

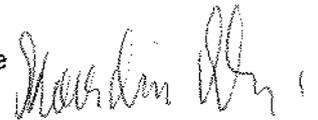
ROSANA CELESTINA MORANDIN

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

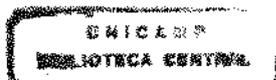
***ALTERAÇÕES DA AORTA EM RATAS
PORTADORAS DE NEOPLASIA***

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área Anatomia Patológica. Campinas, 29 de novembro de 2000.

Prof. Dr. Konradin Metze
Orientador



***Campinas
2000***



ROSANA CELESTINA MORANDIN

**ALTERAÇÕES DA AORTA EM RATAS
PORTADORAS DE NEOPLASIA**

*Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas, Área de Concentração em Anatomia
Patológica*

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Rachel Lewinsohn

**Campinas
2000**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M794a Morandin, Rosana Celestina
Alterações da aorta em ratas portadoras de neoplasia / Rosana
Celestina Morandin. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

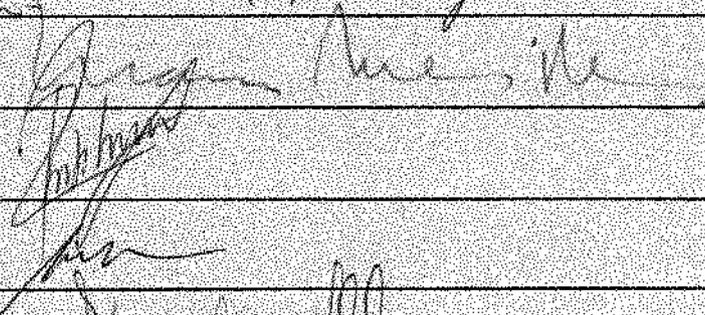
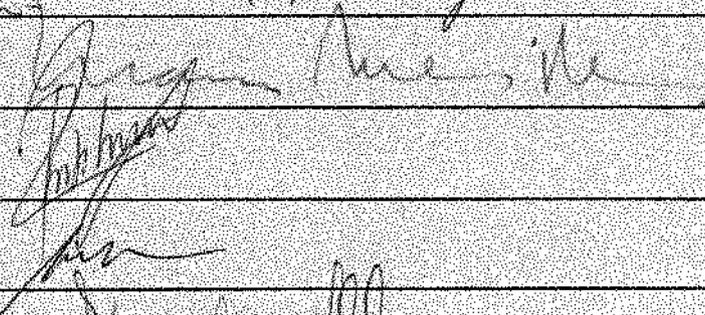
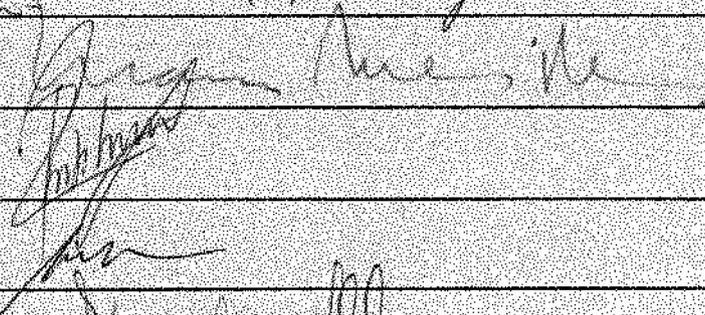
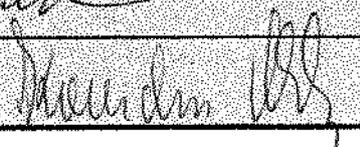
Orientadores : Konradin Metze, Rachel Lewinsohn
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Anatomia Patológica. 2. Cancer. 3. Caquexia. 4. Enzimas. I.
Konradin Metze. II. Rachel Lewinsohn. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

1. Prof. Dr. Winston B. Yoshida 
2. Prof. Dr. Marcos S. Romão 
3. Prof. Dr. Ronaldo W. Lima 
4. Prof. Dr. Cristóvão G. Verani 
5. Prof. Dr. Konradin Metze 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/11/00

DEDICATÓRIA

*Para Ines e para Romeo, meus pais,
pela crença de que, no seu tempo, tudo
é possível, desde que haja amor e
perseverança.*

*Para Aquele que sempre esteve
comigo, fonte de todas as forças.*

AGRADECIMENTOS

Ao Norair, pelo amor, pela paciência e porque acreditou e me fez acreditar.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pela orientação e pelos ensinamentos, mas acima de tudo, pela adoção, pelo incentivo, pela amizade e pelo conforto naqueles momentos tão difíceis (e não foram poucos!). Meu muito obrigada, para sempre.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira, conselheiro de muitos momentos, que me protegeu quando foi necessário. Habita o meu coração, como um dos meus familiares.

Ao Prof. Dr. Mario Mantovani, pelo apoio e por me receber no seu Laboratório, como mostra de confiança.

À Prof^a. Dr^a. Rachel Lewinsohn, pela orientação nos estudos enzimáticos e pelo uso do Laboratório de Pesquisas em Enzimologia.

À Prof^a. Dr^a. Ester Maria Danielli Nicola do Laboratório Experimental de Laser, NMCE-FCM/UNICAMP, pelas matrizes de ratas portadoras do tumor utilizadas no trabalho.

Ao Prof. Dr. José Angelo Camilli pela doação do polímero de NEOPRENE® e pelas oportunas informações técnicas.

À Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti e ao Dr. Fernando Guimarães, sempre pacientes e atenciosos quando do uso do contador de cintilação líquida.

À Maria Dionísia de Oliveira e ao William Adalberto Silva, pelo competente auxílio técnico no trabalho com o tumor e com os animais. Obrigada pelo carinho.

Ao Ismael Vêncio e à Giseli Clotilde Ferreira, pela qualidade do material histológico preparado com capricho e competência.

À Fátima Neder, Marilucia R. Martins e Dona Geralda Domiciana Pádua, pela paciência, competência e carinho na preparação do material de microscopia eletrônica e por me aturar tantas e tantas vezes.

Às farmacêuticas Maria José L. Franco Bartelega e Ronise Carla Sass Pozetti do Laboratório de Bioquímica Clínica do Laboratório de Patologia Clínica, HC-UNICAMP, pelas dosagens bioquímicas e pela gentileza.

À Maria Aparecida Selleghin, Maria Cristina de Souza e Ivanil Sônia Alves Borges do Laboratório de Gasometria do Laboratório de Patologia Clínica, HC-UNICAMP, pelas medidas gasométricas, pela tenção e pelo carinho.

Ao Randall Luis Adam, pelo socorro na projeção de diapositivos e pelos ouvidos atentos aos lapsos da fala.

À grande, gentil e altamente competente Maria do Carmo, sempre disposta, sempre preocupada, sempre resolvendo tudo a tempo. A fada madrinha dos pós-graduandos da Anatomia Patológica. Como extensão, à secretária da Pós-graduação em Ciências Médicas (“Marcinha”), pela paciência e atenção.

Ao Sr. Marco Antonio Gongora, pelas fotos de Microscopia Eletrônica que sempre eram para ontem.

Ao Alexandre Rebac de Paula e ao Jorge Airton Cicala, sempre resolvendo meus emaranhados de informática.

Ao Emilton Barbosa de Oliveira, do Apoio Didático-FCM, pela colaboração na preparação das fotos.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

E às ratas, sem as quais nada teria acontecido. Animais dóceis que servem ao homem como muitos outros tantos e que normalmente nem nos damos conta.

Trabalho realizado com apoio FAPESP

(Projeto 1999/00322-9)

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	<i>xxiii</i>
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Caquexia tumoral	29
1.2. Amino-oxidase Sensível à Semicarbazida (SSAO)	39
1.3. Justificativa e objetivos	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Animal de experimentação	49
2.2. Indução, transplante e manutenção do tumor	49
2.3. Grupos experimentais	51
2.4. Fase da coleta e eutanásia	51
2.5. Avaliação do perfil clínico	53
2.5.1. Condições gerais	53
2.5.2. Exames laboratoriais complementares	53
2.6. Atividade da SSAO	55
2.6.1. Fontes da enzima	55
2.6.2. Determinação da concentração de proteínas totais	57
2.6.3. Método enzimático	57
2.6.4. Reação enzimática	59
2.6.5. Atividade específica da enzima	59
2.6.6. Padronizações prévias	61
2.7. Morfologia	61
2.7.1. Avaliação macroscópica dos vasos abdominais	61
2.7.2. Medidas morfométricas das aortas, músculo esquelético e coração	63
2.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão	67
2.8. Análise estatística	69

3. RESULTADOS	73
3.1. O tumor	75
3.2. Perfil clínico dos animais	79
3.2.1. Condições gerais	79
3.2.2. Exames laboratoriais	83
3.3. Atividade da SSAO	91
3.4. Proteínas totais na aorta	91
3.5. Macroscopia da cavidade abdominal	91
3.6. Morfologia	97
3.6.1. Pressão de perfusão do fixador	97
3.6.2. Morfometria das aortas, músculo esquelético e coração	97
3.6.2.1. Aorta	97
3.6.2.2. Medidas do ventrículo esquerdo e das fibras esqueléticas	111
3.6.3. Microscopia eletrônica de transmissão	113
4. DISCUSSÃO	119
4.1. Condições gerais dos animais	121
4.2. Atividade da SSAO	131
4.3. Morfologia	135
4.4. Considerações finais	143
5. CONCLUSÕES	147
6. SUMMARY	151
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Pesos (em gramas) considerando-se 3 faixas etárias	83
Tabela 2: Dosagens hematológicas e bioquímicas sanguíneas de ratas do Grupo Controle <i>versus</i> Grupo Sarcoma	85
Tabela 3: Dosagens bioquímicas sanguíneas de ratas do Grupo Controle <i>versus</i> Grupo Sarcoma	87
Tabela 4: Dosagens de pH, gases, bicarbonato e consumo de base sanguíneos de ratas do Grupo Controle <i>versus</i> Grupo Sarcoma	89
Tabela 5: Constantes Cinéticas da atividade da SSAO contra a benzilamina em aortas de ratas do Grupo Controle e Grupo Sarcoma	93
Tabela 6: Medidas morfométricas da aorta abdominal de ratas do Grupo Controle e do Grupo Sarcoma	99
Tabela 7: Medidas do diâmetro interno do ventrículo esquerdo e área das fibras esqueléticas do músculo <i>biceps femoris</i>	111

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Fotomicrografia da aorta onde se podem observar as lâminas elásticas refringentes na camada média. As setas indicam os limites estabelecidos para a medida da espessura da camada	67
Figura 2: Aspecto geral de rata, com crescimento de massa tumoral no dorso, à direita	75
Figura 3: Aspecto macroscópico do tumor, visualizando-se uma região central com aspecto necrótico, uma região periférica composta de tecido, aparentemente, viável e cápsula	77
Figura 4: Massa tumoral apresentando intensa anaplasia, caracterizada por polimorfismo celular e nuclear	79
Figura 5: Ultraestrutura da neoplasia: células tumorais com produção de fibras de colágeno	81
Figura 6: Parede retroperitoneal de animal portador de tumor de crescimento dorsal bilateral, mostrando o aspecto atípico das veias íleo-lombares	95
Figura 7: Molde de NEOPRENE® feito em rata com tumor onde se vê a artéria íleo-lombar esquerda irrigando a massa tumoral	95
Figuras 8: Exame microscópico da aorta abdominal de rata do Grupo Controle submetida à perfusão com pressão de 15 mmHg, com pequeno aumento (A) e detalhe da parede (B), mostrando o aspecto contraído do vaso	101
Figuras 9: Exame microscópico da aorta abdominal de rata do Grupo Sarcoma submetida à perfusão com pressão de 15 mmHg, com pequeno aumento (A) e detalhe da parede (B), mostrando o aspecto distendido do vaso	103

Figura 10: Aspecto geral de aortas de animais submetidos à perfusão com 100 mmHg e examinadas com pequeno aumento à microscopia óptica	105
Figura 11: Detalhe da parede de aorta de rata do Grupo Controle sem sinais de alterações (A) e vaso de rata do Grupo Sarcoma (B), com redução da espessura da média e do tamanho nuclear. (Perfusão com pressão de 100 mmHg)	107
Figura 12. Comportamento de auto-fluorescência da eosina permitindo a visualização das lâminas elásticas à microscopia de fluorescência (setas)	109
Figura 13. Cortes transversais do coração. Nota-se a dilatação do ventrículo esquerdo no animal doente	113
Figura 14. Cortes transversais de fragmentos do músculo <i>biceps femoris</i> . O animal com tumor apresentou redução significativa da área de secção transversa das fibras	115
Figura 15. Ultraestrutura da camada média de aorta do Grupo Controle	117
Figura 16. Ultraestrutura da camada média de aorta do Grupo Sarcoma	117

RESUMO

A síndrome da caquexia tumoral é um distúrbio sistêmico muito grave que envolve alterações físicas e metabólicas, podendo estar presente em até 80% dos portadores de tumor. Muitos órgãos e tecidos não acometidos diretamente pelo tumor podem apresentar alterações graves na síndrome. Os tecidos mais intensamente atingidos são o muscular esquelético e o adiposo. Embora haja uma vasta literatura sobre o assunto, estudos clínicos e experimentais sobre os vasos pré-existentes no hospedeiro são muito raros. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as possíveis alterações morfológicas e enzimáticas da aorta de ratos portadores uma neoplasia induzida pelo metil-colantreno (Sarcoma), nos estágios mais avançados da doença.

Exames bioquímicos e hematológicos foram realizados para avaliar o perfil clínico dos animais. As constantes cinéticas da SSAO (Constante de Michaelis - K_m e Velocidade Máxima - V_{max}) foram calculadas utilizando-se a benzilamina como substrato. As análises morfológicas das aortas foram feitas através de medidas morfométricas e de estudos de ultraestrutura. Espessura da camada média, densidade de núcleos, diâmetro interno menor, área luminal e número de lâminas elásticas foram quantificadas.

Os ratos portadores da neoplasia apresentaram sinais de um desgaste físico generalizado, com baixo peso, anemia, hipoalbuminemia, hipoglicemia, distúrbios eletrolíticos e acidose metabólica. A V_{max} da SSAO mostrou uma queda estatisticamente significativa de 35%, sem que houvesse diferença detectável no K_m . A medida de espessura da camada média da aorta mostrou-se significativamente menor (Controle= $50,04 \pm 2,54$ e Sarcoma= $38,37 \pm 4,26 \mu m$, $p < 0,01$). O exame da ultraestrutura do vaso revelou atrofia das células de músculo liso, com uma considerável redução do tamanho celular, uma cromatina nuclear mais densa e irregularidades nos limites citoplasmáticos.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que as alterações morfológicas e o comportamento da SSAO nas aortas dos animais com a neoplasia são semelhantes às alterações descritas em aortas de ratos senis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CAQUEXIA TUMORAL

Os tumores malignos podem ser considerados parasitas do organismo onde ocorrem, pois dependem do hospedeiro para sua nutrição (DILLS, 1993). Precocemente, são produzidos fatores tumorais que estimulam o crescimento dos vasos do hospedeiro, formando uma nova rede vascular que invade o tecido em formação e que permite o aporte nutricional necessário para o crescimento tumoral (FOLKMAN, 1990). É a partir dos vasos neoformados, também, que são transportadas células tumorais e substâncias sintetizadas pela neoplasia. Estabelecida a neovascularização, o tumor pode continuar seu crescimento.

Durante o desenvolvimento tumoral, ocorre uma série de efeitos no hospedeiro, efeitos estes que dependem do tipo de neoplasia e de respostas individuais do organismo portador. Por exemplo, uma neoplasia relativamente pequena pode causar muitos sintomas, enquanto que outra, pode produzir poucos sintomas, permanecendo oculta até que esteja avançada demais e apareçam metástases (RUDDON, 1987).

Os efeitos podem ser locais, através da compressão, invasão e destruição dos tecidos normais, podendo ocorrer sangramento, infecções secundárias e sintomas agudos causados pela ruptura ou pelo infarto da massa tumoral (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

Sintomas distantes do crescimento tumoral, causados por fatores circulantes sintetizados em certos tipos de câncer e chamados coletivamente de Síndromes Paraneoplásicas podem representar as manifestações mais precoces de uma neoplasia oculta. Os diversos sintomas incluem a hiponatremia, hipercalcemia e hipoglicemia, além de síndromes neuromiopáticas, desordens dermatológicas, da coagulação e outras complicações (ABELOFF *et al.*, 1995).

Pacientes com câncer em progressão e, especialmente, aqueles nos estágios terminais de tumores sólidos, comumente apresentam a síndrome da caquexia tumoral, que pode estar presente em até 80% deles (ALBRECHT & CANADA, 1996). Além de ser a causa da morte de um número significativo de pacientes (WARREN, 1932; INAGAKI, RODRIGUEZ, BODEY, 1974) e prejudicar de forma insidiosa a qualidade de vida, a caquexia afeta negativamente o curso das intervenções terapêuticas. A frequência de

resposta e a tolerância à quimioterapia e à radioterapia estão significativamente reduzidas e as complicações cirúrgicas, aumentadas (MULLEN *et al.*, 1979; DeWYS *et al.*, 1980; MEGUID *et al.*, 1983; TISDALE, 1993).

Diversos fatores circulantes vêm sendo investigados como mediadores da síndrome da caquexia tumoral. A produção prolongada de citocinas pelo hospedeiro em resposta ao crescimento tumoral parece ser a causa principal dos graves sinais e sintomas dessa síndrome (MATTHYS & BILLIAU, 1997). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1, interleucina-6, interferon- γ e fator de inibição da leucemia, isoladamente e em conjunto, são os principais mediadores estudados (MOLDAWER, GEORGIEFF, LUNDHOLM, 1987; TISDALE, 1993; STRASSMAN & KAMBAYASHI, 1995; ROUBENOFF, 1997).

De acordo com as publicações de KERN & NORTON (1988) e HOLLAND *et al.* (1993), as manifestações físicas e bioquímicas descritivas da caquexia tumoral são:

FÍSICAS	BIOQUÍMICAS
desgaste dos tecidos do hospedeiro	anemia
anorexia	hipoalbuminemia
atrofia da musculatura esquelética	hipoglicemia
miopatia	acidose láctica
perda acelerada de gordura	hiperlipidemia
balanço negativo de energia	intolerância à glicose
atrofia de órgãos viscerais	

O metabolismo intermediário de carboidratos, proteínas e gorduras é afetado, como também, o metabolismo energético, sendo que o pior impacto prognóstico está relacionado à depleção protéica (NIXON *et al.*, 1980).

Os tecidos muscular esquelético e adiposo do hospedeiro sofrem intensa depleção como consequência da anorexia e do hipercatabolismo lipídico e protéico (HEYMSFIELD & MCMANUS, 1985; KERN & NORTON, 1988; DOUGLAS & SHAW, 1990; TISDALE, 1993; DWORZAK *et al.*, 1998). O músculo esquelético, representando a

maior massa protéica do organismo, é gravemente afetado. LUNDHOLM *et al.* (1980), utilizando um modelo animal de sarcoma induzido pelo metil-colantreno, determinaram que 50% do nitrogênio e carbono do tecido tumoral se originaram da quebra de músculo esquelético do hospedeiro. De acordo com DeWYS *et al.* (1980), em pacientes que apresentam perda de peso, o enfraquecimento dos músculos respiratórios é uma das principais causas de redução do tempo de sobrevivência.

Além do tecido muscular esquelético, também são relatadas alterações no músculo cardíaco. Perda de proteína, de massa muscular e atrofia celular foram descritas tanto em estudos experimentais com animais quanto em pacientes humanos com tumores localizados em outros órgãos (HEYMSFIELD & McMANUS, 1985; SJÖSTRÖM *et al.*, 1987; TESSITORE, *et al.*, 1993; CARBÓ *et al.*, 1997).

No fígado estão aumentadas a gliconeogênese a partir de aminoácidos do músculo esquelético, a síntese de glicose a partir do lactato produzido pelo tumor (Ciclo de Cori), assim como a síntese de proteínas de fase aguda, contribuindo para um aumento transitório do órgão (KARLBERG, KERN, FISCHER, 1983; BACCINO *et al.*, 1986; TESSITORE, BONELLI, BACCINO, 1987; DOUGLAS & SHAW, 1990; FEARON *et al.*, 1991; BARACOS, *et al.*, 1995). Além disso, SEELAENDER *et al.* (1996) observaram esteatose hepática em ratos portadores do tumor de Walker 256, uma neoplasia experimental que induz à síndrome da caquexia.

Os rins e o baço também podem apresentar um aumento transitório, seguido de regressão e atrofia, observados em ratos portadores de tumores experimentais não envolvendo esses órgãos (TESSITORE *et al.*, 1993; De BLAAUW *et al.*, 1997).

Também são descritas alterações no consumo de substratos pelos órgãos do hospedeiro. No cérebro, a utilização da glicose é severamente deprimida e corpos cetônicos tornam-se o combustível metabólico alternativo (MULLIGAN & TISDALE, 1991; DILLS, 1993). O metabolismo da glutamina, um aminoácido utilizado por células tumorais como substrato energético (KOVACEVIC & MORRIS, 1972), está alterado nas células da mucosa intestinal de ratos portadores de sarcoma induzido pelo metil-colantreno (De BLAAUW *et al.*, 1997). A presença do tumor estaria associada a um aumento da depleção da glutamina intracelular, conduzindo a distúrbios no crescimento e diferenciação de

enterócitos e conseqüente perda da função da mucosa como uma barreira a macromoléculas.

Estudos sobre alterações estruturais ou funcionais dos vasos sanguíneos pré-existentes associadas à caquexia tumoral, entretanto, são raros. Considerando-se que a desnutrição é um dos componentes da síndrome da caquexia tumoral, os resultados obtidos por YOSHIDA *et al.* (1995), trabalhando com aortas de ratos desnutridos, foram as únicas referências pertinentes ao assunto encontradas na literatura. Os autores descrevem alterações morfológicas na adventícia e na camada média da aorta abdominal e uma diminuição da resistência do vaso, avaliada pela tensiometria longitudinal, estando o enfraquecimento da parede da aorta, possivelmente associado às modificações da sua estrutura. Coincidentemente, os autores também citam a raridade de dados de literatura sobre o assunto.

De fato, os estudos sobre desordens vasculares associadas ao câncer se referem a complicações causadas por efeitos locais, como a compressão e oclusão do vaso, ou como expressão de outras desordens paraneoplásicas ou, ainda, pelo impacto de terapias anti-tumorais, sendo que as principais complicações descritas são as trombooses, as tromboembolias e as vasculites (NASCHITZ *et al.*, 1996).

É, no mínimo, intrigante que muito pouco tenha sido estudado sobre os efeitos da presença de um tumor que induz à caquexia no tecido vascular pré-existente do hospedeiro, já que é um tecido extremamente extenso e dos primeiros a ter contato com os fatores produzidos pelo tumor. Pode-se supor, por exemplo, que os efeitos sistêmicos que ocorrem na síndrome da caquexia tumoral, atinjam também os vasos do hospedeiro não envolvidos diretamente no crescimento neoplásico.

Estudos das características estruturais e do comportamento funcional desses vasos permitiria delinear ainda melhor o quadro geral dos pacientes com câncer.

enterócitos e conseqüente perda da função da mucosa como uma barreira a macromoléculas.

Estudos sobre alterações estruturais ou funcionais dos vasos sanguíneos pré-existentes associadas à caquexia tumoral, entretanto, são raros. Considerando-se que a desnutrição é um dos componentes da síndrome da caquexia tumoral, os resultados obtidos por YOSHIDA *et al.* (1995), trabalhando com aortas de ratos desnutridos, foram as únicas referências pertinentes ao assunto encontradas na literatura. Os autores descrevem alterações morfológicas na adventícia e na camada média da aorta abdominal e uma diminuição da resistência do vaso, avaliada pela tensiometria longitudinal, estando o enfraquecimento da parede da aorta, possivelmente associado às modificações da sua estrutura. Coincidentemente, os autores também citam a raridade de dados de literatura sobre o assunto.

De fato, os estudos sobre desordens vasculares associadas ao câncer se referem a complicações causadas por efeitos locais, como a compressão e oclusão do vaso, ou como expressão de outras desordens paraneoplásicas ou, ainda, pelo impacto de terapias anti-tumorais, sendo que as principais complicações descritas são as trombooses, as tromboembolias e as vasculites (NASCHITZ *et al.*, 1996).

É, no mínimo, intrigante que muito pouco tenha sido estudado sobre os efeitos da presença de um tumor que induz à caquexia no tecido vascular pré-existente do hospedeiro, já que é um tecido extremamente extenso e dos primeiros a ter contato com os fatores produzidos pelo tumor. Pode-se supor, por exemplo, que os efeitos sistêmicos que ocorrem na síndrome da caquexia tumoral, atinjam também os vasos do hospedeiro não envolvidos diretamente no crescimento neoplásico.

Estudos das características estruturais e do comportamento funcional desses vasos permitiria delinear ainda melhor o quadro geral dos pacientes com câncer.

1.2. AMINO-OXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA (SSAO)

Medidas da atividade de enzimas características de um determinado tecido podem ser utilizadas como uma ferramenta na investigação de alterações do tecido, mesmo antes de mudanças morfológicas detectáveis.

A Amino-Oxidase Sensível à Semicarbazida (SSAO) é uma enzima amplamente distribuída em tecidos de mamíferos (LEWINSOHN, 1984), inclusive no plasma (BERGERET, BLASCHKO, HAWES, 1957; McEWEN & COHEN, 1963). A enzima apresenta atividade catalítica particularmente elevada na parede dos vasos e em tecidos altamente vascularizados, como o pulmão, estando localizada nas células de músculo liso (RYDER *et al.*, 1980; LEWINSOHN, 1981a; LYLES & SINGH, 1985).

A SSAO cataliza a desaminação oxidativa de monoaminas primárias, conforme a reação geral: $R-CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + NH_3 + H_2O_2$ (LEWINSOHN, 1984). A literatura mais recente vem incluindo a enzima na classificação E.C. 1.4.3.6 (a classificação de amino-oxidases que contém cobre), embora o substrato endógeno, assim como seu papel fisiológico ainda sejam desconhecidos.

Provavelmente essa seja a principal razão dos problemas de nomenclatura da enzima verificados na literatura, além de diferenças no comportamento espécie-dependente (LEWINSOHN, 1984).

As denominações Amino-oxidase Sensível à Semicarbazida (enzima tecidual, SSAO - BARRAND & CALLINGHAM, 1984) e Benzilamino-oxidase (enzima plasmática, BZAO - BERGERET *et al.*, 1957) são as mais frequentes. A identidade das duas enzimas ainda é discutida, embora dividam as mesmas características bioquímicas e de distribuição, podendo ser, na verdade, a mesma enzima ou sub-tipos de uma mesma enzima (LYLES, HOLT, MARSHALL, 1990; RAIMONDI *et al.*, 1991). De fato, as duas denominações, em si, não fazem qualquer referência ao seu papel fisiológico. O nome SSAO dá ênfase a um inibidor da enzima e o nome BZAO, a um substrato não fisiológico.

Algumas possíveis funções da SSAO vêm sendo propostas, baseadas na sua localização, substratos e produtos da reação.

Nas células de músculo liso, a enzima estaria associada à membrana plasmática e membranas de microsossomos (WIBO, DUONG, GODFRAIND, 1980; LEWINSOHN, 1981a; HYSMITH & BOOR, 1988), tendo pelo menos metade dos seus sítios ativos voltados para a face externa da membrana (HOLT & CALLINGHAM, 1994). Essa localização sugere um envolvimento da enzima na inativação de amins circulantes, prevenindo que elas alcancem os tecidos (WALDMEIER, 1987; ELLIOTT, CALLINGHAM, SHARMAN, 1989).

Inúmeras amins foram testadas, sendo que a benzilamina (amina sintética, não detectada nos organismos) tem sido utilizada como substrato de preferência para determinações bioquímicas (LEWINSOHN, 1984; ELLIOTT *et al.*, 1989; YU, 1990).

A putrescina acetilada, uma poliamina envolvida na proliferação celular, parece ser um possível substrato da SSAO (IGNESTI *et al.*, 1992). LEWINSOHN (1977) sugeriu uma associação da enzima com fenômenos ligados a crescimento vascular em estudos com pacientes com queimaduras extensas e em pacientes com câncer.

A metilamina, a aminoacetona (biogênicas) e a alilamina (xenobiótica) são as amins que atualmente têm despertado maior interesse na literatura. Os aldeídos formados (formaldeído, metilglioxal e acroleína, respectivamente) são tóxicos para células cardiovasculares (BOOR & HYSMITH, 1987; McLELLAN, PHILLIPS, THORNALLEY, 1992; YU & ZUO, 1993) e parecem estar envolvidos na patogênia de lesões endoteliais e formação da placa de ateroma no *diabetes mellitus* e lesões de cardiomiócitos na insuficiência cardíaca congestiva (YU & ZUO, 1993; AWASTHI & BOOR, 1993; BOOMSMA *et al.*, 1995 e 1997). A investigação da atividade enzimática no plasma em doenças cardiovasculares humanas para o diagnóstico e determinação do grau de gravidade da doença foi objetivo de alguns dos primeiros estudos realizados (McEWEN & HARRISON, 1965; NILSSON, TRYDING, TUFVESSON, 1968; TRYDING *et al.*, 1969).

Outra possível função da amino-oxidase sugerida seria a modulação e regulação do tônus vascular associada à produção de amônia e peróxido de hidrogênio, substâncias que estariam envolvidas na transdução de estímulos externos na membrana das células de músculo liso (CALLINGHAM, HOLT, ELLIOTT, 1990; ELLIOT & CALLINGHAM, 1991).

Estudos recentes com camundongos têm demonstrado que a proteína de adesão vascular 1 (VAP-1), uma molécula de adesão e fator mediador de interações entre linfócitos e células endoteliais, divide semelhanças estruturais com a família de amino-oxidases que contém cobre e, nas células de músculo liso vascular, apresenta uma atividade de monoamino-oxidase (BONO *et al.*, 1998; BONO, JALKANEN, SALMI, 1999). Essas características sugerem que a molécula das células musculares tenha um papel regulador nos níveis de aminas, sejam aquelas potencialmente tóxicas liberadas pelas células lesadas durante processo inflamatório, sejam aquelas bioativas, participantes do processo (SMITH *et al.*, 1998). No ser humano, entretanto, a VAP-1 de células de músculo liso é estruturalmente e funcionalmente distinta da VAP-1 presente nas células endoteliais (JOAKKOLA *et al.*, 1999).

1.3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Do ponto de vista clínico, torna-se importante avaliar possíveis alterações vasculares de pacientes com neoplasias malignas, especialmente nos estágios avançados da caquexia, já que essas alterações podem ser a causa de complicações em procedimentos terapêuticos, especialmente os cirúrgicos.

Embora passível de críticas, o uso de modelos animais ainda é uma importante ferramenta no estudo da fisiopatologia do câncer. O sarcoma induzido pelo 3-metil-colantreno (MCA) é um tumor experimental que reconhecidamente induz à caquexia em ratos e camundongos (LUNDHOLM *et al.*, 1980; GARATTINI & GUAITANI, 1981; POPP, MORRISON, BRENNAN, 1981; SMITH, CONN, KLUGER, 1993; CHEN *et al.*, 1993). A análise morfológica e a utilização de um índice bioquímico na avaliação das condições da aorta de ratos portadores desse tumor poderiam dar informações sobre o comprometimento dos vasos pré-existentes nas fases mais adiantadas da doença.

Por outro lado, embora estudos bioquímicos e imunocitoquímicos venham sendo realizados, o significado de algumas substâncias, entre elas da SSAO, ainda é desconhecido.

Ante esse panorama, os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar o perfil clínico-laboratorial das ratas portadoras do fibrossarcoma induzido pelo 3-metil-colantreno.
2. Estudar as possíveis alterações da aorta das ratas, examinando a morfologia vascular e determinando a atividade da Amino-oxidase Sensível à Semicarbazida (SSAO) tecidual.
3. Identificar possíveis alterações morfológicas no tecido muscular esquelético dos animais doentes, utilizando o *biceps femoris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizadas, para a realização deste estudo experimental, 143 ratas isogênicas da linhagem WAB Not (Wistar Albino Boots de Nottingham), espécie *Ratus norvegicus*, sendo que 30 desses animais foram utilizados nas padronizações prévias das técnicas empregadas. As ratas, fornecidas pelo Centro de Bioterismo-CEMIB/UNICAMP, tinham de 8 a 10 semanas de idade na fase de implante do tumor e foram mantidas no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE)/UNICAMP durante a fase de experimentação, sob condições convencionais controladas. Foi-lhes fornecida ração NUVILAB, peletizada, obtida comercialmente, e água *ad libitum*. O fotoperíodo no biotério foi controlado em 12 horas-luz e 12 horas-escuro, não havendo controle de temperatura e umidade ambientais. A escolha de fêmeas se deu porque a linhagem tumoral foi estabelecida *de novo* em animais desse sexo.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Certificado n° 175-1).

2.2. INDUÇÃO, TRANSPLANTE E MANUTENÇÃO DO TUMOR

A linhagem tumoral, primariamente induzida pelo 3-metil-colantreno em ratos isogênicos em Nottingham (Inglaterra), foi estabelecida *de novo* no Brasil a partir de cultura de células tumorais mantidas em nitrogênio líquido e inoculadas na camada subcutânea do dorso dos animais. As gerações seguintes do tumor foram obtidas através de transplante de fragmentos do tecido. Os animais com tumor que serviram de matrizes para esse trabalho foram doados pela Prof. Dra. Ester Maria Danielli Nicola, do Laboratório Experimental de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP. As gerações do tumor utilizadas foram da 34^a a 44^a, contadas a partir da

inoculação de células cultivadas. A caracterização do tumor foi feita por meio de estudos de microscopia óptica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica. Para acompanhamento de alterações nas características do tumor foi realizada monitorização histológica do tecido nas diferentes gerações, utilizando-se cortes de 5 micrometros de espessura feitos no micrótomo modelo 820-Spencer – AMERICAN OPTICAL CORPORATION e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

De acordo com a técnica padronizada no Laboratório Experimental de Laser, um fragmento do tecido tumoral era introduzido em um túnel subcutâneo feito transversalmente, da esquerda para a direita, no dorso dos animais receptores, com posterior fechamento da incisão. O tumor foi colhido com um "punch" para coleta de biópsia de 5 mm de diâmetro e mantido em solução de cloreto de sódio a 0,9 % por 5 a 10 minutos até o implante. A confirmação do crescimento do tumor implantado foi feita através de palpação diária.

2.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em Grupo Controle (n=91), constituído de ratas não portadoras de tumor, e Grupo Sarcoma (n=52), ratas em que ocorreu o crescimento do tumor.

2.4. FASE DA COLETA E EUTANÁSIA

Para todas as técnicas e métodos empregados, a coleta dos tecidos foi realizada nas fases finais do crescimento tumoral, quando o tamanho do tumor era de, pelo menos, 5 centímetros, equivalente a um peso mínimo de 40 gramas, e o animal apresentava sinais indicativos de caquexia.

A eutanásia foi realizada nos ratos sob anestesia inalatória com éter etílico, por exanguinamento ou perfusão de fixador, de acordo com a análise a ser realizada.

2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO DOS ANIMAIS

2.5.1. Condições gerais

Os animais foram acompanhados durante o período de crescimento do tumor para detecção de possíveis alterações da aparência física e do comportamento natural, através de parâmetros gerais como atividades físicas, aspecto da pelagem, postura e comportamento anormal. Na data da eutanásia foram feitas as observações e medidas que se seguem:

- (a) idade, em meses;
- (b) peso corporal total e peso da carcaça (peso total subtraído do peso do tumor) em gramas, dos animais distribuídos em três faixas etárias (3,5 a 4 meses; 4,5 a 5 meses; 5,5 meses e acima);
- (c) peso do tumor, em gramas, e localização da massa tumoral (à direita, à esquerda ou bilateral);
- (d) tempo de crescimento do tumor, em dias;
- (e) taxa de crescimento médio do tumor, valor obtido a partir do quociente do peso pelo tempo de crescimento tumorais e expresso em gramas/dia.
- (f) exame macroscópico das vísceras.

2.5.2. Exames laboratoriais complementares

Para complementar a avaliação das condições gerais dos animais portadores de tumor em relação aos não portadores, foram realizados exames bioquímicos e hematológicos a partir de amostras de sangue colhido da aorta abdominal de 20 ratas do Grupo Controle e 20 do Grupo Sarcoma.

As amostras de sangue total heparinizado e as de soro, obtido após centrifugação a 2000 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos em centrífuga refrigerada modelo DU-MF 190 - INCIBRÁS, foram conservadas adequadamente até a análise. Foram dosados cálcio iônico, sódio e potássio (mmol/l); glicose, uréia e creatinina (mg/dl); proteínas totais e albumina (g/dl); osmolaridade (mOsm); hematócrito (%) e hemoglobina

(g/dl); pH, pressão parcial de oxigênio (pO_2 – mmHg) e pressão parcial de gás carbônico (pCO_2 – mmHg); ion bicarbonato (HCO_3^- – mmoles/l) e consumo de base (BE). As dosagens foram realizadas nos analisadores bioquímicos de automação COBAS MIRA - ROCHE e SELECTRA VITALAB - MERCK e no auto-analisador de gases, eletrólitos, glicose e hematócrito START PROFILE 5 - NOVA BIOMEDICAL, no mesmo dia da coleta.

2.6. ATIVIDADE DA SSAO

2.6.1. Fontes da enzima

Nas determinações da atividade da SSAO, foram utilizados homogenatos de aortas obtidas de 30 ratas do Grupo Controle e 18 do Grupo Sarcoma. Devido à pequena quantidade de material obtido por animal, cada homogenato foi preparado a partir de um conjunto de 6 aortas, num total de 5 homogenatos do Grupo Controle e 3 do Grupo Sarcoma.

Para a coleta dos vasos, os animais foram, inicialmente, exangüinados utilizando-se um dispositivo para infusão intravenosa (“scalp”) número 21G introduzido na aorta abdominal. Após a morte do rato, as aortas foram perfundidas com 20 ml de tampão fosfato de potássio 1 mM, pH 7,2 e coletadas.

Através de fricção com uma compressa de gaze, foi retirada grande parte da adventícia dos vasos para que restassem basicamente as camadas média e íntima.

As aortas coletadas foram conservadas à temperatura de $-20^\circ C$ durante um período máximo de uma semana, condições nas quais, de acordo GUFFROY & BENEDETTI (1984), não há perda significativa da atividade da enzima.

Os homogenatos foram preparados no mesmo dia em que foram feitas as dosagens radiométricas e de proteínas totais.

A homogeneização foi feita em tampão de fosfato de potássio 1 mM pH 7,2 com o homogeneizador, modelo TR-10 - TECKMAR e hastes S25N-10 g ou 8 g, com 5 pulsos de 5 segundos na velocidade “high”, em banho de gelo. Os homogenatos foram centrifugados na velocidade de 2000 rpm durante 10 minutos a $5^\circ C$, utilizando-se o

sobrenadante para as dosagens necessárias.

2.6.2. Determinação da concentração de proteínas totais

As proteínas totais dos sobrenadantes dos homogenatos foram dosadas pelo Método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro modelo DU-MF 190 - INCIBRÁS e cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico. Os resultados foram expressos em mg/ml.

Também foram calculadas as concentrações das proteínas totais por grama de aorta, considerando-se o peso total do material utilizado em cada "pool" de vasos e os resultados das dosagens dos homogenatos. Os resultados foram expressos em mg/g.

2.6.3. Método enzimático

As atividades específicas da enzima SSAO nas aortas foram determinadas através do radiomicroensaio (RME) desenvolvido por WURTMAN & AXELROD (1963), modificado por McCAMAN *et al.* (1965) e adaptado por LEWINSOHN (1981a, b), LEWINSOHN, GLOVER, SANDLER (1980a, b) e LEWINSOHN *et al.* (1978). As leituras radiométricas foram feitas por 5 minutos para cada amostra no Sistema de Cintilação Líquida modelo LS 5801 - BECKMAN.

O substrato utilizado foi o hidrocloreto de benzilamina ^{14}C com atividade específica de 51,0 mCi/mmol adquirido do Radiochemical Center plc, Amersham, Inglaterra, e a radioatividade específica utilizada nos ensaios de 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. As diluições da benzilamina (Bz) foram feitas em tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 8,0.

Os parâmetros cinéticos utilizados foram a Constante de Michaelis (K_m) e a Velocidade Máxima da Reação (V_{max}), calculadas a partir do método de WILKINSON (1961). O K_m reflete a afinidade da enzima por um substrato específico e numericamente é igual à concentração do substrato onde a velocidade de reação é igual à metade da V_{max} . A velocidade máxima é a velocidade da reação obtida sob condições de saturação da enzima pelo substrato.

Os resultados do K_m foram expressos em μM e os da V_{max} em nanomoles/mg/h.

2.6.4. Reação enzimática

Para as dosagens, foram utilizados 50 μ l de substrato e 50 μ l de sobrenadante contendo a enzima. Os tubos brancos foram iguais aos tubos controle, exceto pela adição de ácido cítrico 2 M antes do substrato. As pipetagens do substrato foram feitas em banho de gelo.

Imediatamente antes da incubação com o substrato, feita a 37°C, todos os tubos receberam um fluxo de 5 psi de oxigênio super-seco a 100 % durante 3 segundos sendo tampados logo a seguir. A reação com o substrato foi interrompida pela adição de 20 μ l de ácido cítrico. Todas as dosagens foram feitas em duplicata em tubos de polipropileno de 75 x 12 mm.

A extração dos produtos da reação foi feita adicionando-se 0,8 ml de solvente (tolueno e acetato de etila na proporção 1:1). Os tubos foram, então, tampados e agitados duas vezes por 3 segundos em agitador mecânico, com intervalo de 15 minutos, e centrifugados a 2.500 rpm numa temperatura de 5°C durante 10 minutos. Em seguida, foram colocados sobre um banho de gelo seco até congelamento da fase aquosa. A fase orgânica sobrenadante foi, então, decantada em tubos de polipropileno e foram acrescentados 2,5 ml de líquido de cintilação, preparado com 5 g de 2,5-difeniloxazol(PPO)/litro de tolueno. A radioatividade, em contagens por minuto (cpm), foi medida por 5 minutos. Todas as leituras das amostras foram corrigidas pelos brancos correspondentes. Foram feitas leituras diretas dos substratos utilizando-se 20 μ l de cada concentração + 0,8 ml de etanol + 2,5 ml de líquido de cintilação. Todos os resultados foram expressos como as médias das duplicatas cujas diferenças não deveriam ultrapassar 5%.

2.6.5. Atividade específica da enzima

A atividade específica das enzimas, base para o cálculo do K_m e da V_{max} , foi expressa em nanomoles/mg de proteína/hora e calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{A \times n \times 1000 \times 100 \times 60}{D \times V \times E \times T \times P}$$

onde:

A = contagem das amostras em cpm;

n = nanomoles de substrato no tubo de reação;

D = contagem direta de substrato em cpm no volume de substrato usado na reação;

V = volume de homogenato utilizado para a reação em microlitros;

E = eficiência de extração de radioatividade;

T = tempo de reação em minutos;

P = proteínas totais do homogenato em mg/ml.

2.6.6. Padronizações prévias

A partir de curvas de padronização prévias, foram estabelecidas para as reações: concentração de proteínas totais dos homogenatos de 1,0 mg/ml; tempo de incubação com o substrato de 20 minutos; pH de 8,0 para a preparação da Bz; faixa de cinco concentrações para o K_m , 10-50 μ M; eficiência de extração de radiatividade de 91%.

2.7. MORFOLOGIA

2.7.1. Avaliação macroscópica dos vasos abdominais

Após identificação das principais artérias abdominais envolvidas na irrigação do tumor e para melhor visualização e registro fotográfico, foi realizado um molde de NEOPRENE®, preparado com corante verde e injetado via descendente na aorta abdominal de 3 ratas portadoras de tumor e de 3 ratas controle.

O procedimento foi realizado manualmente com seringa de 5 ml e catéter de polietileno (PE 200), num volume suficiente para preencher o sistema, inclusive artérias de menor calibre.

Em seguida, os animais foram mantidos por uma noite em geladeira e no dia seguinte foi feita a dissecação e fixação do conjunto de tecidos da parede retroperitoneal em formalina a 10% tamponada com sais de fosfato de sódio e pH 7,4. Na dissecação foram preservados os vasos abdominais desde a aorta infra-renal até artérias ilíacas, retirando-se pele e vísceras.

2.7.2. Medidas morfométricas das aortas, músculo esquelético e coração

As análises morfométricas foram feitas à microscopia óptica, sendo que tecidos de 11 ratos do Grupo Controle e 7 do Grupo Sarcoma foram examinadas.

Os animais foram perfundidos com formalina a 10%, tamponada. A pressão de perfusão nos 18 ratos foi de 100 a 110 mmHg durante 20 minutos, para evitar a fixação em estado de contração dos vasos.

Testes iniciais para treinamento da técnica e padronização dos procedimentos envolvidos na perfusão foram realizados a uma pressão de 15 mmHg durante 20 minutos em 3 animais com o tumor e 3 sem o tumor.

O fixador foi injetado com um "scalp" nº 21G posicionado no ventrículo esquerdo e a drenagem, feita através de uma pequena incisão no ventrículo direito. Após a perfusão, foram colhidos segmentos da aorta abdominal, desde a artéria renal direita até as ilíacas, coração e fragmento do músculo *biceps femoris*.

O material coletado foi fixado por mais 18-24 horas e desidratado em uma série crescente de concentrações de álcool (70°GL, 80°GL e absoluto, num total de 8 banhos), diafanizado em xilol (3 banhos) e dois banhos e inclusão com Paraplast com DMSO - OXFORD LABWARE a 60°C, no Auto-Técnico modelo Ultra II - TECHNICON INSTRUMENTS CORPORATION. A duração de cada banho foi de 1 hora.

Os cortes foram feitos com 5 µm de espessura no Micrótopo modelo 820-Spencer - AMERICAN OPTICAL CORPORATION e corados pela hematoxilina e eosina.

Na aorta foram medidos: (a) número de núcleos de células de músculo liso/área e (b) espessura da camada média; (c) diâmetro menor e (d) área luminal; (f) número de lâminas elásticas.

No coração foi medido o diâmetro interno do ventrículo esquerdo e no músculo esquelético, a área de secção transversa das fibras musculares.

As medidas foram realizadas em cortes transversais nos três órgãos. Cinco cortes da aorta de cada animal foram utilizados nas contagens morfométricas, excluindo-se aqueles com orientação diagonal. Dois recortes com os maiores diâmetros do ventrículo foram escolhidos e a medida foi feita desde o músculo papilar até o septo interventricular. Cem fibras de músculo esquelético de 3 a 6 feixes musculares, selecionados entre cortes de dois fragmentos do m. *biceps femoris* foram medidos.

As leituras de densidade, diâmetro e espessura na aorta foram feitas no microscópio óptico modelo LABOPHOTE – NIKON; as áreas dos vasos e das células musculares esqueléticas e a contagem de lâminas elásticas, no microscópio AXIOPLAN2 – ZEISS; o diâmetro das câmaras cardíacas, no microscópio universal de medições modelo U.W.M., - LEITZ e ocular de 10 vezes de aumento.

A densidade de núcleos foi medida com ocular de grade milimetrada KPL 8x - CARL ZEISS e objetiva de 40 vezes de aumento e contados 4 campos por corte, nas regiões centrais da camada muscular, evitando-se as regiões próximas à íntima e à adventícia. Na contagem foram incluídos os núcleos com orientação longitudinal e com, aparentemente, mais de 50% da área nuclear dentro do campo de medida. Os resultados apresentados são a média das medidas dos cinco cortes examinados por animal e expressos em número de núcleos/ μm^2 .

A ocular de régua milimetrada KPL W10x/18 - CARL ZEISS foi utilizada nas medidas de espessura, (objetiva de 40 vezes de aumento) e diâmetros luminiais (objetiva de 10 vezes de aumento). A ocular foi aferida utilizando-se régua padrão 5 + 100/100 mm, CARL ZEISS. A espessura foi medida em 4 pontos, aproximadamente equidistantes e as lâminas elástica interna e externa foram estabelecidas como os limites para as mensurações (Figura 1). O diâmetro interno do vaso foi definido como a maior medida do eixo menor do lúmen, de uma parede a outra (“lesser fiber diameter”).

Os resultados apresentados são as médias dessas medidas expressas em μm .

As áreas de secção transversa das fibras esqueléticas e do lúmen do vaso foram calculadas utilizando-se o programa KS 300 V2.00, com o desenho realizado à mão-livre, com seleção de objetiva de 40 vezes de aumento para o músculo e 2,5 vezes para o lúmen.

Os resultados são as médias das medidas expressas em μm^2 e mm^2 ,

respectivamente.

As lâminas elásticas foram contadas sob microscopia de fluorescência, com objetiva de 40 vezes de aumento, a partir do fenômeno de auto-fluorescência induzido pela eosina. As contagens foram feitas em 4 pontos aproximadamente eqüidistantes.

Os resultados apresentados foram o menor e o maior número contados nos dois grupos de estudo e as médias e desvios-padrão de todas as contagens.

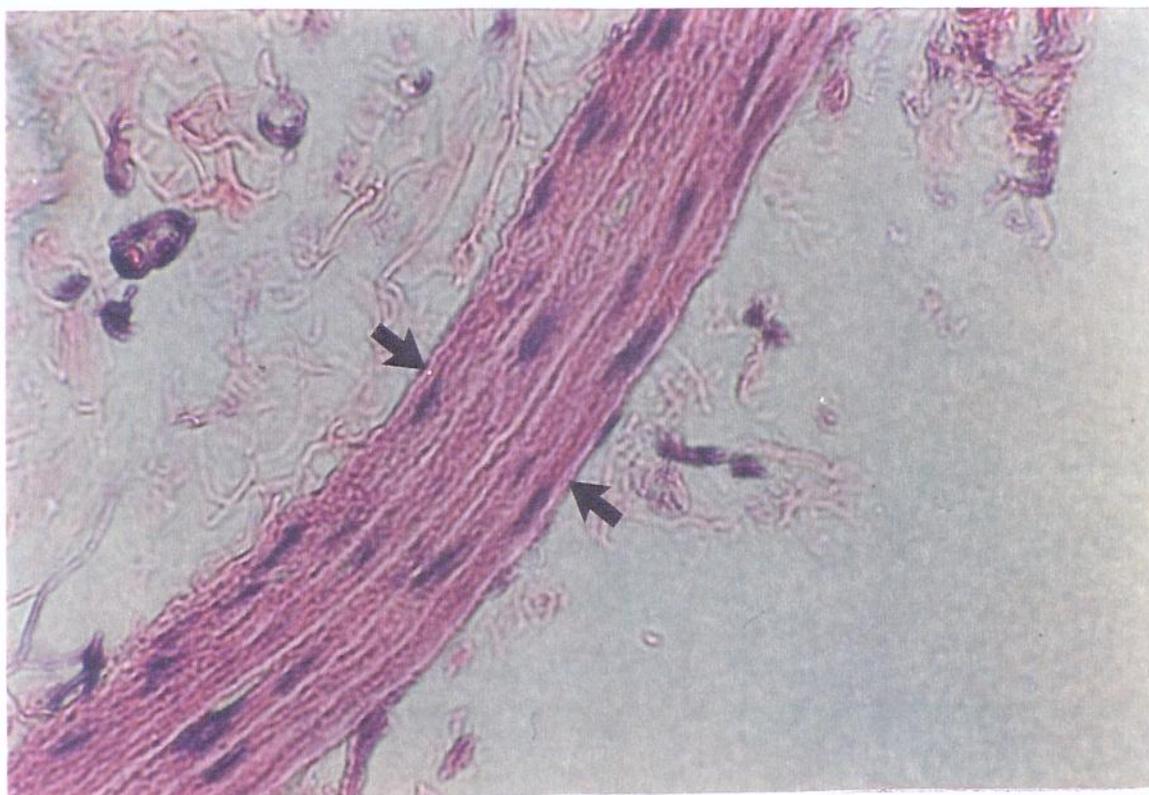


Figura 1. Fotomicrografia de aorta onde se podem observar as lâminas elásticas refringentes na camada média. As setas indicam os limites estabelecidos para a medida da espessura da camada. (HE, 500 vezes. Fixador: formalina a 10%, tamponada).

2.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Quatro ratas do Grupo Controle e três do Grupo Sarcoma foram perfundidas com 20ml de solução de Karnovsky (paraformaldeído e glutaraldeído) a 4%, pH 7,2 a 7,4, por 10 minutos, injetada no ventrículo esquerdo e drenada pelo ventrículo direito através de

uma pequena incisão.

Foram coletados tumor e aorta abdominal, recortados em pequenos fragmentos, mergulhados na solução de Karnovsky durante 2 horas e lavados com tampão cacodilato de sódio, na concentração de 4,28 g/dl, pH 7,2 a 7,4.

A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1 % durante 2 horas, lavando-se os fragmentos com acetato de uranila a 0,5 g/dl, deixando-os em repouso na solução por uma noite. A desidratação foi feita através de banhos consecutivos em uma série crescente de concentrações de acetona (30, 50, 70 e 90% e anidro), durante 15 minutos cada.

Os fragmentos desidratados foram colocados no rotor em mistura de resina de ARALDITE® e acetona na proporção 1:1 durante 4 horas e mantidos a 60°C em resina pura por 1 hora para inclusão em blocos e mais 48 horas para a polimerização.

Os cortes semi-finos, com aproximadamente 300 nm de espessura, foram feitos no ultra-micrótomo MT-5000 - SORVALL e corados com azul de toluidina Becto Chemical a 2 g/dl para seleção das melhores áreas. Os cortes ultra-finos foram feitos com espessura em torno de 90 nm, com navalha de diamante, no ultra-micrótomo MT-6000 XL - SORVALL. Colocados em tela de cobre de 150 MESH, foram corados com citrato de chumbo RIEDEL a 2,66 g/dl durante 10 minutos.

O material foi examinado no Microscópio Eletrônico de Transmissão Modelo M-10 - CARL ZEISS.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados, submetidos ao Teste de Kolmogorov-Smirnov, mostraram uma aproximação satisfatória à distribuição normal. Assim, a análise estatística para a comparação dos resultados obtidos foi realizada através do Teste T-Student para amostras independentes.

Os pesos dos animais foram submetidos à análise de variância (ANOVA de fator único) e o Teste de Student-Newman-Keuls foi empregado para estabelecer quais grupos eram diferentes.

O nível de significância α assumido foi de 0,05 para todos os tratamentos

estatísticos empregados, exceto para a análise do perfil hematológico e bioquímico dos animais e para as medidas morfométricas das aortas (comparações múltiplas no mesmo conjunto de casos). Nesses casos o nível de significância foi corrigido calculando-se a correção do erro α' para testes múltiplos (CROSS & CHAFFIN, 1982), pela fórmula:

$$\alpha' = \frac{(0,05)}{(n+1)-k}$$

onde: n = número total de variáveis

k = número de parâmetros onde $p < 0,05$

O intervalo de confiança a nível de 95% da diferença entre os grupos foi calculado para o perfil hematológico e bioquímico, para as dosagens enzimáticas e para as medidas morfométricas das aortas e apresentado nas respectivas tabelas.

3. RESULTADOS

3.1. O TUMOR

No exame ectoscópico, a neoplasia apresentava-se regularmente de forma esférica à ovóide, consistência firme e crescimento restrito ao local de implante, na camada subcutânea. Dos animais que receberam o implante, 17 tinham a massa tumoral localizada à direita, 4 à esquerda e em 27, o crescimento foi bilateral. Nenhuma metástase foi verificada nos animais portadores de tumor. Na Figura 2 pode ser vista uma fêmea com uma massa tumoral no dorso, à direita .



Figura 2. Aspecto geral de rata de 5 meses e 265 gramas, com crescimento de massa tumoral no dorso, à direita, pesando 80 gramas.

Os tumores coletados pesaram, em média, $67,7 \pm 18,8$ gramas ($n=52$) e o exame macroscópico do material, revelou uma massa encapsulada composta de uma região central necrótica e uma região periférica sugestiva de tecido tumoral viável (Figura 3).

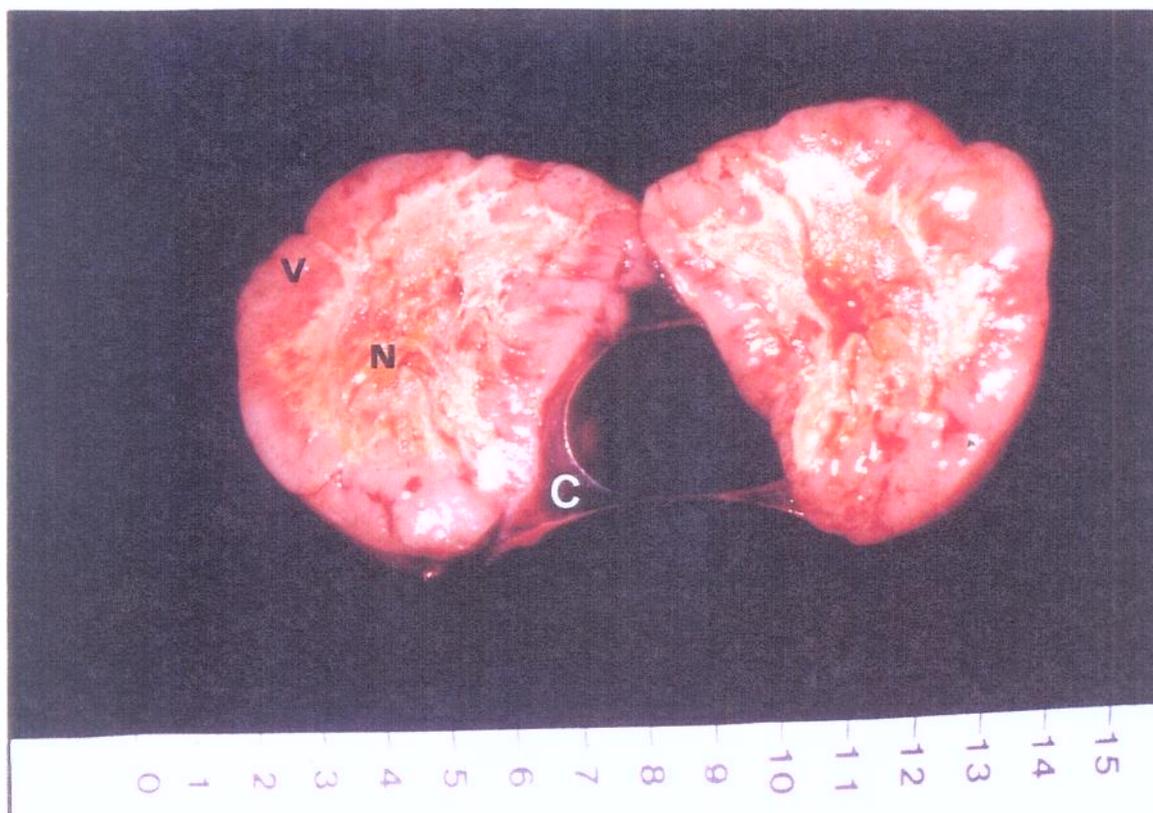


Figura 3. Macroscopia do tumor, visualizando-se uma região central com aspecto necrótico (N), uma região periférica composta de tecido, aparentemente, viável (V) e cápsula (C).

Os estudos de microscopia óptica confirmaram a necrose central da neoplasia e permitiram identificar, na região periférica, células com características mesenquimatosas, intensa anaplasia, presença de células gigantes multinucleadas e mitoses atípicas (Figura 4). Através da microscopia eletrônica, foram identificadas fibras de colágeno intra-celulares (Figura 5).

O resultado do exame imuno-histoquímico demonstrou presença difusa de vimentina e não evidenciou a presença de queratina, corroborando com o diagnóstico de sarcoma.

A taxa média de crescimento tumoral foi de $1,0 \pm 0,3$ g/dia, sendo que o tecido neoplásico não apresentou diferenças morfológicas macro e microscopicamente perceptíveis entre as gerações tumorais utilizadas.

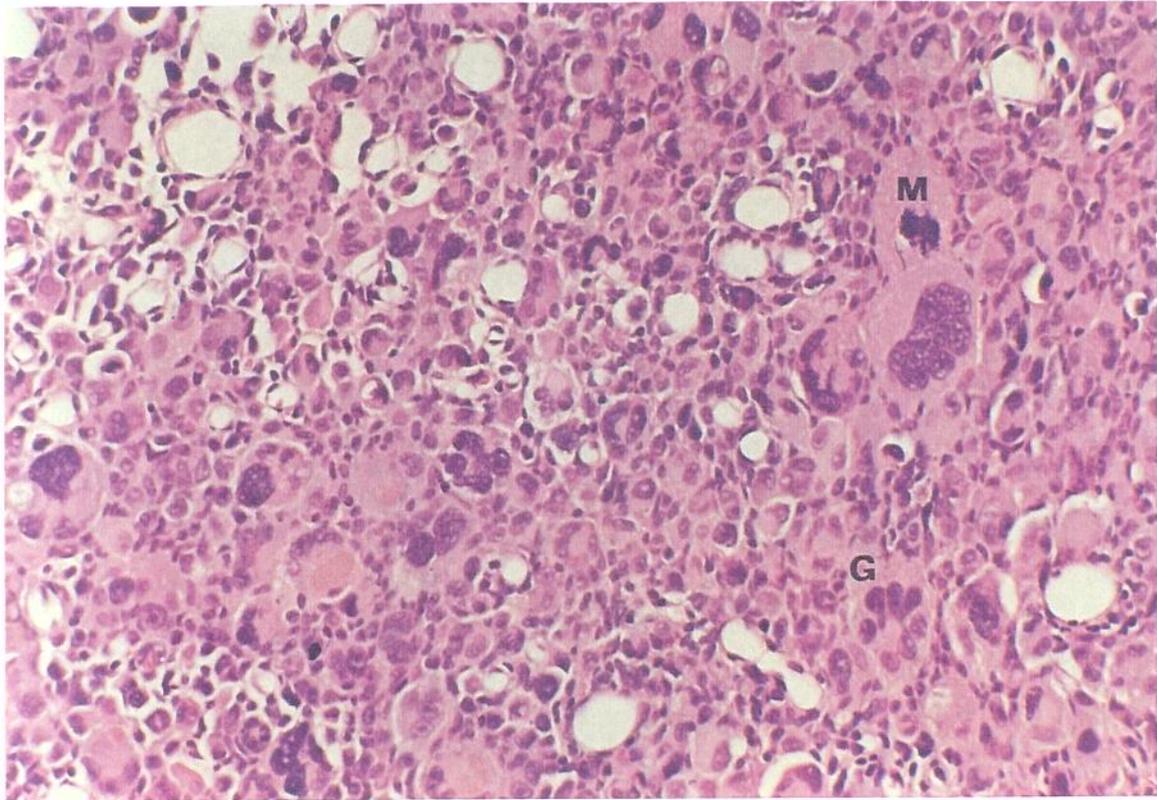


Figura 4. Massa tumoral apresentando intensa anaplasia caracterizada por polimorfismo celular e nuclear. Observam-se células gigantes neoplásicas multinucleadas (G) e mitose atípica (M). (HE, 250 vezes)

3.2. PERFIL CLÍNICO DOS ANIMAIS

3.2.1. Condições gerais

Em relação às condições gerais dos animais com tumor, foram observadas alterações comportamentais e físicas que se acentuavam na medida em que crescia a neoplasia.

O eriçamento e a perda de brilho dos pelos; a postura recurvada; a diminuição das atividades físicas e dificuldade na locomoção na razão direta do tamanho do tumor; a descoloração de mucosas e olhos; um aparente emagrecimento e ulcerações da pele acima do tumor foram as principais alterações encontradas.



Figura 5. Ultraestrutura da neoplasia: células tumorais com produção de fibras de colágeno (C). (14.000 vezes)

A média de peso dos animais com o tumor foi maior nas três faixas etárias estabelecidas (3,5 a 4,0 meses, 4,5 a 5,0 meses e 5,5 meses e acima), com diferenças estatisticamente significativas e $P < 0,05$. Nos animais mais jovens, as medidas médias obtidas foram de $181,6 \pm 9,9$ e $212,1 \pm 15,8$ g, na faixa etária intermediária, $194,1 \pm 17,5$ e $232,0 \pm 15,5$ g e nos mais velhos, $188,3 \pm 12,8$ e $237,8 \pm 13,0$ g, respectivamente no Grupo Controle e Grupo Sarcoma.

Quando comparadas as médias dos pesos dos animais sem o tumor, nos dois grupos de estudo, a média das carcaças nas três faixas etárias foi sempre menor, com $P < 0,05$. Em ordem crescente de idade, as médias foram de $155,6 \pm 13,9$ g, $157,5 \pm 26,3$ g e $159,7 \pm 11,4$ g para as carcaças dos animais do Grupo Sarcoma.

A comparação entre as médias de pesos distribuídos pelas três faixas etárias estabelecidas pode ser vista na Tabela 1.

No exame macroscópico das vísceras, o que chamou a atenção foi a aparente dilatação do coração, avaliada posteriormente por medidas de diâmetro do ventrículo esquerdo.

Tabela 1. Pesos (em gramas) considerando-se 3 faixas etárias

Faixa Etária (meses)	Grupo Controle (n=91)	Grupo Sarcoma (n=52)	
		Total	Carcça
3,5 a 4,0	181,6 ± 9,9 (n=22)	212,1 ± 15,8 (n=24)	155,6 ± 13,9 (n=24)
4,5 a 5,0	194,1 ± 17,5 (n=42)	232,0 ± 15,5 (n=10)	157,5 ± 26,3 (n=10)
5,5 meses e acima	188,3 ± 12,8 (n=27)	237,8 ± 13,0 (n=18)	159,7 ± 11,4 (n=18)

3.2.2. Exames laboratoriais

Dentre as 16 análises laboratoriais de sangue periférico realizadas, 12 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Portanto, o nível de significância corrigido passou a ser $\alpha' = 0,01$.

Os exames hematológicos apresentaram queda significativa ($P < 0,001$) nos animais com tumor. A média de hematócrito caiu de $45,75 \pm 3,61\%$ para $25,00 \pm 3,71\%$ e a hemoglobina, $15,25 \pm 1,20$ g/dl para $8,38 \pm 1,20$ g/dl.

Os valores médios de glicemia, proteínas totais e albumina dos ratos do Grupo Sarcoma também apresentaram queda estatisticamente significativa em relação ao Grupo Controle.

As diferenças mais acentuadas foram nos resultados da albumina e proteínas totais, com albumina = $3,09 \pm 0,33$ g/dl e $3,68 \pm 0,31$ g/dl e proteínas totais = $4,89 \pm 0,59$ g/dl e $6,02 \pm 0,61$ g/dl, respectivamente para o Sarcoma e o Controle ($P < 0,001$). A média das

dosagens da glicose foi de $184,55 \pm 41,08$ mg/dl para ratos sem tumor e $142,75 \pm 36,37$ mg/dl para ratos com câncer ($P < 0,002$).

Tabela 2. Dosagens hematológicas e bioquímicas sanguíneas de ratas do Grupo Controle versus Grupo Sarcoma

Grupo	Ht %	Hb g/d	Glicemia mg/dl	Ptn.Tot. g/dl	Alb g/dl
Controle					
média	45,75	15,25	184,55	6,02	3,68
(d.p.)	(3,61)	(1,20)	(41,08)	(0,61)	(0,31)
n	20	20	20	18	18
Sarcoma					
média	25,00	8,38	142,75	4,89	3,09
(d.p.)	(3,71)	(1,20)	(36,37)	(0,59)	(0,33)
n	20	20	20	16	16
P ($\alpha' = 0,01$)	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001
Diferença (Intervalo de confiança 95%)*	-45% (-40 a -51%)	-45% (-40 a -50%)	-23% (-9 a -36%)	-19% (-1 a -26%)	-16% (-10 a -22%)

Obs.: Ht – hematócrito; Hb – hemoglobina; Ptn.Tot. – proteínas totais; Alb. – albumina; d.p. – desvio-padrão. * O sinal negativo antes da porcentagem indica queda em relação ao grupo Controle.

Dentre os eletrólitos analisados, os valores médios do cálcio iônico e do potássio foram maiores no Grupo Sarcoma ($Ca^i = 1,42 \pm 0,12$ mmoles/l e $K = 5,24 \pm 0,51$ mmoles/l) do que no Grupo Controle ($Ca^i = 1,30 \pm 0,11$ mmoles/l e $K = 4,68 \pm 0,76$ mmoles/l). As diferenças foram estatisticamente significativas. As médias dos valores de sódio não foram estatisticamente distintas no Controle ($138,55 \pm 4,82$ mmoles/l) dos animais

com tumor ($137,40 \pm 3,42$ mmoles/l).

A uréia apresentou um aumento nos animais portadores de tumor ($73,75 \pm 26,37$ mg/dl) em relação aos não portadores ($41,25 \pm 6,27$ mg/dl). A creatinina, entretanto, não foi diferente nos dois grupos (Controle = $0,48 \pm 0,05$ mg/dl e Sarcoma = $0,46 \pm 0,08$ mg/dl; $P > 0,05$).

A osmolaridade mostrou valores médios de $277,90 \pm 8,93$ mOsm (Controle) e $272,60 \pm 6,18$ mOsm (Sarcoma) e $P = 0,036$, diferença não significativa para um $\alpha' = 0,01$.

Tabela 3. Dosagens bioquímicas sanguíneas de ratas do Grupo Controle versus Grupo Sarcoma

Grupo	Ca ⁱ mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Uréia mg/dl	Creat. mg/dl	Osmol. Mosm
Controle						
média	1,30	138,55	4,68	41,25	0,48	277,90
(d.p.)	(0,11)	(4,82)	(0,76)	(6,27)	(0,05)	(8,93)
n	20	20	19	16	18	20
Sarcoma						
média	1,42	137,40	5,24	73,75	0,46	272,60
(d.p.)	(0,12)	(3,42)	(0,51)	(26,37)	(0,08)	(6,18)
n	20	20	20	16	16	20
P ($\alpha' = 0,01$)	0,002	>0,05	0,006	<0,001	>0,05	0,036
Diferença (Intervalo confiança 95%)*	+9% (+4 a +15%)	-1% (-3 a +1%)	+12% (+3 a +21%)	+79% (+45 a +112%)	-6% (-16 a 4%)	-2% (-4 a 0,1%)

Obs.: Caⁱ - Cálcio iônico; Na - sódio; K - potássio; Creat. - creatinina; Osmol. - osmolaridade; d.p. - desvio-padrão. * O sinal negativo antes da porcentagem indica queda em relação aos valores do controle e o sinal positivo, aumento.

Os dados de pH e bicarbonato mostram queda acentuada, assim como um elevado valor negativo de consumo de base nos animais com tumor (pH = $7,228 \pm 0,073$; $\text{HCO}_3^- = 15,46 \pm 2,27$ mmoles/l; BE = $-10,58 \pm 2,78$) em relação aos animais controles (pH = $7,355 \pm 0,061$; $\text{HCO}_3^- = 20,69 \pm 2,12$ mmoles/l; BE = $-3,66 \pm 2,08$), com $p < 0,001$.

As pressões parciais dos gases não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos (Sarcoma: $\text{pO}_2 = 83,39 \pm 13,39$ mmHg, $p = 0,577$; $\text{pCO}_2 = 37,12 \pm 6,96$ mm Hg e Controle: $\text{pO}_2 = 80,43 \pm 18,22$ mmHg e $\text{pCO}_2 = 37,31 \pm 6,70$ mmHg, $p = 0,930$).

Os resultados obtidos são apresentados em valores médios e desvios-padrão na Tabela 2, 3 e 4, onde se pode ver o quadro geral das condições das ratas nos dois grupos de estudo.

Tabela 4. Dosagens de pH, gases, bicarbonato e consumo de base sanguíneos de ratas do Grupo Controle versus Grupo Sarcoma

Grupo	pH	pO_2 mmHg	pCO_2 mmHg	HCO_3^- mmol/l	BE
Controle (n=18)					
média	7,355	80,43	37,31	20,69	-3,66
(d.p.)	(0,061)	(18,22)	(6,70)	(2,12)	(2,08)
Sarcoma (n=20)					
média	7,228	83,39	37,12	15,46	-10,58
(d.p.)	(0,073)	(13,39)	(6,96)	(2,27)	(2,78)
P ($\alpha' = 0,01$)	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001
Diferença (Intervalo confiança 95%)*	-1,5% (-1 a -2%)	+4% (-9 a 17%)	+0,5% (-13 a +12%)	-25% (-18 a -32%)	-189% (-145 a -234%)

Obs.: pO_2 – pressão parcial de oxigênio; pCO_2 – pressão parcial de gás carbônico; HCO_3^- - bicarbonato; BE – consumo de base; d.p. – desvio padrão. * Valores negativos da porcentagem indicam queda em relação ao Controle e valores positivos indicam aumento.

3.3. ATIVIDADE DA SSAO

As velocidades máximas da reação de desaminação da benzilamina nos dois grupos de estudo apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com valor de $P = 0,012$. A média da V_{max} dos animais portadores de tumor ($84,71 \pm 18,65$ nmoles/mg/h) apresentou uma queda média de 35% em relação aos animais do grupo Controle ($129,63 \pm 16,75$ nmoles/mg/h).

As médias das Constante de Michaelis (K_m), entretanto, não foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos ($8,14 \pm 0,97$ μ M e $5,72 \pm 2,92$ μ M, respectivamente para o grupo Controle e Grupo Sarcoma), sendo o $P = 0,125$.

Os valores individuais, as médias, os desvios-padrão dos parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 5.

3.4. PROTEÍNAS TOTAIS NA AORTA

As concentrações de proteínas totais nas aortas (por grama de tecido) calculadas para os dois grupos de animais não foram estatisticamente diferentes ($p=0,768$). As médias foram de $45,4 \pm 9,7$ mg/g (Controle) e $43,5 \pm 4,3$ mg/g (Sarcoma).

3.5. MACROSCOPIA DA CAVIDADE ABDOMINAL

No exame da cavidade abdominal o que prontamente chamou a atenção foi o aspecto dos vasos, especialmente das veias, que se apresentavam dilatadas, tortuosas e com curso irregular (Figura 6). As artérias íleo-lombares, que partem da aorta abdominal e estão localizadas abaixo das artérias renais, foram identificadas como sendo as principais vias de irrigação do tumor e apresentavam numerosas ramificações na extremidade proximal ao tumor.

O molde de NEOPRENE® permitiu uma melhor visualização da vascularização da massa tumoral pelas artérias íleo-lombares. A Figura 7 mostra a parede retro-peritoneal, o tumor e as artérias que estão preenchidas com o polímero.

Não foi encontrado acúmulo de líquido intraperitoneal (ascite) em nenhum animal estudado.

Tabela 5. Constantes Cinéticas da atividade da SSAO contra a benzilamina em aortas de ratos do Grupo Controle e Grupo Sarcoma

Amostra	K_m	(e.p.)	V_{max}	(e.p.)
Controle				
1	6,50	(2,33)	118,46	(17,81)
2	8,76	(2,81)	154,42	(23,25)
3	8,07	(3,15)	120,75	(11,97)
4	8,89	(3,88)	139,38	(14,24)
5	8,48	(3,99)	115,15	(12,32)
Média	8,14		129,63	
(d.p.)	(0,97)		(16,75)	
Sarcoma				
1	5,21	(2,68)	73,70	(11,38)
2	3,09	(1,52)	74,19	(5,70)
3	8,86	(3,76)	106,24	(16,04)
Média	5,72		84,71	
(d.p.)	(2,92)		(18,65)	
Diferença (Intervalo de Confiança)	-30% (-72 a 11%)		-35% (-11 a -59%)	
CONTROLE X SARCOMA	K_m		P=0,125 (NS)	
	V_{max}		P=0,012 (S)	

Obs.: K_m – Constante de Michaelis, μM ; V_{max} – velocidade máxima, nanomoles/mg/h; d.p. – desvio-padrão; S – significativo; NS – não significativo. * Valores negativos da porcentagem indicam queda em relação ao Controle e valores positivos indicam aumento.

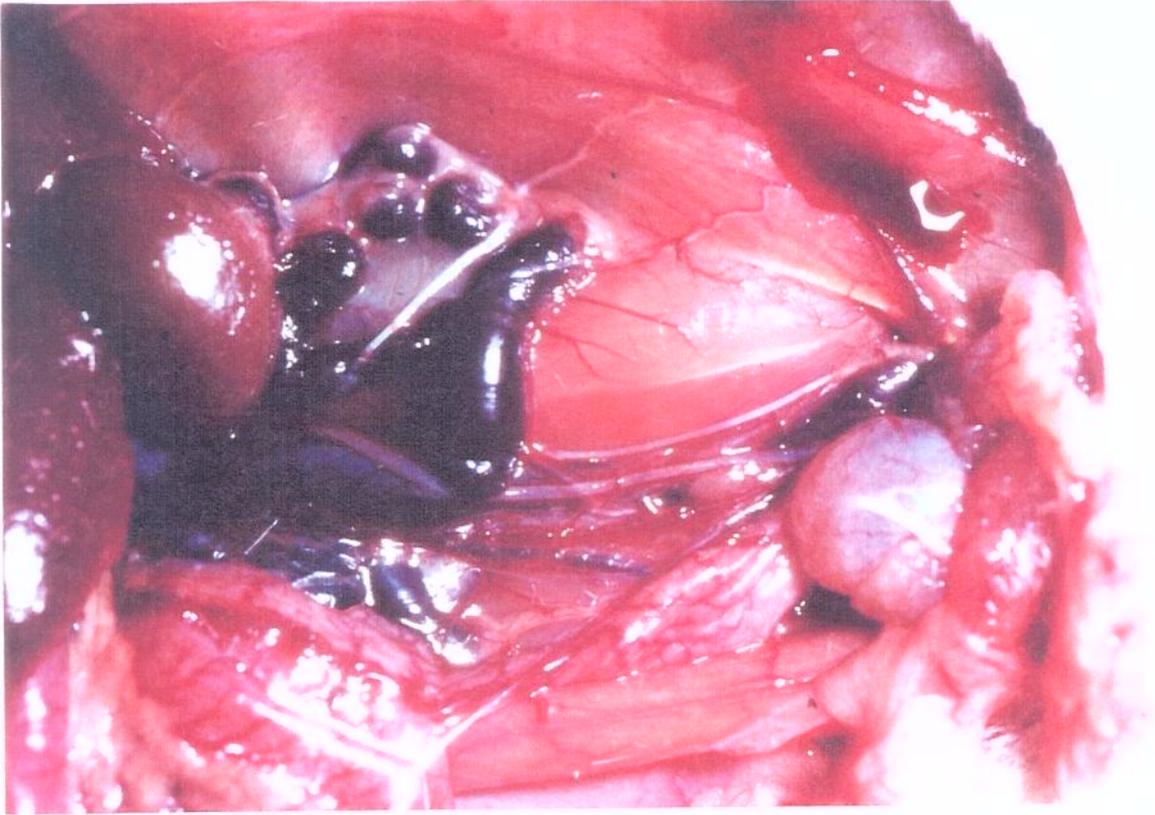


Figura 6. Parede retroperitoneal de animal portador de tumor de crescimento dorsal bilateral, mostrando o aspecto atípico das veias íleo-lombares.

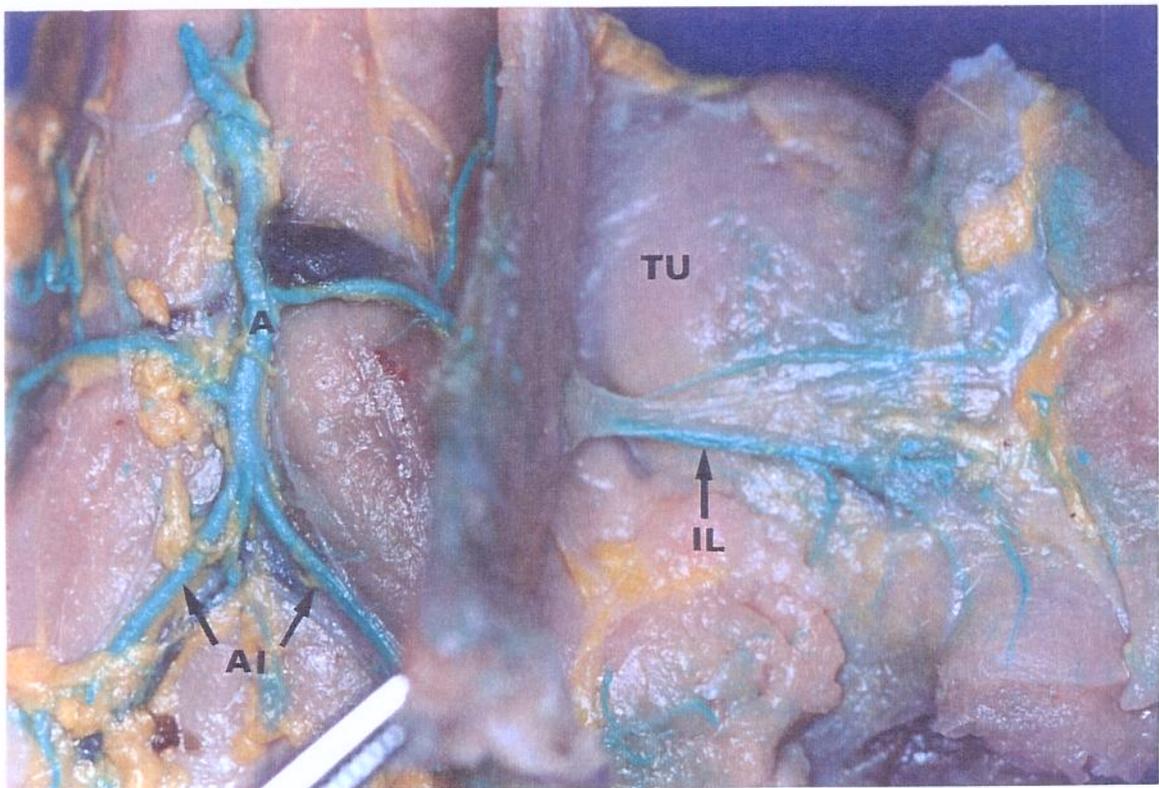


Figura 7. Molde de NEOPRENE® feito em rata com tumor onde se vê a artéria íleo-lombar esquerda irrigando a massa tumoral. A - aorta abdominal; IL - artéria íleo-lombar; TU - tumor; AI - artérias ilíacas.

3.6. MORFOLOGIA

3.6.1. Pressão de perfusão do fixador

O exame dos cortes histológicos das aortas perfundidas com pressão de 15 mmHg durante a fase de padronização da técnica, mostrou que os vasos dos animais sem tumor tinham aspecto mais contraído, com lâminas elásticas mais tortuosas do que aqueles dos animais com tumor. As Figuras 8A e B e 9A e B ilustram o achado em aortas de ratas da mesma faixa etária e com peso semelhante; tumor com 60 g.

3.6.2. Morfometria das aortas, músculo esquelético e coração

3.6.2.1. Aorta

Dentre as cinco variáveis morfométricas analisadas na artéria, somente uma apresentou resultados estatisticamente diferentes entre o Grupo Controle e o Grupo Sarcoma. O nível de significância corrigido foi calculado como $\alpha' = 0,01$.

A espessura da camada média diminuiu significativamente na aorta dos animais portadores de tumor (Sarcoma = $38,37 \pm 4,26 \mu\text{m}$ versus Controle = $50,04 \pm 2,54 \mu\text{m}$, $p < 0,001$).

A densidade dos núcleos por mm^2 de área não foi diferente nos dois grupos de estudo ($P = 0,240$). Foram contados $3,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$ núcleos e $2,8 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$ núcleos/ mm^2 , no Controle e no Sarcoma, respectivamente.

As medidas de diâmetro interno menor não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p=0,052$). Nos ratos com tumor a média foi de $0,48 \pm 0,11 \text{ mm}$ e nos controle, $0,59 \pm 0,08 \text{ mm}$.

As médias das medidas de área luminal dos vasos também não foram diferentes nos dois grupos ($p=0,276$), sendo $0,39 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ e $0,44 \pm 0,05 \text{ mm}^2$, nos controles e portadores de sarcoma, respectivamente.

A Figura 10 (A e B) ilustra aspecto geral das aortas quando submetidas à pressão de perfusão de 100 mmHg.

A Figura 11 (A e B) mostra detalhes de corte transversais das aortas de um animal controle e um doente, onde se vê a redução do tamanho nuclear e da espessura da média. Numa avaliação qualitativa das características dos núcleos, verificou-se que eles se coravam mais

intensamente com a hematoxilina e pareciam mais alongados e finos nos animais com tumor.

O número de lâminas elásticas contadas não foi diferente num grupo e noutro. Nos animais do Grupo Sarcoma a contagem variou de 4 a 7 lâminas, com média de $5,3 \pm 0,3$. Nos animais controle a faixa de contagem foi de 5 a 7 lâminas e média de $5,6 \pm 0,3$. Comparadas estatisticamente as medidas, não foi verificada diferença significativa ($p=0,090$).

Na figura 12 (A e B) podem ser vistos detalhes de cortes transversais de aortas dos grupos de estudo, analisados sob microscopia de fluorescência. O aspecto tortuoso, característico de contração do vaso, que apresentam no controle não é observado nos animais com tumor.

Os resultados das médias e desvios-padrão obtidos nas medidas morfométricas das aortas são apresentados na Tabela 6.

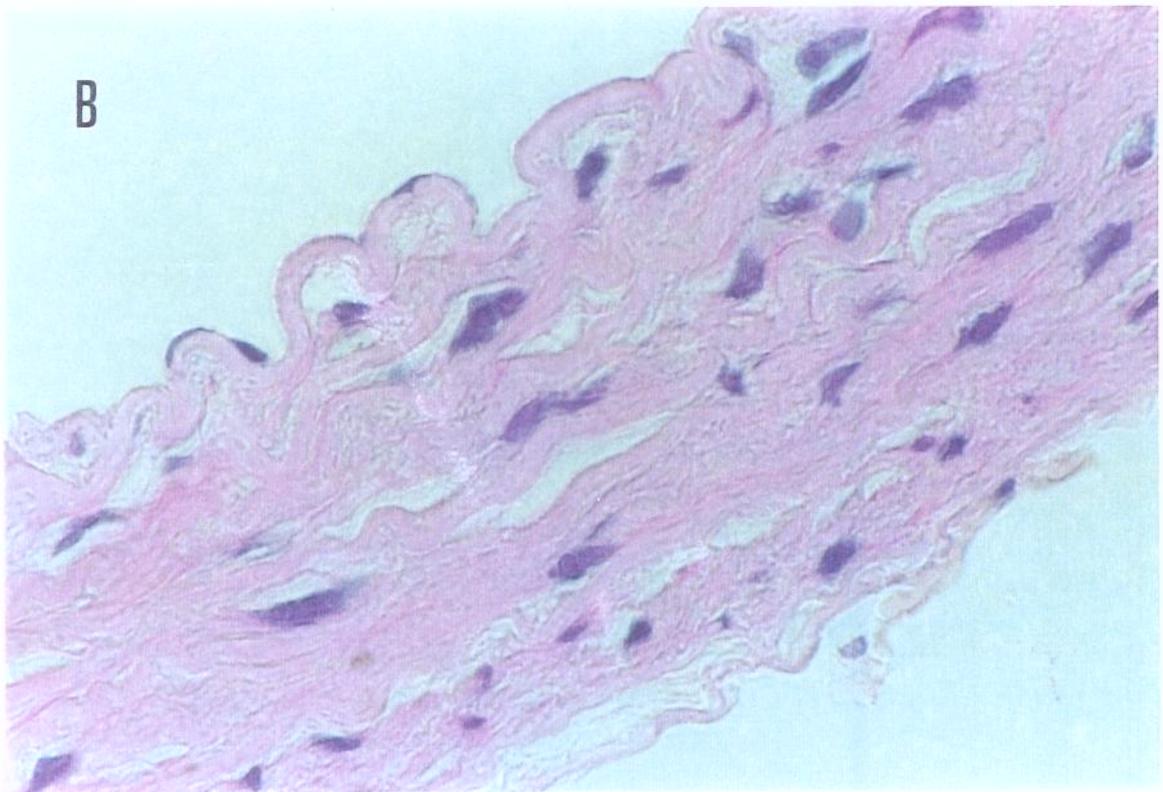
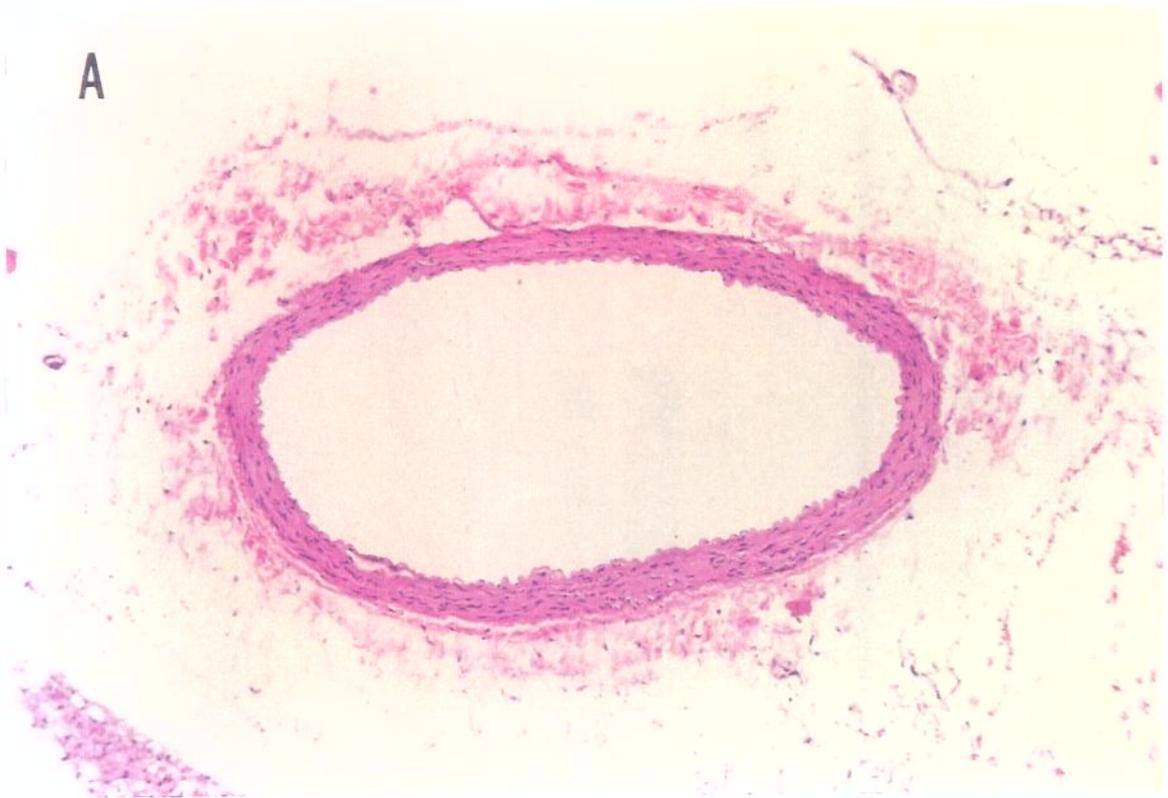
Tabela 6. Medidas morfométricas da aorta abdominal de ratas do Grupo Controle e do Grupo Sarcoma

GRUPO	Espessura da Camada Média (μm)	Núcleos ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Diâmetro Menor (mm)	Área Luminal* (mm^2)	Nº de Lâminas Elásticas (var.)
CONTROLE	50,04	$3,0 \times 10^3$	0,59	0,39	5,6
	2,54	$0,3 \times 10^3$	0,08	0,14	0,3 (5-7)
SARCOMA	38,37	$2,8 \times 10^3$	0,48	0,44	5,3
	4,26	$0,4 \times 10^3$	0,11	0,05	0,3 (4-7)
P ($\alpha' = 0,01$)	<0,001 (S)	=0,240 (NS)	=0,052 (NS)	=0,276 (NS)	=0,090 (NS)
Diferença (Intervalo confiança 95%)*	-23% (-17 a -30%)	+7% (-7 a +21%)	-19% (-2 a -34%)	+2% (-9 a +16%)	-5% (-10 a +1%)

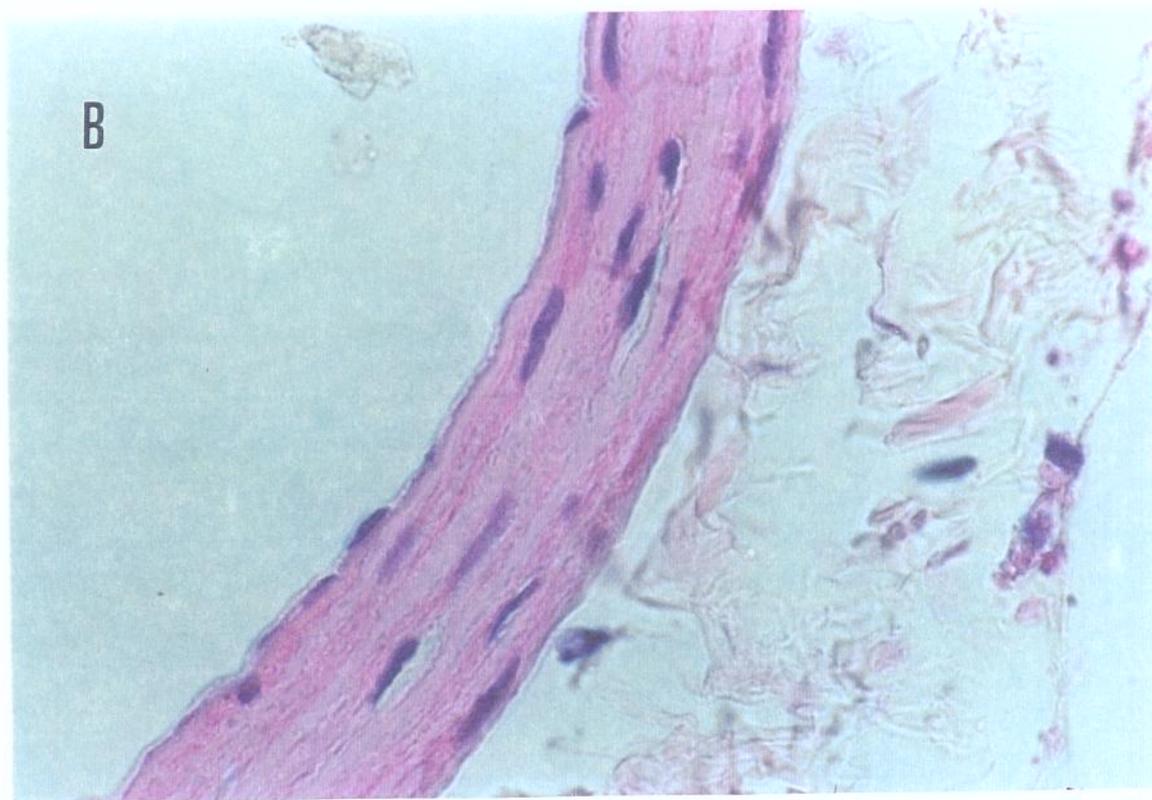
Obs.: Os valores apresentados são média e desvio-padrão de cada parâmetro e a variação do número de lâminas elásticas contadas/campo (var.); S – significativo; NS – não significativo.

* Para a medida de área luminal o tamanho amostral foi $n = 10$.

** Valores negativos da porcentagem indicam queda em relação ao Controle e valores positivos indicam aumento.



Figuras 8A e 8B: – Exame microscópico da aorta abdominal de rata do Grupo Controle submetida à perfusão com pressão de 15 mmHg, com pequeno aumento (A – 100 vezes) e detalhe da parede (B – 1000 vezes) mostrando o aspecto contraído do vaso. (Hematoxilina e eosina).



Figuras 9A e 9B: – Exame microscópico da aorta abdominal de rata do Grupo Sarcoma submetida à perfusão com pressão de 15 mmHg, com pequeno aumento (A – 100 vezes) e detalhe da parede (B – 1000 vezes) mostrando o aspecto distendido do vaso. (Hematoxilina e eosina).

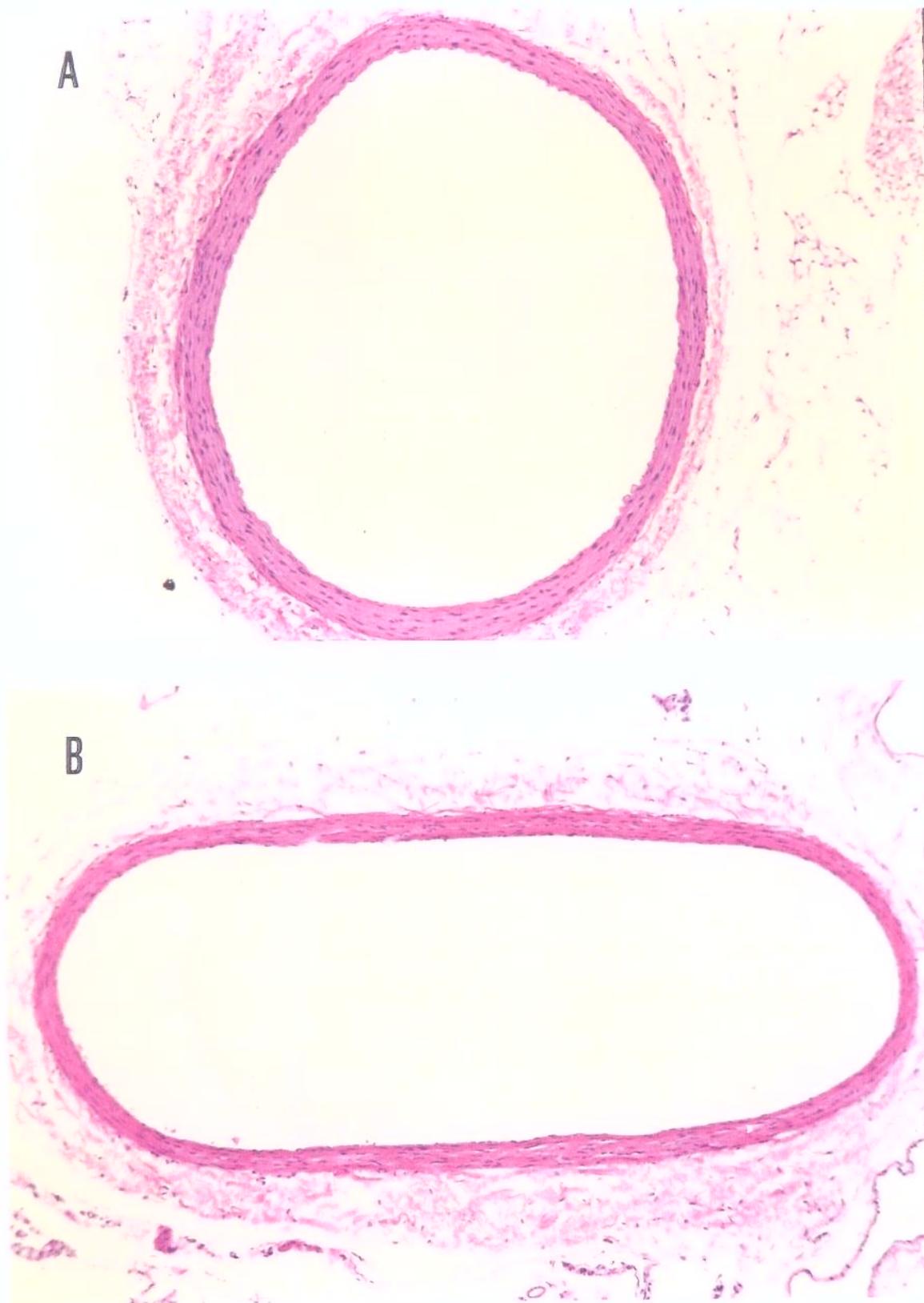


Figura 10. Aspecto geral de aortas de animais submetidos à perfusão com 100 mmHg e examinadas com pequeno aumento à microscopia óptica. A aorta do animal sem tumor, com 5 meses e 190 g, apresentou área luminal de $0,43 \text{ mm}^2$ e diâmetro de $0,66 \text{ mm}$ (A). A aorta da rata com o sarcoma, com 5 meses, peso total 245 g e tumor com 60 g, mediu $0,50 \text{ mm}^2$ de área luminal e $0,49 \text{ mm}$ de diâmetro (B). (HE, 100 vezes de aumento).

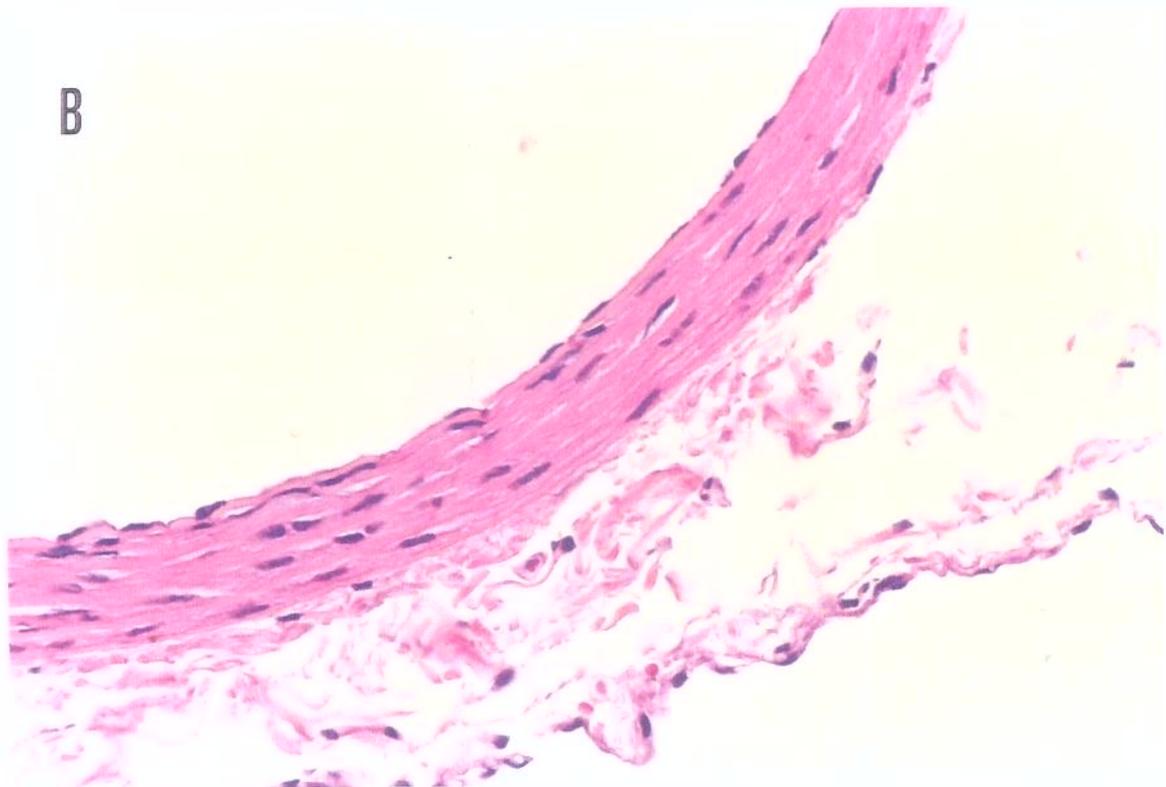
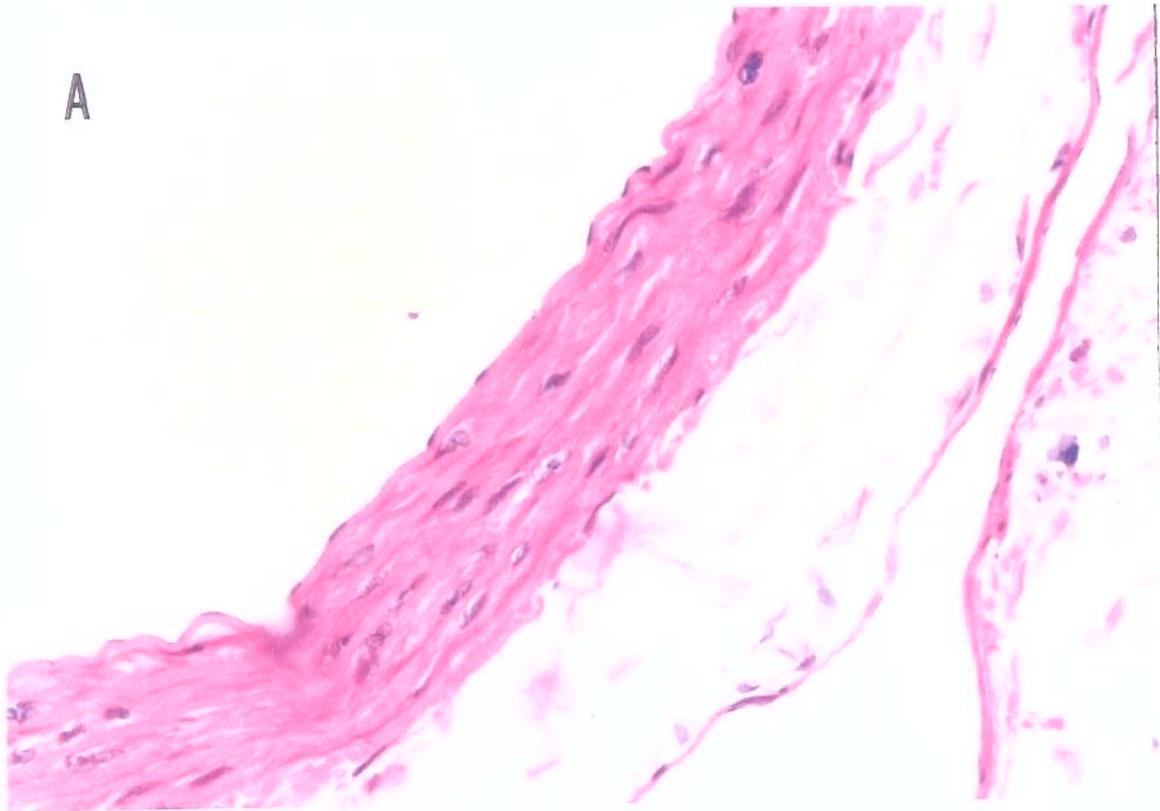


Figura 11. **A** – Detalhe da parede de aorta de rata do Grupo Controle , sem sinais de alterações, com espessura da camada média de $53,8 \mu\text{m}$ e $2,6 \times 10^3$ núcleos/ mm^2 (5 meses de idade e 205 g de peso). **B** – Aorta de rata do Grupo Sarcoma, com espessura da camada média de $40,8 \mu\text{m}$ e $3,1 \times 10^3$ núcleos/ mm^2 , com redução do tamanho dos núcleos que se coram mais intensamente pela hematoxilina (6 meses de idade, 275g de peso total e tumor com 110 g). (HE, 400 vezes de aumento. Perfusão com 100 mmHg).

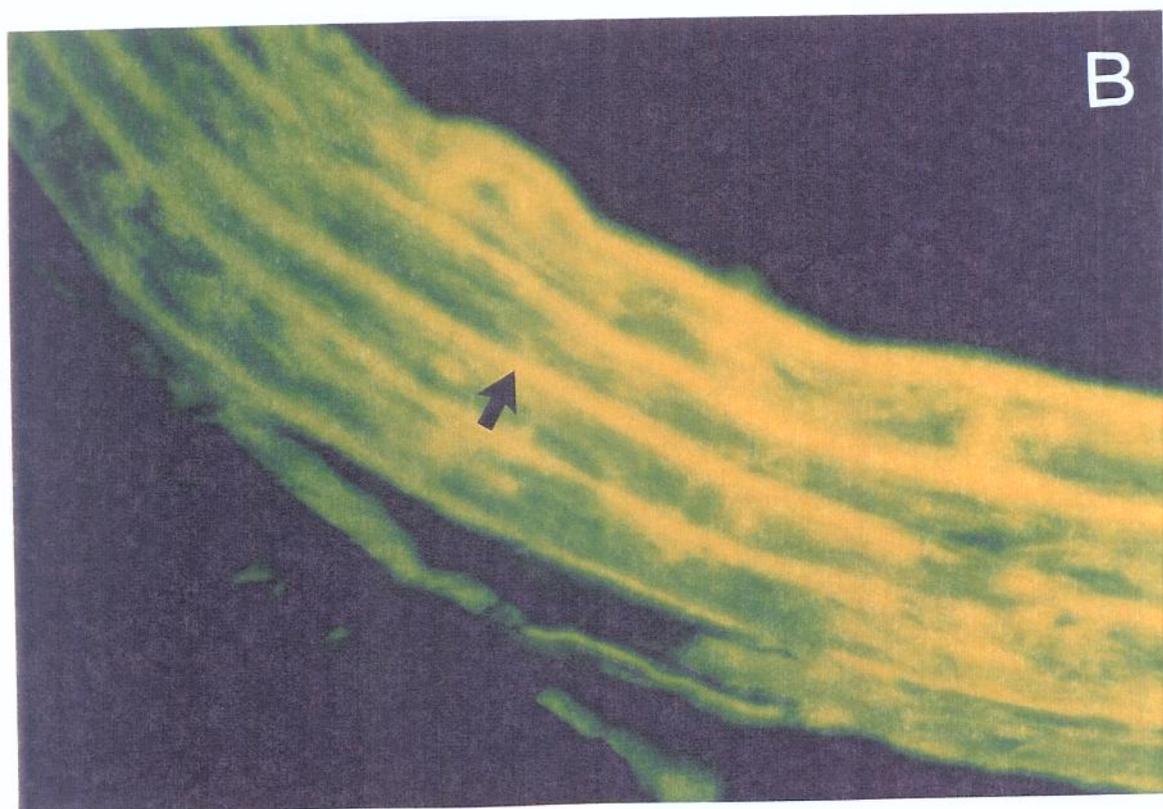
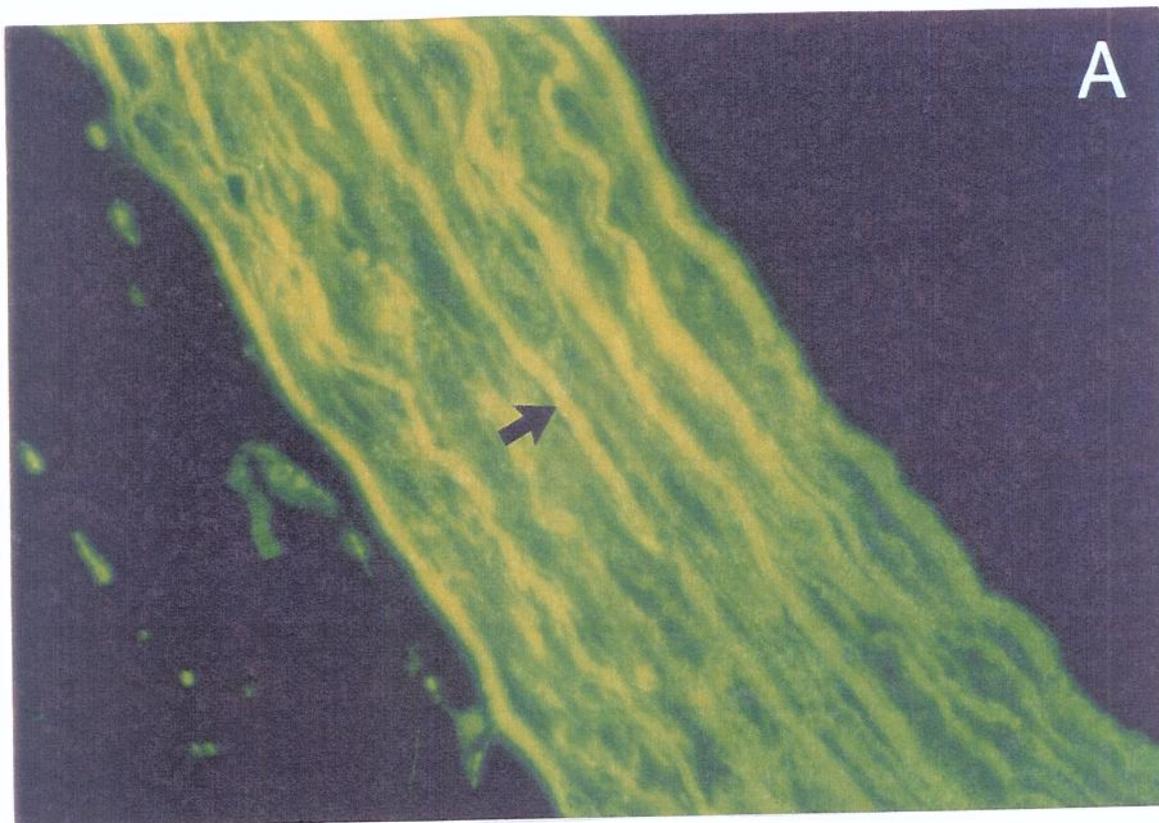


Figura 12. Comportamento de auto-fluorescência da eosina permitindo a visualização das lâminas elásticas à microscopia de fluorescência (setas). No animal controle, com 5 meses e peso de 205 g, contam-se 6 lâminas elásticas (A). Na rata com o sarcoma, de 5 meses de idade, com 240 g de peso total e tumor pesando 55 g, o número de lâminas elásticas que pode ser contado é 5 (B). (HE, 1.000 vezes de aumento).

3.6.2.2. Medidas do ventrículo esquerdo e das fibras esqueléticas

As medidas do diâmetro interno do ventrículo esquerdo nos ratos com o câncer ($6,2 \pm 0,5$ mm) mostram uma dilatação da câmara em relação aos animais do Grupo Controle ($4,9 \pm 0,3$ mm), sendo que as diferenças das medidas são estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

A Figura 13 permite a comparação dos corte transversais do coração de ratas dos dois grupos estudados, pertencentes à mesma faixa etária e com pesos semelhantes, opeso do tumor sendo 55 g.

As médias das áreas de secção transversa das fibras estriadas esqueléticas do m. *biceps femoris* foram diferentes estatisticamente ($p = 0,029$) nas ratas com tumor em relação aos animais controle. Os resultados foram $1111,8 \pm 197,7 \mu\text{m}^2$ (Controle) e $926,6 \pm 130,5 \mu\text{m}^2$ (Sarcoma), correspondendo a uma redução média de 17%.

A Tabela 7 mostra as médias e desvios-padrão das medidas cardíacas e das fibras esqueléticas. Exemplos de cortes são vistos na Figura 14A e B, Controle e Sarcoma, respectivamente.

Tabela 7. Medidas do diâmetro interno do ventrículo esquerdo e área das fibras esqueléticas do músculo *biceps femoris*

Grupo	Diâmetro Interno do VE (mm)	Área de secção Transversa de Fibras Esqueléticas (μm^2)
Controle (n=11)	$4,9 \pm 0,3$	$1111,8 \pm 197,7$
Sarcoma (n=7)	$6,2 \pm 0,5$	$926,6 \pm 130,5$
Controle X Sarcoma	$p < 0,001$	$p = 0,029$
Diferença (Intervalo Confiança 95%) *	+26% (+18 a +34%)	-17% (-33 a -0,5%)

Obs.: Os valores apresentados são média e desvio-padrão de cada parâmetro. * Valores negativos da porcentagem indicam queda em relação ao Controle e valores positivos indicam aumento.

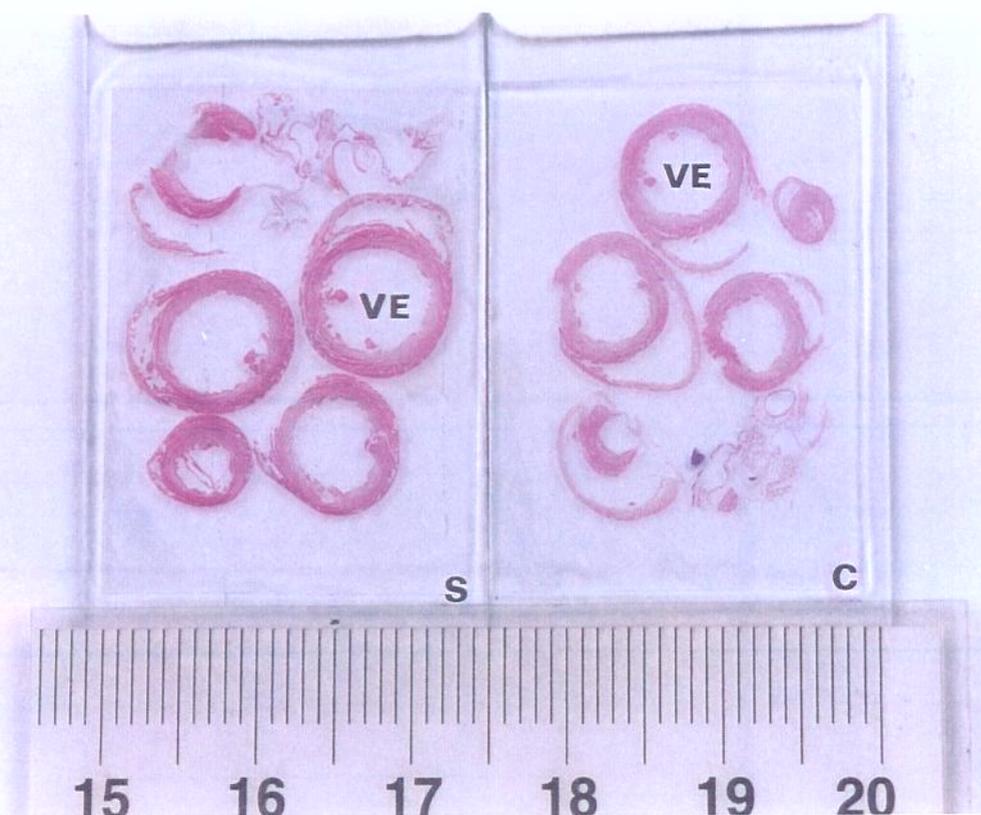


Figura 13. Cortes transversais do coração de rata controle (C) e rata portadora de sarcoma (S). Nota-se a dilatação do ventrículo esquerdo da rata doente. VE – ventrículo esquerdo. (Hematoxilina e eosina)

3.6.3. Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica revelou características de desorganização, atrofia e degeneração nas células da aorta de ratas do grupo Sarcoma, não observadas no grupo Controle.

De forma geral, nos animais com tumor, as fibras de músculo liso apresentavam espessura consideravelmente reduzida, sem um contorno uniforme, de limites irregulares, algumas vezes bizarros. A densidade dos filamentos citoplasmáticos não parecia estar diminuída. Não foi identificada calcificação citoplasmática.

Os núcleos das células de músculo liso apresentavam cromatina densa sob o nucleolema dos ratos com sarcoma sem equivalência na célula muscular do Controle (Figuras 15 e 16).

Havia um aparente aumento do estroma em relação à redução das células de músculo liso. Algumas vezes remanescentes celulares nos espaços intercelulares eram indicativos de necrose celular prévia, porém não foram encontradas células que sugerissem processo inflamatório. Células espumosas não foram identificadas.

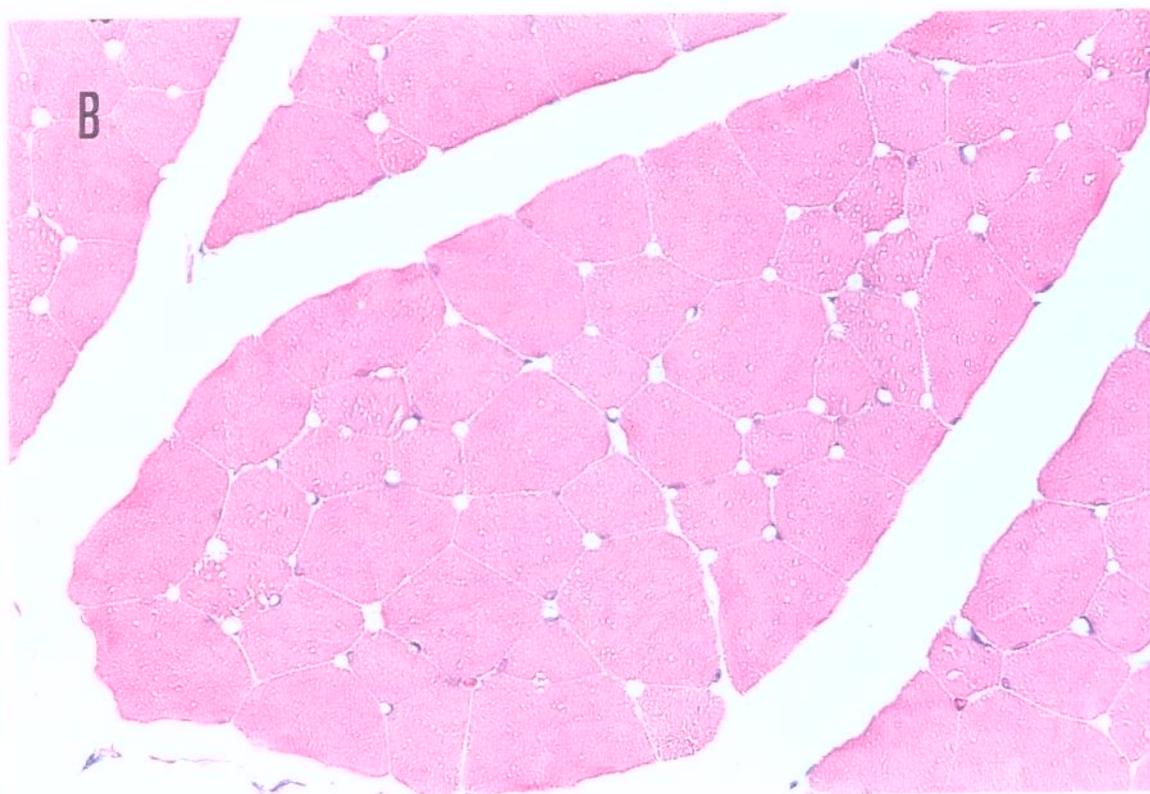
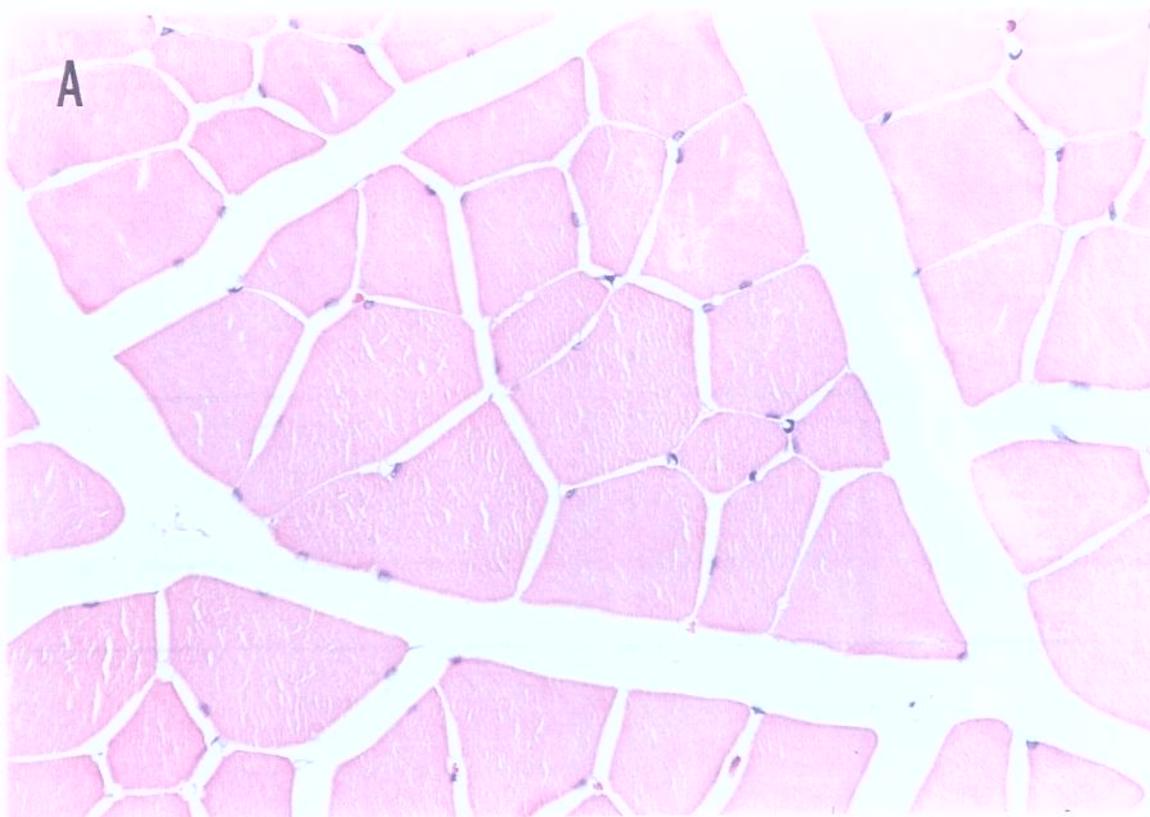


Figura 14. Cortes transversais de fragmentos do músculo *biceps femoris*. (A) Rata Controle com área de secção transversa das fibras de $1172,2 \pm 517,6 \mu\text{m}^2$ e (B) rata do grupo Sarcoma, com $985,0 \pm 418,4 \mu\text{m}^2$. (HE, 400 vezes de aumento).

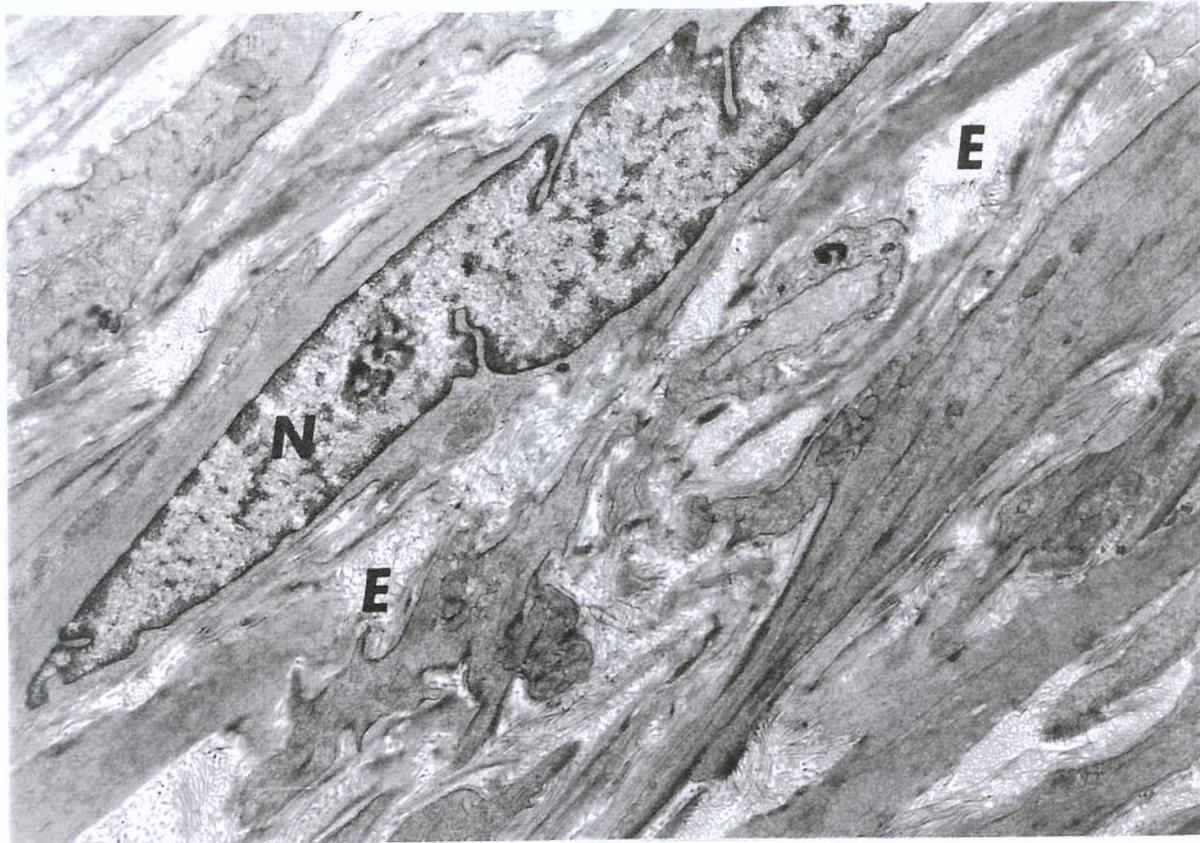


Figura 15. Ultraestrutura da camada média de aorta do Grupo Controle. Material extracelular (E) e núcleo da célula de músculo liso com características normais (N). (13.000 vezes de aumento)

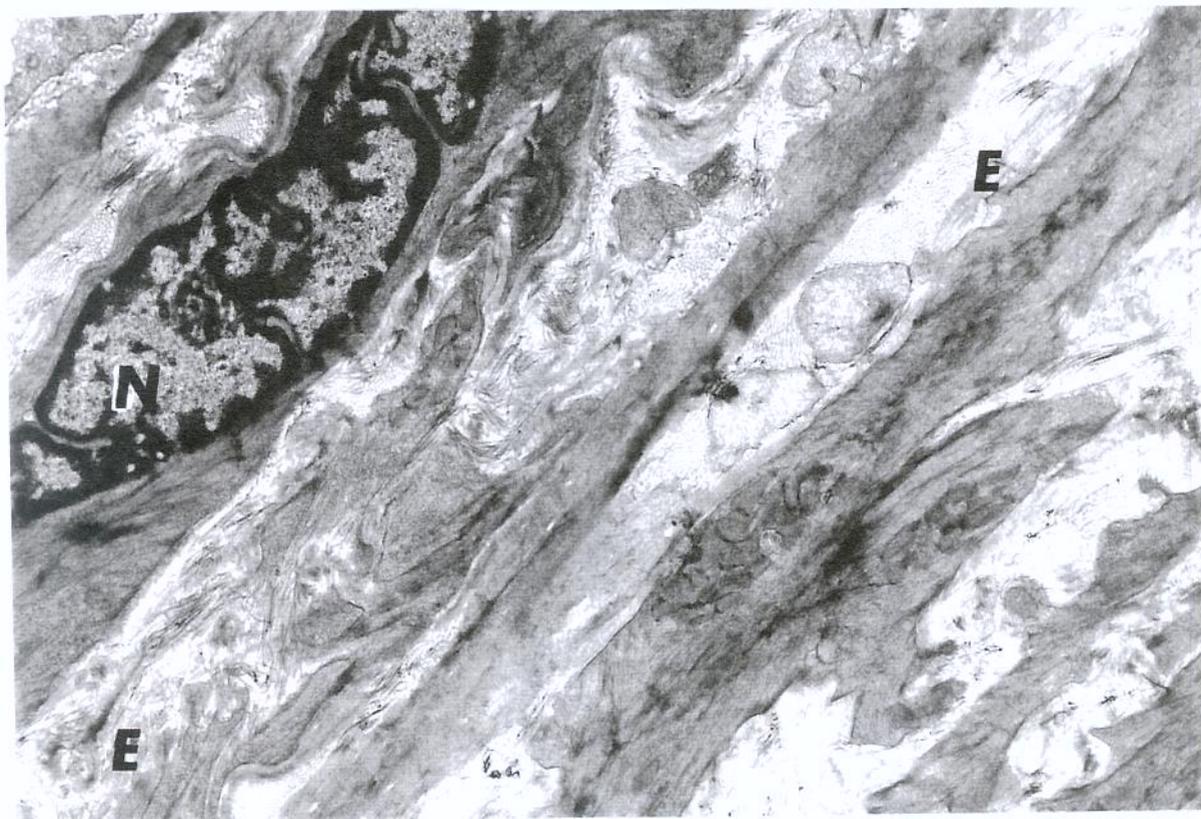


Figura 16. Ultraestrutura da camada média de aorta do Grupo Sarcoma. Note-se aparente aumento do material extracelular (E) e compactação da cromatina no núcleo da célula de músculo liso (N). (13.000 vezes de aumento)

4. DISCUSSÃO

4.1. CONDIÇÕES GERAIS DOS ANIMAIS

No estudo realizado, as alterações físicas e comportamentais e de dosagens hematológicas e bioquímicas detectadas nos animais com tumor revelaram um quadro de profundo desgaste do organismo hospedeiro.

Em relação ao comportamento do animal, chama a atenção a redução das atividades físicas que pode ser interpretada como resultado de um declínio da atividade motora, descrita na caquexia tumoral, função possivelmente do declínio da ingestão alimentar (SMITH *et al.*, 1993), da atrofia muscular esquelética ou de uma possível miopatia, achados clínicos freqüentes em pacientes com caquexia tumoral (MEGUID *et al.*, 1983; KERN & NORTON, 1988).

Contudo, entre outros fatores, o volume e o peso do tumor (totalizando mais de 30% do peso do animal) também podem estar contribuindo para essa alteração do comportamento das ratas observado no modelo experimental utilizado.

Outro sinal indicativo de um quadro de caquexia é o baixo peso da carcaça verificado no Grupo Sarcoma.

O peso da carcaça se manteve sempre abaixo do peso esperado para cada faixa etária, quando comparado com o Grupo Controle. De acordo com CHANCE *et al.* (1986), o tumor induzido pelo MCA causa substancial perda de peso quando a massa neoplásica atinge 30% do peso corpóreo, como é o caso nesse estudo.

ALBRECHT & CANADA (1996) relacionam a perda de peso observada na caquexia tumoral com uma ingestão inadequada de nutrientes, num nível abaixo do necessário e que poderia ocorrer por 3 mecanismos: (1) incapacidade de ingerir alimentos, (2) elevado gasto energético e (3) competição por nutrientes entre o tumor e o hospedeiro.

Em relação ao sarcoma induzido pelo MCA, embora não tenham sido localizados relatos na literatura sobre a incapacidade de ingestão de alimentos nos animais portadores desse tumor, um comportamento hipofágico associado à perda de peso são achados muito freqüentes nesse modelo experimental (LUNDHOLM *et al.*, 1980; POPP, BRENNAN, MORRISON, 1982; KARLBERG *et al.* 1983; KERN & NORTON, 1988; MOLEY *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1993). No estudo, não foi realizada nenhuma avaliação

do comportamento alimentar das ratas, mas provavelmente a diminuição da ingestão seja um fator importante a ser considerado.

Já a respeito da elevação do gasto energético, estudos em pacientes e em animais têm associado os sarcomas a respostas hipermetabólicas (DEMPSEY *et al.*, 1984; ROH *et al.*, 1985; SHAW, HUMBERSTONE, WOLFE, 1988), podendo ser também um dos fatores responsáveis pelo baixo peso da carcaça do hospedeiro observado no modelo utilizado nesse estudo.

A competição por nutrientes torna-se um aspecto importante a ser considerado no estudo, pois de acordo com COSTA (1977), em modelos animais de neoplasias em que a massa tumoral exceda 30% do peso do hospedeiro cria-se uma condição especial de parasitismo.

Outros distúrbios característicos da caquexia tumoral e que foram detectados nas ratas doentes deste estudo foram a hipoglicemia, a deficiência protéica e a anemia.

Os reduzidos valores de hematócrito e hemoglobina nos animais com tumor indicam uma anemia profunda que provavelmente seja resultante da desnutrição e da ação de citocinas (BLICK *et al.*, 1987; MOLDAWER *et al.*, 1989), como o TNF- α , cuja ação *in vitro* está relacionada à inibição da proliferação da célula precursora da hematopoiese (PEETRE *et al.*, 1986). Além disso, a própria anemia contribui para o desgaste do hospedeiro, pois tem sido associada a um aumento do consumo energético basal do organismo (LOWRY, 1991; HYL TANDER *et al.*, 1991).

Os níveis de proteínas totais medidos no sangue refletem o alto grau de carência nutricional das ratas com tumor. A hipoproteinemia observada poderia ser resultado, também, de um desequilíbrio do metabolismo protéico num animal caquético (NORTON, STEIN, BRENNAN, 1981; FEARON *et al.*, 1988; DWORZAK *et al.*, 1998). Na caquexia tumoral, aparentemente ocorre uma má adaptação do hospedeiro ao estado de inanição, resultando numa redistribuição de aminoácidos, com perda no músculo (a partir da degradação de proteínas) e aumento, especialmente no fígado, para síntese de proteínas de fase aguda, um dos mecanismos de resposta de defesa do hospedeiro ao crescimento tumoral (KARLBERG *et al.*, 1983; KELLER, 1993).

Uma das expressões clínicas da depleção das proteínas do hospedeiro é a hipoalbuminemia (MEGUID *et al.*, 1983; KERN & NORTON, 1988), condição presente nos animais portadores de tumor desse estudo.

Segundo SIROTT *et al.* (1993), uma redução na concentração sérica da albumina é um marcador bem estabelecido de prognóstico reservado em várias doenças, inclusive em pacientes portadores de neoplasias malignas.

No câncer, a hipoalbuminemia pode ser resultado da soma de três condições: síntese deprimida, aumento da degradação e distribuição alterada em diferentes compartimentos do organismo – por exemplo, no fígado, no tumor ou no sangue (ROTHSCHILD, ORATZ, SCHREIBER, 1975; KARLBERG *et al.*, 1983; SHAW *et al.*, 1991). De qualquer forma, representaria uma expressão de metabolismo alterado na presença da neoplasia (BOZZETTI *et al.*, 1982).

Flutuações no balanço de fluidos em animais com tumor ocorrem muito cedo no curso da doença, sendo que o achado mais consistente é o aumento total da água do corpo (LUNDHOLM *et al.*, 1980).

Por exemplo, num estudo realizado em ratos Fischer 344 implantados com tumor induzido pelo MCA, SMITH *et al.* (1993) observaram a ocorrência de polidipsia, com um consumo de água 2 a 3 vezes acima do normal nos animais severamente caquéticos.

Segundo KARLBERG *et al.* (1983), uma característica do sarcoma experimental induzido pelo MCA é o aumento do volume plasmático em 25%, causando uma hemodiluição que influiria nas medidas da albumina no compartimento intravascular.

Entretanto, já que um dos principais estímulos para a produção de albumina pelo hepatócito é a pressão coloidosmótica do soro (PIETRANGELO & SHAFRITZ, 1994), seria esperado um aumento compensatório na síntese da proteína. Aparentemente a taxa normal de síntese de albumina total observada em estudos com câncer, representa uma supressão de uma resposta compensatória, citocina-induzida (FEARON *et al.*, 1998).

Outro aspecto que deve ser considerado na hipoalbuminemia é a acidose sanguínea.

A maioria dos tumores sólidos, seja pela alteração de isoenzimas ou pelo déficit vascular, conta quase que exclusivamente com o metabolismo anaeróbico da glicose

como principal fonte energética, a maioria sendo convertida em lactato (NOLOP *et al.*, 1987; HOLM *et al.*, 1995).

CHEN *et al.* (1993) verificaram que ratos portadores de tumores induzidos pelo MCA e de grande tamanho, apresentavam concentrações de bicarbonato e pH arteriais reduzidos quando comparados aos controles, razão pela qual foram considerados acidóticos (acidose metabólica).

Um estudo realizado em seres humanos mostrou que a acidose metabólica causa um balanço negativo de nitrogênio e diminui a síntese de albumina (BALLMER *et al.*, 1995).

Em cultura de células hepáticas, a acidose causou a redução da secreção da albumina e da ferritina sem alterar a produção de proteínas positivas de fase aguda (ULRICH *et al.*, 1999).

Os animais com tumor apresentaram queda de pH e da concentração do íon bicarbonato, com pressões parciais dos gases em taxas semelhantes aos controles. Esses resultados indicam que as ratas apresentavam acidose metabólica.

Embora os métodos empregados nesse estudo não permitam qualquer conclusão mais específica sobre a hipoalbuminemia nos animais com tumor, a avaliação conjunta das alterações sanguíneas detectadas pode auxiliar na interpretação da redução da proteína sérica.

As concentrações plasmáticas do cálcio na forma iônica (fração circulante não ligada à albumina) estavam significativamente aumentadas e podem, pelo menos em parte, serem explicadas pela menor disponibilidade de moléculas de albumina no sangue dos animais com tumor.

Levando-se em consideração os resultados obtidos e as informações da literatura, pode-se supor que tanto uma provável hemodiluição quanto uma condição metabólica alterada tenham contribuído para a hipoalbuminemia detectada nos ratos do grupo Sarcoma.

Ainda em relação ao metabolismo protéico, outra alteração constatada foi o aumento da concentração da uréia sérica nas ratas com a neoplasia, também observada por KARLBERG *et al.* (1983). O ciclo da uréia é o passo metabólico central nos mamíferos

para dispor de produtos da degradação celular que contenham nitrogênio e que são excretados na urina como uréia (COOMES, 1997).

Assim, o resultado obtido pode ser interpretado como consequência de um intenso catabolismo protéico, especialmente no compartimento muscular esquelético, um dos tecidos que sofre maior depleção na caquexia tumoral (COHN *et al.*, 1981; NORTON *et al.*, 1981; MACFIE & BURKINSHAW, 1987; DWORZAK *et al.*, 1998).

Um fenômeno a ser considerado é a necrose tumoral, onde ocorre intensa atividade proteolítica. Os fibrossarcomas experimentais são tumores que apresentam normalmente áreas com hemorragia e necrose causadas por isquemia, infecção ou trauma, ou ainda pela morte celular de um tumor de crescimento rápido (CARTER, 1987).

Outra provável consequência da necrose celular que ocorre no tumor é um aumento da concentração de potássio plasmático, como o detectado nos animais doentes. Na necrose, em função da perda da integridade celular, há ruptura de organelas e ruptura da célula, com escape de material para o espaço extracelular (COTRAN *et al.*, 1999).

Baixos níveis de glicose plasmática foi outro achado nos animais com sarcoma. De acordo com COSTA (1977), a hipoglicemia em pacientes portadores de fibrossarcoma foi uma das primeiras alterações do metabolismo da glicose na neoplasia citadas na literatura.

IMMERMAN, SENER, KHANDEKAR (1982), propuseram quatro mecanismos para a hipoglicemia induzida pelo tumor: (a) atividade de insulina ou “insulina-like” produzida pelo tumor; (b) redução da gliconeogênese; (c) alteração do metabolismo do glucagon e (d) aumento da utilização da glicose pelo tumor.

Elevados níveis de hormônio de crescimento-II “insulina-like” têm sido descritos no soro e no tecido tumoral em pacientes com hipoglicemia associada a tumores grandes de origem mesenquimal (DAUGHADAY, 1989).

Além disso, os sarcomas experimentais são conhecidos como “consumidores de glicose” (GULLINO, GRANTHAM, COURTNEY, 1967). Muitos tumores sólidos utilizam a via anaeróbica para obtenção de energia (NOLOP *et al.*, 1987; HOLM *et al.*,

1995) e, já que a glicólise é um método de baixa eficiência, altos níveis de glicose serão consumidos pela neoplasia (TISDALE, 1997).

Queda significativa na concentração plasmática da glicose em animais com sarcoma foi observada em outros estudos (SHAPOT, 1972; LUNDHOLM *et al.*, 1980; BURT *et al.*, 1981; De BLAAUW, DEUTZ, MEYENFELDT, 1998).

Em resumo, na fase de coleta das aortas, os animais portadores de tumor desse trabalho apresentavam um quadro importante de desnutrição e alterações metabólicas relacionadas à presença do sarcoma, confirmando o quadro de caquexia tumoral.

4.2. ATIVIDADE DA SSAO

A V_{max} é um parâmetro cinético calculado a partir de medidas da atividade específica da enzima. A atividade específica, por sua vez, é calculada por unidade de proteínas totais do tecido analisado, o resultado sendo expresso como: nanomoles de aldeído produzido em uma hora de reação enzimática em cada miligrama de proteínas totais contido no homogenato do tecido. Em outras palavras, é uma medida que permite avaliar isoladamente a atividade enzimática, sem a interferência das variações individuais do conteúdo protéico geral dos organismos (normalização dos resultados).

No modelo experimental utilizado, houve uma redução média de 35% da V_{max} da SSAO nas aortas dos animais com tumor.

Aparentemente, a causa da queda da ação da enzima contra a benzilamina não está relacionada a modificações na afinidade pelo substrato, já que os valores de K_m não foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos de estudo.

Entretanto, numa observação mais minuciosa dos valores da Constante de Michaelis obtidos individualmente em cada "pool", verifica-se existir uma maior homogeneidade entre os resultados do grupo Controle (desvio padrão de 0,97 μM). No grupo Sarcoma os dados de K_m são bastante heterogêneos, conforme mostra o desvio padrão de 2,92 μM . Essas dados indicam a necessidade de novos estudos, com maior amostragem para confirmar e, caso persista, para estabelecer o possível significado da variabilidade do K_m nos vasos dos animais com tumor.

Os estudos de LEWINSOHN (1981a) e HAYES, OSTROW, CLARKE (1983), determinando a atividade da SSAO contra a benzilamina em homogenatos de regiões ateroscleróticas de aortas humanas, também mostram queda da V_{max} sem alteração significativa do K_m . Os autores sugerem uma relação entre redução da densidade da população celular e queda da V_{max} da SSAO na placa aterosclerótica.

Comportamento semelhante dos parâmetros cinéticos da amino-oxidase contra a benzilamina foi relatado em estudos com aortas de ratos de 23-26 meses, quando comparados com ratos de 3 meses (DANH *et al.*, 1985). Os autores detectaram uma queda de 30-40% na V_{max} da SSAO nos vasos dos ratos velhos (estatisticamente significativa) sem que houvesse diferenças nos valores do K_m .

Quando comparados com os resultados em ratos senis e nas placas ateroscleróticas, os valores obtidos nas ratas com sarcoma sugerem que a redução da atividade da SSAO esteja associada a modificações vasculares similares às que ocorrem no vaso no processo de envelhecimento.

Por outro lado, LANGFORD *et al.* (1999) estudaram os efeitos fisiopatológicos na parede da aorta torácica resultantes da inibição crônica *in vivo* da enzima SSAO em ratos a partir de 21 dias de idade.

As lesões observadas foram uma intensa desorganização da arquitetura da elastina na camada média, acompanhada de alterações degenerativas e metaplásicas nas células de músculo liso. Além disso, os vasos exibiam um aumento no diâmetro luminal (dilatação) em relação aos controles.

Os autores sugerem, então, que um possível papel da enzima esteja relacionado ao desenvolvimento da elastina e que a falta de maturação normal do tecido conjuntivo poderia conduzir à formação de aneurismas e à morte.

Embora seja uma hipótese que não pode ser desconsiderada, a existência de inibição endógena da SSAO causando uma redução da atividade da enzima e a possível relação dessa inibição com as alterações morfológicas vasculares observadas no presente modelo animal de tumor, não pôde ser determinada em função dos limites da metodologia empregada neste estudo.

4.3. MORFOLOGIA

Além da redução do parâmetro cinético, o estudo morfológico das aortas também mostrou alterações nos vasos das ratas doentes.

A avaliação macroscópica da cavidade abdominal, já aponta para um possível comprometimento da rede vascular pré-existente. A dilatação, a tortuosidade, o curso irregular e as ramificações dos vasos são anormalidades também observadas por VIAMONTE, ROEN, LEPAGE, (1973) em estudos angiográficos de pacientes portadores de tumores malignos.

A análise microscópica da aorta mostrou características indicativas de atrofia da camada média nos animais com tumor.

Considerando-se o animal como um todo, essa atrofia vascular apareceu em conjunto com um quadro de baixo peso da carcaça, anemia profunda, hipoproteinemia e hipoglicemia, acidose metabólica e níveis séricos aumentados de cálcio iônico, potássio e uréia. Também fez parte do quadro, a dilatação da cavidade ventricular esquerda e perda de massa muscular esquelética.

O desgaste da musculatura periférica pode ser resultado de aumento do catabolismo ou da redução da síntese protéica ou de uma combinação dos dois fenômenos (TISDALE, 1993). LUNDHOLM *et al.* (1980), utilizando camundongos portadores de sarcoma induzido pelo MCA, verificaram que a degradação de músculo esquelético fornece aproximadamente 50% das necessidades tumorais de nitrogênio e carbono, enquanto que a alimentação e os outros tecidos do hospedeiro fornecem o restante. DWORZAK *et al.* (1998) relatam que em pacientes com caquexia tumoral o compartimento esquelético parece ser o mais comprometido, com uma importante queda na síntese de proteínas.

Atualmente, os estudos sobre a aceleração da proteólise muscular têm-se centrado na ativação da via metabólica ATP-dependente envolvendo a ubiquitina (BARACOS *et al.*, 1995). De acordo com LLOVERA *et al.* (1994), a expressão do gene da ubiquitina está aumentada nos músculos esqueléticos de ratos portadores de um hepatoma experimental.

Em relação à desnutrição, o seu efeito sobre a arquitetura vascular não foi avaliado isoladamente. Entretanto, de acordo com YOSHIDA *et al.* (1995), a aorta de ratos

desnutridos mostra uma redução da substância fundamental e um aumento da espessura das lâminas elásticas, sem alterações na camada endotelial ou nas células de músculo liso.

Nas ratas do grupo Sarcoma, porém, as lâminas elásticas aparentemente não apresentavam tal alteração. Por outro lado, a microscopia eletrônica revelou características de atrofia nas células de músculo liso da média, com irregularidades na forma e compactação da cromatina e considerável redução do tamanho celular.

A desnutrição parece ser um fator bastante importante nos animais utilizados, porém não deve ser a única condição a ter efeito sobre as aortas.

Uma outra alteração do metabolismo que supostamente poderia estar associada à atrofia seria a acidose, pois é conhecido que esse distúrbio metabólico estimula a proteólise muscular a partir da ativação da via proteolítica que envolve a ubiquitina (MITCH *et al.*, 1994). Embora os mecanismos bioquímicos da atrofia tecidual sejam pouco conhecidos, alterações na síntese e, especialmente, na degradação de proteínas parecem estar diretamente envolvidas (COTRAN *et al.*, 1999).

Nas ratas do grupo Sarcoma foram observadas, simultaneamente, acidose metabólica e características de atrofia das células do músculo liso da camada média da aorta. Uma associação entre a atrofia de células do músculo liso vascular detectada e a acidose medida, entretanto, só poderia ser estabelecida a partir de estudos da via proteolítica nos vasos, sob as mesmas condições.

Ainda em relação à atrofia da camada média, modificações na composição dos vasos implicaria em alterações das propriedades mecânicas dos órgãos.

As células de músculo liso são responsáveis pelas propriedades mecânicas ativas da parede da aorta e pela produção da matriz extracelular e lâmina elástica (RHODIN, 1962; FAWCET, 1994). A elastina e o colágeno são os principais componentes responsáveis pelas propriedades passivas (ROACH & BURTON, 1957).

Portanto, pode-se imaginar que com a atrofia das células de músculo liso aconteça um comprometimento das propriedades mecânicas, tanto pela redução da função contrátil quanto da função secretora da célula.

A resposta aparentemente distinta dos vasos à baixa pressão de perfusão do fixador parece apontar para modificações mecânicas da aorta nos animais com tumor.

Os fatores mais comuns que causam redução da resistência da parede arterial são o envelhecimento, processos inflamatórios associados ou não a aterosclerose, fatores hereditários (formação inadequada dos componentes) e a gravidez (PRÉTRE & SEGESSER, 1997; METZE & MONTENEGRO, 2000).

Ratos muito velhos (35 a 45 meses) foram examinados por KOJIMAHARA (1985) para avaliar as mudanças na parede da aorta (pela microscopia eletrônica) relacionadas à idade avançada.

O autor relata que as alterações mais marcantes da parede foram encontradas principalmente na média: as células de músculo liso tinham citoplasma irregular, ramificado e geralmente se apresentavam reduzidas no tamanho e com “atrofia bizarra”, havia necrose ou perda celular em áreas focais; foi verificado aumento da substância fundamental tanto quanto de fibras de colágeno, além de calcificação em algumas das células musculares necróticas; a rede elástica, entretanto, não estava destruída; células espumosas derivadas das células de músculo liso foram observadas. Na íntima, não havia sinais de aterosclerose, embora leve espessamento difuso ou localizado da camada estivesse presente.

Os resultados da análise da microscopia eletrônica da aorta do grupo Sarcoma dividem muitas semelhanças com os achados de KOJIMAHARA (1985). A atrofia e as formas irregulares das células de músculo liso, o aumento relativo de estroma e os restos celulares indicativos de necrose são observações comuns aos dois estudos. Portanto, assim como acontece em relação à atividade da SSAO, as alterações morfológicas que ocorrem na aorta na presença do sarcoma mostram uma similaridade com o processo de envelhecimento.

Outra condição associada à redução da resistência da parede arterial é a gravidez. Modelos experimentais com ratas prenhes mostraram um aumento do volume plasmático na gestação (BAYLIS, 1979/1980; ATHERTON & PIRIE, 1981) e um aumento da complacência e da distensibilidade da aorta (SLANGEN *et al.*, 1996, 1997).

Um aumento do volume plasmático de 25% foi relatado por KARLBERG *et al.* (1983) no modelo experimental de tumor induzido pelo MCA, o mesmo utilizado nesse estudo. A resposta da aorta à baixa pressão de perfusão do fixador pode indicar um aumento na distensibilidade do vaso como uma resposta adaptativa a uma alteração do

volume circulante. A dilatação da câmara ventricular esquerda observada nos ratos do grupo Sarcoma também pode ser resultado desse possível aumento.

A anemia e a hipoproteïnemia, diminuindo a viscosidade sanguínea, facilitariam o fluxo do sangue, melhorando, portanto, o aporte nutricional aos tecidos do hospedeiro e ao tumor.

Entretanto, nem o volume plasmático, nem as propriedades mecânicas foram medidos, impossibilitando uma análise mais conclusiva.

Dentre os fatores congênitos que podem contribuir para a redução da resistência da parede vascular, um exemplo é a Síndrome de Marfan, caracterizada pela produção de tecido conjuntivo anormal causada por uma mutação cromossômica (KAINULAINEN *et al.*, 1990). A anormalidade vascular ocorre por conta de modificações da lâmina elástica, com alterações consistentes com fadiga de material (JEREMY *et al.*, 1994). O enfraquecimento da parede vascular resulta na formação de aneurismas.

Geralmente se definem aneurismas como dilatações circunscritas dos vasos ou das câmaras cardíacas. Os aneurismas são provocados pela formação inadequada dos componentes ou pela destruição da parede (METZE & MONTENEGRO, 2000).

De acordo com ANIDJAR *et al.* (1994), a expansão de um aneurisma ocorreria inicialmente com a perda seletiva de fibras elásticas e um aumento limitado do diâmetro da aorta. As fibras de colágeno restantes garantiriam a integridade estrutural e a forma cilíndrica do vaso. À medida que as fibras de colágeno se tornam dissociadas, o equilíbrio hemodinâmico é perdido e o diâmetro aumenta. A degeneração da camada média também é acompanhada de perda de células de músculo liso através do fenômeno da apoptose (ANIDJAR *et al.*, 1994; LÓPEZ-CANDALES *et al.*, 1997).

Nas ratas com tumor deste estudo não foi detectada dilatação do vaso, pois as medidas de área luminal e de diâmetro interno menor não apresentaram diferenças estatisticamente distintas do controle. Portanto, considerando-se a definição de “dilatações circunscritas”, as aortas das ratas doentes não foram consideradas aneurismáticas.

Em relação à perda celular, entretanto, embora houvesse redução da espessura da camada média, ela não foi acompanhada de modificações significativas na densidade de núcleos. Todavia, se a atrofia das células de músculo liso envolvesse somente redução volumétrica, seria esperado um aumento na densidade de núcleos. Os resultados

apontam, portanto, para uma perda celular numérica. Os restos celulares evidenciados pela microscopia eletrônica confirmam uma perda celular numérica, seja pelo fenômeno da necrose, seja a partir da apoptose.

A inflamação crônica, caracterizada por infiltração de células mononucleares na parede mais externa da aorta é comumente observada nos aneurismas ateroscleróticos de aorta abdominal (KOCH *et al.*, 1990; BROPHY *et al.*, 1991; FREESTONE *et al.*, 1995). Também não foram encontradas células indicativas de inflamação na parede do vaso.

Em resumo, a respeito da redução da resistência da parede vascular, as aortas dos animais do grupo Sarcoma, têm características semelhantes às aortas de ratos velhos (em relação à atrofia), porém sem aspecto aneurismático ou de processo inflamatório.

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aparentemente, a condição geral de depleção da síndrome da caquexia tumoral também afeta a estrutura e a função vasculares.

Uma hipótese possível em função dos resultados obtidos nesse estudo seria a de que a atrofia das células de músculo liso da aorta dos ratos doentes esteja associada a alterações da sua função secretora.

A queda da atividade da SSAO poderia ser interpretada como resultado de uma redução da síntese da enzima em uma célula em atrofia. ISHIZAKI (1990), estudando a atividade plasmática dessa amino-oxidase em pacientes com doenças vasculares cerebrais, sugeriu que a redução da atividade da enzima refletiria o estado de deterioração da parede vascular.

Por outro lado, considerando-se que a inibição crônica da SSAO *in vivo* está relacionada a alterações degenerativas e metaplásicas nas células de músculo liso da aorta (LANGFORD *et al.*, 1999), é possível que uma redução na síntese da enzima, alterando o metabolismo de aminas, também esteja relacionada a processos degenerativos.

Assim, pode-se supor que distúrbios metabólicos nas células de músculo liso da aorta dos animais portadores de tumor causariam uma diminuição da síntese da SSAO que causaria, então, uma série de distúrbios celulares, numa seqüência de eventos.

Da mesma forma, também pode-se supor que essas células estariam produzindo uma matriz extracelular alterada e, como consequência, o vaso apresentaria propriedades mecânicas inferiores àquelas de uma aorta normal.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

1. As ratas portadoras do sarcoma apresentaram um quadro de desgaste do organismo, composto de alterações físicas, comportamentais e metabólicas que são indicativos de caquexia tumoral.
2. A redução da área de secção transversa das fibras musculares esqueléticas indica perda de massa muscular, compatível com um quadro de caquexia tumoral.
3. Nas aortas dos animais com câncer ocorreu redução da espessura da camada média em consequência da atrofia das células de músculo liso, com sinais de perda celular.
4. As alterações morfológicas e o comportamento da SSAO encontradas nos vasos dos animais com sarcoma são semelhantes às alterações descritas em aortas de ratos senis.

6. SUMMARY

Cancer cachexia is a systemic disorder composed by physical wasting features and metabolic disturbance. Although skeletal muscle and fat tissue are the most affected structures, atrophy of heart, spleen, liver and kidney has also been described. Clinical and experimental data about alterations due to cachexia of the pre-existing host vessels are rare. The purpose of this study was to evaluate possible morphological and enzymatic alterations in the aorta of rats bearing a methylcholanthrene-induced sarcoma (MCA) in advanced stage.

Hematological and biochemical parameters were analysed in order to evaluate animal conditions. Lumen cross-sectional area, media thickness, lesser inside lumen diameter, elastic laminae number and nuclear density were the morphometric parameters measured in the aorta. Ultrathin sections were examined by transmission electron microscopy. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) kinetics was determined by the deamination [^{14}C] Benzylamine in homogenates of rat aorta.

Tumor bearing rats presented signs of general physical wasting with weight loss, anemia, hypoalbuminemia, hypoglycemia, electrolyte disturbance and metabolic acidosis. The SSAO V_{max} was 35 % lower in MCA aorta rats ($p < 0,05$) but the K_m was not different between the groups. Morphometry showed significant decrease of the thickness of the media (Control = $50,04 \pm 2,54$ and MCA = $38,37 \pm 4,26$ μm , $p < 0,01$). Electron microscopy showed atrophy of smooth muscle cells, with a considerable reduction of cells size, a more dense nuclear chromatin and irregularities in cytoplasmatic outlines.

In conclusion, the biochemical and morphological alterations found in the aorta of tumor bearing rats are very similar to those described for aging rats.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOFF, M.D.; ARMITAGE, J.O.; LICHTER, A.S.; NIEDERHUBER, J.E. – **Clinical Oncology**. Nova Iorque, Churchill Livingstone Inc., 1995. 2350p.
- ALBRECHT, J.T. & CANADA, T.W. – Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematol Oncol Clin North Am.**, **10**: 791-800, 1996.
- ANIDJAR, S.; DOBRIN, P.B.; CHEJFEC, G.; MICHER, J.B. - Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdominal aorta. **Ann Vasc Surg**, **8**: 127-136, 1994.
- ATHERTON, J.C. & PIRIE, S.C. - The effect of pregnancy on glomerular filtration rate and salt and water reabsorption in the rat. **J Physiol (Lond.)**, **319**: 153-164, 1981.
- AWASTHI, S. & BOOR, P.J. – Semicarbazide protection from in vivo oxidant injury of vascular tissue by allylamine. **Toxicol Lett**, **66**: 157-163, 1993.
- BACCINO, F.M.; TESSITORE, L.; BONELLI, G.; ISIDORO, C. – Protein turnover states of tumour cells and host tissues in an experimental model. **Biomed Biochem Acta**, **45(11-12)**: 1585-1590, 1986.
- BALLMER, P.E.; McNURLAN, M.A.; HULTER, H.N.; ANDERSON, S.E.; GARLICK, P.J.; KRAPP, R. - Chronic metabolic acidosis decreases albumin synthesis and induces negative nitrogen balance in humans. **J Clin Invest**, **95**: 39-45, 1995.
- BARACOS, V.E.; DeVIVO, C.; HOYLE, D.H.R.; GOLDBERG, A.L. – Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. **Am J Physiol** **268**: E996-E1006, 1995.
- BARRAND, M.A. & CALLINGHAM, B.A. – Solubilization and some properties of a semicarbazide-sensitive amine oxidase in brown adipose tissue of the rat. **Biochem J**, **222**: 467-475, 1984.
- BAYLIS, C. - Effect of early pregnancy on glomerular filtration rate and plasma volume in rat. **Renal Physiol**, **2**: 333-339, 1979/1980.
- BERGERET, B.; BLASCHKO, H.; HAWES, R. – Occurrence of an amine oxidase in horse serum. **Nature (London)**, **180**: 1127-1128, 1957.

- BLICK, M.; SHERWIN, S.A.; ROSENBLUM, M.; GUTTERMAN, J. – Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. **Cancer Res**, 47: 2986-2989, 1987.
- BONO, P.; SALMI, M.; SMITH, D.J.; JALKANEN, S. – Cloning and characterization of mouse vascular adhesion protein-1 reveals a novel molecule with enzymatic activity. **J Immunol**, 160: 5563-5571, 1998.
- BOOMSMA, F.; DERKX, FF.H.; MEIRACKER, A.H.; VELD, A.J.M.; SCHALEKAMP, M.A. – Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase activity is elevated in diabetes mellitus and correlates with glycosylated haemoglobin. **Clin Sci (Colch)**, 88: 675-679, 1995.
- BOOMSMA, F.; VELDHUISEN, D.J.; KAM, P.J.; VELD, A. J.M.; MOSTERD, A.; LIE, K.I.; SCHALEKAMP, M.A.- Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. **Cardiovasc Res**, 33: 387-391, 1997.
- BOOR, P.J. & HYSMITH, R.M. – Allylamine cardiovascular toxicity. **Toxicology**, 44: 129-145, 1987.
- BOZZETTI, F.; MIGLIAVACCA, S.; SCOTTI, A.; BONALUMI, M.G.; SCARPA, D.; BATICCI, F.; AMMATUNA, M.; PUPA, A.; TERNO, G.; SEQUEIRA, C.; MASSERINI, C.; EMANUELLI, H. - Impact of cancer, type, site, stage and treatment on the nutritional status of patients. **Ann Surg**, 196: 170-179, 1982.
- BROPHY, C.M.; REILLY, J.M.; SMITH, G.J.W.; TILSON, M.D. - The role of inflammation in nonspecific aneurysm disease. **Ann Vasc Surg**, 5: 229-233, 1991.
- BURT, M.E.; LOWRY, S.F.; GORSCHBOTH, C.; BRENNAN, M.F. - Metabolic alterations in a noncachectic animal tumor system. **Cancer**, 47: 2138-2146, 1981.
- CALLINGHAM, B.A.; HOLT, A.; ELLIOTT, J. – Some aspects of the pharmacology of semicarbazide-sensitive amine oxidases. **J Neural Transm Suppl** 32: 279-290, 1990.
- CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, J.; TARRAGÓ, T.; GONZÁLEZ, O.; LLOVERA, M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. – Comparative effects of β_2 -adrenergic

- agonists on muscle waste associated with tumour growth. **Cancer Lett**, 115: 113-118, 1997.
- CARTER, R.L. – Tumours of soft tissues. In: **TURUSOV, V.S., ed. - Pathology of tumours in laboratory animal: Tumours of the rat.** Parte 1 e 2. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1987. p.151-167. (v.1)
- CHANCE, W.T.; MUGGIA-SULLAM, M.; CHEN, M.H.; MURPHY, R.F.; FISCHER, J.E. - Reversal of tumor-induced biochemical abnormalities by insulin treatment in rats. **J Natl Cancer Inst**, 77: 497-503, 1986.
- CHEN, M.K.; ESPAT, N.J.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. - Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. **Ann Surg**, 217: 655-667, 1993.
- COHN, S.H.; GARTENHAUS, W.; SAWITSKY, A.; RAI, K.; ZANZI, I.; VASWANI, A.; ELLIS, K.J.; YASUMURA, S.; CORTES, E.; VARTSKY, D. - Compartmental body composition of cancer patients by measurement of total body nitrogen, potassium and water. **Metabolism**, 30: 222-229, 1981.
- COOMES, M.W. – Amino acid metabolism. In: **DEVLIN, T.M., ed. - Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.** 4.ed. Nova Iorque, Willey-Liss, 1997. p. 445-488.
- COSTA, G. – Cachexia, the metabolic component of neoplastic disease. **Cancer Res**, 37: 2327-2335, 1977.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. – **Robbins Pathologic Basis of Disease.** 6.ed. Filadélfia, W.B. Saunders Company, 1999. 1425p.
- CROSS, E. & CHAFFIN, W.W. – Use of the binomial theorem in interpreting results of multiple tests of significance. **Educ Psychol Measur**, 42: 25-34, 1982.
- DANH, H.C.; BENEDETTI, M.S.; DOSTERT, P.; MOUSSET, A. - Age-related changes in monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase activities of rat aorta. **J Pharm Pharmacol**, 37: 354-357, 1985.
- DAUGHADAY, W.H. – Hypoglycemia in patients with non-islet cell tumor. **Clin North Am**, 18: 91-101, 1989.

- De BLAAUW, I.; DEUTZ, N.E.P.; HULST, R.R.W.W.; MEYENFELDT – Glutamine depletion and increased gut permeability in nonanorectic, non-weight-losing tumor-bearing rats. *Gastroenterology*, **112**: 118-126, 1997.
- De BLAAUW, I.; DEUTZ, N.E.P.; MEYENFELDT, M.F. - Cancer reduces the metabolic response of muscle to surgical stress in the rat. *J Surg Res*, **80**: 94-101, 1998.
- DEMPSEY, D.T.; FEURER, I.D.; KNOX, L.S.; CROSBY, L.O.; BUZBY, G.P.; MULLEN, J.L. - Energy expenditure in malnourished gastrointestinal cancer patients. *Cancer*, **53**: 1265-1273, 1984.
- DeWYS, W.D.; BEGG, C.; LAVIN, P.T.; BENNETT, J.M.; BERTINO, J.R.; COHEN, M.H.; DOUGLASS Jr., H.D.; ENGSTROM, P.F.; EZDINLIE, Z.; HORTON, J.; JOHNSON, G.J.; MOERTEL, C.G.; OKEN, M.M.; PERLA, C.; ROSENBAUM, C.; SINDERSTEIN, M.N.; SKEEL, R.T.; SPONZO, R.W.; TORMEY, D.C. – Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am J Med*, **69**: 491-496, 1980.
- DILLS Jr, W.L. – Nutritional and physiological consequences of tumour glycolysis. *Parasitology*, **107**: S177-186, 1993.
- DOUGLAS, R.G. & SHAW, J.H.F. – Metabolic effects of cancer. *Br J Surg*, **77**: 246-254, 1990.
- DWORZAK, F.; FERRARI, P.; GAVAZZI, C.; MAIORANA, C.; BOZZETTI, F. – Effects of cachexia due to cancer on whole body and skeletal muscle protein turnover. *Cancer*, **82**: 42-48, 1998.
- ELLIOTT, J.; CALLINGHAM, B.A.; SHARMAN, D.F. – Interactions with some naturally occurring amines and their structural analogues. *Biochem Pharmacol*, **38**: 1507-1515, 1989.
- ELLIOTT, J. & CALLINGHAM, B.A. – Effect of benzylamine and its metabolites on the response of the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *J Auton Pharmacol*, **11**: 323-335, 1991.
- FAWCETT, D.W. - *Bloom and Fawcett, a Textbook of Histology*. 12.ed. Nova Iorque, Chapman & Hall, 1994. 964p.

- FEARON K.C.; HANSELL, D.T.; PRESTON, T.; PLUMB, J.A.; DAVIES, J.; SHAPIRO, D.; SHENKIN, A.; CALMAN, K.C.; BURNS, H.J. - Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. **Cancer Res**, **48**: 2590-2595, 1988.
- FOLKMAN, J. - What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst**, **82**: 4-6, 1990.
- FREESTONE, T.; TURNER, R.J.; COADY, A.; HIGMAN, D.J.; GREENHALGH, R.M.; POWELL, J.T. - Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **15**: 1145-1151, 1995.
- GARATTINI, S. & GUAITANI, A. - Animal models for the study of cancer-induced anorexia. **Cancer Treat Rep**, **65(Suppl.5)**: 23-25, 1981.
- GUFFROY, C. & BENEDETTI, M.S. - Monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase in spontaneously hypertensive and in normotensive control rats. **Life Sci**, **34**: 535-545, 1984.
- GULLINO, P.M.; GRANTHAM, F.M.; COURTNEY, A.M. - Glucose consumption by transplanted tumors *in vivo*. **Cancer Res**, **27**: 1031-1040, 1967.
- HAYES, B.E.; OSTROW, P.T.; CLARKE, D.E. - Benzylamine oxidase in normal and atherosclerotic human aortae. **Exp Mol Pathol**, **38**: 243-254, 1983.
- HEYMSFIELD, S.B. & McMANUS, C.B. - Tissue components of weight loss in cancer patients. **Cancer**, **55**: 238-249, 1985.
- HOLLAND, J.F.; FREI III, E.; BAST, R.C.; KUFEL, D.W.; MORTON, D.L.; WEICHSELBAUM, R.R. - **Cancer Medicine**. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.1285-2502. (v.2)
- HOLM, E.; HAGMULLER, E.; STAEDT, U.; SCHLINCKEISER, G.; GUNTHER, H.J.; LEWELING, H.; TOKUS, M.; KOLLMAR, H.B. - Substrate balance across colonic carcinomas in humans. **Cancer Res**, **55**: 1373-1378, 1995.
- HOLT, A. & CALLINGHAM, B.A. - Location of the active site of rat vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase. **J Neural Transm Suppl**, **41**: 433-437, 1994.

- KERN, K.A. & NORTON, J.A. – Cancer cachexia. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, **12**: 286-298, 1988.
- KOCH, A.E.; HAINES, G.K.; RIZZO, R.J.; RADOSEVICH, J.A.; POPE, R.M.; ROBINSON, P.G.; PEARCE, W.H. - Human abdominal aortic aneurysms: immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. **Am J Pathol**, **137**: 1199-1213, 1990.
- KOJIMAHARA, M. - Age-induced changes in the aortas of rats. **Exp Path**, **28**: 191-195, 1985.
- KOVACEVIC, Z. & MORRIS, H.P. – The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. **Cancer Res**, **32**: 326-333, 1972.
- LANGFORD, S.D.; TRENT, M.B.; BALAKUMARAN, A.; BOOR, P.J. - Developmental vasculotoxicity associated with inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase. **Toxicol Appl Pharmacol**, **155**: 237-244, 1999.
- LEWINSOHN, R. – Human serum amine oxidase. Enzyme activity in severely burnt patients and in patients with cancer. **Clin Chim Acta**, **81**: 247-256, 1977.
- LEWINSOHN, R. – Amine oxidase in human blood vessels and non-vascular smooth muscle. **J Pharm Pharmacol**, **33**: 569-575, 1981a.
- LEWINSOHN, R. - A safe homogenizing procedure for the study of tissue benzylamine oxidase and monoamine oxidase. **J Pharmacol Methods**, **6**: 121-127, 1981b.
- LEWINSOHN, R. – Mammalian monoamine-oxidizing enzymes, with special reference to benzylamine oxidase in human tissues. **Braz J of Med Biol Res**, **17**: 223-256, 1984.
- LEWINSOHN, R.; BOHM, K.H.; GLOVER, V.; SANDLER, M. - A benzylamine oxidase distinct from monoamine oxidase B – widespread distribution in man and rat. **Biochem Pharmacol**, **27**: 1857-1863, 1978.
- LEWINSOHN, R.; GLOVER, V.; SANDLER, M. - β -phenylethylamine and benzylamine as substrates for human monoamine oxidase A: a source of some anomalies? **Biochem Pharmacol**, **29**: 777-781, 1980a.

- LEWINSOHN, R.; GLOVER, V.; SANDLER, M. - Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B in man. **Biochem Pharmacol**, **29**: 1221-1230, 1980b.
- LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; MARZABAL, M.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. - Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **FEBS LETT**, **7**: 311-318, 1994.
- LÓPEZ-CANDALES, A.; HOLMES, D.R.; LIAO, S.; SCOTT, M.J.; WICKLINE, S.A.; THOMPSON, R.W. - Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. **Am J Pathol**, **150**: 993-1007, 1997.
- LOWRY, S.F. - Cancer cachexia revisited: old problems and perspectives. **Eur J Cancer**, **27**: 1-3, 1991.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, **193**: 265-275, 1951.
- LUNDHOLM, K.; EDSTROM, S.; KALBERG, I.; EKMAN, L.; SCHERSTEN, T. - Relationship of the food intake, body composition and tumor growth to host metabolism in nongrowing mice with sarcoma. **Cancer Res**, **40**: 2516-2522, 1980.
- LYLES, G.A. & SINGH, I. - Vascular smooth muscle cells: a major source of the semicarbazide-sensitive amine oxidase of the rat aorta. **J Pharm Pharmacol**, **37**: 637-643, 1985.
- LYLES, G.A.; HOLT, A.; MARSHALL, S. - Further studies on the metabolism of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in human plasma, umbilical artery and rat aorta. **J Pharm Pharmacol**, **42**: 322-338, 1990.
- MAcFIE, J. & BURKINSHAW, L. - Body composition in malignant disease. **Metabolism**, **36**: 290-294, 1987.
- MATTHYS, P. & BILLIAU, A. - Cytokines and cachexia. **Nutrition**, **13**: 763-770, 1997.
- McCAMAN, R.E.; McCAMAN, M.W.; HUNT, J.M.; SMITH, M.S. - Microdetermination of MAO and 5-hydroxytryptophan decarboxylase activities in nervous tissue. **J Neurochem**, **12**: 15-23, 1965.

- McEWEN, C.M. Jr. & COHEN, J.D. – An amine oxidase in normal human serum. **J Lab Clin Med**, **62**: 766-776, 1963.
- McEWEN, C.M. Jr. & HARRISON D.C. – Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic congestive heart failure. **J Lab Clin Med**, **65**: 546-559, 1965.
- McLELLAN, A.C.; PHILLIPS, S.A.; THORNALLEY, P.J. – The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-diamethoxybenzene. **Anal Biochem**, **206**: 17-23, 1992.
- MEGUID, M.M.; DEBONIS, D.; MEGUID, V.; TERZ, J.J. – Nutritional support in cancer. **Lancet**, **2(8343)**: 230-231, 1983.
- METZE, K. & MONTENEGRO, M.R. – Artérias, veias e linfáticos. In: **BRASILEIRO FILHO, G. – BOGLIOLO PATOLOGIA**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p.393-420.
- MITCH, W.E.; MEDINA, R.; GRIEBER, S.; MAY, R.C.; ENGLAND, B.K.; PRICE, S.R.; BAILEY, J.L.; GOLDBERG, A.L. - Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. **J Clin Invest**, **93**: 2127-2133, 1994.
- MOLDAWER, L.L.; GEORGIEFF, M.; LUNDHOLM, K.G. – Interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha (cachectin) and the pathogenesis of cancer cachexia. **Clin Physiol**, **7**: 263, 1987.
- MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.A.; WEI, H.; FONG, Y.; SILEN, M.L.; KUO, G.; MANOGUE, K.R.; VLASSARA, H.; COHEN, H.; CERAMI, A. - Cachectin/tumor necrosis factor- α alters red blood cell kinetics and induces anemia *in vivo*. **FASEB J**, **3**: 1637-1643, 1989.
- MOLEY, J.F.; MORRISON, S.D.; GORSCHBOTH, C.M.; NORTON, J.A. – Body composition changes in rats with experimental cancer cachexia: improvement with exogenous insulin. **Cancer Res**, **48**: 2784-2787, 1988.
- MULLEN, J.L.; GERTNER, M.H.; BUZBY, G.P.; GOODHART, G.L.; ROSATO, E.F. – Implications of malnutrition in the surgical patient. **Arch Surgery**, **114**: 121-125, 1979.

- MULLIGAN, H.D. & TISDALE, M.J. – Metabolic substrate utilization by tumour and host tissue in cancer cachexia. **Biochem J**, **277**: 321-326, 1991.
- NASCHITZ, J.E.; YESHURUN, D.; ELDAR, S.; LEV, L.M. - Diagnosis of cancer-associated vascular disorders. **Cancer**, **77**: 1759-1767, 1996.
- NILSSON, S.E.; TRYDING, N.; TUFVESSON, G. – Serum monoamine oxidase (MAO) in diabetes mellitus and some other internal diseases. **Acta Med Scand**, **184**: 105-108, 1968.
- NIXON, D.W.; HEYMSFIELD, S.B.; COHEN, A.E.; KUTNER, M.H.; ANSLEY, J.; LAWSON, D.H.; RUDMAN, D. – Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. **Am J Med**, **68**: 683-690, 1980.
- NOLOP, K.B.; RHODES, C.G.; BRUDIN, L.H.; BEANEY, R.P.; KRAVSZ, T.; JONES, T.; HUGHES, J.N. - Glucose utilization *in vivo* by human pulmonary neoplasms. **Cancer**, **60**: 2682-2689, 1987.
- NORTON, J.A.; STEIN, T.P.; BRENNAN, M.F. - Whole body protein synthesis and turnover in normal man and malnourished patients with and without known cancer. **Ann Surg**, **194**: 123-128, 1981.
- PEETRE, C.; GULLBERG, U.; NILSSON, E.; OLSSON, I. - Effects of recombinant tumor necrosis factor on proliferation and differentiation of leukemic and normal hemopoietic cells in vitro. Relationship to cell surface receptor. **J Clin Invest**, **78**: 1694-1700, 1986.
- PIETRANGELO, A. & SHAFRITZ, D.A. - Homeostatic regulation of hepatocyte nuclear transcription factor1 expressed in cultured hepatoma cells. **Proc Nat Acad Sci USA**, **91**: 182-186, 1994.
- POPP, M.B.; MORRISON, S.D.; BRENNAN, M.F. – Total parenteral nutrition in a methylcholanthrene-induced rat sarcoma model. **Cancer Treat Rep**, **65(Suppl5)**: 137-143, 1981.
- POPP, M.B.; BRENNAN, M.F.; MORRISON, S.D. - Resting and activity energy expenditure during total parenteral nutrition in rats with methylcholanthrene-induced sarcoma. **Cancer**, **49**: 1212-1220, 1982.

- PRÊTRE, R. & SEGESSER, L.K. - Aortic dissection. **Lancet**, **349**: 1461-1464, 1997.
- RAIMONDI, L.; PIRISINO, R.; IGNESTI, G.; CAPECCHI, S.; BANCHELLI, G.; BUFFONI, F. - Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity (SSAO) of rat epididymal white adipose tissue. **Biochem Pharmacol**, **41**: 467-470, 1991.
- RHODIN, J.A.G. - Fine structure of vascular walls in mammals with special reference to smooth muscle component. **Physiol Rev**, **42**: 48-81, 1962.
- ROACH, M.R. & BURTON, A.C. - The reason for the shape of distensibility curves of arteries. **Can J Biochem Physiol**, **35**: 681-690, 1957.
- ROH, M.S.; EKMAN, L.G.; JEEVANANDAM, M.; BRENNAN, M.F. - Elevated energy expenditure in hepatocytes from tumor-bearing rats. **J Surg Res**, **38**: 407-415, 1985.
- ROTHSCHILD, M.; ORATZ, M.; SCHREIBER, S.S. - Regulation of albumin metabolism. **Annu Rev Med**, **26**: 91-104, 1975.
- ROUBENOFF, R. - Inflammatory and hormonal mediators of cachexia. **J Nutr**, **127**: 1014S-1016S, 1997.
- RUDDON, R.W. - Host-tumor interactions. In: _____ - **Cancer Biology**. 2.ed. Oxford, Oxford University Press, 1987. p.468-498.
- RYDER, T.A.; MACKENZIE, M.L.; LEWINSOHN, R.; PRYSE-DAVIES, J.; SANDLER, M. - Amine oxidase histochemistry of the human uterus during the menstrual cycle. **Histochemistry**, **67**: 199-204, 1980.
- SEELAENDER, C.D.; NASCIMENTO, C.M.O.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. - Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **Biochem Mol Biol Int**, **39**: 1037-1047, 1996.
- SHAPOT, V.S. - Some biochemical aspects on the relationship between the tumor and the host. **Adv Cancer Res**, **15**: 253-286, 1972.
- SHAW, J.H.F.; HUMBERSTONE, D.M.; WOLFE, R.R. - Energy and protein metabolism in sarcoma patients. **Ann Surg**, **207**: 283-289, 1988.
- SHAW, J.H.F.; HUMBERSTONE, D.A.; DOUGLAS, R.G.; KOEA, J. - Leucine kinetics in patients with benign disease, non-weight-losing cancer, and cancer cachexia:

- studies at the whole-body and tissue level and the response to nutritional support. **Surgery**, **109**: 37-50, 1991.
- SIROTT, M.N.; BAJORIN, D.F.; WONG, G.Y.; TAO, Y.; CHAPMAN, P.B.; TEMPLETON, M.A.; HOUGHTON, A.N. - Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. **Cancer**, **72**: 3091-3098, 1993.
- SJÖSTRÖM, M.; WRETLING, M-L.; KALBERG, I.; EDÉN, E.; LUNDHOLM, K. - Ultrastructural changes and enzyme activities for energy production in hearts concomitant with tumor-associated malnutrition. **J Surg Res**, **42**: 304-313, 1987.
- SLANGEN, B.F.M.; OUT, I.C.M.; VERKESTE, C.M.; PEETERS, L.L.H. - Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented conscious rats. **Am J Physiol**, **270**: H1779-H1784, 1996.
- SLANGEN, B.F.M.; SCHENAU, D.S.I.; GORP, A.W.; DE MEY, J.G.R.; PEETERS, L.L.H. - Aortic distensibility and compliance in conscious pregnant rats. **Am J Physiol**, **272**: H1260-H1265, 1997.
- SMITH, B.K.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J. - Experimental cachexia: effects of MCA sarcoma in the Fischer rat. **Am J Physiol**, **265**: R376-R384, 1993.
- SMITH, D.J.; SALMI, M.; BONO, P.; HELLMAN, J.; LEU, T.; JALKANEN, S. - Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. **J Exp Med**, **188**: 17-27, 1998.
- STRASSMAN, G. & KAMBAYASHI, T. - Inhibition of experimental cancer cachexia by anti-cytokine and anti-cytokine receptor therapy. **Cytokines Mol**, **1**: 107-113, 1995.
- TESSITORE, L.; BONELLI, G.; BACCINO, F. - Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. **Biochem J**, **241**: 153-159, 1987.
- TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BONELLI, G.; BACCINO, F. - Cancer cachexia, malnutrition and tissue protein turnover in experimental animals. **Arch Biochem Biophys**, **306**: 52-58, 1993.
- TISDALE, M.J. - Cancer cachexia. **Anti-Cancer Drugs**, **4**: 115-125, 1993.

- TISDALE, M.J. - Biology of cachexia. **J Natl Cancer Inst**, **89**: 1763-1773, 1997.
- TRYDING, N.; NILSSON, S.E.; TUFVESSON, G.; BERG, R.; CARLSTROM; ELMFORS, B.; NILSSON, J.E. – Physiological and pathological influences on serum monoamine oxidase level. **Scand J Clin Lab Invest**, **23**: 79-84, 1969.
- ULRICH, C.; KRUGER, B.; KOHLER, H.; RIEGEL, W. - Effects of acidosis on acute phase protein metabolism in liver cells. **Miner Electrolyte Metab**, **25**: 228-233, 1999.
- VIAMONTE, M.; ROEN, S.; LePAGE, J. - Nonspecificity of abnormal vascularity in the angiographic diagnosis of malignant neoplasms. **Radiology**, **106**: 59-63, 1973.
- WALDMEIER, P.C. – Amine oxidases and their endogenous substrates. **J Neural Transm Suppl** **23**: 55-72, 1987.
- WARREN, S. – The immediate causes of death in cancer. **Am J Med Sci**, **184**: 610-616, 1932.
- WIBO, M.; DUONG, A.T.; GODFRAIND, T. – Subcellular location of semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. **Eur J of Biochem**, **112**: 87-94, 1980.
- WILKINSON, G.N. – Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem J**, **80**: 324-332, 1961.
- WURTMAN, R.J. & AXELROD, J. - A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. **Biochem Pharmacol**, **12**: 1439-1440, 1963.
- YOSHIDA, W.B.; MÜLLER, S.S.; CARVALHO, I.; FABRIS, V.E.; NARESSE, L.E.; MAFFEI, F.H.A. - Tensile strength and histological changes of abdominal aorta of malnourished rats. **Cardiovasc Surg**, **3**: 437-439, 1995.
- YU, P.H. – Oxidative deamination of aliphatic amines by rat aorta semicarbazide-sensitive amine oxidase. **J Pharm Pharmacol**, **42**: 882-884, 1990.
- YU, P.H. & ZUO, D.M. – Oxidative deamination of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase leads to cytotoxic damage in endothelial cells. Possible consequences for diabetes. **Diabetes**, **42**: 594-603, 1993.