado para contrabalançar as células tumorais invasivas.

Outros SLRPs podem também contribuir para o controle da progressão tumoral. A expressão do biglicam por células de câncer pancreático inibe a proliferação do tumor por induzir a permanência das células tumorais na fase G1 do ciclo celular (WEBER, *et al.*, 2001). Em células de glioma, esse proteoglicano é atipicamente transportado para o núcleo (LIANG *et al.*, 1997). O luminicam inibe o crescimento do melanoma murino *in vivo* e *in vitro* (VUILLERMOZ *et al.*, 2004). A

expressão reduzida desse SLRP está associada ao avanço da progressão tumoral em uma linhagem de carcinoma de mama invasivo (TROUP *et al.*, 2003). Estes proteoglicanos possuem a mesma capacidade do decorim em neutralizar a ação do TGF- β . A interação entre as SLRPs e este fator de crescimento é de natureza protéica, não envolvendo a cadeia de glicosaminoglicano. Numerosos estudos mostram ainda que existe uma interação direta entre os SLRPs e células cancerígenas. O decorim, por exemplo, se liga ao receptor de EGF (fator de crescimento epidérmico), inibindo a expressão de ErbB2 e MAP quinases e ativando genes inibidores de CDK como o p21^{cip1WAF1}, o que diminui a proliferação celular das células transformadas e induz apoptose. O biglicam também inibe a expressão de proteínas controladoras do ciclo celular como a ciclina A e ativa genes supressores de tumor como o p27 (WEGROWSKI; MAQUART, 2004). Muitas vezes, a propriedade de uma cadeia de glicosaminoglicano isolada é antagônica à da mesma molécula quando anexada ao núcleo protéico de um proteoglicano (TÍMAR *et al.*, 2002). Por exemplo, enquanto os SLRPs possuem efeitos antiproliferativos, os glicosaminoglicanos liberados após a degradação destas moléculas podem promover migração das células cancerígenas (DENHOLM *et al.*, 2001).

FURUKAWA & BHAVANANDAN (1982) analisaram a influência de vários glicosaminoglicanos sobre a síntese endógena de DNA em células normais e células cancerígenas. Estes autores partiram da observação de que células de melanoma murino B16 continham glicosaminoglicanos em seus núcleos. Outros autores também relataram a presença deste tipo de moléculas no núcleo de uma variedade de células animais. Estes estudos mostraram que a heparina possui efeitos, por vezes, antagônicos: ela é capaz de estimular a síntese de DNA em células normais, mas inibe sua síntese em células tumorais. Já outras moléculas como o condroitim 4- e condroitim 6-sulfato, heparam, proteoglicanos de cartilagem e glicoforina causaram inibição da síntese de DNA tanto em células normais como em células cancerígenas. Este resultado corrobora com a hipótese de que muitas das moléculas secretadas pelo estroma peritumoral podem atuar como um mecanismo de defesa.

O alto grau de heterogeneidade dos glicosaminoglicanos pode ser responsável pela definição de outro fenômeno de grande importância durante o crescimento tumoral: a formação do gradiente de citocinas e quimiocinas. Essas proteínas

sinalizadoras produzidas principalmente pelas células do sistema imune possuem motivos básicos capazes de interagir com os grupamentos ácidos dos glicosaminoglicanos. Desta maneira, o padrão de expressão dos glicosaminoglicanos extracelulares pode influenciar o gradiente de moléculas quimioatrativas nas regiões adjacentes ao tumor e o grau de progressão celular e metástase (WEGROWSKI; MAQUART, 2004). A interação glicosaminoglicano-citocina está correlacionada com a oligomerização da citocina, potencializando seus efeitos biológicos. Recentemente, uma elegante abordagem experimental demonstrou a importância destas interações *in vivo*. Citocinas recombinantes como o RANTES, MIP-1 e MCP-1, em suas formas nativas, são capazes de recrutar células mononucleares quando injetados na cavidade peritoneal. Entretanto, uma mutação nos aminoácidos básicos destas citocinas, essenciais para a ligação com os glicosaminoglicanos, faz com que estas moléculas percam suas propriedades quimioatrativas *in vivo*, mas continuem capazes de estimular a migração de células *in vitro* (PROUDFOOT *et al.*, 2003).

Durante o processo de progressão e transformação, as células cancerosas sintetizam e secretam uma variedade de interleucinas e fatores de crescimento. YAYON *et al.* (1991) demonstraram que a presença de heparam sulfato ou heparina na superfície celular ou no meio de cultura é um pré-requisito para a ligação do fator de crescimento ao seu receptor. O FGF-2, por exemplo, interage com cadeias de heparam sulfato, o que provoca uma mudança conformacional necessária para a ligação em seu receptor. Apenas o complexo ternário FGF-receptor-heparam sulfato permite a transdução de sinal (PELLEGRINI *et al.*, 2000). Outras citocinas também são capazes de interagir com o heparam sulfato: IL-1 α e β , IL-2, -4, -5, -6 e -7, além das quimiocinas IL-8, -10, -11 e 12.

Os proteoglicanos estão também intimamente relacionados com a invasão e metástase das células tumorais. O processo metastático envolve uma cascata de passos seqüenciais que requerem a coordenação apropriada entre adesão, motilidade e crescimento. Entre as moléculas que podem influenciar cada um destes passos críticos estão os proteoglicanos que contêm heparam sulfato (HSPGs) (SANDERSON, 2001). Devido à sua natureza, os HSPGs podem agir ora como inibidores, ora como promotores da invasão celular, sendo sua função determinada por 5 fatores: 1) sua localização (superfície celular ou matriz extracelular); 2)

moléculas às quais está associado; 3) pela presença de enzimas modificadoras, 4) característica estrutural precisa do proteoglicano e 5) tipo do tecido e estado patofisiológico do tumor. De um modo geral, os HSPGs da superfície celular inibem a metástase por promover forte adesão célula-célula e célula-matriz. Inúmeros estudos mostram que a diminuição dos níveis de heparan sulfato na superfície celular de inúmeros tumores está correlacionado com uma maior atividade metastática. O HSPG de superfície celular mais estudado quanto a este aspecto é o sindecam-1. Em uma série de tumores epiteliais incluindo cólon, mesotelioma, pulmão, carcinoma hepatocelular, carcinoma de ducto de mama, carcinoma de cabeça e pescoço, a expressão de sindecam-1 na superfície celular está inversamente correlacionada com o potencial metastático (DAY *et al.*, 1999; KUMAR-SINGH *et al.*, 1998; NACKAERTS *et al.*, 1997; STANLEY *et al.*, 1999; MATSUMOTO *et al.*, 1997; INKI *et al.*, 1994). Contraditoriamente, HSPGs da superfície celular podem contribuir para a metástase protegendo ou servindo como âncora para proteases degradadoras da matriz (BERNFELD *et al.*, 1999). Diferentemente dos HSPGs de superfície celular, os de matriz e membrana basal normalmente possuem propriedades promotoras da invasão tumoral. Estes proteoglicanos podem, como já descrito nesta revisão, ligar citocinas e fatores de crescimento, criando um reservatório destas moléculas nas regiões adjacentes ao tumor. Neste sentido, um gradiente de fatores de crescimento pode ser formado, criando um ambiente favorável para a difusão das células invasoras (SANDERSON, 2001).

3. JUSTIFICATIVA

O papel das citocinas na patofisiologia da caquexia associada ao câncer tem sido amplamente documentado, como bem detalhamos nesta revisão bibliográfica. O estudo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio neste contexto tem, em sua maioria, sido limitado à perda de massa muscular. Apesar dos macrófagos constituírem a principal fonte destas moléculas e possuírem papel chave na imunocompetência, pouco se sabe sobre as alterações funcionais destas células em animais caquéticos portadores de tumor. O que já foi relatado nesta área é controverso e conflitante devido principalmente a diferenças nos modelos experimentais, espécie de animal ou subpopulação de macrófagos utilizados (KLIMP, 2002).

Os proteoglicanos também possuem papel importante na progressão tumoral e alguns deles parecem ser mediadores da caquexia (TODOROV *et al.*, 1996a; FIGUEROA *et al.*, 1999a). Evidências sugerem que estas moléculas sejam produzidas por células não cancerosas (FIGUEROA *et al.*, 1999b). Essa hipótese é reforçada pela observação de que muitas das alterações metabólicas do organismo geradas em resposta à inflamação e a alguns tipos de câncer são induzidas por substâncias liberadas pelas células de defesa. Entretanto, nenhum estudo avaliando a produção de proteoglicanos por macrófagos peritoneais de ratos caquéticos portadores de tumor foi realizado. Na realidade, este é um aspecto funcional pouco investigado e a função biológica dos proteoglicanos produzidos pelos macrófagos não é totalmente compreendida. Adicionalmente, o papel modulador destas macromoléculas sobre características funcionais dos macrófagos constitui outro aspecto pouco explorado.

Neste trabalho, portanto, investigamos alterações na morfologia e em aspectos funcionais de macrófagos peritoneais de ratos Wistar portadores do tumor de Walker-256, com destaque para a produção de proteoglicanos. Investigamos ainda o papel modulador do glicosaminoglicano condroitim 4-sulfato sobre estas células.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de realizar um estudo comparativo entre características de macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor de Walker 256 na forma sólida e ratos saudáveis, tendo como objetivos específicos:

1. Avaliar os aspectos morfológicos dos macrófagos;
2. Comparar a capacidade fagocítica;
3. Avaliar a produção de óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio;
4. Investigar a produção de proteoglicanos por macrófagos e caracterizar a estrutura de suas cadeias de glicosaminoglicanos;
5. Avaliar o efeito *in vitro* do condroitim 4-sulfato sobre a produção de ânion superóxido e óxido nítrico em macrófagos de ratos saudáveis e portadores de tumor.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia de ação do presente estudo pode ser visualizada na figura 3. O tumor de Walker 256 foi utilizado como modelo experimental de caquexia associada ao câncer. Este tumor foi primeiramente descrito em 1928 por George Walker como um neoplasma espontâneo de glândula mamária em ratos (MARIA *et al.*, 1994). Este carcinossarcoma é conhecido por sua agressividade e rápido espalhamento pelas vias linfática e hematogênica. Sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia (GUAITANI *et al.* 1982). Em curto espaço de tempo após sua implantação verifica-se redução no peso do animal, dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia), catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Aos 14 dias após o implante a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO *et al.*, 2002). Para realização dos experimentos descritos neste trabalho, foram utilizados animais saudáveis como controle e animais portadores de tumor na forma sólida com 7 ou 14 dias de crescimento. Somente animais com desenvolvimento tumoral característico, nos quais o tumor representava 8 a 10% do peso do animal aos 14 dias após o implante das células foram utilizados. Nas séries experimentais realizadas com animais portadores de tumor com 7 dias de crescimento, a massa tumoral não havia alcançado 1/3 daquela encontrada em animais no 14º dia após a inoculação das células tumorais. A figura 4 mostra uma fotografia de um animal portador do tumor de Walker-256 com 14 dias de crescimento.

Os macrófagos peritoneais obtidos de animais saudáveis e portadores de tumor de Walker 256 foram utilizados para avaliação das características morfológicas e funcionais. Dentre os aspectos funcionais investigados encontram-se: produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, capacidade fagocítica e produção de proteoglicanos. As cadeias de glicosaminoglicanos dos proteoglicanos produzidos pelos macrófagos foram caracterizadas enzimaticamente. Adicionalmente, como inúmeros estudos relatam a presença aumentada de condroitim sulfato no estroma de tumores de diferentes origens (SAMPAIO *et al.*, 1977; JERÔNIMO *et al.*, 1994) e para melhor caracterizar o papel dos glicosaminoglicanos na inflamação associada ao câncer, foi também avaliado o papel modulador do glicosaminoglicano condroitim

4-sulfato sobre a liberação ROS/RNS em células de animais controle e de animais caquéticos.

FIGURA 3: FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

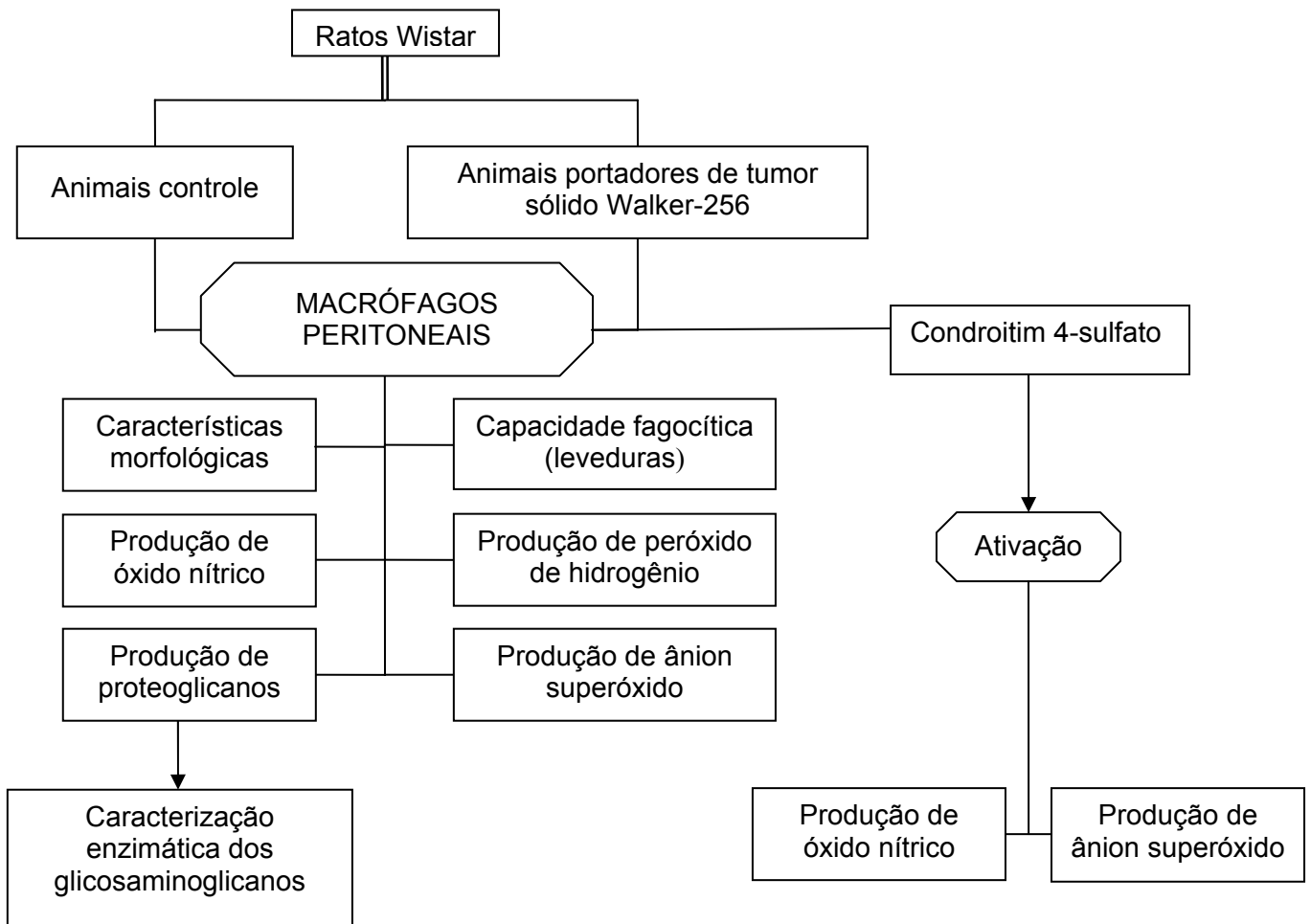


FIGURA 4: RATO PORTADOR DO TUMOR DE WALKER-256

Fotografia ilustrativa de um rato Wistar macho no 14º dia após o implante de 2×10^7 células tumorais de Walker-256 no flanco direito.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS E REAGENTES

Condroitim 4-sulfato foi isolado, purificado e gentilmente cedido pelo Instituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche G. Ronzoni, Itália, por intermédio do professor Marcelo Iacomini do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Condroitinase ABC (EC 4.2.2.4), condroitinase AC (EC 4.2.2.5), heparitinase (EC 4.2.2.8), horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7), citocromo c de coração bovino, brometo de 3-metil-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 2-etano sulfônico) (HEPES), albumina bovina (BSA), lipopolissacarídeo (LPS), azul de Trypan, azul de dextran, dodecil sulfato de sódio (SDS), Sephadex G-50 Fine e Sephadex G-100 Fine foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, EUA).

Hidróxido de sódio, glicose, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, nitrito de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), Entellan, Tris-HCl, Triton X-100 e Coomassie Brilliant Blue G-250 foram adquiridos da Merck do Brasil.

Gentamicina, meio Eagle (MEM) e soro fetal bovino (SFB) foram fornecidos pela Cultilab (Campinas, SP).

³⁵Sulfato de sódio foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo, SP).

Filtros descartáveis de 0,45 µm e 0,22 µm de poro e membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de poro foram obtidos da Millipore®.

Os demais reagentes utilizados foram preparações comerciais de pureza analítica adequada.

6.2 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

6.2.1 Solução Salina Tamponada

A solução salina fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada. Esta solução era constituída por 680 mmol.L⁻¹ de NaCl, 13,4 mmol.L⁻¹ de KCl, 40,5 mmol.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 7,3 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄ (pH 7,4). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 1 atm, 20 minutos) e armazenada à 4°C. No momento do uso, a solução foi diluída com água Milli-Q estéril.

6.2.2 Solução Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução balanceada de Hanks (HBSS) é constituída da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas vinte vezes). A solução A era constituída de 27,3 mmol.L⁻¹ de NaCl, 107 mmol.L⁻¹ de KCl, 25 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ e 27 mmol.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. A solução B era constituída de 8,5 mmol.L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 111 mmol.L⁻¹ de glicose. As duas soluções foram preparadas em água Milli-Q em volume de 50 mL e armazenadas à 4°C. No momento do uso, as soluções A e B foram misturadas na proporção 1:1, diluídas vinte vezes com água Milli-Q e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de Hanks foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm (Millipore®) em câmara de fluxo laminar vertical (Veco).

6.2.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio essencial mínimo de Eagle (MEM, CultiLab, Campinas, Brasil). Este meio foi reconstituído em água Milli-Q e esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poros de 0,22 µm (Millipore®). Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram

deixadas em estufa à 37°C como controle da qualidade da esterilização. O meio foi mantido em geladeira à 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com 5% de soro fetal bovino estéril, previamente inativado a 56°C por 30 minutos. O meio foi tamponado com HEPES 20 mmol.L⁻¹ (esterilizado por filtração em membrana de acetato de celulose estéril com poros de 0,22 µm) e bicarbonato de sódio 8 mmol.L⁻¹ (esterilizado por autoclavação) em pH 7,4. Além desses componentes foi adicionado o antibiótico gentamicina na concentração de 40mg.mL⁻¹.

6.3 ANIMAIS

Neste trabalho, foram utilizados ratos albinos Wistar machos, pesando 200 a 280 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo alimentados com ração Purina® e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos utilizando animais, descritos na seção Materiais e Métodos, estão de acordo com os princípios éticos de pesquisa estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O certificado emitido pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pode ser visualizado como ANEXO I.

6.4 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256 EM RATOS

A manutenção das células Walker-256 foi realizada através de passagens semanais por inoculação intraperitoneal de 10⁶ células em ratos albinos Wistar. Alternativamente, formas tumorais sólidas do carcinosarcoma Walker-256 foram obtidas pela injeção de 2 × 10⁷ células/animal, no seu flanco direito. O crescimento do tumor ocorreu por 7 ou 14 dias, dependendo do procedimento experimental realizado, quando então os animais foram sacrificados.

A avaliação e contagem das células viáveis das suspensões celulares foram realizadas através do método de exclusão do azul de tripano (PHILLIPS, 1973).

6.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Para obtenção de macrófagos peritoneais os animais foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após a assepsia com álcool 70% e exposição do peritônio, com auxílio de seringa e agulha estéreis foram inoculados 20 mL de PBS estéril à 25°C e, após suave massagem na cavidade peritoneal, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas e acondicionadas em tubos plásticos estéreis, mantidos em banho de gelo até a utilização. A seguir as células foram centrifugadas a 1080g por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células ressuspensas em meio estéril. Após contagem de células em câmara de Neubauer, o volume da suspensão foi ajustado de forma a se obter o número de células desejado para cada um dos experimentos. Em seguida as células foram plaqueadas em placas de cultura estéreis de 6, 24 ou 96 poços, de acordo com as condições experimentais desejadas, e colocadas para aderir durante 1 hora à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, a monocamada de células aderentes foi lavada duas vezes com solução de PBS estéril pré-aquecida à 37°C para remoção das células não aderentes. Por este método, acima de 90% das células aderidas são macrófagos, não sendo necessária posterior purificação das preparações (ADAMS, 1979; HAWORTH; GORDON, 1998). Após esta etapa, as condições dos experimentos variaram conforme a necessidade experimental desejada.

6.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para dosagem das proteínas totais o método utilizado foi o de BRADFORD (1976). Este método baseia-se na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com moléculas de proteína da amostra, formando um complexo de cor azul. A solução estoque do corante foi preparada pela dissolução de 40 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 20 mL de etanol absoluto, 40 mL de ácido orto-fosfórico a 85% (v/v) e água bidestilada até o volume de 100 mL.

Para dosagem de proteína, as monocamadas aderidas nas placas de cultura foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido à 37°C para remoção do meio residual. Em seguida, foi adicionado 100 µL de solução 0,2% (v/v) de triton X-100,

seguindo-se de incubação por 1 hora à 37°C. A proteína total foi dosada transferindo-se 20 µL de cada poço para tubos de ensaio, adicionando-se então 500 µL do reativo de Bradford diluído na proporção 1:4 em água. Após 5 minutos, 200 µL da mistura foram transferidos para placas de 96 poços e a absorbância foi determinada em 595 nm em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, contra um branco contendo quantidade equivalente de solução de triton X-100, utilizando-se curva padrão de soroalbumina bovina.

6.7 MICROSCOPIA DE LUZ

Macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ratos Wistar (5×10^6 células) foram plaqueados e cultivados por 24 horas em placas de 24 poços que continham lamínulas de vidro (37° C, 5%CO₂). As monocamadas de células aderidas às lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em Bouin por 5 minutos. Este fixador é preparado na forma de solução estoque, composta de 300 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico e 100 mL de formol. No momento do uso, para cada 20 mL desta solução foi adicionado 1 mL de ácido acético. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas duas vezes em etanol 70% (v/v) e em seguida coradas em Giemsa por 2 horas. Para o preparo deste corante foram utilizados 3,8 g do corante de Giemsa, diluídos em 250 mL de álcool metílico e 250 mL de glicerina. O excesso de corante foi retirado e as lamínulas foram lavadas duas vezes com água bidestilada, desidratadas e pré-diafanizadas em soluções de acetona e xilol nas seguintes proporções: mistura a = 2 acetona : 1 xilol; mistura b = 1 acetona : 1 xilol; mistura c = 1 acetona : 2 xilol. Em seguida as lamínulas foram submetidas a duas lavagens em xilol puro e montadas em lâminas de vidro com Entelan.

6.8 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MACRÓFAGOS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E RATOS NORMAIS

6.8.1 Produção de ânion superóxido

Para esta série experimental os animais foram inoculados com tumor na forma sólida no flanco direito, como descrito no item 6.4. Animais sadios foram

utilizados como controle. Sete ou quatorze dias após a implantação do tumor, os animais foram sacrificados. As células do exsudato peritoneal foram obtidas conforme descrito no item 6.5 e plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços. Após o período de 1 hora, a monocamada aderente de macrófagos foi incubada por 2 horas à 37°C com meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c ($80 \mu\text{M}$) de acordo com o descrito por SASADA *et al.* (1983). Em cada um dos grupos, metade dos poços contendo macrófagos foram incubados na presença de PMA, controle positivo de ativação, e os restantes na ausência de PMA. Após duas horas de incubação a absorbância foi medida em comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde à concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar para a mistura ($\epsilon=2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.8.2 Produção de peróxido de hidrogênio

O microensaio utilizado para medida da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais foi realizado de acordo com a técnica descrita por PICK; MIZEL (1981). Este método é baseado na oxidação do vermelho de fenol dependente de horseradish peroxidase (HRPO). Esta oxidação converte o vermelho de fenol em um composto que apresenta aumento de absorbância em 600-610 nm.

Macrófagos isolados da cavidade peritoneal de animais sadios ou com tumor de Walker (7 ou 14 dias após a implantação) foram plaqueados em placas de 96 poços na densidade de 5×10^5 células/poço, como descrito no item 6.5. Após adesão, $100 \mu\text{L}$ de uma solução de vermelho de fenol (SVF) foi adicionada a cada poço. Esta solução era constituída de vermelho de fenol ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) e HRPO (19 U.mL^{-1}) em HBSS. Em cada um dos grupos, metade dos poços contendo macrófagos foram incubados na presença de PMA e os restantes na ausência de PMA. As células foram incubadas por 2 horas à 37°C quando então $10 \mu\text{L}$ de NaOH (1 mol.L^{-1}) foram adicionados em cada poço. Esta adição teve o propósito de parar a reação de produção de peróxido de hidrogênio e de elevar o pH da mistura de reação para 12,5, eliminando mudanças na absorbância do vermelho de fenol devido ao seu

comportamento como indicador de pH. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 610 nm em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark contra um branco contendo células e SVF ao qual 10 μL de NaOH (1mol.L^{-1}) foram adicionados no tempo zero. A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada utilizando-se uma curva padrão de peróxido de hidrogênio.

6.8.3 Produção de óxido nítrico

Nestes experimentos também foram utilizados animais inoculados com tumor na forma sólida no flanco direito, como descrito no item 6.4. e ratos saudáveis como controle. Após 7 ou 14 dias após a implantação do tumor, os animais foram sacrificados e as células do exsudato peritoneal foram obtidas conforme descrito no item 6.5 e plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços. As monocamadas de células foram incubadas em meio MEM na presença ou ausência de 50 ng/ml de LPS + 26 U/ml de IFN- γ . Após 48 horas em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para outra placa, procedendo-se a dosagem do óxido nítrico com o uso do reagente 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 naftiletilenodiamino 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). Aos 100 μL do sobrenadante foram adicionados 100 μL do reagente de Griess seguindo-se incubação por 10 minutos. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark. A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão de NaNO₂.

6.8.4 Capacidade fagocítica

A capacidade fagocítica foi avaliada de acordo com o descrito por RAMESH *et al.* (2002) e BUCHI *et al.* (1993), utilizando leveduras como partículas fagocíticas. As leveduras, obtidas a partir do fermento biológico, foram preparadas por três lavagens consecutivas em PBS estéril, pH 7,4 e mantidas à 4°C até a utilização. As

células do exsudato peritoneal foram obtidas conforme descrito no item 6.5 e plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Foram utilizados ratos com tumor sólido de 14 dias e ratos controle. Após 24 horas o sobrenadante foi descartado e as lamínulas de vidro contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes em meio MEM com antibióticos e sem soro fetal bovino. Em seguida, os macrófagos foram incubados com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos as lamínulas foram lavadas três vezes para a retirada das leveduras não fagocitadas e processadas para a microscopia de luz como descrito no item 6.7. Utilizando objetiva de 1000 vezes de aumento foram contados o número total de macrófagos, o número de macrófagos que fagocitaram leveduras e o número de leveduras fagocitadas.

6.8.5 Produção de proteoglicanos

Esta técnica é baseada na incorporação de sulfato radioativo ($^{35}\text{SO}_4$) às moléculas de proteoglicanos sintetizados pelos macrófagos e está descrita em KOLSET (1986).

Macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ratos portadores do tumor na forma sólida 14 após dias da implantação e de ratos controle (5×10^6 células por poço) foram colocados para aderir em placas de 6 poços. As monocamadas de células aderentes foram cultivadas com 2 mL de meio MEM contendo [^{35}S]sulfato (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) durante 24 horas em estufa (37°C, 5% de CO_2). Após a incorporação do sulfato radioativo, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 400 g para remover as células não aderentes. Esta fração continha os proteoglicanos secretados pelos macrófagos. A monocamada de células aderidas foi lavada três vezes com PBS e a fração que continha os proteoglicanos associados à membrana celular foi extraída com tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4) contendo 1% de SDS e PMSF 0,1 mmol.L^{-1} como inibidor de protease. Para separar o [^{35}S]sulfato não incorporado, alíquotas de ambas as frações foram submetidas a uma cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex G-50 (0,7X42 cm). O líquido de eluição era constituído de uma solução salina fosfato tamponada (pH 7,4) contendo 0,1% de SDS e o azul de dextrano foi utilizado como marcador do volume morto. O volume morto foi coletado

em frações de 100 μL e a quantidade de radioatividade presente nestas frações foi quantificada com 1 mL de líquido de cintilação biodegradável (Amersham Biosciences) em um contador de cintilações para amostras líquidas Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.

6.8.5.1 Caracterização dos glicosaminoglicanos [^{35}S]-sulfatados

As cadeias de glicosaminoglicanos radioativamente marcadas foram caracterizadas pela degradação enzimática com mucopolissacaridasas específicas (ELLYOT-BRYANT *et al.*, 1999). As frações contendo proteoglicanos liberados para o meio e aquelas que continham os proteoglicanos associados à membrana celular foram submetidas à diálise em água destilada à 4°C por 24 horas para remover o excesso de [^{35}S]sulfato livre e de SDS. Após este período, as frações foram liofilizadas e redissolvidas nos tampões adequados para ação de cada enzima, em volume final de 100 μL . Os proteoglicanos [^{35}S]sulfatados foram incubados com 0,15 unidades de condroitinase ABC (2 horas à 37°C) em tampão Tris-HCl 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo acetato de sódio 0,1M e 0,01% de albumina bovina; 0,15 unidades de condroitinase AC (2 horas à 37°C) em tampão Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,3), 0,1M de acetato de sódio e 0,01% de albumina bovina ou com 0,01 unidades de heparitinase (4 horas à 37°C) em tampão Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,4) e 1 μM de cloreto de cálcio.

Os produtos de degradação foram separados por cromatografia em colunas de Sephadex G-100 (0,7X42 cm), eluídos com uma solução salina fosfato tamponada contendo 0,1% de SDS. As frações excludentes que continham os proteoglicanos resistentes à degradação foram coletadas, liofilizadas e analisadas quanto ao seu conteúdo radioativo. Condroitim [^{35}S]sulfato foi determinado pela quantidade de radioatividade sensível à condroitinase AC. Dermatom [^{35}S]sulfato foi determinado pela quantidade de radioatividade resistente à condroitinase AC, mas sensível à condroitinase ABC. Heparom [^{35}S]sulfato foi determinado pela radioatividade resistente à condroitinase ABC, mas sensível à degradação pela heparitinase.

6.8.6 Atividade enzimática da catalase (peróxido de hidrogênio:peróxido de hidrogênio óxido-redutase, EC.1.11.1.6)

A atividade da catalase foi avaliada de acordo com a técnica proposta por AEBI (1984), através da medida da decomposição do peróxido de hidrogênio em 232 nm. Células obtidas da cavidade peritoneal de ratos portadores do tumor de Walker-256 na forma sólida (14 dias de crescimento) e de ratos saudáveis foram plaqueadas em placas de Petri plásticas de 35 mm de diâmetro e incubadas por 1 hora em estufa à 37°C, 5% CO₂. Após adesão os macrófagos aderentes foram lavados duas vezes com PBS e gentilmente retirados das placas com auxílio de um raspador de borracha em 1 - 2 mL de PBS. As células foram então rompidas por ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido e homogeneizadas em homogeneizador van Potter. O lisado de células foi centrifugado a 10000 G por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante, chamado de extrato livre de células (ELC), foi utilizado para análise da atividade enzimática e quantificação do conteúdo protéico.

O sistema de reação para o ensaio da catalase era composto de tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 30 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de diferentes quantidades do ELC ao sistema e acompanhada através do decréscimo da absorbância em comprimento de onda de 232 nm. A concentração de peróxido de hidrogênio decomposto pela enzima foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar da água oxigenada em 232 nm ($\epsilon=0,00394 \text{ M}^{-1}.\text{mm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em quantidade de peróxido de hidrogênio decomposto por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{prot}$).

6.9 EFEITOS *IN VITRO* DO CONDROITIM 4-SULFATO SOBRE MACRÓFAGOS

6.9.1 Efeito do condroitim 4-sulfato sobre a viabilidade celular

Estes experimentos foram realizados de acordo com o descrito por REILLY *et al.* (1998). Segundo este método, as células viáveis e ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO e que possuem cor roxa característica.

Os macrófagos aderentes (5×10^5 células) obtidos conforme descrito no item 6.5 foram cultivados por 48 horas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 na presença de diferentes concentrações de condroitim (20 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O grupo controle foi cultivado na ausência do glicosaminoglicano. Após este período o meio foi retirado e, após lavagem com PBS, as células foram incubadas por 3 horas em estufa à 37°C em meio de reação constituído de HBSS e MTT ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A seguir o excesso de MTT foi aspirado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmark.

6.9.2 Efeito do condroitim-4-sulfato sobre a produção de ânion superóxido

Células do exsudato peritoneal de ratos portadores de tumor na forma sólida após 14 dias da implantação e de ratos sadios, obtidas conforme descrito no item 6.5, foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços. As monocamadas aderentes de macrófagos do grupo tratado foram incubadas por 2 horas à 37°C com meio de reação constituído de HBSS e $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ferricitocromo c (SASADA *et al*, 1983), acrescido de diferentes concentrações de condroitim-4-sulfato: 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e $500 \mu\text{g/mL}$. O grupo controle foi incubado apenas com o meio de reação. Em cada um dos grupos, metade dos poços contendo macrófagos foram incubados na presença de PMA e os restantes na ausência de PMA. Após duas horas de incubação a absorbância foi medida em 550 nm e a concentração de ânion superóxido foi determinada como descrito no item 6.8.1.

6.9.3 Efeito do condroitim 4-sulfato sobre a produção de óxido nítrico

Macrófagos (5×10^5 células/poço) de ratos portadores de tumor (14 dias) e ratos sadios foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços. As células do grupo tratado foram incubadas em meio MEM que continha condroitim-4-sulfato nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e $500 \mu\text{g/mL}$. As células do grupo controle foram incubadas apenas com meio MEM. Em metade dos poços de ambos os grupos foram adicionados 50 ng/ml de LPS e 26 U/ml de $\text{IFN-}\gamma$. Após 48

horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa, procedendo-se a dosagem do óxido nítrico como já descrito no item 4.6.2.

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA). O teste Newmans Keuls foi utilizado para localizar diferenças obtidas na ANOVA, através do pacote de estatística para microcomputador Statistica (StatSoft, Inc.).

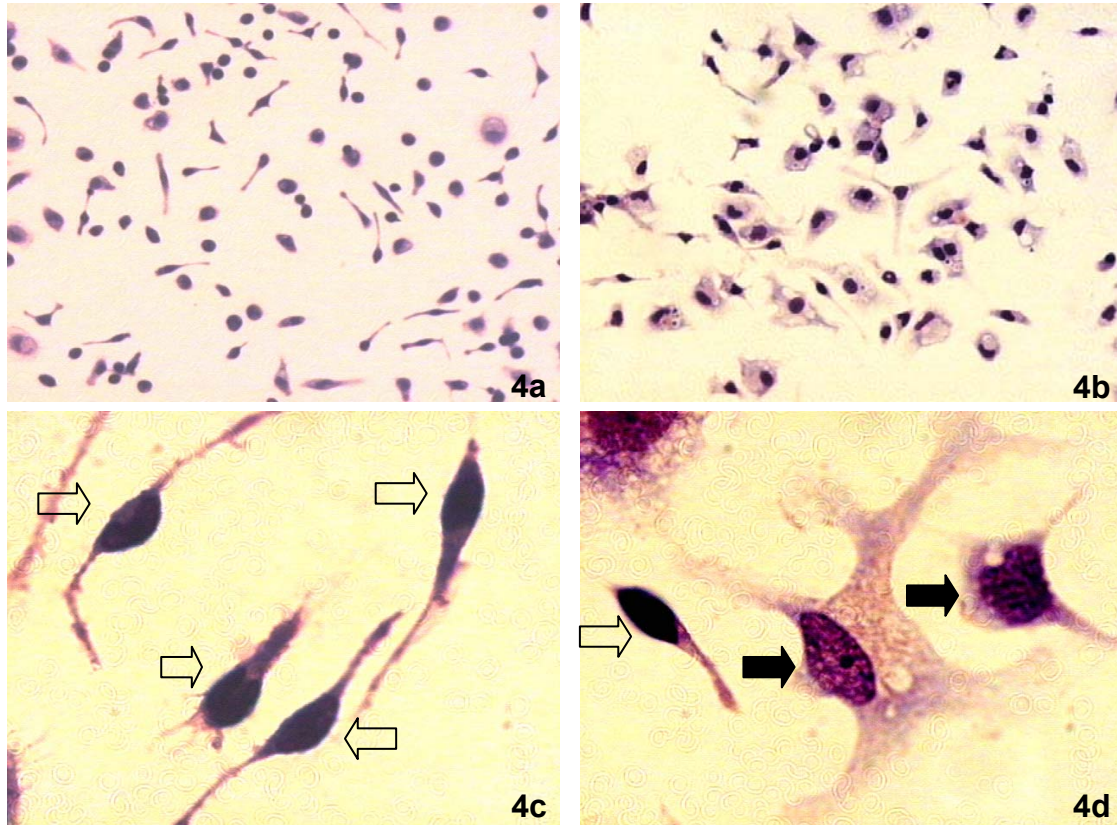
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

Para avaliar as alterações na morfologia dos macrófagos de animais caquéticos, células do exudato peritoneal foram isoladas aos 14 dias da inoculação das células Walker e cultivadas por 24 horas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, sendo então fixadas e avaliadas à microscopia ótica quanto à presença de macrófagos com características morfológicas de macrófagos residentes ou com características que indicavam ativação. O resultado de tais experimentos pode ser visualizado na figura 5, que mostra imagens representativas de macrófagos residentes e ativados no grupo controle (5a e 5c) e no grupo portador do tumor de Walker-256 com 14 dias de crescimento (5b e 5d). Macrófagos residentes possuem núcleo pequeno e escuro, poucas projeções citoplasmáticas e pouco espalhados sobre a lamínula de vidro. Macrófagos ativados possuem citoplasma aumentado, núcleo grande e claro, várias projeções citoplasmáticas e grande capacidade de espalhamento (BURGALETA *et al.*, 1978). Nas figuras 5a e 5b é possível observar a distribuição geral destas células em cada grupo. As figuras 5c e 5d mostram detalhes da morfologia de macrófagos residentes e ativados. É claramente observado que o grupo controle possui principalmente macrófagos residentes (indicados pelas setas abertas) e o grupo portador de tumor apresenta grande quantidade de macrófagos ativados (indicados pelas setas fechadas).

Os dados quantitativos da distribuição geral de macrófagos residentes e ativados nos grupos controle e portador de tumor estão representados na figura 6. Em cada um dos grupos foram contados 2500 macrófagos totais e os dados numéricos obtidos após a contagem foram submetidos à análise estatística como descrito em Materiais e Métodos no item 6.4. No grupo controle 67% dos macrófagos apresentaram características morfológicas de macrófagos residentes. No entanto, apenas 30% das células isoladas de animais portadores de tumor apresentavam características de macrófagos residentes, sendo que 70% apresentaram-se ativadas.

FIGURA 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos aderentes de animais sadios (controle) e de animais portadores do tumor de Walker-256, 14 dias após a inoculação, foram cultivados por 24 horas em placas contendo lamínulas de vidro, as quais foram processadas para microscopia óptica. Coloração: Giemsa. As micrografias desta figura são representativas.

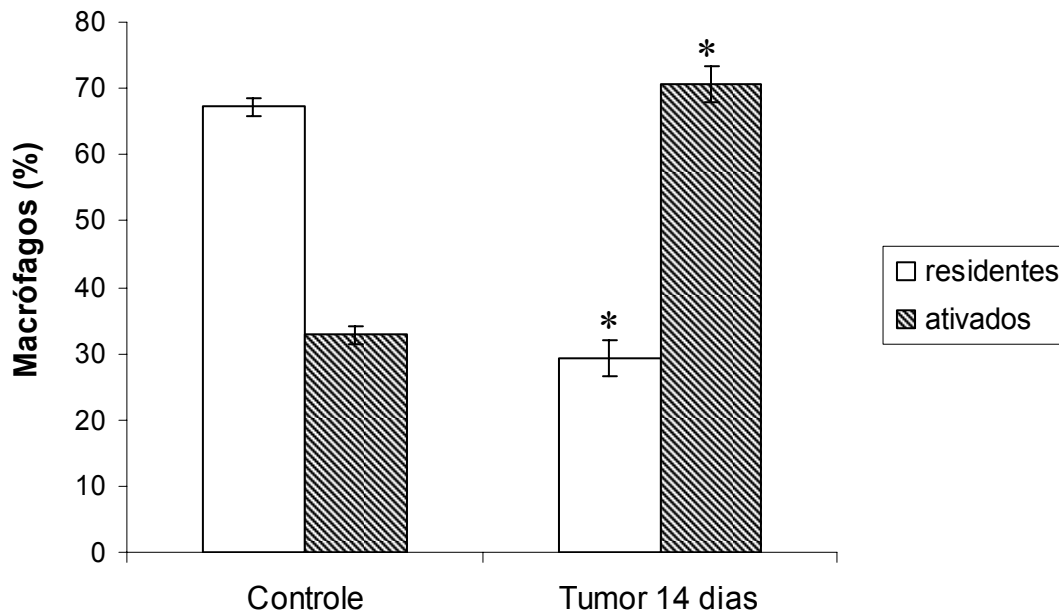
5a) distribuição geral de macrófagos do grupo controle (400X).

5b) distribuição geral de macrófagos de animais portadores de tumor (400X).

5c) macrófagos residentes (setas abertas) do grupo controle (1000X).

5d) macrófagos ativados (setas fechadas) e residente (seta aberta) do grupo portador de tumor.

FIGURA 6: DADOS QUANTITATIVOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256



Sistema: Macrófagos aderentes foram cultivados por 24 horas sobre lamínulas de vidro. Após incubação o meio foi removido e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram processadas para microscopia óptica. O número de macrófagos residentes e ativados foi contado. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

Estes resultados indicam que a presença do tumor elicit uma resposta inflamatória sistêmica. Embora o aumento nos níveis circulantes de inúmeras substâncias mediadoras da inflamação tenha sido observado em vários modelos animais e em pacientes com câncer, a avaliação das características morfológicas de macrófagos nestas condições tem sido pouco investigada. ARGILÉS *et al.* (2005b) sugere duas hipóteses básicas que podem explicar este fenômeno de ativação sistêmica. Em primeiro lugar, a hipótese denominada hipótese “endotóxica”, na qual o crescimento da massa tumoral promove um aumento na translocação de bactérias intestinais para a cavidade peritoneal e a endotoxina liberada neste processo conseqüentemente ativaria uma cascata de citocinas. Em segundo lugar, a hipótese do tumor, que envolve tanto compostos derivados das células tumorais quanto citocinas produzidas pelo tumor que engatilhariam a resposta inflamatória. Uma terceira hipótese, proposta por MCKEE *et al.* (1997), sugere que fragmentos da matriz extracelular podem também ser responsáveis pela ativação dos macrófagos nos sítios de inflamação não-infecciosa. Estes autores relatam que fragmentos de ácido hialurônico, que podem ser produzidos pela lesão tecidual decorrente da inflamação ou do crescimento tumoral, são capazes de induzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos. Adicionalmente, fragmentos de ácido hialurônico e de condroitim sulfato obtidos pela degradação com enzimas de origem bacteriana possuem propriedades anti-inflamatórias, enquanto aqueles obtidos pela degradação com enzimas de mamíferos possuem propriedades pró-inflamatórias (JOBE *et al.*, 2003)

Além das características morfológicas os macrófagos ativados possuem características funcionais que os identificam. Algumas destas funções foram avaliadas nos presente estudo e serão descritas a seguir.

7.2 ALTERAÇÕES NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR

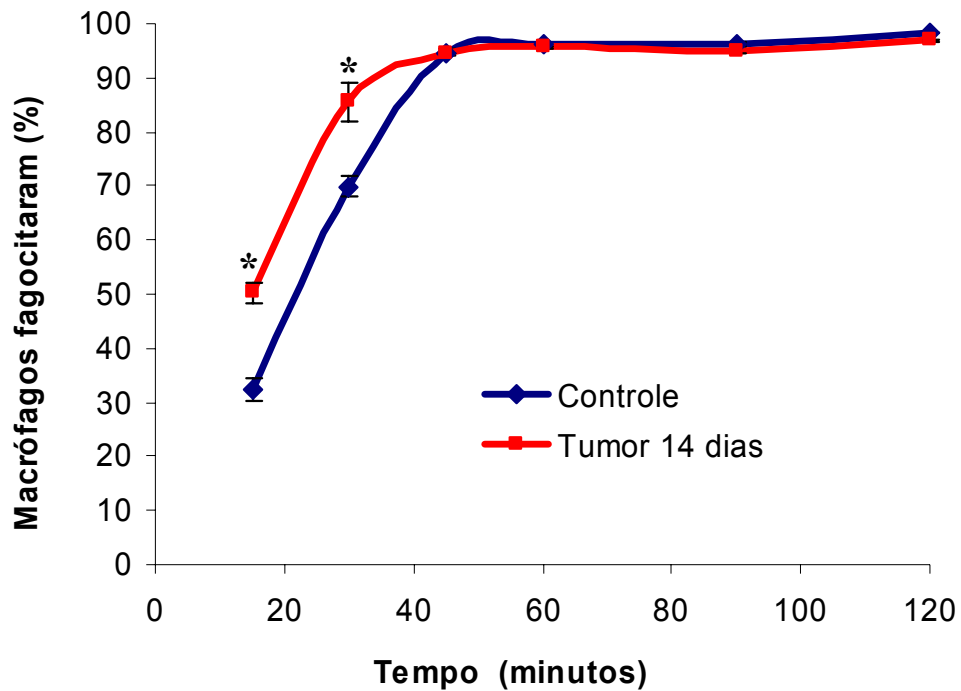
A fagocitose constitui a primeira linha da defesa imune contra elementos estranhos. Neste trabalho esta função foi avaliada em macrófagos de animais portadores do tumor de Walker-256 com 14 dias de crescimento, utilizando-se leveduras como partículas fagocíticas. A interação entre as leveduras e os

macrófagos foi acompanhada com o decorrer do tempo até um máximo de 120 minutos. A análise desta série experimental nos fornece dois parâmetros de grande relevância: 1) o número de macrófagos que realizaram fagocitose e 2) o número de leveduras fagocitadas por macrófago com o transcorrer do tempo de incubação. Os resultados obtidos nestes experimentos, em que um total de 25.444 células e 87.759 leveduras foram contadas, podem ser visualizados na figura 7 e na tabela II. A figura 7 mostra que a porcentagem de macrófagos que fagocitaram aumentou com o decorrer do tempo de incubação até que, no tempo de 45 minutos, um ponto de saturação foi alcançado tanto para o grupo controle quanto para o grupo portador de tumor, onde mais de 90% das células continham partículas fagocitadas em seus citoplasmas. Nos tempos de incubação anteriores a este ponto, entretanto, uma maior quantidade de células dos animais portadores de tumor havia fagocitado: aos 15 minutos de incubação o número de macrófagos que havia fagocitado já representava 50% da população de células nos animais portadores de tumor, enquanto que nos animais saudáveis, apenas 30%. Esta diferença se manteve com 30 minutos de incubação, onde a porcentagem de células que possuíam partículas fagocíticas em seus citoplasmas foi de 69% para o grupo controle e 86% para o grupo tratado.

A tabela II contém os dados quantitativos do número de leveduras fagocitadas por macrófago com o transcorrer do tempo. Pode-se observar que nos tempos iniciais de incubação os macrófagos dos ratos portadores de tumor foram capazes de fagocitar uma maior quantidade de leveduras do que as células do grupo controle: com 15 minutos de interação os macrófagos dos ratos portadores de tumor fagocitaram 86% mais leveduras. Esta diferença diminuiu com o decorrer do tempo de cultivo, sendo que com 30 minutos o aumento na quantidade de leveduras fagocitadas por macrófagos do grupo com tumor foi de 31% e, com 60 minutos, 22% em relação ao controle. Com 90 e 120 minutos de interação não houve diferença significativa entre o número de leveduras fagocitadas por macrófagos de ratos portadores de tumor de Walker-256 e ratos normais.

A figura 8 mostra imagens representativas da atividade fagocítica de macrófagos do grupo controle (8a, c, e, g) e do grupo portador de tumor (8b, d, f, h) cultivados por 15, 30, 60 e 120 minutos.

FIGURA 7: POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS QUE REALIZARAM FAGOCITOSE COM O TRANSCORRER DO TEMPO



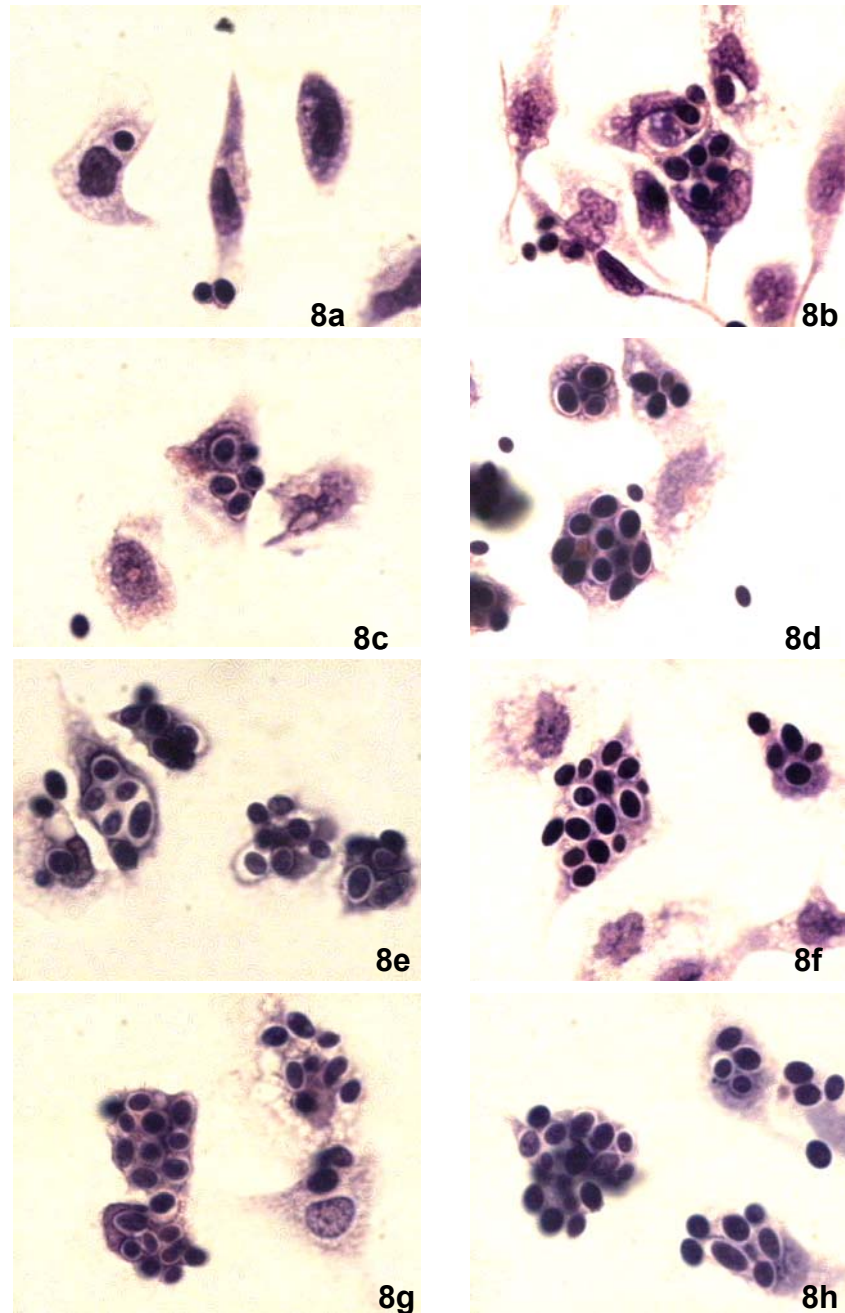
Sistema: Macrófagos aderentes foram cultivados por 24 horas sobre lamínulas de vidro. O sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas em meio sem SFB e incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após cada um dos tempos indicados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. O número total de macrófagos e o número de macrófagos que fagocitaram leveduras foram contados. A contagem foi realizada em aumento de 1000X. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

TABELA II: NÚMERO DE LEVEDURAS FAGOCITADAS POR MACRÓFAGO COM O TRANSCORRER DO TEMPO

Tempo (min)	Número de leveduras fagocitadas/ macrófagos	
	Controle	Tumor
15	1,60 ±0,06	2,98*±0,11
30	3,06 ±0,1	4,01*±0,32
60	4,80 ±0,04	5,84*±0,12
90	5,38 ±0,32	5,37 ±0,13
120	6,15 ± 0,13	6,37 ±0,18

Sistema: Macrófagos aderentes foram cultivados por 24 horas sobre lamínulas de vidro. O sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas em meio sem SFB e incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após cada um dos tempos indicados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. O número total de macrófagos que fagocitaram e o total de leveduras fagocitadas foram contados. A contagem foi realizada em aumento de 1000X. Os valores representam a média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. * Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

FIGURA 8: CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos aderentes foram cultivados por 24 horas sobre lamínulas de vidro. O sobrenadante foi removido, as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas em meio sem SFB e incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após cada um dos tempos indicados as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. As micrografias são representativas. Aumento: 1000X. 8a) controle 15 minutos; 8b) tumor 15 minutos; 8c) controle 30 minutos; 8d) tumor 30 minutos; 8e) controle 60 minutos; 8f) tumor 60 minutos; 8g) controle 120 minutos; 8h) tumor 120 minutos.

Os resultados mostram que os macrófagos de ratos portadores de tumor de Walker-256 possuem atividade fagocítica inicial maior que ratos controle, considerando que tanto uma maior porcentagem de células foi capaz de fagocitar leveduras, quanto um maior número de leveduras foi fagocitado por macrófagos nesta condição. Entretanto, o aumento na capacidade fagocítica não foi cumulativo, mostrando que, embora as células dos animais portadores de tumor sejam inicialmente mais eficientes, a capacidade fagocítica máxima alcançada à medida que as células fagocitam e se tornam ativadas foi igual para ambos os grupos.

Em concordância com os resultados apresentados no item anterior, o aumento da capacidade fagocítica indica que o desenvolvimento tumoral elicitava uma ativação sistêmica dos macrófagos. Embora a ativação das propriedades funcionais de macrófagos exerça um papel importante para atividade tumoricida do sistema imune (NATHAN *et al.*, 1987), ela também pode acarretar consequências adversas para os indivíduos. Um exemplo claro disto é a síndrome da ativação macrofágica, uma patologia causada pelo excesso de ativação e proliferação de macrófagos. Esta condição ocorre em um grupo heterogêneo de doenças como infecções, doenças autoimunes e neoplasias, cujas características clínicas incluem: febre persistente, hepatoesplenomegalia e anemia profunda (SAWHNEY *et al.*, 2001). O sinal mais característico da doença é a presença de um grande número de macrófagos fagocitando elementos hematopoiéticos. De maneira semelhante, CAVALCANTI *et al.* (2003) relatam que animais portadores do tumor de Walker-256 desenvolvem anemia a partir do 10º dia de implantação das células. Estes autores relatam também que há um aumento na fragilidade osmótica das células vermelhas do sangue nestes animais e que elementos encontrados no plasma de animais portadores de tumor são capazes de mimetizar este efeito. Adicionalmente, ratos portadores de tumor de Walker-256 normalmente apresentam hipertrofia do baço (RETTORI *et al.*, 1995). Outra similaridade entre as observações clínicas da síndrome da ativação macrofágica e o modelo de câncer estudado é que a hipertrigliceridemia está presente em 60% dos pacientes com a síndrome portadores de melanoma (CORDEL *et al.*, 2000) e níveis aumentados de ácidos graxos livres circulantes foram encontrados em animais portadores de tumor de Walker-256 (ARGILÉS; LÓPEZ-SORIANO, 1992). Embora não haja até o momento uma explicação clara para o fenômeno, estas observações em conjunto com os

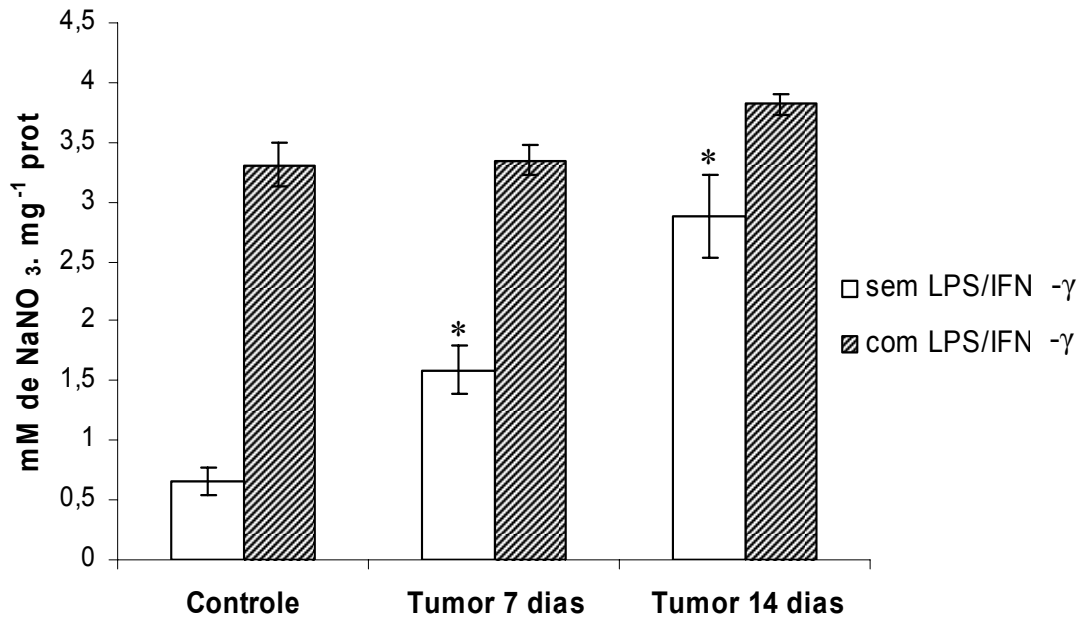
resultados aqui obtidos reforçam a sugestão de que a ativação exacerbada do sistema imune, mais especificamente a ativação macrofágica, pode ser em parte responsável pelos sintomas adversos observados em animais caquéticos portadores do tumor de Walker-256. Os fatores desencadeantes desta ativação, entretanto, permanecem desconhecidos.

7.3 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

7.3.1 Produção de óxido nítrico

Outra importante via pela qual os macrófagos exercem a sua função é a via de produção de óxido nítrico (NO^\bullet), molécula que atua como parte da resposta inflamatória e tem sido proposta como importante efetora da atividade tumoricida (MIWA *et al.*, 1997). A produção de NO^\bullet ocorre em resposta ao estímulo produzido principalmente por $\text{IFN-}\gamma$ e LPS (STUEHR; MARLETTA, 1985; JAMES, 1995). No presente estudo a produção NO^\bullet oriunda da atividade da enzima iNOS foi determinada em experimentos de 48 horas de duração, desenvolvidos na ausência ou presença de $\text{IFN-}\gamma$ e LPS. Foram utilizados animais saudáveis como controle e animais portadores de tumor de Walker-256 no 7º e no 14º dia após a inoculação das células cancerígenas, com o intuito de acompanhar a produção desta RNS com o decorrer do desenvolvimento tumoral e da manifestação do estado caquético. A figura 9 mostra os resultados obtidos nestes experimentos, onde se pode observar que o crescimento tumoral foi acompanhado por um aumento progressivo na capacidade de produção de NO^\bullet pelos macrófagos. Macrófagos de ratos portadores de tumor 7 dias após a inoculação mostraram-se capazes de produzir 2,4 vezes mais NO^\bullet do que células de animais saudáveis. Quatorze dias após a inoculação do tumor, os macrófagos produziram praticamente o dobro da quantidade de NO^\bullet produzido por animais com 7 dias de crescimento tumoral, valor 4,4 vezes maior que o controle. Nenhum estímulo adicional da produção de NO^\bullet na presença de $\text{IFN-}\gamma$ e LPS foi encontrado em animais portadores de tumor em relação ao controle também

FIGURA 9: PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos peritoneais foram isolados de ratos Wistar portadores de tumor de Walker com 7 e 14 dias de crescimento. Ratos saudáveis foram utilizados como controle. Após aderência, as células foram cultivadas em meio MEM na ausência ou presença de $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LPS + $26\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IFN- γ . Após 48 horas o sobrenadante foi utilizado para determinação da produção de NO pelo método de Griess. Os valores representam a média \pm SEM de 7 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

estimulado. Entretanto, a diferença entre a produção basal de NO[•] e a produção estimulada por IFN- γ e LPS diminuiu com o decorrer do crescimento tumoral, chegando a ser quase 3 vezes menor que o controle em animais portadores de tumor com quatorze dias de crescimento. Nesta condição a produção de NO[•] por macrófagos não estimulados foi apenas 24% menor que a produção desta RNS em células estimuladas.

Estes resultados indicam que os níveis basais de NO[•] produzido por macrófagos peritoneais estão excessivamente aumentados em ratos portadores de tumor. Adicionalmente, o aumento na produção de NO[•] parece estar correlacionado com o desenvolvimento da massa tumoral e, conseqüentemente com o desenvolvimento das manifestações da caquexia. Níveis plasmáticos aumentados de NO[•] já foram descritos para pacientes com câncer gástrico e carcinoma colorretal (BAKAN *et al.*, 2002; SZALECZKY *et al.*, 2000), refletindo uma alteração no estado oxidante/antioxidante. Embora esta molécula seja considerada importante efetora da atividade antitumoral (HIBBS *et al.*, 1988), a produção exacerbada de NO[•] por longos períodos, como demonstrado neste trabalho em animais portadores de tumor de Walker-256, pode levar a danos no DNA, resultando em morte celular, mutações e até câncer (ALEXANDROVA, 2001). O excesso de NO[•] produzido em tecidos inflamados pode também ocasionar a nitração da proteína p53 supressora de tumor (TAPIEIRO *et al.*, 2002), contribuindo com a carcinogênese e progressão tumoral. Adicionalmente, esta espécie radicalar pode estar envolvida com a perda de massa muscular. Em um modelo de perda muscular murina, o TNF- α induziu estresse oxidativo e síntese de óxido nítrico sintase (NOS) no músculo esquelético. O tratamento com antioxidantes, α -tocoferol, BW755c ou inibidor da óxido nítrico sintase previniu a perda muscular e as anormalidades moleculares do músculo esquelético (BUCK; CHOJKIER, 1996). Estas evidências em associação com os resultados obtidos no presente estudo reforçam a sugestão de que esta espécie radicalar contribui de alguma maneira para o fenômeno que leva à caquexia.

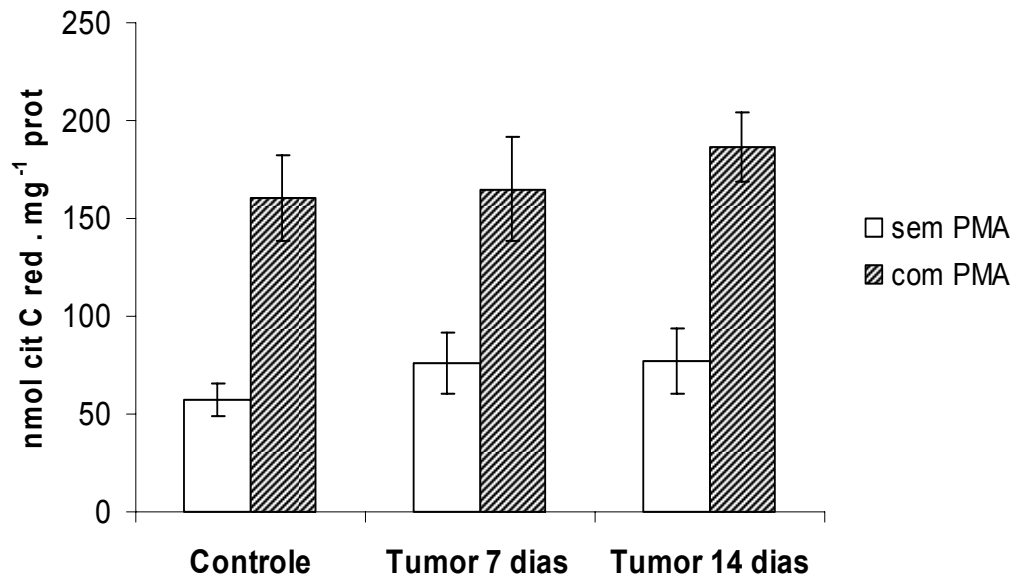
7.3.2 Produção de espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido e peróxido de hidrogênio

A produção de $O_2^{\bullet-}$ resultante da atividade da NADPH oxidase está mostrada na figura 10. Nesses experimentos foram utilizados animais sadios como controle e animais portadores de tumor de Walker-256 no 7º e no 14º dia após a inoculação das células cancerígenas no flanco direito, para monitorar a produção deste radical livre com o decorrer do desenvolvimento tumoral. As condições experimentais incluíram também a adição de PMA, um agente conhecido por seu efeito estimulador do “burst” respiratório *in vitro* (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Nesta figura pode-se observar que sob estas condições experimentais não houve diferença significativa entre a produção de $O_2^{\bullet-}$ por macrófagos de animais controle e portadores de tumor, na ausência ou presença de PMA.

Outra espécie reativa de oxigênio (ROS) identificada como efetora da atividade antitumoral é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NATHAN *et al.*, 1979). A produção desta ROS, resultante da ação da superóxido dismutase, em macrófagos de ratos normais e portadores de tumor de Walker-256 com 7 ou 14 dias de crescimento pode ser visualizada na figura 11. Os resultados destes experimentos mostraram que os macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor com 14 dias de desenvolvimento foram capazes de produzir quase 4 vezes mais H_2O_2 que macrófagos de ratos controle na ausência de PMA. Nenhuma diferença significativa foi observada entre a produção basal de H_2O_2 por macrófagos de ratos com tumor de 7 dias de crescimento e ratos controle, assim como não houve diferença entre a produção desta espécie reativa de oxigênio por células estimuladas com PMA em ratos portadores de tumor (7 ou 14 dias) e ratos sadios.

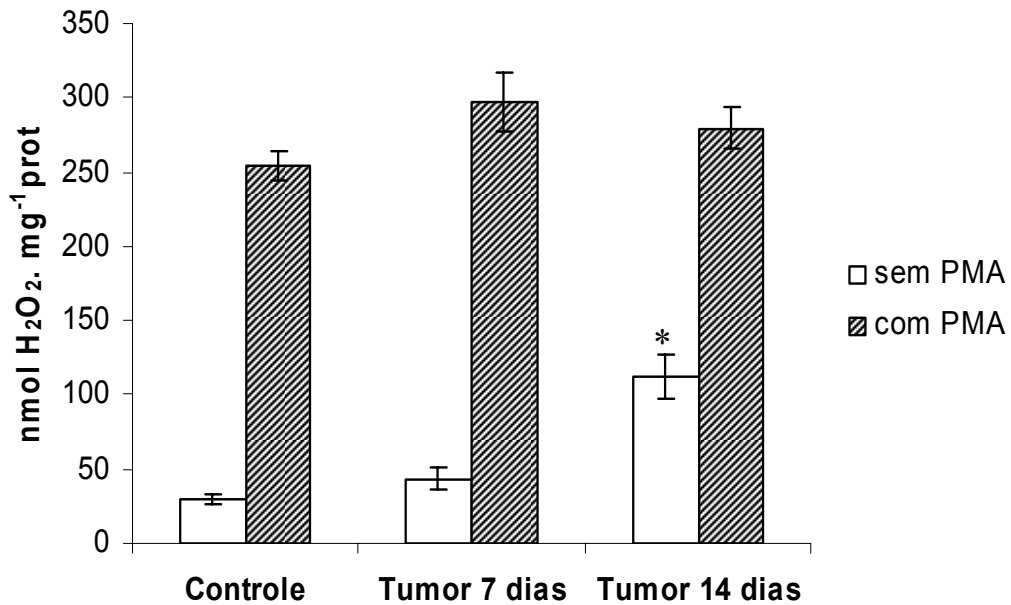
Nossos resultados indicam que apesar de não haver aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ em macrófagos de ratos com tumor, há um estímulo significativo na produção basal de H_2O_2 em células de animais portadores de tumor com 14 dias de desenvolvimento. Como as reações de produção destas duas espécies reativas de oxigênio estão interrelacionadas, onde o H_2O_2 é formado a partir da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela superóxido dismutase, níveis discrepantes destas ROS podem ser resultantes de uma alteração na atividade de enzimas antioxidantes, como a própria

FIGURA 10: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos isolados de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 7 e 14 dias após a inoculação e de ratos saudáveis foram plaqueados em placas de 96 poços. Após aderência, as células foram incubadas com meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c ($80\mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença ou ausência de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PMA. Após 2 horas a absorbância foi medida em 550 nm e a concentração de citocromo c reduzido, correspondente à concentração de ânion superóxido formado, foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar para a mistura citocromo $c_{\text{oxid-red}}$ ($\Delta\varepsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os valores representam a média \pm SEM de 9 experimentos independentes para cada um dos grupos.

FIGURA 11: PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos isolados de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 7 e 14 dias após a inoculação e de ratos saudáveis foram plaqueados em placas de 96 poços. Após aderência, as células foram incubadas com meio de reação constituído de uma solução de vermelho de fenol (0,2 g.L⁻¹) e horseradish-peroxidase (19 U.mL⁻¹) em HBSS, na presença ou ausência de 1µg.mL⁻¹ de PMA. Após 2 horas 10 µL de NaOH (1mol.L⁻¹) foram adicionados em cada poço e absorbância foi medida em comprimento de onda de 610 nm. Os valores representam a média ± SEM de 5 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle (p≤0,05).

superóxido dismutase ou a catalase, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio. Este fenômeno pode decorrer de um mecanismo de auto-proteção das células estimuladas contra a toxicidade das espécies reativas de oxigênio geradas intracelularmente (PEREIRA *et al.*, 1995). Embora os mecanismos de regulação destas enzimas em macrófagos tenham sido pouco investigados, sabe-se que hormônios tireoideanos, insulina, epinefrina e glucocorticóides são capazes de modular a atividade das enzimas antioxidantes e a produção de H_2O_2 em macrófagos (PEREIRA *et al.*, 1995). Neste contexto, a epinefrina parece exercer um papel importante, haja visto que receptores β -adrenérgicos já foram identificados em células do sistema imune (CREMASCHI *et al.*, 1991). Outros estudos mostram ainda que este hormônio é capaz de estimular a produção de H_2O_2 em macrófagos (COSTA-ROSA *et al.*, 1992) e que a remoção da medula adrenal reduz a produção desta ROS em macrófagos de ratos além de reduzir a atividade da Mn-superóxido-dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (PEREIRA *et al.*, 1995). Adicionalmente, a epinefrina parece estar relacionada com a caquexia, já que a infusão deste hormônio em humanos produz algumas características da síndrome (DROTT *et al.*, 1989). Este fato parece ser importante, pois os níveis plasmáticos de epinefrina em ratos portadores do tumor de Walker-256 encontram-se elevados e este hormônio é capaz de afetar o metabolismo de células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) aumentando a produção de prostaglandina E-2 (SEELAENDER, 1999).

Para investigar a hipótese de uma possível alteração no sistema enzimático antioxidante de macrófagos em ratos portadores de tumor de Walker-256, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar a atividade enzimática da catalase. Entretanto, como pode ser observado na tabela III, não houve diferença significativa entre a atividade desta enzima em animais portadores de tumor e animais sadios, indicando que a catalase não deve estar envolvida com o fenômeno observado. O possível envolvimento da superóxido dismutase neste fenômeno não pode ser excluído, embora mais estudos complementares sejam necessários para comprovar esta hipótese.

O fato de não haver estímulo na produção de $O_2^{\bullet-}$ em macrófagos peritoneais de ratos portadores do tumor de Walker-256 levanta ainda a questão da real importância desta substância para a atividade citotóxica neste modelo de câncer.

TABELA III: ATIVIDADE DA CATALASE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

Atividade Catalase ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	
Controle	122 \pm 19
Tumor 14 dias	123 \pm 19

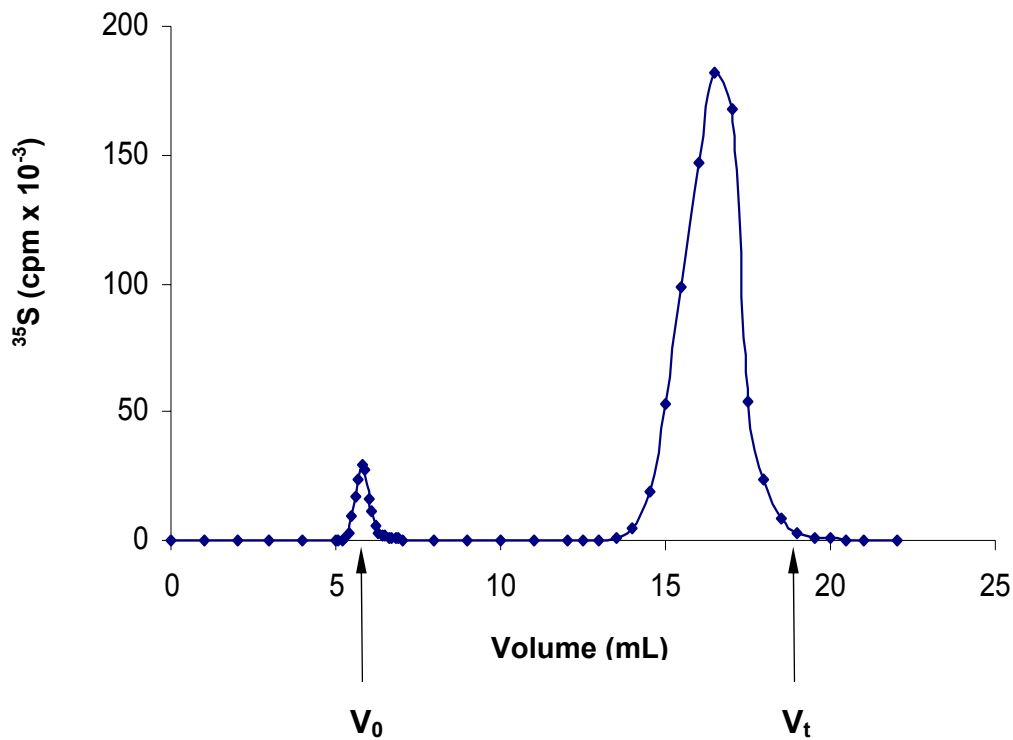
Sistema: Macrófagos de ratos controle e portadores de tumor (14 dias após a inoculação) foram isolados por aderência em placas de Petri plásticas. As células foram removidas das placas, lisadas por ciclos de congelamento/descongelamento, homogeneizadas em van Potter e centrifugadas por 15 minutos a 10000G. O sobrenadante foi utilizado para análise da atividade enzimática e dosagem de proteína. O sistema de reação era composto de tampão fosfato 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A reação foi iniciada pela adição de diferentes quantidades do sobrenadante de células ao sistema e a decomposição do H_2O_2 acompanhada através do decréscimo da absorbância em comprimento de onda de 232 nm. Os valores representam a média \pm SEM de 5 experimentos independentes para cada um dos grupos.

Embora o papel tumoricida destes intermediários reativos de oxigênio esteja amplamente documentado (NATHAN *et al.*, 1979), outros estudos mostram que estas substâncias nem sempre estão relacionadas com a atividade citotóxica de macrófagos. KLEINERMAN *et al.*, (1985) mostraram que a lise de células de melanoma A357 por monócitos humanos em um ensaio de longa duração (72 horas) é independente da geração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Estes autores relataram também que monócitos circulantes de pacientes portadores de granulomatose crônica, que são incapazes de produzir espécies radicalares de oxigênio, não apresentam diferença na atividade citotóxica contra células tumorais em comparação com o controle. Outros autores mostraram que a atividade citotóxica de macrófagos contra células tumorais da linhagem L929 é basicamente dependente do óxido nítrico e independente de H_2O_2 ou $TNF-\alpha$ (NASCIMENTO *et al.*, 1998). Decréscimo na produção de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos circulantes também já foi relatado num modelo de nefroma mesoblástico em ratos, sendo que este fenômeno foi considerado pelos autores como um indicador do estágio avançado do câncer (SZUCS *et al.*, 1996). Estes autores sugerem ainda, que um fator presente no plasma de ratos portadores deste modelo de câncer possa ser responsável pela inibição da proteína quinase C, impedindo a translocação dos componentes citosólicos da NADPH-oxidase.

7.4 PRODUÇÃO DE PROTEOGLICANOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

É amplamente reconhecido que monócitos e macrófagos são capazes de produzir e liberar proteoglicanos com cadeias de condroitim, heparam e dermatam sulfato quando cultivados *in vitro* (UHLIN-HANSEN; KOLSET, 1987; ELLYOT-BRYANT *et al.*, 1999; PETRICEVICH; MICHELACCI, 1990). Com a finalidade de avaliar a produção destas macromoléculas durante um processo de caquexia macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ratos normais e portadores do tumor de Walker-256 no 14º dia após o implante das células foram expostos ao $^{35}SO_4$ por 24 horas. O $^{35}SO_4^{-2}$ é incorporado em grande quantidade nos proteoglicanos em culturas de monócitos e macrófagos (UHLIN-HANSEN; KOLSET, 1988). Nestes experimentos, o $^{35}SO_4^{-2}$ não incorporado pôde ser separado daquele preso aos proteoglicanos por uma cromatografia de exclusão em Sephadex G-50. A figura 12

FIGURA 12: PERFIL DE ELUIÇÃO DOS PROTEOGLICANOS PRODUZIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS



Sistema: Macrófagos peritoneais isolados de ratos sadios (controle) e de ratos portadores de tumor de Walker-256 (14 dias após a inoculação) foram cultivados em placas de 6 poços por 24 horas em meio MEM contendo $^{35}\text{SO}_4$ ($50 \mu\text{Ci/mL}$). As frações contendo os proteoglicanos foram eluídas em Sephadex G-50 com uma solução salina tamponada (pH 7,4) contendo 0,1% de SDS. O pico menor, eluído no volume morto (V_0) representa a fração contendo o $^{35}\text{SO}_4^{-2}$ incorporado aos proteoglicanos. O pico maior representa a fração contendo o $^{35}\text{SO}_4^{-2}$ não incorporado.

mostra o perfil de eluição dos proteoglicanos produzidos pelos macrófagos (pico menor, eluído no volume morto) e do $^{35}\text{SO}_4^{-2}$ não incorporado (pico maior). A quantidade total de ^{35}S -proteoglicanos sintetizados, liberados para o meio ou associados às células, está apresentada na tabela IV. Verifica-se nesta tabela que em ambos os grupos cerca de 15% dos proteoglicanos totais produzidos encontravam-se associados às células enquanto aproximadamente 85% foram liberados para o meio de cultura. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por outros autores (KOLSET, 1986 e PETRICEVICH; MICHELACCI, 1990), onde cerca de 80% dos proteoglicanos produzidos por macrófagos foram recuperados no meio de cultura após 20 horas de cultivo. A tabela IV mostra ainda que macrófagos isolados de ratos portadores do tumor de Walker-256 foram capazes de sintetizar 40% mais ^{35}S -macromoléculas do que macrófagos de ratos saudáveis. Este estímulo ocorreu como consequência de um aumento tanto nos proteoglicanos liberados para o meio (34%) quanto naqueles associados à célula (53%).

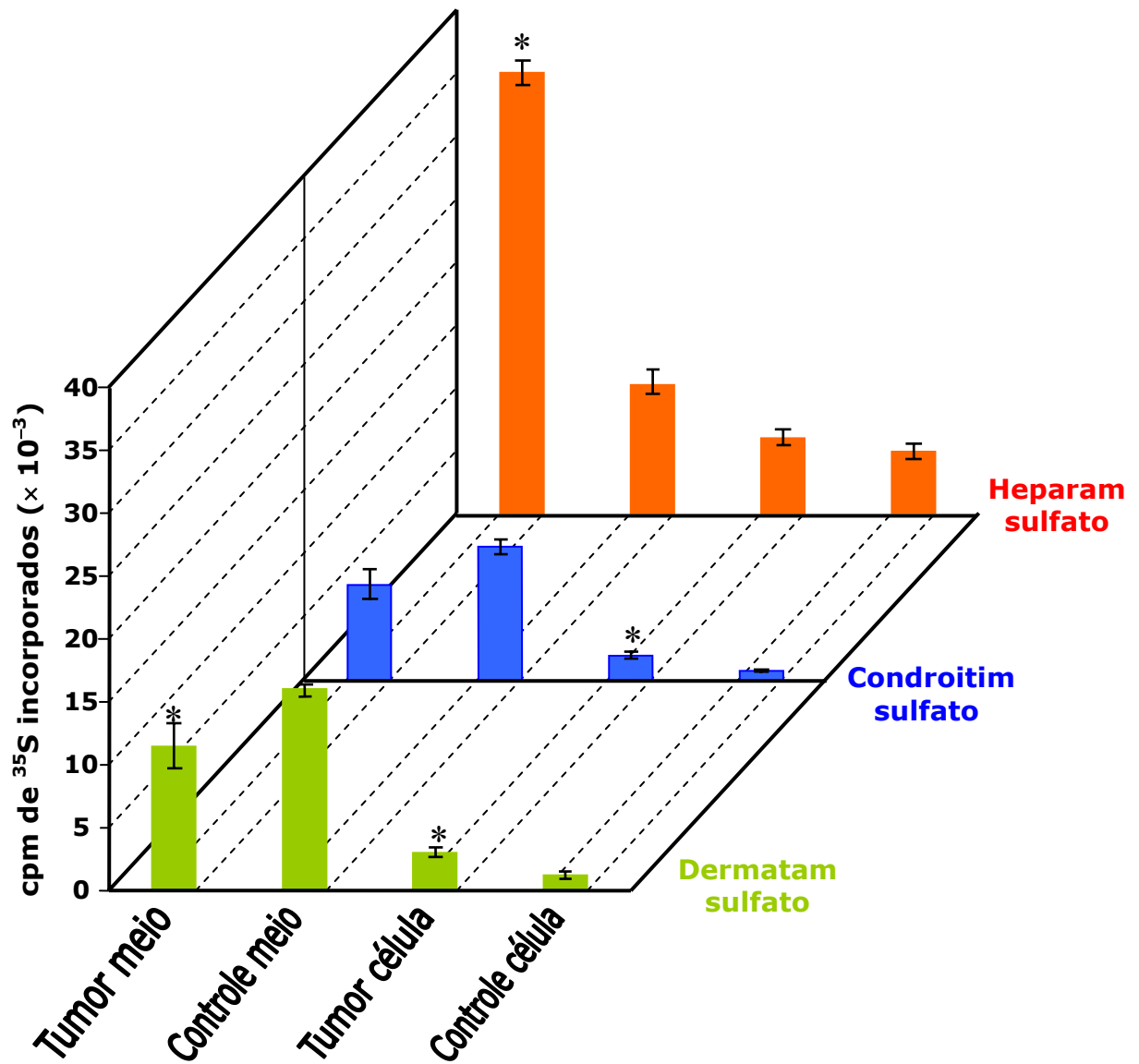
Com a finalidade de caracterizar os diferentes tipos de glicosaminoglicanos produzidos por macrófagos de ratos caquéticos portadores do tumor de Walker e de ratos saudáveis, os ^{35}S -proteoglicanos isolados do meio de cultura e aqueles associados à membrana celular foram submetidos à degradação com mucopolissacaridasas específicas, nomeadamente as condroitinases ABC, AC e a heparitinase. Esta estratégia experimental possibilitou a discriminação entre condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, tendo em vista a especificidade destas enzimas quanto ao tipo de ligação sobre as quais atuam. A condroitinase ABC age degradando polissacarídeos constituídos de condroitim 4-, condroitim 6- e dermatam sulfato. A condroitinase AC degrada somente condroitim 4- e 6-sulfato (YAMAGATA *et al.*, 1968) e a heparitinase I polissacarídeos de heparam sulfato e heparina (LINHARDT, 1990). Os resultados desta série de experimentos foram apresentados na figura 13 onde se verifica para os macrófagos dos animais controle que as cadeias de ^{35}S -glicosaminoglicanos liberadas para o meio (controle meio) consistiram em aproximadamente 40% dermatam sulfato, 30% condroitim sulfato e 30% heparam sulfato, dados consistentes com aqueles descritos por ELLYOT-BRYANT (1999). Já para a fração associada à célula (controle célula), o principal ^{35}S -glicosaminoglicano produzido foi o heparam sulfato, representando 70% e aquele produzido em menor quantidade foi o condroitim sulfato,

TABELA IV: PRODUÇÃO DE ³⁵S-PROTEOGLICANOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

	<i>Total de ³⁵S- macromoléculas (cpm)</i>	<i>Célula</i>		<i>Meio</i>	
		cpm	(%)	cpm	(%)
Controle	47704 ± 760	6901 ± 306	(16)	40802 ± 1379	(84)
Tumor	65178* ± 1632	10633* ± 341	(14)	54545* ± 2168	(86)

Sistema: Macrófagos peritoneais isolados de ratos sadios (controle) e de ratos portadores de tumor de Walker-256 (14 dias após a inoculação) foram cultivados em placas de 6 poços por 24 horas em meio MEM contendo ³⁵SO₄ (50 μCi/mL). As frações contendo os proteoglicanos liberados para o meio e aquelas contendo os proteoglicanos associados à célula foram eluídas em Sephadex G-50 com uma solução salina tamponada (pH 7,4) contendo 0,1% de SDS. As frações excludentes, que continham as ³⁵S-macromoléculas, foram coletadas para análise do conteúdo radioativo. Os valores foram expressos em cpm/5x10⁶ células e representam a média ± SEM de 7 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle (p≤0,05).

FIGURA 13: ^{35}S -GLICOSAMINOGLICANOS PRODUZIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256



Sistema: As frações contendo proteoglicanos produzidos por macrófagos peritoneais de ratos controle e de ratos portadores de tumor de Walker-256 (14 dias de crescimento) que haviam sido liberadas para o meio e aquelas que continham as proteoglicanos associados à célula foram submetidas à degradação enzimática com 0,15 unidades de condroitinase ABC, 0,15 unidades de condroitinase AC ou com 0,01 unidades de heparitinase. Os produtos de degradação foram separados por cromatografia em colunas de Sephadex G-100 (0,7X42 cm). Condroitim [^{35}S]sulfato foi determinado pela quantidade de radioatividade sensível à condroitinase AC. Dermatam [^{35}S]sulfato foi determinado pela quantidade de radioatividade resistente à condroitinase AC, mas sensível à condroitinase ABC. Heparan [^{35}S]sulfato foi determinado pela radioatividade resistente à condroitinase ABC, mas sensível à degradação pela heparitinase. Os resultados foram expressos em cpm/ 5×10^6 células e representam a média \pm SEM de 5 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

representando 12% do total para esta fração. Macrófagos de ratos portadores de tumor apresentaram um aumento de 3,5 vezes na quantidade de heparam sulfato produzido e liberado para o meio (tumor meio) e um decréscimo de 30% no montante de dermatam sulfato em relação ao controle, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido demonstrada para cadeias constituídas de condroitim sulfato. Dermatam e condroitim sulfato presentes na fração celular de macrófagos de ratos com tumor aumentaram 2,4 vezes em relação ao controle. Diferença significativa não foi observada para as cadeias de heparam sulfato nesta fração. Entretanto, de maneira semelhante ao controle, o heparam sulfato também constituiu o principal ³⁵S-glicosaminoglicano associado à célula. Um dado importante a se extrair destes resultados é a relação condroitim/heparam sulfato que é aproximadamente 5 vezes menor em ratos com tumor em relação ao controle, decorrente do aumento na produção de heparam sulfato.

Os resultados aqui obtidos sugerem uma correlação positiva entre ativação e produção de proteoglicanos por macrófagos isolados de animais caquéticos. Na verdade, o aumento da produção destas macromoléculas sulfatadas pode estar relacionado mais especificamente com a inflamação decorrente da presença do tumor. Tal proposição encontra suporte também em uma série de evidências da literatura. A primeira é a de que processos inflamatórios geram um aumento do “turnover” de proteoglicanos e de componentes da matriz extracelular (JULIANO; HASKILL, 1993). Vale mencionar com relação aos macrófagos, que o aumento na produção de proteoglicanos foi observado também em ratos tratados com injeções intraperitoneais da proteína amilóide sérica A, uma proteína inflamatória de fase aguda (ELLYOT-BRYANT *et al.*, 1999). Os resultados obtidos por estes autores se assemelham aos aqui descritos, já que um aumento principalmente na quantidade de heparam sulfato foi observado. A proteína amilóide sérica A também foi capaz de estimular a síntese de proteoglicanos em macrófagos em ensaios *in vitro*. Por outro lado, macrófagos isolados de camundongos “nude” atímicos, muito embora apresentem características funcionais de macrófagos ativado (sem processo inflamatório estabelecido), produzem quantidades menores de proteoglicanos do que macrófagos de animais sadios (PETRICEVICH; MICHELACCI, 1990). Ainda, macrófagos estimulados *in vitro* com LPS também produzem quantidades diminuídas de proteoglicanos (MICHELACCI; PETRICEVICH, 1991). Portanto, é

provável que diferentes mecanismos estejam relacionados com a regulação da síntese de proteoglicanos por macrófagos peritoneais. Estas observações permitem inferir que o processo de ativação *per se* não é exclusivamente responsável pelo aumento da síntese destas macromoléculas, onde a inflamação parece ter uma relação mais direta. Neste sentido, pode ser que substâncias inflamatórias como as proteínas de fase aguda exerçam um papel preponderante. A síntese destas proteínas da inflamação está aumentada em pacientes caquéticos com câncer e parece ser direcionada por citocinas (ARGILÉS *et al.*, 2005a).

Embora no presente estudo a excreção urinária de proteoglicanos não tenha sido avaliada, o aumento da síntese e liberação dos proteoglicanos pelos macrófagos em animais portadores do tumor de Walker-256 fornece também um forte indício de que as células de defesa possam ser responsáveis pela produção de moléculas como o PIF e o azaffig, os quais são reconhecidos como mediadores diretos da caquexia (TODOROV *et al.*, 1996a; FIGUEROA *et al.*, 1999a). Esta hipótese é reforçada por outros resultados obtidos neste trabalho, de que a produção de espécies reativas também está aumentada em macrófagos de ratos com tumor de Walker e de que os macrófagos constituem a principal fonte de citocinas, moléculas intimamente relacionadas com a síndrome. Outro aspecto a ser destacado refere-se ao aumento evidenciado na liberação de heparam sulfato pelos macrófagos dos animais portadores do tumor. Alguns autores mostram que ocorre aumento da excreção urinária de heparam sulfato em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (MARTINS *et al.*, 2000). Este aumento não parece ser consequência do aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos do tumor, já que neste caso a molécula majoritariamente produzida é o condroitim sulfato (SAMPAIO *et al.*, 1977). Na realidade, a urina de pacientes com este tipo de câncer apresenta um decréscimo de aproximadamente 4 vezes na razão condroitim/heparam sulfato comparado com pacientes saudáveis. Como já mencionado, nossos resultados demonstram que esta razão é quase 5 vezes menor em macrófagos de ratos com tumor em relação ao controle. O aumento na produção de heparam sulfato por macrófagos peritoneais neste modelo de caquexia associada ao câncer poderia ser refletido sistemicamente, aumentando a excreção deste glicosaminoglicano. A excreção aumentada de glicosaminoglicanos também já foi relatada em pacientes com leucemia, linfoma e

câncer de próstata (DE KLERK; WERELY, 1988; LUIKART *et al.*, 1989; STRISCIUGLIO *et al.*, 1989).

O aumento da produção de heparam sulfato pelos macrófagos dos animais portadores de tumor permite algumas especulações, tendo em vista as funções associadas com este tipo de molécula que envolvem interações com componentes da matriz extracelular (DAVID, 1993), participação na formação de pontos de adesão focal (WOODS; COUCHMAN, 1996) e controle do crescimento celular (DIETRICH; ARMELIN, 1978; DIETRICH *et al.*, 1982). Quanto a este último aspecto, o heparam sulfato pode agir como molécula estimuladora ou inibidora, dependendo do modelo experimental utilizado. A ação como um modulador positivo da proliferação celular ocorre devido a sua capacidade de se ligar e agir como co-receptor para fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Inúmeras abordagens experimentais, entretanto, indicam que este glicosaminoglicano pode funcionar como inibidor da proliferação celular. Em experimentos *in vitro*, proteoglicanos de heparam sulfato mantiveram células de músculo liso em um estado quiescente (PORCINATTO *et al.*, 1999). Esta molécula também foi capaz de inibir a síntese de DNA em células normais e cancerígenas (FURUKAWA; BHAVANANDAN, 1981). A expressão de heparam sulfato extracelular pode ainda influenciar o gradiente de moléculas quimioatrativas nas regiões onde é liberada. Sabe-se que este glicosaminoglicano é capaz de se ligar a citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ , retendo-as próximo aos seus sítios de secreção e dirigindo a resposta de células TCD4 para o fenótipo Th1 (HASAN *et al.*, 1999), cuja principal ação efetora é a ativação de macrófagos (JANEWAY *et al.*, 2002). Considerando que os macrófagos secretam centenas de substâncias cujas ações estão muitas vezes interrelacionadas, não é improvável que o estímulo da síntese de proteoglicanos esteja de alguma forma ligado à regulação da atividade de fatores de crescimento e citocinas durante a inflamação. Assim, o aumento da liberação de proteoglicanos de heparam sulfato em macrófagos de ratos portadores de tumor de Walker-256 pode ser responsável por modular a ação ou mesmo a secreção de moléculas sinalizadoras e auxiliar o direcionamento da resposta inflamatória mediada por células Th1, aumentando grandemente a eficiência dos macrófagos e amplificando a resposta imune.

Nossos resultados também mostram significância relevante com relação aos valores aumentados das quantidades de dermatam e condroitim sulfato da fração associada à célula em ratos portadores de tumor. GARNIER *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento enzimático de células “natural killer” com condroitinase ABC resultou em redução substancial da secreção de IFN- γ estimulada por IL-12. Este resultado não foi reproduzido com outras mucopolissacaridases, indicando que condroitim e dermatam sulfato são as moléculas críticas para tal efeito. A explicação para esse fenômeno pode estar relacionada à existência de um mecanismo de ação semelhante ao da heparina com o FGF-2, onde a cadeia do polissacarídeo agiria como co-receptor para a IL-12, ou ainda, a interação entre um componente do receptor e o glicosaminoglicano seria fundamental para sua ação. Como o principal glicosaminoglicano encontrado nas células tanto de animais portadores de tumor quanto de animais sadios foi o heparam sulfato, que também é capaz de se ligar a citocinas como a IL-12, o aumento de condroitim e dermatam sulfato em ratos portadores de tumor pode indicar um estímulo adicional na interação desta molécula sinalizadora, novamente direcionando para o fenótipo Th1 da imunidade mediada por células.

Portanto, o estudo do perfil de proteoglicanos produzidos por macrófagos peritoneais de ratos portadores do tumor de Walker-256 fornece evidências relevantes que corroboram com o possível papel regulador da resposta imune por estas macromoléculas e sua associação com a inflamação. Nossos resultados sugerem ainda a hipótese de que os proteoglicanos isolados da urina de pacientes caquéticos capazes de induzir a síndrome em modelos animais poderiam ser produzidos por células de defesa como os macrófagos.

7.5 EFEITOS DO CONDRITIM-4-SULFATO SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

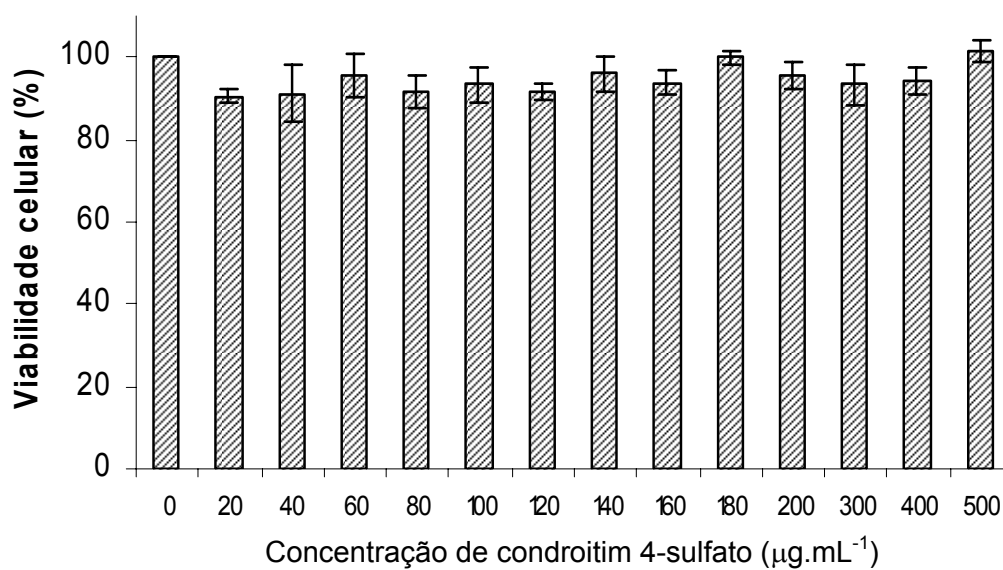
Os experimentos realizados nesta etapa do trabalho tiveram a finalidade de avaliar efeitos de cadeias de glicosaminoglicanos sobre a modulação de macrófagos, ajudando a esclarecer a função biológica destas macromoléculas no contexto da inflamação e caquexia associadas ao câncer. Os ensaios foram

realizados com o glicosaminoglicano condroitim 4-sulfato, um polissacarídeo sulfatado constituído de unidades dissacarídicas repetitivas formadas por β -D-N-acetilgalactosamina e ácido β -D-glucurônico ligados por ligações $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$, com o sulfato anexado ao carbono 4 do açúcar aminado. Em ensaios de atividade biológica é usualmente necessário o estabelecimento de concentrações ideais para incubação da molécula a ser estudada, de forma a evitar que doses excessivas causem danos à célula. Para tanto, experimentos analisando o efeito do condroitim4-sulfato sobre a viabilidade celular de macrófagos foram realizados. Estes resultados estão apresentados na figura 14, em que macrófagos do exsudato peritoneal foram expostos ao condroitim 4-sulfato nas concentrações de 20 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 48 horas. Nestas condições experimentais o polímero não causou efeitos citotóxicos, visto que a viabilidade celular esteve sempre próxima de 100% independentemente da concentração utilizada. Estes resultados possibilitaram o estudo do efeito biomodulador do condroitim 4-sulfato, no qual os parâmetros funcionais analisados foram: a produção de ânion superóxido e a produção de óxido nítrico em macrófagos de ratos saudáveis e portadores de tumor de Walker-256.

7.5.1 Produção de ânion superóxido por macrófagos expostos ao condroitim 4-sulfato

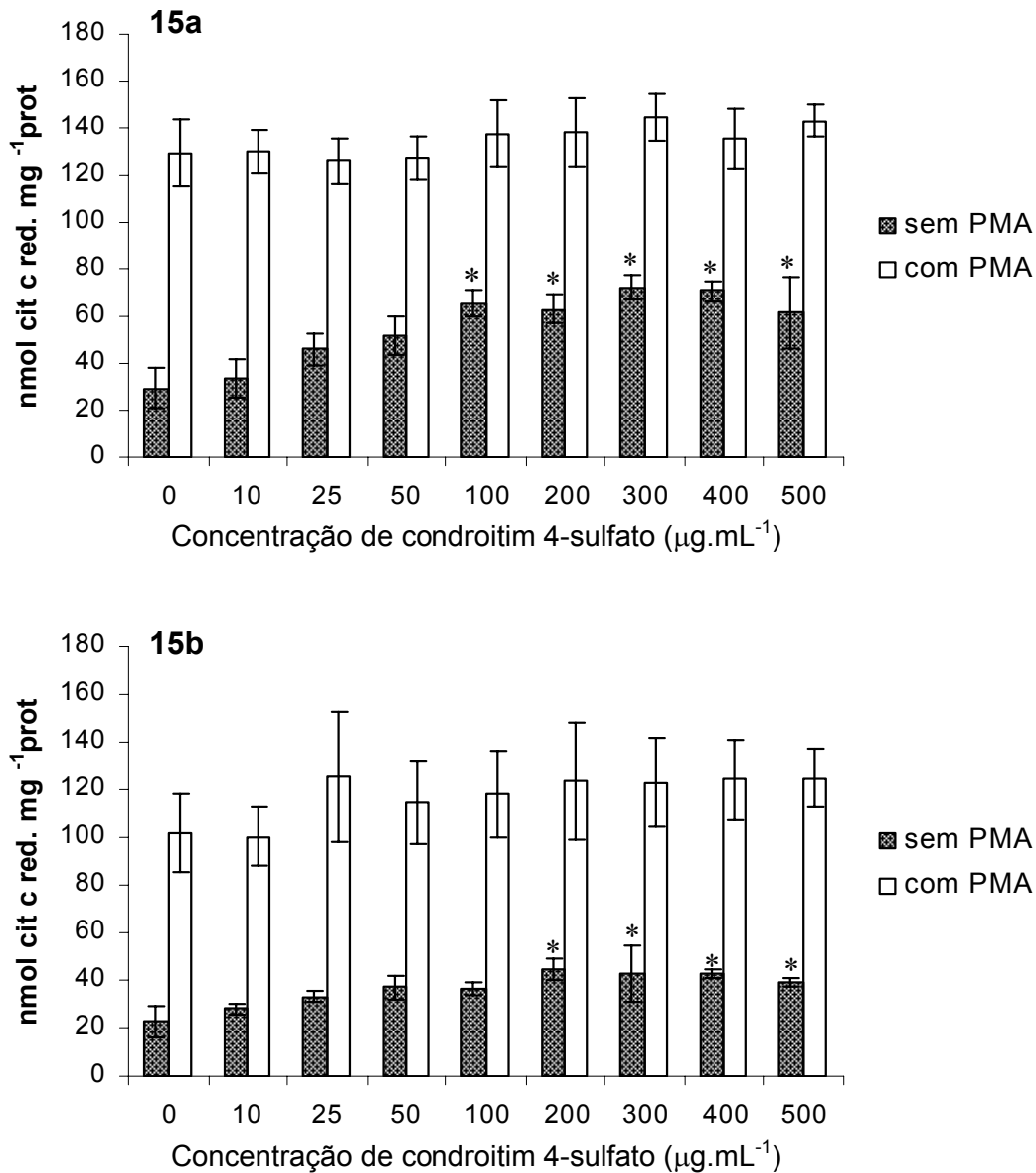
A figura 15 mostra a interferência do condroitim 4-sulfato sobre a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em macrófagos peritoneais de animais saudáveis e de animais portadores do tumor de Walker-256 no 14º dia após o implante das células. Nestes experimentos as células aderentes isoladas do exsudato peritoneal foram incubadas por 2 horas em meio de reação contendo condroitim 4-sulfato em concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A figura 15a representa a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por macrófagos peritoneais de ratos saudáveis expostos ao condroitim 4-sulfato, onde se observa que houve um aumento significativo na produção desta espécie radicalar na ausência de PMA quando as células foram expostas às concentrações de 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este polissacarídeo sulfatado também foi capaz de estimular a produção desta espécie radicalar em macrófagos de animais portadores de tumor na ausência de PMA quando presente no meio de cultura em concentrações de 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 15b). O

FIGURA 14: EFEITO *IN VITRO* DO CONDROITIM 4-SULFATO SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS



Sistema: Macrófagos aderentes foram incubados por 48 horas na presença de condroitim 4-sulfato nas concentrações indicadas. Após a incubação o meio foi removido e o reagente MTT foi adicionado, seguindo-se de incubação por mais 3 horas. Após a remoção do excesso de MTT, DMSO foi adicionado. A absorbância foi medida em 550 nm. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade celular determinada para as células cultivadas em meio de cultura na ausência de condroitim 4-sulfato.

FIGURA 15: EFEITO DO CONDROITIM 4-SULFATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos peritoneais de ratos controle (15a) ou ratos portadores do tumor de Walker-256 com 14 dias de crescimento (15b) foram incubados por 2 horas com meio de reação constituído de HBSS e ferricitocromo c ($80\mu\text{mol.L}^{-1}$) contendo condroitim 4-sulfato nas concentrações indicadas, na presença ou ausência de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PMA. A absorbância foi medida em 550 nm e a concentração de citocromo c reduzido, correspondente à concentração de ânion superóxido formado, foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar para a mistura citocromo $c_{\text{oxid-red}}$ ($\Delta\varepsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

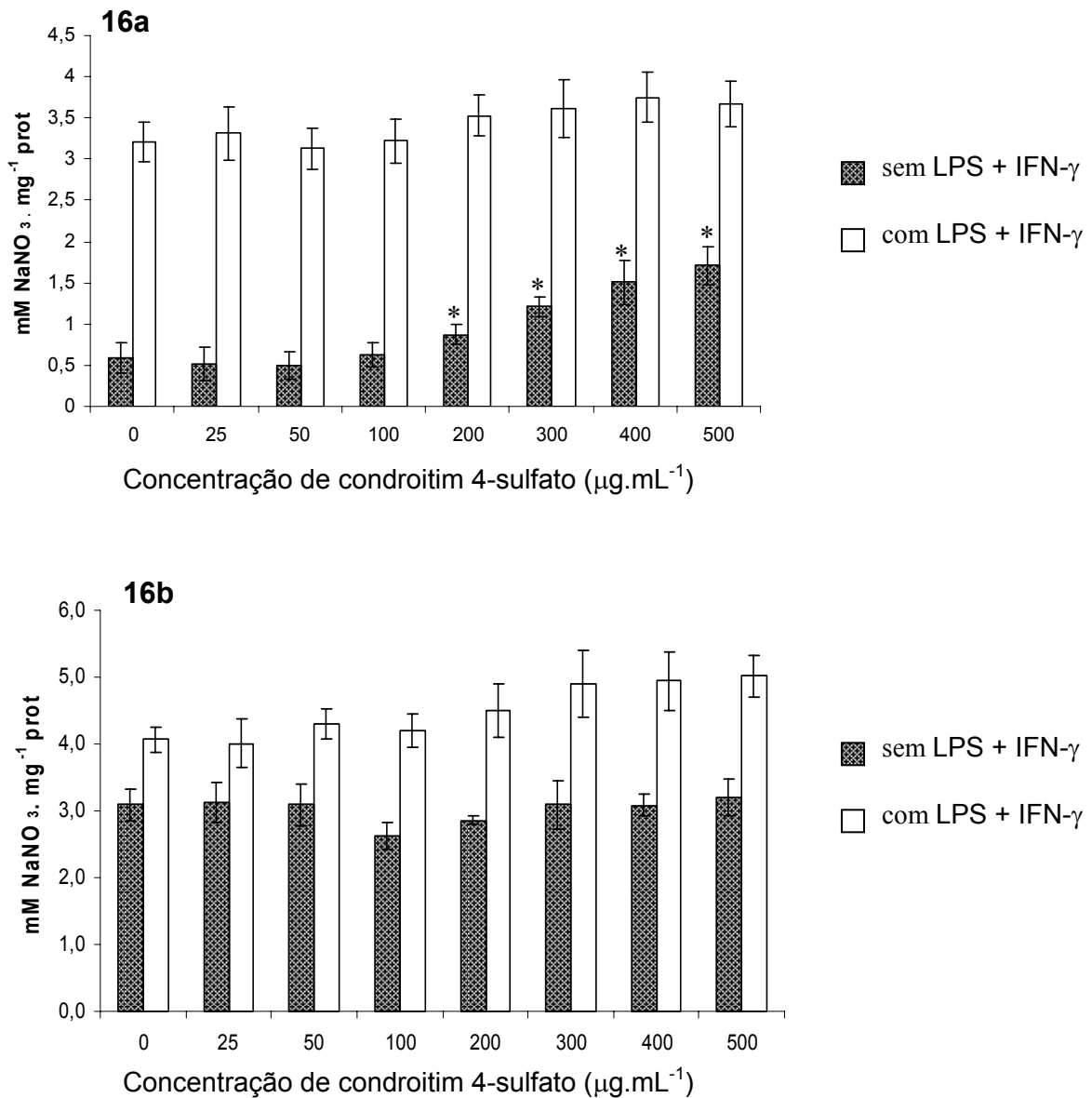
estímulo médio observado foi semelhante para ambos os grupos, sendo de 127% para o grupo controle e 117% para o grupo portador de tumor. Na presença do indutor do “burst” respiratório não foi observado estímulo adicional na produção de ânion superóxido (figura 15a e 15b).

7.5.2 Produção de óxido nítrico por macrófagos expostos ao condroitim 4-sulfato

Para avaliar o efeito do condroitim 4-sulfato sobre a produção de NO[•] em macrófagos peritoneais de ratos saudáveis e portadores de tumor, células do exsudato peritoneal foram cultivadas por 48 horas em meio de cultura que continha condroitim 4-sulfato em concentrações de 25 a 500 µg.mL⁻¹, na presença ou ausência de IFN-γ e LPS. Os resultados desta série experimental estão apresentados na figura 16, onde se pode observar que o condroitim 4-sulfato aumentou de maneira dose dependente a produção de NO[•] por macrófagos peritoneais de ratos saudáveis na ausência de IFN-γ e LPS a partir da concentração de 200 µg.mL⁻¹ (figura 16a). O estímulo observado foi de 48, 106, 157 e 191% para as concentrações de 200, 300, 400 e 500 µg.mL⁻¹, respectivamente. Este glicosaminoglicano não causou nenhum efeito sobre a produção de NO[•] quando as células foram estimuladas IFN-γ e LPS. Já a produção desta RNS por macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor de Walker-256 não foi afetada pela presença do condroitim 4-sulfato na ausência ou presença de IFN-γ e LPS (figura 16b). Não podemos esquecer que a produção destas RNS já está bastante aumentada em ratos portadores de tumor.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho reforçam a sugestão de que cadeias de glicosaminoglicanos se enquadram potencialmente como uma classe de mediadores inflamatórios. Uma série de relatos tem associado os proteoglicanos (solúveis ou associados às células) com ativação de células do sistema imune e processos inflamatórios, alguns já descritos no item 7.5. Outras evidências devem ser destacadas, como por exemplo, a de que proteoglicano serglicam secretado por células hematopoiéticas, que possui cadeias de condroitim 4-sulfato, é capaz de se ligar a receptores do tipo CD44 das células de defesa, contribuindo para a ativação de células T-citotóxicas (TOYAMA-SORIMACHI *et al.*, 1995). Cadeias de condroitim e dermatam sulfato proporcionaram estímulo da secreção de citocinas pró-

FIGURA 16: EFEITO DO CONDROITIM 4-SULFATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256



Sistema: Macrófagos peritoneais de ratos controle (16a) ou ratos portadores do tumor de Walker-256 com 14 dias de crescimento (16b) foram cultivados por 48 horas em meio de cultura contendo condroitim 4-sulfato nas concentrações indicadas, na ausência ou presença de 50ng.mL^{-1} de LPS + 26 U/mL^{-1} de IFN- γ . Após este período o sobrenadante foi utilizado para determinação da produção de NO pelo método de Griess. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes para cada um dos grupos. *Diferença significativa do controle ($p \leq 0,05$).

inflamatórias em uma população de células mononucleares da circulação periférica (RACHMILEWITZ; TYCOCINSKI, 1998).

Outros autores relatam que o condroitim sulfato não só é capaz de aumentar a secreção de citocinas do tipo Th1 (pró-inflamatórias), como também de inibir a secreção das citocinas anti-inflamatórias IL-5 e IL-10 em uma população de células do baço de animais sensibilizados com ovoalbumina (SAKAI *et al.*, 2002). O efeito do condroitim sulfato em estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos já foi descrito na literatura (WRENSHALL *et al.*, 1999). Nossos resultados expandem o entendimento sobre o papel deste glicosaminoglicano na ativação de macrófagos e sua relação com o processo inflamatório resultante da progressão tumoral. Os achados do presente trabalho, de que o condroitim 4-sulfato estimula a produção de NO em células de ratos saudáveis, mas não em macrófagos de ratos com tumor e que a produção de proteoglicanos e de óxido nítrico em ratos com tumor está aumentada, reforçam a evidência de que estas macromoléculas sulfatadas estão envolvidas com a ativação demonstrada em macrófagos de ratos portadores do tumor de Walker-256. Nossos resultados contribuem ainda com a informação de que, além de citocinas e óxido nítrico, o condroitim 4-sulfato também atua estimulando a via de produção de ânion superóxido em macrófagos. Entretanto, o estímulo desta via foi observado tanto em macrófagos de ratos saudáveis quanto em células de ratos portadores de tumor. Como a produção de ânion superóxido em ratos com tumor não está aumentada em relação ao controle, mas a produção de proteoglicanos está, a hipótese de que alguma substância presente em ratos com tumor esteja atuando como inibidora da produção desta espécie radicalar não pode ser descartada. Este fenômeno poderia resultar ainda de um efeito diferenciado das distintas classes de glicosaminoglicanos, já que o principal glicosaminoglicano secretado pelos macrófagos de ratos com tumor é o heparim sulfato e não o condroitim sulfato. Porém, mais experimentos serão necessários para esclarecer esta hipótese.

De maneira geral, este trabalho suporta um modelo que postula que a composição de proteoglicanos/glicosaminoglicanos de um determinado tecido, que pode ser alterada em processos inflamatórios pelas células de defesa, seria capaz de regular o comportamento destas próprias ou de outras células que, em última instância, determinariam as características da resposta imune. Portanto, o presente

trabalho contribui de maneira relevante com o esclarecimento da relação dos proteoglicanos/glicosaminoglicanos com a ativação de macrófagos de animais portadores de tumor de Walker-256 e com a caquexia.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1) Macrófagos peritoneais de animais caquéticos portadores do tumor de Walker-256 possuem características de células ativadas de acordo com os seguintes critérios:

- a) características morfológicas de células ativadas;
- b) aumento na capacidade fagocítica;
- c) aumento na produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.

2) A via de produção de ânion superóxido não está estimulada em animais portadores de tumor de Walker-256.

3) A produção de proteoglicanos, liberados para o meio e associados à célula, está aumentada em macrófagos peritoneais de ratos portadores do tumor de Walker-256.

4) Houve aumento considerável dos proteoglicanos constituídos por cadeias de heparam 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 proteoglicanos constituídos de condroitim e dermatam sulfato do que células de ratos sadios. Em ambas as frações, porém, o heparam sulfato constituiu o principal glicosaminoglicano produzido.

5) O condroitim 4-sulfato foi capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos de animais sadios, mas não em células de animais portadores do tumor de Walker-256. Este glicosaminoglicano também estimulou a via de produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de ratos sadios e em células ratos portadores de tumor.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.O. Macrophages. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 58, p. 494-506, 1979.

ADANY, R.; HEIMER, R.; CATERSON, B.; SORREL, J.M.; IOZZO, R.V. Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased content and RNAm levels. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore v. 265, p.11389-11396, 1990.

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

ALEXANDROVA, R.; MILEVA, M.; ZVETKOVA, E. Nitric oxide and cancer. **Experimental Pathology and Parasitology**, Sofia, v. 4, p. 13-18, 2001.

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, Baltimore, v. 17, p. 477-498, 1997.

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

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**, Pennsylvania, v. 21, p. 977-985, 2005b.

ARGILÉS, J.M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumour-bearing rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 61, p. 239-242, 1992.

ATHAR, M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.40, p. 656-667, 2002.

BAEUERLE, P.A. Reactive oxygen species as co-stimulatory signals of cytokine-induced NF- κ B activation pathways. In: Antioxidant and Redox Regulation of Genes. Sen, C.K.; Sies H.; Baeuerle, P.A. (Eds.). Academic Press: New York, p. 182,187, 2000.

BAKAN E, TAYSI S, POLAT MF, DALGA S, UMUDUM Z, BAKAN N, GUMUS M. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Tokyo, v. 32, p. 162-166, 2002.

BANDTLOW, C.E.; ZIMMERMANN, D.R. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 80, p.1267-90, 2000.

BERNFELD, M.; KOKENYESI, R.; KATO, M.; HINKES, M.T.; SPRING, J.; GALLO, R.L.; LOSE, E.J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annual Reviews in Biochemistry**, Palo Alto, v.8, p. 365-393, 1992.

BERNFELD, M.; PARK, P.W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M.L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions of cell surface heparin sulphated proteoglycans. **Annual Reviews in Biochemistry**, Palo Alto, v.68, p. 729-777, 1999.

BLOCHBERGER, T.C.; VERGNES, J.P.; HEMPEL, J.; HASSELL, J.R. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 347-52, 1992.

BOOT, F.W.; CRISWELL, D.S. Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. **International Journal of Sports and Medicine**, Stuttgart, v. 18, p. S265-S269, 1997.

BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAY BA, LIEBERMAN R, MEYER K. Structure of human skeletal keratosulfate. The linkage region. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 242, p. 3373-3380, 1967.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Structure and Function**, Kyoto, v.18, p. 399-407, 1993.

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

BURGALETA C, TERRITO MC, QUAN SG, GOLDE DW. Glucan-activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, New York, v. 23, p. 195-204, 1978.

BUSQUETS, S.; ARANDA, X.; RIBAS-CARBÓ, M.; AZCON-BIETO, J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Tumour necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria. **Cytokine**, Philadelphia, v.22, p.1-4, 2003.

CARBÓ, N.; BUSQUETS, S.; VAN ROYEN, M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. **British Journal of Cancer**, London, v. 86, p. 1012-1016, 2002.

CARSWELL, .A.E.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 48, p.445-453, 1994.

CAVALCANTI, T.C.; GREGORINI, C.C.; GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 887-95, 2003.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and structure. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.121, p. 813-816, 1978.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.; HAYBALL, J.D. The efficacy of a commercial β -glucan preparation, EcoActivaTM, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish Shellfish Immunology**, London, v.11, p.661-672, 2001.

CORDEL, N.; LE CORVAISIER-PIETO, C.; YOUNG, P.; LENORMAND, B.; COURVILLE, P.; SOUBRANE, J.; JOLY, P.; LAURET, P. Hemophagocytic syndrome and metastatic melanoma: 3 cases. **Annales de dermatologie et de venerologie**, Paris, v. 127, p. 1077-1079, 2000.

COSTA-ROSA, L.F.; SAFI, D.A.; CURY, Y.; CURI, R. Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 44, p. 2235-41, 1992.

CRAWFORD, R.M.; FINBLOOM, D.S.; CHARA, J.; PAUL, W.E.; MELTZER, M.S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of antigens. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.139, p. 135-141, 1987.

CREMASCHI GA, FISHER P, BOEGE F. Beta-adrenoceptor distribution in murine lymphoid cell lines. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 22, p. 195-206, 1991.

CURTIN J.F.; DONOVAN M.; COTTER T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**., Amsterdam, v. 1, p. 49-72, 2002

DAIDOUJI, K.; TAKAGAKI, K.; YOSHIHARA, S.; MATSUYA, H.; SASAKI, M.; ENDO, M. Neoplastic changes in saccharide sequence of dermatan sulfate chains derived from human colon cancer. **Digestive diseases and sciences**, New York, v 47, p.331-337, 2002.

DAVID, G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, p. 1023-1030, 1993.

DAVID, G.; VAN DER SCHUEREN, B.; MARYNEN, P.; CASSIMAN, J.J.; VAN DEN BERGHE, H. Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan

sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 118, p.961-969, 1992.

DAY, R.; ILYAS, M.; DASZAK, P.; TALBOT, I.; FORBES, A. Expression of syndecan-1 in inflammatory bowel disease and a possible mechanism of heparin therapy. **Digestive diseases and sciences**, New York, v. 44, p. 2508-15, 1999.

DE KLERK, D.P; WERELEY, C. Urinary glycosaminoglycan excretion metastatic prostate cancer. **World Journal of Urology**, Berlin, v. 4, p-200, 1988.

DE WYS, W. D.Management of cancer cachexia. **Seminars in oncology**, Amsterdam, v.12, p. 452-460, 1985.

DENHOLM, E.M.; LIN, Y.Q.; SILVER, P.J. Anti-tumor activities of chondroitinase AC and chondroitinase B: inhibition of angiogenesis, proliferation and invasion. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 416, p. 213-221, 2001.

DIETRICH, C.P.; ARMELIN, H.A. Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 84. p. 794-801, 1978.

DIETRICH, C.P.; ARMELIN, H.A.; NOGUEIRA, Y.L.; NADER, H.B.; MICHELACCI, Y.M. Turnover, change of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.717, p. 387-397, 1982.

DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O.; TOLEDO, O.M. Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 71, p.1-10, 1976.

DINARELLO, C.A.; BERNHEIM, H.A. Ability of human leukocytic pyrogen to stimulate brain prostaglandin synthesis in vitro. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 37, p. 702-708, 1981.

DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v. 32, p. 30-38, 1996.

DROTT, C.; PERSSON, H.; LUNDHOLM, K. Cardiovascular and metabolic response to adrenaline infusion in weight-losing patients with and without cancer. **Clinical Physiology**, Oxford, v. 9, p. 427-39, 1989.

ELLIOT-BRYANT, R.; SILBERT, J.E.; SUGUMARAN, G. Serum amyloid A, an acute-phase protein, modulates proteoglycan synthesis in cultured murine peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.261, p. 298-301, 1999.

EMERY, P.Q. Cachexia in experimental models. **Nutrition**, Pennsylvania, v.5, p. 600-60, 1999.

ENDRES, S.; VAN DER MEER, J.W.; DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 17, p. 469-474, 1987.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, Pennsylvania, v.18, p.872-879, 2002.

FIGUEROA J.; VIJAYAGOPAL, P.; DEBATA, C.; PRASAD, A.; PRASAD, C. Azaftig, urinary proteoglycan from a cachectic cancer patient, causes profound weight loss in mice. **Life Science**, Amsterdam, v. 64, p.1339-1347, 1999a.

FIGUEROA J.E.; VIJAYAGOPAL, P.; PRASAD, A.; SCHAPIRA, D.V.; PRASAD, C. Isolation, characterization, and distribution of a 24-kDa proteoglycan in the urine of cachectic cancer and AIDS patients. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 254, p.642-646, 1999b.

FILMUS, J.; SHI, W.; WONG, Z.M.; WONG, M.J. Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. **The Biochemical Journal**, London, v. 311, p. 561-565, 1995.

FLORES, E.A.; BISTRAN, B.R.; POMPOSELLI, J.J.; DINARELLO, C.A.; BLACKBURN, G.L.; ISTFAN, N.W. Infusión of tumor necrosis factor/cachectin promoters muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin-1. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 83, p.1614-1622, 1989.

FURUKAWA, K.; BHAVANANDAN, V.P. Influence of glycosaminoglycans on endogenous DNA synthesis in isolates normal and cancer cell nuclei. Differential effect of heparin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.697, p. 344-352, 1982.

GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 76, p. 1-4, 1994.

GARNIER, P.; GIBBS, R.V.; RIDER, C.C. A role for chondroitin sulphate B in the activity of interleukin-12 in stimulating gamma-interferon secretion. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 85, p. 53-58, 2003.

GOLDMAN, R. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophages. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.174, p.481-490, 1988.

GOODLAD, G.A.; RAYMOND, M.J. The action of the Walker-256 carcinoma and toxohormone on amino acid incorporation into diaphragm protein. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v.9, p.139-145, 1973.

GORDON, S. The macrophage home page. 1996 <Disponível em <http://www.path.ox.ac.uk/sg/>> Acesso em 14 set. 2005.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.145, p.131-138, 1982.

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

HA, H.C.; SIRISOMA, N.S.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J.L.; WOSTER, P.M.; CASERO, J.R. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.95, p. 11140-11145, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed. Oxford: Oxford University Press, New York, 1999.

HARANAKA, K.; SATOMI, N. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells *in vitro*. **The Japanese Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 51, p. 191-194, 1981.

HARDINGHAM TE, FOSANG AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 6, p. 861-701, 1992.

HASAN, M.; NAJJAM, S.; GORDON, M.Y.; GIBBS, R.; RIDER, C.C. IL-12 is a heparin-binding cytokine. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 162, p. 1064-1070, 1999.

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

HAWORTH, R.; GORDON, S. Isolation of and measuring the function of professional phagocytes: murine macrophages. **Methods Microbiology**, London, v.25, p. 287-310, 1998.

HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical Biophysical Research Communications**. New York, v. 157, p. 87-94, 1988.

IMAI, T.; HIRATA, K.; MARUMO, F. Induction of nitric oxide synthase by cAMP in rat vascular smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 93, p. 543-549, 1994.

INKI, P.; JOENSUU, H.; GRENNAN, R.; KLEMI, P.; JALKANEN, M. Association between syndecan-1 expression and clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. **British Journal of Cancer**, London, v. 70, p. 319-323, 1994.

IOZZO, R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 609-652, 1998.

IOZZO, R.V.; COHEN, I. Altered proteoglycan gene expression and tumour stroma. **Experientia**, Basel, v. 49, p. 447-455, 1993.

JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 2, p. 481-539, 1991.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 533-547, 1995.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. WALPORT, M.; SHLOMCHIK, *Imunobiologia*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

JERÔNIMO, S.M.B.; SALES, A.O.; FERNANDES, M.Z.; MELO, F.P.; SAMPAIO, L.O.; DIETRICH, C.P.; NADER H.B. Glycosaminoglycan structure and content and differ according to the origins of human tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 2253-2258, 1994.

JOBE, K.L.; ODMAN-GHAZI, S.O.; WHALEN, M.M.; VERCRUYSSSE, K.P. Interleukin-12 release from macrophages by hyaluronin, chondroitin sulfate A and chondroitin sulfate C oligosaccharides. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 89, p. 99-109, 2003.

JOHNSON, W.J.; STEPLEWSKI, Z.; MATTHEWS, T.J.; HAMILTON, T.A.; KOPROWISKI, H.; ADAMS, D.O. Cytolytic interactions between murine macrophages, tumor cells, and monoclonal antibodies characterization of lytic conditions and requirements for effector activation. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.136, p. 4707-4713, 1986.

JULIANO, R.L.; HASKILL, S. Signal transduction from the extracellular matrix. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 120, p. 577-585, 1993.

KAWAKAMI, M.; PEKALA, P.H.; LANE, M.D. Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 79, p. 912-916, 1982.

KJÉLEEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 60, p. 443-475, 1991.

KLASSEN, D.K.; SAGONE, A.L.J. Evidence for both oxygen and non-oxygen dependent mechanisms of antibody sensitized target cell lysis by human monocytes. **Blood**, Philadelphia, v. 56, p. 985-992, 1980.

KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Inflammation. Basic principles and clinical correlates. Raven Press, New York, p. 541-588, 1992.

KLEBANOFF, S.J.; ROSEN. H. The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 8, p. 263-84, 1978.

KLEINERMAN, E.S.; CECCORULLI, L.M.; BONVINI, E.; ZICHT, R.; GALLIN, J.I. Lysis of tumor cells by human blood monocytes by a mechanism independent of activation of the oxidative burst. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, p. 2058-2064, 1985.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T.A. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in oncology/hematology**, Shannon, v. 44, p. 143-161, 2002.

KOJIMA T, SHWORAK NW, ROSENBERG RD. Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 4870-4877, 1992.

KOLSET SO. Oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan in cultured human peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 139, p. 377-82, 1986.

KONDO, H.; NISHINO, K.; ITOKAWA, Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.349, p. 169-172, 1994.

KOREKANE, H.; NISHIKAWA, A.; IMAMURA, K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 412, p. 216-222, 2003.

KOTLER, F.P. Cachexia. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 133, p. 622-634, 2000.

KUMAR-SINGH, S.; JACOBS, W.; DHAENE, K.; WEYN B, BOGERS J, WEYLER J, VAN MARCK E. Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome. **The American Journal of pathology**, Philadelphia, v.186, p.300-305, 1998.

LANGSTEIN, H.N.; NORTON, J.A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology/Oncology Clinics North America**, Philadelphia, v. 5, p.103-123, 1991.

LAWLER, J.M.; SONG, W.; DEMAREE, S.R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radicals in Biology and Medicine**, New York, v. 35, p. 9-16, 2003.

LEU, R.W.; ZHOU, A.Q.; KENNEDY, M.J., SHANNON, B.J. Exogenous C1q reconstitutes a secondary deficiency of C5-deficient AKR mouse macrophages for FcR-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 146, p. 1233-1239, 1991.

LIANG, Y.; HARING, M.; ROUGHLEY, P.J.; MARGOLIS, R.K.; MARGOLIS, R.U. Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 139, p.851-864, 1997.

LINDAHL, U. The structure of xylosyl-serine from heparin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 130, p. 361-367, 1966.

LINHARDT, R.J.; LOGANATHAN, D.; AL-HAKIM, A.; WANG, H.M.; WALENGA, J.M.; HOPPENSTEADT, D.; FAREED, J. Oligosaccharide mapping of low molecular weight heparins: structure and activity differences. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 33, p. 1639-1645, 1990.

LLOVERA, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; AGELL, N.; MARZÁBAL, M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 338, p.311-318, 1994.

LOHMANDERM L.S.; DE LUCA, S.; NILSSON, B.; HASCALL, V.C.; CAPUTO, C.P.; KIMURA, J.H.; HEINEGARD, D. Oligosaccharids on proteoglycans from the Swarm rat chondrosarcoma. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, p. 6084-6091, 1980.

LUIKART, S.D.; FOSDICK, L.; OGLE, K.M.; PETERSON, B.A.; BLOOMFIELD, C.D. Serum and urine glycosaminoglycans in myeloid leukemia and myelodysplasia. **Leukemia**, Baltimore, v. 3, p. 48-50, 1989.

MARIA, D.A.; PAGLIARINI, R.C.; MISTRONE, R.J.; POZZI, D.H.B.; ZYNGIER, S. Mononuclear cell cytotoxicity in rats with Walker 256 tumor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1343-1346, 1994.

MARTINS, J.R.; GADELHA, M.E.; FONSECA, S.M.; SAMPAIO, L.O.; DE L PONTES, P.A.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation: a new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy. **Otolaryngology Head Neck Surgery**, Rochester, v. 122, p. 115 -118, 2000.

MATSUMOTO, A.; ONO, M.; FUJIMOTO, Y.; GALLO, R.L.; BERNFIELD, M.; KOHGO, Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma

with high metastatic potential. **International Journal of Cancer**, New York, v. 74, p. 482-491, 1997.

MCKEE, C.M.; LOWENSTEIN, C.J.; HORTON, M.R.; WU, J.; BAO, C.; CHIN, B.K.; CHOI, A.M.K.; NOBLE, P. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.272, p. 8013-8018, 1997.

MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1271, p. 35-42, 1995.

MICHELACCI, Y.M.; PETRICEVICH, V.L. Glycosaminoglycan profile of peritoneal and bone marrow-derived macrophages. Changes associated with macrophage activation. **Comparative Biochemistry Physiology**, New York, v. 100, p. 617-625, 1991.

MIKHAILOV, V.F.; MAZURIK, V.D.; BURLAKOVA, E.B. Signal function of the reactive oxygen species in regulatory networks of the cell reaction to damaging effects: contribution of radiosensitivity and genome instability. **Radiatsionnaia biologiiia, radioecologiiia**, Moskva, v.43, p.5-18, 2003.

MIWA, M.; SHIBATA, K.; NAGAYAMA, K.; AIKAWA, K. Nitric oxide formation by macrophages stimulated with water extracts from meats and offals. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, p. 1953-1954, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 43, p. 109-142, 1994.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of an acidic hetero polyssaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadathera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophages functions. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRÔNIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic hetero polyssaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadathera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 89, p. 189-197, 2004.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **The Journal of Pathology**, London, v. 181, p. 257-266, 1997.

NACKAERTS, K.; VERBEKEN, E.; DENEFFE, G.; VANDERSCHUEREN, B.; DEMEDTS, M.; DAVID, G. Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. **International Journal of Cancer**, New York, v. 74, p. 335-45, 1997.

NASCIMENTO, F.R.; RIBEIRO-DIAS, F.; RUSSO, M. Cytotoxic activity of BCG-activated macrophages against L929 tumor cells is nitric oxide-dependent. **Brazilian**

Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 31, p. 1593-1596, 1998.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 79, p. 319-326, 1987.

NATHAN, C.F.; SILVERSTEIN, S.C.; BRUKNER, L.H.; COHN, Z.A. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 149, p. 100-113, 1979.

NATHAN, C.F.; TSUNAWAKI, S. Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 118, p. 211-230, 1986.

NILSSON, B.; DE LUCA, S.; LOHMANDER, S. Structure of N-linked or O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the Swarm chondrosarcoma. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, p. 10920-10927, 1982.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, vol 233, p. 73-83, 2002.

OBA-SHINJO, S.M.; BERTO, A.G.; PASSEROTI, C.C.; BARBOSA, C.D.; SAMPAIO, L.O. Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker-256 rat mammary carcinoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 1079-1089, 2003.

OSTENSEN, ME.; THIELE, D.L.; LIPSKY, P.E. Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 15, p. 4185-4191, 1987.

PELLEGRINI, L.; BURKE, D.F.; VON DELFT, F.; MULLOY, B.; BLUNDELL, T.L. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. **Nature**, London, v. 407, p. 1029-1034, 2000.

PEREIRA B, ROSA LF, SAFI DA, BECHARA EJ, CURI R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 50, p. 2093-2098, 1995.

PETRICEVICH, V.L.; MICHELACCI, Y.M. Proteoglycans synthesized in vitro by nude and normal mouse peritoneal macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1053, p. 135-143, 1990.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion test for viability. Tissue culture: methods and application. **Academic Press**, New York, p. 406-408, 1973.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 46, p. 211-226, 1981.

POPOV, S.V.; POPOVA, G.Y.; OVODOVA, R.G.; BUSHNEVA, O.A; OVODOV, Y.S. Effects of polyssacharide from *Silene vulgaris* on phagocytosis. **International Journal of Immunopharmacology**, Kidington, v.21. p. 617-624, 1999.

PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Heparan sulfate and cell division. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 539-544, 1999.

PROUDFOOT AE, HANDEL TM, JOHNSON Z, LAU EK, LIWANG P, CLARK-LEWIS I, BORLAT F, WELLS TN, KOSCO-VILBOIS MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.100, p. 1885-1890, 2003.

PULLYBLANK, A.M.; GUILLOU, P.J.; MONSON, J.R. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha may be responsible for the lytic mechanism during anti-tumour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **British Journal of Cancer**, London, v. 72, p. 601-606, 1985.

RACHMILEWITZ, J.; TYKOCINSKI, ML. Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway. **Blood**. Philadelphia, v. 1, p. 223-229, 1998

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) galctomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion on HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 50, p. 79-83, 2002.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H. 3rd, WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 55, p. 803-10, 1998.

RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N.; TAHIN, Q.S. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. **Tumori**, Milano, v. 81, p. 370-7, 1995.

RÓDEN L.; SCHWARTZ, N.B. Biosynthesis of connective tissue proteoglycan. In: WHELAN, W.I. (Ed). **Biochemistry of Carbohydrates**. MTP International Review of Science. Biochemistry Series One. Butterwords, London, v.5, p. 95-152, 1975.

RUBIN, H. Cancer cachexia: its correlations and causes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p.: 5384-5389, 2003.

SAKAI S, AKIYAMA H, HARIKAI N, TOYODA H, TOIDA T, MAITANI T, IMANARI T. Effect of chondroitin sulfate on murine splenocytes sensitized with ovalbumin. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 3p. 211-216, 2002.

SAMPAIO, L.O.; DIETRICH, C.P.; GIANNOTTI, O.F. Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 498, p. 123-131, 1977.

SANDERSON, R.D. Heparan sulphate proteoglycans in invasion and metastasis. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 12, p. 89-98, 2001.

SANTRA, M.; MANN, D.M.; MERCER, E.W. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.100, p.149-157, 1997.

SANTRA, M.; SKORSKI, T.; CALABRETTA, B.; LATIME, E.C.; IOZZO, R.V. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 7016-7020, 1995.

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B.J. Activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NAPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.258, p. 9631-9635, 1983.

SATOH. A.; TOIDA, T.; YOSHIDA, K.; KOJIMA, K.; MATSUMOTO, I. New role of glycosaminoglycans on the plasma membrane proposed by their interaction with phosphatidylcholine. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 477, p. 249, 252, 2000.

SAWHNEY S, WOO P, MURRAY KJ. Macrophage activation syndrome: a potentially fatal complication of rheumatic disorders. **Archives of disease in childhood**, London, v. 85, p. 421-6, 2001.

SEELAENDER, M.C.; KAZANTZIS, M.; COSTA-ROSA, L.F. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. **Cell Biochemistry and Function**, Guildford, v. 17, p. 151-6, 1999.

SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, K.; PAULES, R.S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.28, p.1387-1404, 2000.

SHEPHERD VL, LEE YC, SCHLESINGER PH, STAHL PD. L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 78, p. 1019-1022, 1981.

SMITH, D.M.; LACKIDES, G.A.L EPSTEIN, L.B. Coordinated induction of autocrine tumor necrosis factor and interleukin-1 in normal human monocytes and the implications for monocyte-mediated cytotoxicity. **Cancer Research**, Baltimore, v. 1, p. 3146-3153, 1990.

SMITH, K.L.; TISDALE, M.J. Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, London, v.68, p. 314-318, 1993.

SODERSTROM, M.; BOHLING, T.; EXFORS, T. Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers. **International Journal of Cancer**, New York, v.100, p.144-151, 2002.

SONG, J.Y.; HAN, S.K.; SON, E.H.; PYO, S.N.; YUN, Y.S. YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 857-865, 2002.

SOUBA, W.W. Cytokine control of nutrition and metabolism in critical illness. **Current Problems in Surgery**, St. Louis, v. XXXI, p. 581-643, 1994.

STANLEY, M.J.; STANLEY, M.W.; SANDERSON, R.D.; ZERA, R. Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 112, p. 377-83, 1999.

STIPP, C.S.; LITWACK, E.D.; LANDER, A.D. Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 124, p.149-160, 1994.

STRISCIUGLIO, P.; FIORILLO, A.; COSTABILE, M.; MONTINI, T. Urinary excretion of glycosaminoglycans in neoplastic diseases of children. **European Journal of Pediatrics**, v.148, p. 584, 1989.

STUEHR DJ, MARLETTA MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 7738-7742, 1985.

STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; LEÃO, A.A.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 691-698, 2002.

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. **British Journal of Pharmacology**, v.113, p. 757-766, 1994.

SZALECZKY, E.; PRONAI, L.; MOLNAR, B.; BERCZI, L.; FEHER, J.; TULASSAY, Z. Increased cell proliferation in chronic Helicobacter pylori positive gastritis and gastric

carcinoma--correlation between immuno-histochemistry and Tv image cytometry. **Analytical cellular pathology**, v. 20, p. 131-139, 2000.

SZUCS, S.; KAVAI, M.; VARGA, C.; KERTAI, P.; POCSAI, Z.; KARANYI, Z.; ADANY, R. Changes in superoxide anion production and phagocytosis by circulating neutrophils during tumor progression in a rat model. **Cellular Immunology**, v. 170, p. 202-11, 1996.

TAKEUCHI, J. Effect of chondroitin sulfate on the growth of solid Ehrlich ascites tumor under the influences of other interstitial components. **Cancer Research**, Baltimore, v. 28, p.1520-1523, 1968.

TAPIEIRO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D.I. Arginine. **Biomedicin & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, p. 439-445, 2002.

TARTAGLIA, L.A.; AYRES, T.M.; WONG, G.H.; GOEDDEL, D.V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. **Cell**, Cambridge, v. 10, p. 845-853, 1993.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunology today**, Amsterdam, v. 13, p. 151-153, 1992.

TAYOAN, A.; GIULIVI, C. Purification and characterization of a nitric- oxide synthase from rat liver mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p.11044-11048, 1998.

TAYOAN, A.; GIULIVI, C. Purification and characterization of a nitric- oxide synthase from rat liver mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 11044-11048, 1998.

THONAR, E.J.; SWEET, M.B.E. An oligosaccharide component in proteoglycan of articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 498, p. 353-357, 1997.

TÍMÁR, J.; KÁROLY, L.; JÓZSEF, D.; SEBESTYÉN, A.; LÁSZLÓ, K.; KOVALSZKY, I. Proteoglycans and tumour progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, London, v.12, p. 173-186, 2002.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, Pennsylvania, v.17, p. 438-442, 2001.

TISDALE, M.J. Cancer Cachexia. **Anticancer Drugs**, London, v.4, p. 115-125, 1993.

TISDALE, M.J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, Pennsylvania, v.16, p. 1013-1014, 2000.

TODOROV, P.; CARIUK, P.; MCDEVITT, T.; COLES, B.; FEARON, K.; TISDALE, M. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, London, v.379, p. 739-742, 1996a.

TODOROV, P.T.; MCDEVITT, T.M.; CARIUK, P.; COLES, B.; DEACON, M.; TISDALE, M.J. Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. **Cancer Research**, Baltimore, v.56, p. 1256-1261, 1996b.

TOLEDO, O.M.; DIETRICH, C.P. Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 498, p.114-122, 1977.

TOYAMA-SORIMACHI, N.; SORIMACHI, H.; TOBITA, Y.; KITAMURA, F.; YAGITA, H. SUZUKI, K. MIYASAKA, M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. **The Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 7437-7444, 1995.

TRALHAO, J.G.; SCHAEFER, L.; MICEGOVA, M.; In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 17, p. 464-466, 2003.

TROUP, S.; NJUE, C.; KLIEWER, E.V.; PARISIEN, M.; ROSKELLEY, C.; CHAKRAVARTI, S.; ROUGHLEY, P.J.; MURPHY, L.C.; WATSON, P.H. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. **Clinical cancer research**, Baltimore, v. 9, p. 207-214, 2003.

UHLIN-HANSEN, L.; KOLSET, S.O. Cell density-dependent expression of chondroitin sulfate proteoglycan in cultured human monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, p. 2526-2531, 1988.

UHLIN-HANSEN, L.; KOLSET, S.O. Proteoglycan biosynthesis in relation to differentiation of cord blood monocytes in vitro. **Cell Differentiation**, Amsterdam, v. 21, p. 189-197, 1987.

VADIVELOO, P.K; VAIRO, G.; HERTZOG, P.; KOLA, I.; HAMILTON, J.A. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. **Cytokine**, London, v.12, p. 1639-1646, 2000.

VEIGA, R.P. Fluxos metabólicos no fígado de ratos com tumor de Walker-256: Influência do nível circulante de substratos e ácidos graxos. Maringá, 2005. Dissertação de mestrado em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; APARECIDO STECANELLA, L.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N.S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology**, New York, v. 8, p.175-182, 2002.

VUILLERMOZ B, KHORUZHENKO A, D'ONOFRIO MF, RAMONT L, VENDEO L, PERREAU C, ANTONICELLI F, MAQUART FX, WEGROWSKI Y. The small leucine-

rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. **Experimental cell research**, Orlando, v. 296, p. 294-306, 2004.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 85, p. 89-99, 2002.

WATANABE, N.; NIITSU, Y.; SONE, H.; NEDA, H.; URUSHIZAKI, I.; YAMAMOTO, A.; NAGAMUTA, M.; SUGAWARA, Y. Therapeutic effect of endogenous tumor necrosis factor on ascites Meth A sarcoma. **Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 8, p. 271-283, 1986.

WEBER, C.K.; SOMMER, G.; MICHL, P.; FENSTERER, H.; WEIMER, M.; GANSAUGE, F.; LEDER, G.; ADLER, G.; GRESS, T.M. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 121, p. 657-67, 2001.

WEGROWSKI, Y.; MAQUART, F.X. Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Shannon, v. 49, p. 259-268, 2004.

WEISS, S.J.; SLIVKA, A. Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 69, p. 255-262, 1982.

WHITWORTH, P.W.; PAK, C.C.; ESGRO, J.; KLEINERMAN, E.S.; FIDLER, I.J. Macrophages and cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, Boston, 1990, v. 8, p. 319-51, 1990.

WOODS, A.; COUCHMAN, J.R. Signaling from the matrix to the cytoskeleton: role of cell surface proteoglycans in matrix assembly. **Kidney International**, New York, v. 49, p. S64-S7, 1996.

WRENSHALL, L.; STEVENS, R.B.; CERRA, F.B.; PLATT, J.L. Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.66 p. 391-400, 1999.

XAUS, J.; COMALADA, M.; VALLEDOR, A.F.; CARDO, M.; HERRERO, C.; SOLER, C.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 204, p. 543-550, 2001.

XU, W.; LIU, L.Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I.G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, Shanghai, v.12, p. 311-320, 2002.

YAMAGATA, T.; SAITO, H.; HABUCHI, O.; SUZUKI, S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 243, p. 1523-1535, 1968.

YAMAGUCHI, T.; KANEDA, M. Presence of cytochrome b-558 in guinea-pig alveolar macrophages-subcelular localization and relationship with NADPH oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 933, p. 450-459, 1988.

YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J.D.; LEDER, P.; ORNITZ, D.M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**, Cambridge, v. 64, p. 841-8, 1991.