

**LÍVIA BRACHT**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FUNCIONAIS DE  
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE ANIMAIS  
PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Benigna Martinelli de Oliveira

**CURITIBA  
2006**

***Dedico***

***Aos meus pais, Ana e Adelar. Este trabalho é sem sombra de dúvida fruto do amor que nos une. Obrigada pelo incentivo constante e pelo muito que me ensinaram.***

## Agradecimentos

- Ao Marcelo, por todo apoio, amor e paciência. Aos meus tios, Alcione e Nestor, por me abrigarem durante estes dois anos. Ao Fabrício, meu irmão, pela montagem das colunas de Sephadex e auxílio com os aparelhos.
- À minha orientadora, Binha, antes de mais nada pela ajuda fundamental na hora em que tudo parecia perdido, pela amizade verdadeira e pela confiança e conhecimentos dispensados, que muito acrescentaram à minha formação acadêmica.
- À Professora Guilhermina Noletto, por ter me ensinado muito sobre macrófagos, pela atenção constante e pela grande amizade.
- Às Professoras Gláucia Regina Martinez, Sílvia Maria Suter Correia Cadena, Maria Eliane Merlin Rocha e Eva Gunilla Skare Carnieri, pela amizade e auxílio.
- Aos amigos Rosilene, Marianna, André e Magda, pelo apoio mútuo e pela grande amizade que levaremos pelo resto da vida.
- Às amigas do laboratório Sílvia Romão, Tatiana, Ana Paula, Stelia Carolina, Viviane e Amanda pelo ambiente de trabalho agradável e aconchegante.
- À colega Mariana Piemonte Moretão pelo auxílio prestado em alguns experimentos e sugestões.
- À Silvana, técnica do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR e às funcionárias do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá, Cida e Irene, pelo auxílio imprescindível.
- Ao Professor David Mitchell pela compreensão.
- À coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, professores e amigos do departamento.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), PRONEX e Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.
- À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 CAQUEXIA .....	3
2.1.1 Fisiopatologia de animais portadores de tumor.....	3
2.1.2 Mediadores da caquexia.....	4
2.1.3 O estresse oxidativo na caquexia.....	9
2.2 MACRÓFAGOS .....	11
2.2.1 Produtos secretados pelos macrófagos.....	14
2.2.1.1 Espécies radicalares .....	14
2.2.1.2 Citocinas .....	17
2.2.2 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS .....	19
2.3.1 Conceitos e estrutura .....	20
2.3.2 Envolvimento dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos na progressão tumoral.....	24
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	31
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
6.1 MATERIAIS E REAGENTES .....	34
6.2 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA .....	35
6.2.1 Solução Salina Tamponada .....	35
6.2.2 Solução Balanceada e Hanks (HBSS) .....	35
6.2.3 Meio de cultura .....	35
6.3 ANIMAIS .....	36
6.4 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256 EM RATOS .....	36
6.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS .....	37

6.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	37
6.7	MICROSCOPIA DE LUZ.....	38
6.8	ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MACRÓFAGOS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256 E RATOS NORMAIS.....	38
6.8.1	Produção de ânion superóxido.....	38
6.8.2	Produção de peróxido de hidrogênio .....	39
6.8.3	Produção de óxido nítrico.....	40
6.8.4	Capacidade fagocítica .....	40
6.8.5	Produção de proteoglicanos.....	41
6.8.5.1	Caracterização dos glicosaminoglicanos [ <sup>35</sup> s]-sulfatados.....	42
6.8.6	Atividade enzimática da catalase .....	43
6.9	EFEITOS <i>IN VITRO</i> DO CONDROITIM 4-SULFATO SOBRE MACRÓFAGOS.....	43
6.9.1	Efeito do condroitim 4-sulfato sobre a viabilidade celular.....	43
6.9.3	Efeito do condroitim-4-sulfato sobre a produção de ânion superóxido.....	44
6.9.4	Efeito do condroitim 4-sulfato sobre a produção de óxido nítrico.....	44
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
7.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	46
7.2	ALTERAÇÕES NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR.....	49
7.3	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	55
7.3.1	Produção de óxido nítrico.....	55
7.3.2	Produção de espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.....	58
7.4	PRODUÇÃO DE PROTEOGLICANOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	63

7.5	EFEITOS DO CONDROITIM-4-SULFATO SOBRE MACRÓFAGOS PERIOTNEIAS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	71
7.5.1	Produção de ânion superóxido por macrófagos expostos ao condroitim 4-sulfato.....	72
7.5.2	Produção de óxido nítrico por macrófagos expostos ao condroitim 4-sulfato.....	75
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
9.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
	<b>ANEXO I</b> .....	98

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - DIRECIONAMENTO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA CAQUEXIA POR CITOCINAS .....	5
<b>FIGURA 2</b> - SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELOS MACRÓFAGOS E SUA RELAÇÃO COM A CAQUEXIA.....	15
<b>FIGURA 3</b> - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	32
<b>FIGURA 4</b> - RATO PORTADOR DO TUMOR DE WALKER-256.....	33
<b>FIGURA 5</b> - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256.....	47
<b>FIGURA 6</b> - DADOS QUANTITATIVOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256.....	48
<b>FIGURA 7</b> - POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS QUE REALIZARAM FAGOCITOSE COM O TRANSCORRER DO TEMPO.....	51
<b>FIGURA 8</b> - CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	53
<b>FIGURA 9</b> - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	56

<b>FIGURA 10</b> PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	59
<b>FIGURA 11-</b> PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	60
<b>FIGURA 12-</b> PERFIL DE ELUIÇÃO DOS PROTEOGLICANOS PRODUZIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	64
<b>FIGURA 13-</b> <sup>35</sup> S-GLICOSAMINOGLICANOS PRODUZIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	67
<b>FIGURA 14-</b> EFEITO <i>IN VITRO</i> DO CONDRÓITIM 4-SULFATO SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	73
<b>FIGURA 15-</b> EFEITO <i>IN VITRO</i> DO CONDRÓITIM 4-SULFATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256.....	74
<b>FIGURA 16</b> -EFEITO <i>IN VITRO</i> DO CONDRÓITIM 4-SULFATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SADIOS E PORTADORES DO TUMOR DE WALKER-256.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA I</b> - CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS GLICOSAMINOGLICANOS.....	21
<b>TABELA II</b> - NÚMERO DE LEVEDURAS FAGOCITADAS POR MACRÓFAGO COM O TRANSCORRER DO TEMPO.....	52
<b>TABELA III</b> - ATIVIDADE DA CATALASE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	62
<b>TABELA IV</b> - PRODUÇÃO DE <sup>35</sup> S-PROTEOGLICANOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	- Albumina bovina
CSF	- Fator estimulador de colônia
FGF	- Fator de crescimento de fibroblastos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
HBSS	- Solução balanceada de Hanks
HEPES	- N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 2-etano sulfônico)
HSPG	- Proteoglicanos de heparam sulfato
IL	- Interleucina
INF	- Interferon
LIF	- Fator inibidor de leucemia
LMF	- Fator de mobilização de lipídios
MCP	- Proteína quimioatrativa de monócitos
MEM	- Meio essencial mínimo Eagle
MIF	- Fator inibidor da migração de macrófagos
MIP	- Proteína inflamatória de monócitos
MTT	- Brometo de 3-metil-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NO•	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
•OH	- Radical hidroxil
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	- Ânion superóxido
OSM	- Oncostatina M
PBS	- Solução salina fosfato tamponada
PIF	- Fator indutor de proteólise
PMA	- Forbol 12-miristato 13-acetato
RNS	- Espécies reativas de nitrogênio
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SFB	- Soro fetal bovino
SLRP	- Pequenos proteoglicanos ricos em leucina
TGF	- Fator de crescimento e diferenciação celular
TNF	- Fator de necose tumoral
Tris	- Tris (hidroximetil) amino metano

## RESUMO

A caquexia constitui um fator importante das mortes associadas ao câncer e está relacionada com uma série de anormalidades metabólicas e hormonais. O papel das citocinas no estabelecimento da caquexia está amplamente documentado. O estudo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio neste contexto tem, em sua maioria, sido limitado à perda de massa muscular. Adicionalmente, proteoglicanos isolados da urina de pacientes caquéticos têm sido postulados como mediadores diretos da síndrome. Embora os macrófagos constituam uma importante fonte destes mediadores, incluindo proteoglicanos, pouco se sabe sobre as alterações funcionais destas células em animais caquéticos portadores de tumor. Adicionalmente, a função biológica dos proteoglicanos na inflamação é pouco compreendida e nenhum estudo avaliando a produção destas macromoléculas por células de defesa em organismos portadores de tumor foi realizado. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi o de investigar o efeito da caquexia associada ao câncer sobre os seguintes aspectos de macrófagos peritoneais: características morfológicas, capacidade fagocítica, produção de espécies radicalares e produção de proteoglicanos. Foi avaliado também o efeito *in vitro* do glicosaminoglicano condroitim 4-sulfato sobre aspectos funcionais de macrófagos de ratos sadios e caquéticos portadores de tumor. O carcinossarcoma de Walker-256 foi utilizado como modelo experimental de caquexia associada ao câncer. Macrófagos de ratos portadores de tumor apresentaram características morfológicas de células ativadas e uma maior capacidade fagocítica. A produção basal de óxido nítrico foi 2,4 vezes maior em macrófagos de ratos no 7º dia de desenvolvimento tumoral e aproximadamente 4 vezes maior no 14º dia, quando comparados com o controle. Os níveis basais de peróxido de hidrogênio produzidos pelos macrófagos também estavam aumentados em quase 4 vezes nos animais com 14 dias de crescimento tumoral. Em contraste com este resultado, não foi encontrada diferença significativa entre a produção de ânion superóxido por macrófagos de animais sadios e portadores de tumor. O desenvolvimento tumoral causou ainda um aumento de 3,5 vezes na produção de proteoglicanos constituídos de heparan sulfato liberados para o meio e aumento de 2,4 vezes na produção de condroitim e dermatan sulfato associados à célula. O condroitim 4-sulfato estimulou a produção de ânion superóxido e óxido nítrico em macrófagos de animais controle. Macrófagos de animais caquéticos portadores de tumor, tratados *in vitro* com o glicosaminoglicano, apresentaram capacidade aumentada de produzir ânion superóxido, embora nenhuma mudança na capacidade de produção de óxido nítrico tenha sido observada. O estímulo na produção basal de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor reforça a sugestão de que estas espécies radicalares podem contribuir com o fenômeno que gera a caquexia. A produção aumentada de proteoglicanos em macrófagos de ratos com tumor de Walker-256 sugere que células de defesa como os macrófagos possam ser responsáveis pela produção daqueles proteoglicanos mediadores da caquexia isolados da urina de pacientes caquéticos. Finalmente, este trabalho suporta um modelo em que a composição de proteoglicanos/glicosaminoglicanos de um determinado tecido, possivelmente controlada por processos inflamatórios, atuaria regulando o comportamento das células do sistema imune.

## ABSTRACT

Cancer cachexia is one of the primary factors leading to cancer-related death and encompasses a wide range of metabolic and hormonal abnormalities that result in a progressive wasting syndrome. The mediators responsible for the development of cancer cachexia seem to be cytokines such as tumor-necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1, interleukin-6, and interferon- $\gamma$ . The role of free radicals in this context is limited to muscle wasting. Furthermore, proteoglycan-like molecules isolated from the urine of cachectic patients were postulated as direct mediators of the syndrome. Despite the fact that macrophages constitute an important source of such metabolites, including proteoglycans, little is known about the alterations in macrophage functions in the tumor-bearing host. Additionally, the biological role of proteoglycans in inflammation is poorly understood and there are no data available on the production of such macromolecules by immune cells in the cancer state. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of cancer cachexia on the following aspects of macrophage function: morphological characteristics, phagocytosis, release of free radicals and production of proteoglycans. We also evaluated the *in vitro* effect of chondroitin 4-sulfate on the function of macrophages from normal and tumor-bearing rats. The Walker-256 carcinosarcoma was used as experimental model of cancer cachexia. Macrophages from tumor-bearing rats presented morphological characteristics of activated cells and a higher phagocytic activity. The basal nitric oxide production was 2-fold higher at day 7 after injection of cancer cells and approximately 4-fold higher at day 14 when compared with controls. Basal hydrogen peroxide levels in tumor-bearing animals were also almost 4-fold higher at day 14. In contrast with the latter result, no difference in superoxide production between tumor-bearing and control conditions was found. Macrophages from tumor-bearing rats showed a 3.5-fold increase in liberation of heparan sulfate proteoglycans into the culture medium and a 2.4-fold increase in cell-associated dermatan and chondroitin sulfate proteoglycans. Chondroitin 4-sulfate increased superoxide anion and nitric oxide productions by control macrophages. Macrophages from tumor-bearing rats, treated *in vitro* with this glycosaminoglycan, presented an increased capacity of superoxide anion production, with no change in the capacity of nitric oxide production. The stimulation of basal nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages from tumor-bearing rats reinforces the suggestion that these radicals contribute in some way to the phenomena leading to cachexia. Increased proteoglycan synthesis and release by peritoneal macrophages from Walker-256 tumor bearing-rats suggests that those proteoglycans isolated from the urine of cachectic patients may be derived from immune cells like macrophages. The present work also supports the model postulating that the glycosaminoglycan/proteoglycan composition of a given tissue, possibly controlled by inflammatory processes, helps to regulate the behavior of immune system cells.