



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

Tatiane Pertile

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DO
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 EM RATOS
JOVENS E ADULTOS, SUPLEMENTADOS COM
ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO (EPA).**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Tatiane Pertile
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada
ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular,
na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P434e Pertile, Tatiane, 1982-
Estudo do crescimento do carcinossarcoma de Walker 256 em ratos jovens e adultos, suplementados com ácido eicosapentaenoico (EPA) / Tatiane Pertile. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Ácidos graxos Omega-3. 3. Caquexia. 4. Proteínas - Metabolismo. 5. Proteínas - Síntese. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1952. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em Inglês: Study of Walker 256 tumour growth in young and adults rats treated with eicosapentaenoic acid (EPA)

Palavras-chave em Inglês:

Cancer

Omega-3 fatty acids

Cachexia

Proteins - Metabolism

Proteins - Synthesis

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Dora Maria Grassi Kassis

Estela Maria Gonçalves

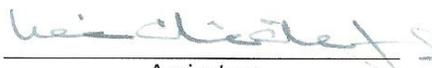
Data da defesa: 12-08-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 12 de Agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
(Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis



Assinatura

Profa. Dra. Estela Maria Gonçalves



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que participaram, mesmo que indiretamente, da realização desse trabalho e da minha vida. Agradeço imensamente...

...aos meus pais, que se preocuparam durante toda a minha vida com meus estudos.

Graças a eles, que confiaram quando disse que eu queria cursar uma faculdade pública, estou aqui. Agradeço aos meus pais e ao meu irmão por permanecerem ao meu lado em todos os momentos, dando total apoio.

...ao meu namorado, Alexandre, pela imensa paciência nos momentos de total estresse, principalmente nessa fase final do mestrado. Obrigada pelo carinho, pela companhia e pela atenção.

...à minha eterna orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, com quem pude aprender muito, não só conhecimentos científicos, mas também aprendizados de vida. Obrigada por ter desempenhado não somente um trabalho de orientadora, mas também de mãe. Obrigada pela imensa dedicação a esse trabalho.

...à todos os alunos do laboratório de Nutrição e Câncer, que, graças à companhia e à amizade, tornaram o trabalho um pouco menos árduo. Agradeço em especial às pessoas que me auxiliaram na fase experimental, devido ao meu afastamento por motivos de saúde. Agradeço também algumas pessoas do depto de Fisiologia, pelas quais tenho enorme carinho e respeito.

...aos meus eternos amigos e ao pessoal do MEJ pela amizade e companhia, que foram essenciais durante toda minha graduação e meu mestrado.

...à todos que fizeram parte da minha e me ensinaram algo, seja pessoal ou profissional.

...à Fapesp, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

Agradeço também ao Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino e Metabolismo pelo empréstimo de reagentes e de equipamentos, que foram essenciais para a conclusão do trabalho.

SUMÁRIO

<u>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</u>	1
<u>RESUMO GERAL</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA</u>	5
<u>INTRODUÇÃO</u>	6
Objetivo geral	9
Objetivos específicos	9
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	10
1. Modelo experimental.....	10
2. Grupos experimentais.....	11
3. Protocolo experimental	13
3.1. Determinação do ganho de peso	13
3.2. Órgãos – determinação do peso relativo (PR)	14
3.3. Determinação do peso relativo da carcaça.....	14
3.4. Determinação do peso relativo do Tumor.....	14
3.5. Análise fluorimétrica do fator de crescimento IGF-1, leptina e citocinas	15
3.6. Análises bioquímicas	15
3.7. <i>Western blot</i> da presença da subunidade proteossômica 20S.....	17
3.8. Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real – PCR-RT	18
4. Análise estatística.....	18
<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	19
1. Indução da caquexia em ratos adultos inoculados com o tumor de Walker 256	19
1.1. Efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) em relação à caquexia nos animais adultos.....	25
2. Indução da caquexia em ratos jovens inoculados com o tumor de Walker 256	28
2.1. Efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) em relação à caquexia nos animais jovens.....	33
3. Efeito da inoculação do tumor de Walker 256, em ratos adultos, sobre o processo de degradação protéica	35
3.1. Modulação da degradação protéica pelo EPA, nos animais adultos	41
4. Efeito da inoculação do tumor de Walker 256, em ratos jovens, sobre o processo de degradação protéica	43
4.1. Modulação da degradação protéica pelo EPA, nos animais jovens	48

5. Análise da síntese protéica, via fatores de iniciação eucarióticos, em ratos adultos inoculados com células de Walker 256	50
5.1. Modulação da síntese protéica pelo EPA, nos animais adultos	51
6. Análise da síntese protéica, via fatores de iniciação eucarióticos, em ratos jovens inoculados com células de Walker 256	54
6.1. Modulação da síntese protéica pelo EPA, nos animais jovens	55
7. Concentração de citocinas pró e antiinflamatórias, em resposta à evolução do tumor de Walker 256 nos grupos adultos.....	59
7.1. Modulação da resposta inflamatória pelo EPA, nos animais adultos.....	62
8. Concentração de citocinas pró e antiinflamatórias, em resposta a evolução do tumor de Walker 256 nos grupos jovens	63
8.1. Modulação da resposta inflamatória pelo EPA, nos animais jovens.....	66
<u>CONCLUSÕES</u>	71
<u>REFERÊNCIAS</u>	73

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais	12
Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina nos animais adultos	23
Figura 3. Concentração de proteína muscular nos animais adultos	24
Figura 4. Concentração sérica de IGF-1 nos animais adultos	24
Figura 5. Concentração sérica de leptina nos animais adultos	25
Figura 6. Atividade da fosfatase alcalina nos animais jovens	32
Figura 7. Concentração de proteína muscular nos animais jovens	32
Figura 8. Concentração sérica de IGF-1 nos animais jovens	33
Figura 9. Concentração sérica de leptina nos animais jovens	33
Figura 10. Atividade da enzima <i>chymotrypsin-like</i> nos animais adultos	39
Figura 11. Expressão da subunidade 20S nos animais adultos	39
Figura 12. Expressão das subunidades proteossômicas PC5 e PC2 nos adultos	40
Figura 13. Atividade enzimática da calpaína nos animais adultos	40
Figura 14. Atividade da enzima catepsina B nos animais adultos	41
Figura 15. Atividade da enzima catepsina H nos animais adultos	41
Figura 16. Atividade da enzima <i>chymotrypsin-like</i> nos animais jovens	46
Figura 17. Expressão da subunidade 20S nos animais jovens	46
Figura 18. Expressão das subunidades proteossômicas PC5 e PC2 nos jovens	47
Figura 19. Atividade enzimática da calpaína nos animais jovens	47
Figura 20. Atividade da enzima catepsina B nos animais jovens	48

Figura 21. Atividade da enzima catepsina H nos animais jovens	48
Figura 22. Expressão dos fatores de iniciação eucarióticos nos animais adultos	53
Figura 23. Expressão dos fatores de iniciação eucarióticos nos animais jovens	58
Figura 24. Concentração sérica de IL-4 nos animais adultos	60
Figura 25. Concentração sérica da IL-10 nos animais adultos	61
Figura 26. Concentração sérica de IL-6 nos animais adultos	61
Figura 27. Concentração sérica de INF- α nos animais adultos	62
Figura 28. Concentração sérica de IL-4 nos animais jovens	64
Figura 29. Concentração sérica da IL-10 nos animais jovens	65
Figura 30. Concentração sérica de IL-6 nos animais jovens	65
Figura 31. Concentração sérica de INF- α nos animais jovens	66

Tabelas

Tabela 1. Resultados das análises morfométricas dos animais adultos	23
Tabela 2. Resultados das análises morfométricas dos animais jovens	31

RESUMO GERAL

O câncer pode promover a morte do hospedeiro, pois durante sua evolução há modificações da homeostasia dos processos metabólicos, promovendo profundas alterações caracterizadas como caquexia, que por sua vez relaciona-se à diminuição da qualidade e do tempo de vida do hospedeiro. Assim, no presente estudo, analisamos os efeitos da evolução do crescimento de neoplasia – carcinossarcoma de Walker 256 – em ratos jovens e adultos e os efeitos modulatórios do tratamento desses animais com EPA (ácido eicosapentaenóico) sobre o processo de caquexia e a concentração de citocinas anti e proinflamatórias no músculo gastrocnêmio, pois o tecido muscular é o tecido mais afetado no processo de caquexia. Foram utilizados 108 ratos Wistar machos, com idade de 30 dias (jovens) e 100 dias (adultos), os quais foram distribuídos de acordo com o local de implante tumoral, intraperitônio e subcutâneo, e tratamento ou não com ácido eicosapentaenóico, 100µg/Kg de peso corpóreo. Os animais receberam gavagem diária do EPA (animais tratados) ou de óleo mineral (grupos sem tratamento) até a fase pré-agônica. A partir dos órgãos coletados, foram calculados o ganho de peso corpóreo, os pesos relativos de cada órgão, do tumor e da carcaça. Com o objetivo de identificarmos a via de degradação protéica predominante nos grupos experimentais, foram avaliados, no tecido muscular, o teor de proteína muscular total e as atividades das seguintes enzimas: *chymotrypsin-like*, catepsinas B e H, calpaína e fosfatase alcalina,. A partir do sangue desses animais foram feitas análises fluorimétricas do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e das citocinas – interleucinas 4 (IL-4), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), interferon gama (INF- α) e leptina, utilizando-se kits específicos para citômetro de fluxo de fluorescência (Luminex). Também foi analisada a expressão gênica, no tecido muscular, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT), para a via proteossômica e também para os fatores eucarióticos de inicialização. Os dados indicam efeitos modulatórios do EPA sobre o tecido muscular (manutenção da proteína e do peso), principalmente para os grupos jovens, e também no processo inflamatório crônico (aumento de citocinas pró e antiinflamatórias). Entretanto, efeitos mais expressivos do EPA não foram verificados na prevenção da espoliação de gordura (gordura perirrenal e leptina), no processo de síntese protéica (manutenção da expressão gênica de fatores eucarióticos de inicialização) ou também sobre a via proteossômica.

Palavras-chave: câncer, ácido eicosapentaenóico, ômega 3, caquexia, degradação protéica, síntese protéica e resposta imunológica.

ABSTRACT

Cancer can promote the host death, because during its evolution there are modifications in metabolic processes of homeostasis, promoting deep changes characterized as cachexia, which in turn relates with reduction in quality and lifetime of the host. Thus, in this study, we analyze the effects of development in Walker 256 carcinoma evolution – in young and adult rats and the modulatory effect of treatment with EPA (eicosapentaenoic acid) in gastrocnemius muscle as this tissue is the most affected in the cachexia process. Wistar male rats were used (n=108 animals), 30 days-old (young) and 100 days-old (adults), which were distributed according to the tumour implant, intraperitoneally and subcutaneously and treatment or not with eicosapentaenoic acid, 100 µg/Kg of body weight. The animals received daily EPA by gavage (treated animals) or nujol (sham groups) and were cared up to pre-agonic state. The body weights were measured and the body weight gain was calculated, as well the relative weights of tissues, tumour, and carcass. In order to identify the predominant pathway of protein degradation the total muscle protein content and proteolytic enzymes activities (chymotrypsin-like, cathepsin B and H, calpain and alkaline phosphatase) were measured in gastrocnemius muscle. The blood samples were assessed to measure the insulin-like growth factor 1 (IGF-1), leptin and the cytokines – interleukins (IL-4), 6 (IL-6) and 10 (IL-10), gamma interferon (INF-α), using specific kits for cytometer fluorescence (Luminex). It was also examined gene expression, in the muscle tissue, by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), assessing keys of ubiquitin-proteasome pathway and also on the eukaryotic initiation factors. The data indicated some modulatory effects of EPA on the muscle tissue (maintenance of protein and weight), mainly for the young rats, and also the chronic inflammatory process. However, more expressive effects of EPA have not been verified as preventing fat wasting (perirenal fat and leptin), nor in the process of protein synthesis (maintenance of eukaryotic initiating factors gene expression) or also in the ubiquitin-proteasome via.

Keywords: cancer, eicosapentaenoic acid, omega-3 fatty acid, cachectic state, protein degradation, protein synthesis and inflammatory chronic process.

DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada **ESTUDO DO CRESCIMENTO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 EM RATOS JOVENS E ADULTOS, SUPLEMENTADOS COM ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO (EPA)**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(**X**) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. **1817-2**, Instituição: Instituto de Biologia – UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluna: Tatiane Pertile



Orientadora: Profa Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(**X**) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna pode promover a morte do hospedeiro por modificar a harmonia dos processos metabólicos, promovendo profundas alterações, tais como: redução do aporte de nutrientes causada pela anorexia, consumo de substratos específicos pelas células neoplásicas, estimulação das vias catabólicas e transformação qualitativa e quantitativa do meio interno, em função da produção de substâncias pelo câncer e/ou hospedeiro, originando o quadro denominado caquexia (BARACOS & MACKENZIE, 2006; TISDALE, 2002, 2003, 2005a, 2009). Estudos de casos clínicos e trabalhos experimentais mostram que, no organismo hospedeiro de câncer, ocorre elevada mobilização de nutrientes para provimento das células neoplásicas (STOUTHARD *et al.*, 1995; FEARON *et al.*, 2006).

A caquexia é caracterizada pela grande perda de peso, relacionando-se à diminuição da qualidade e do tempo de vida do hospedeiro (TISDALE, 1997), sendo a causa *mortis* mais frequente nos pacientes com câncer, devido à espoliação dos tecidos do hospedeiro, principalmente da massa muscular esquelética (LANGSTEIN & NORTON, 1991; STALLION *et al.*, 1993; CAMPS *et al.*, 2006; BOSSOLA *et al.*, 2006). O estado de caquexia parece não ser provocado apenas pela redução da ingestão de nutrientes, mas também por fatores catabólicos produzidos pelo tumor (TESSITORE *et al.*, 1993; TISDALE, 1997).

Estudo de TODOROV *et al.* (1996) mostrou que uma glicoproteína sulfatada de peso molecular de 24KDa causava caquexia em camundongos não portadores de tumor quando administrada intravenosamente, sendo que a perda de peso, nesses animais, ocorreu sem alteração na ingestão de água e dieta. Essa perda de peso aconteceu primariamente pelo efeito catabólico sobre a musculatura esquelética. Por outro lado, esse efeito pôde ser atenuado pelo tratamento prévio dos camundongos com anticorpos monoclonais contra essa glicoproteína denominada de fator de indução de proteólise (PIF). Estudos *in vitro*, mostraram que o PIF pode induzir a degradação de proteína muscular, diferentemente dos efeitos observados por outras citocinas, além de participar da ativação de fatores envolvidos no processo de espoliação muscular (WYKE *et al.*, 2004). Estudos com animais e com humanos evidenciaram que a

presença desse fator de indução de proteólise na caquexia correlaciona-se ao crescimento neoplásico, envolvendo, principalmente, o sistema ubiquitina-proteossomo no processo de degradação protéica, responsável pela intensa espoliação do tecido muscular (GOMES-MARCONDES *et al.*, 2002; SMITH & TISDALE, 2003; BELIZARIO *et al.*, 1991, TISDALE, 2005b).

Redução na síntese de proteína muscular foi observada em pacientes com câncer que apresentaram perda de peso corpóreo, sem haver alteração na síntese ou degradação das proteínas totais (EDEN *et al.*, 1984). A manutenção da síntese de proteínas totais, nesses pacientes, parece ser devido ao aumento na síntese de proteínas não-musculares, mais provavelmente, devido ao aumento da produção hepática de proteínas de fase aguda (FEARON *et al.*, 1991).

A indução da degradação protéica pelo PIF foi atenuada através de pré-tratamento com ácido eicosapentaenóico (EPA) (LORITE *et al.*, 1997), que atuou como regulador da expressão de componentes-chaves da via ubiquitina-proteossomo em músculo esquelético de camundongos implantados com tumor MAC16 (WHITEHOUSE *et al.*, 2001). O EPA é um ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (n-3), sendo que a designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação existente na molécula, contando a partir do grupo metílico final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos ômega-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomos de carbono (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002). Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) apresentam muitas funções vitais em nosso organismo, como por exemplo: modulam a fluidez da membrana celular, uma vez que constituem os fosfolípidios, além de participarem de processos de sinalização e interações celulares (COLOMER *et al.*, 2007). Os ácidos graxos ômega-3 podem ser encontrados em vários alimentos, como por exemplo, em nozes e óleo de canola, sendo que sua principal fonte é o óleo extraído de alguns peixes, como o salmão, a sardinha, o arenque e a anchova. Os ácidos graxos ômega-3 protegem contra os estágios iniciais do câncer, diminuindo a proliferação celular tumoral, aumentando a apoptose das células tumorais, promovendo a diferenciação celular e limitando a angiogênese (COLOMER *et al.*, 2007). Estudos com animais implantados com adenocarcinoma de cólon (MAC16) têm mostrado que o EPA atenuou a perda de peso corpóreo do hospedeiro, com preservação tanto do

tecido adiposo quanto do tecido muscular esquelético (BECK *et al.*, 1991). Animais implantados com tumor MAC16, tratados com EPA, apresentaram redução significativa da degradação protéica, porém sem efeito sobre a síntese protéica (BECK *et al.*, 1991).

Em culturas primárias de hepatócitos humanos e células cancerígenas humanas Hep G2, o PIF promoveu ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, resultando em aumento da produção de interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa e diminuição na síntese de transferrina (WATCHORN *et al.*, 2001). O NF- κ B atua na regulação da transcrição de genes envolvidos na resposta imunológica, no crescimento e morte das células (BAEURELE & BALTIMORE, 1996; MARKS *et al.* 2009). Na maioria das células, NF- κ B promove proliferação celular e proteção contra apoptose (DAJEE *et al.*, 2003). A concentração de NF- κ B no núcleo está aumentada em resposta ao PIF, nas mesmas concentrações que induz catabolismo protéico e aumento da expressão da subunidade α do proteossomo 20S, associado ao desaparecimento da sua forma inativa – I κ B α (I kappa beta alfa) – no citosol (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003).

O EPA pode exercer seus efeitos através da inibição da degradação de I κ B α através de efetores, como a quinase do I κ B (IKK) (MUSZBECK & LAPOSATA, 1993). Tanto a expressão das subunidades proteossômicas quanto o acúmulo de NF- κ B no núcleo, induzidos pelo PIF, foram atenuados pelo EPA, que preveniu a degradação de I κ B α , possivelmente através da estabilização do complexo NF- κ B/I κ B (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003).

Estudo de LI *et al.* (1998) mostrou que miotúbulos murínicos tratados com fator de necrose tumoral α (TNF α) apresentaram redução do teor de proteínas totais e miosina, juntamente com ativação de NF- κ B. Este estudo mostrou que a ativação de NF- κ B relaciona-se com o aumento de proteínas musculares conjugadas com ubiquitina e com subsequente aumento do RNAm da ubiquitina, sugerindo que NF- κ B age aumentando a expressão de componentes da via ubiquitina-proteossomo, em músculo esquelético.

A alimentação forçada não é capaz de contornar ou reverter o efeito da caquexia. Assim, um possível meio de se promover a reversão de caquexia seria através de métodos químicos bloqueando a ação do fator NF- κ B.

Assim, com base nos dados obtidos previamente, faz-se necessária a avaliação do tratamento com EPA sobre a modulação dos efeitos da indução de caquexia em

animais jovens e adultos, implantados com tumor em diferentes locais, visto que a evolução tumoral nos animais implantados com tumor no peritônio apresenta agressividade bastante acentuada, não estabelecendo o estado caquético como verificado na evolução tumoral no implante subcutâneo (PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2008; PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2010).

Objetivo geral

Verificar o efeito do ácido eicosapentaenóico (EPA) sobre a modulação do processo de espoliação tecidual (caquexia) em ratos jovens e adultos com evoluções tumorais distintas.

Objetivos específicos

Através da comparação da evolução tumoral, em diferentes locais de implante, em hospedeiros jovens e adultos, tratados ou não com o EPA, estudamos os seguintes aspectos:

1. A relação da sinalização celular para proteólise frente à administração do EPA e seus efeitos no organismo portador de tumor;
2. Os processos de sinalização envolvidos na síntese protéica, através da expressão de fatores eucarióticos de inicialização, e os efeitos do EPA nos animais com tumor;
3. A degradação protéica, através da análise da expressão das subunidades proteossômicas e os efeitos do EPA na modulação da degradação protéica;
4. A resposta imunológica dos animais com implante tumoral e em resposta ao tratamento com EPA.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Modelo experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idades iniciais de 30 dias (jovens) e 100 dias (adultos), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais receberam água *ad libitum* e dieta semipurificada contendo 18% de proteína normoprotéica, seguindo padrão AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993). Os animais permaneceram em gaiolas coletivas durante todo o período experimental, em ambiente com controle de luz claro-escuro (12/12 horas) e temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Suspensão de células tumorais provenientes do carcinossarcoma de Walker 256 (linhagem proveniente do Banco de tumores *Christ Hospital Line, Arthur D'Little*, EUA) foi obtida de animais doadores, implantados com tumor no peritônio, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES *et al.* (1998). Os animais jovens e adultos pertencentes aos grupos implantados com tumor foram inoculados com cerca de 1×10^6 células viáveis no peritônio ou no subcutâneo do flanco direito. Para simulação *sham* do estresse de manipulação e injeção nos animais, em estudos prévios verificamos que a inoculação ou não com solução salina (NaCl 0,9%) não produzia efeitos ou diferenças significativas em todos os parâmetros analisados. Desse modo no presente estudo os grupos controles não receberam simulação *sham*. A partir da inoculação das células tumorais, foi administrado diariamente, através de gavagem, $100\mu\text{g/Kg}$ do ácido eicosapentaenóico (EPA, Calbiochem, 99% de pureza, PM=302,5), diluído em óleo mineral (Nujol, Mantecorp, São Paulo, Brasil), para os grupos experimentais tratados (ver Protocolo Experimental), durante todo o período experimental. A dosagem diária recomendada para humanos é bastante divergente, pois alguns estudos recomendam administração de 1,5 a 2g de EPA/dia, o que corresponde a aproximadamente $28,5\text{mg/Kg}$ de peso corpóreo diariamente, enquanto que outros estudos recomendam dosagens maiores, como 4,7g de EPA/dia ou $67,1\text{mg/Kg}$ (COLOMER *et al.*, 2007).

Os animais não tratados com EPA receberam o equivalente em volume de Nujol, através de gavagem. O Nujol foi utilizado devido a sua característica química inerte, isto é, pelo fato de ser um óleo mineral purificado indigerível e pouco absorvido pelo

organismo. Devido à pequena quantidade de Nujol administrada diariamente, os ratos não apresentaram diarreia ou qualquer outra alteração nas fezes.

O período de gavagem foi diferente entre os grupos, pois dependeu do tempo de sobrevivência dos animais, uma vez que receberam a gavagem até o momento pré-agônico (quando foram sacrificados). Para os grupos adultos, que receberam implante tumoral intraperitoneal, o tempo de gavagem foi cerca de 7 dias enquanto que os adultos, implantados no subcutâneo, foram gavados por cerca de 17 dias. Já os grupos jovens, com tumor intraperitônio, receberam gavagem por cerca de 6 dias e os jovens, com implante tumoral no subcutâneo, por cerca de 13 dias.

2. Grupos experimentais

Ratos jovens e adultos foram distribuídos de acordo com a idade, implante tumoral (subcutâneo e intraperitônio) e tratados ou não com ácido eicosapentaenóico (EPA), conforme mostrado na Figura 1.

Nesse trabalho utilizamos grupos controles correspondentes aos tratamentos utilizados. Para os animais jovens, foi instituído um grupo controle em correspondência a cada grupo com implante tumoral, pois a diferença de tempo experimental entre os implantes intraperitônios e subcutâneos é responsável por grande variação do peso dos animais, uma vez que esses animais encontravam-se em fase de crescimento. Para os animais adultos, utilizamos apenas um grupo controle adulto tratado (CA-E) e um grupo controle adulto não tratado (CA) porque, devido à fase adulta, esses animais não apresentam grandes alterações de peso e com isso pudemos utilizá-los como controles tanto para os implantes intraperitônios quanto para os subcutâneos.

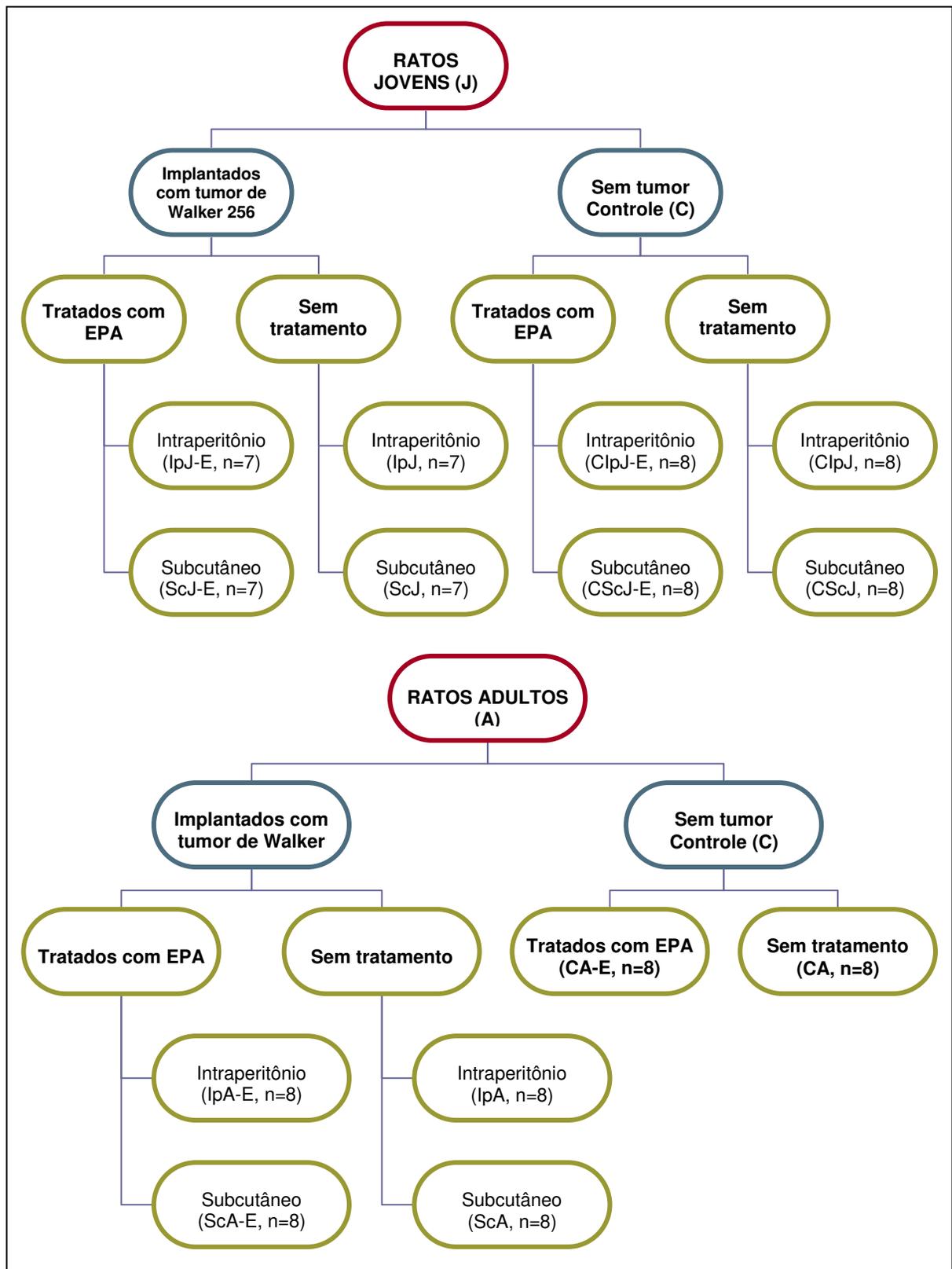


Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais, segundo o implante tumoral e o tratamento com EPA. Número mínimo de animais por grupo igual a 7.

3. Protocolo experimental

Os animais foram pesados no início do experimento (dia do implante tumoral) e ao final do período experimental, na fase pré-agônica (dia do sacrifício). O tempo experimental variou de acordo com a idade e o tipo de evolução tumoral, ou seja, os grupos ClpJ, ClpJ-E, IpJ e IpJ-E foram sacrificados cerca de 6 dias após o implante tumoral, enquanto que os grupos CScJ, CScJ-E, ScJ, ScJ-E foram sacrificados cerca de 13 dias após o implante tumoral. Já os grupos IpA e IpA-E foram sacrificados cerca de 7 dias após a inoculação do tumor e os grupos CA, CA-E, ScA e ScA-E, cerca de 17 dias após o implante do tumor. Após o sacrifício (por deslocamento cervical), foi coletado sangue, por punção cardíaca, dissecados coração, fígado, baço, adrenais, gordura perirrenal, músculos gastrocnêmios e tecido tumoral e pesada a carcaça.

A condução deste estudo, assim como a manipulação dos animais, foi baseada no protocolo experimental nº 1817-2, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação em Animal do Instituto de Biologia (CEEA-IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), além disso, os animais foram tratados de acordo com as regras do comitê internacional de pesquisa em câncer, *United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research – UKCCR 1998 (VALE et al. 2005)*.

3.1. Determinação do ganho de peso

O ganho de peso dos animais foi determinado utilizando-se os pesos inicial e final do animal e o peso do tumor ⁽¹⁾:

$$\text{GANHO DE PESO (g)} = \text{PF} - (\text{PI} - \text{PT}) \quad (1)$$

onde: PF = peso corpóreo final;
PI = peso corpóreo inicial;
PT = peso tumoral;

3.2. Órgãos – determinação do peso relativo (PR)

Foram retirados e pesados os seguintes órgãos: coração, fígado, baço, adrenais, gordura perirrenal e músculos gastrocnêmios.

Os pesos relativos (%) foram determinados através da fórmula 2.

$$\text{PR} = (\text{PO}/\text{PF}) \times 100 \quad (2)$$

onde: PR = peso relativo;
PO = peso do órgão;
PF = peso corpóreo final do animal

3.3. Determinação do peso relativo da carcaça

Depois de retirados todos os órgãos, as vísceras e o tumor, foi obtido o peso da carcaça. Para o cálculo do peso relativo da carcaça foi utilizada a fórmula 3.

$$\text{PR}_C = (\text{PC}/\text{PI}) \times 100 \quad (3)$$

onde: PR_C = peso relativo da carcaça;
PC = peso da carcaça;
PI = peso corpóreo inicial do animal.

3.4. Determinação do peso relativo do Tumor

O peso relativo do tumor foi calculado como mostrado na fórmula 4.

$$\text{PR}_T = (\text{PT}/(\text{PF}-\text{PT})) \times 100 \quad (4)$$

onde: PR_T = peso relativo tumor;
PT = peso tumoral;
PF = peso corpóreo final do animal

3.5. Análise fluorimétrica do fator de crescimento IGF-1, leptina e citocinas

A análise sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), da leptina e das citocinas – interleucinas 4 (IL-4), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), interferon gama (INF- α), foi avaliada utilizando-se kits específicos para citômetro de fluxo de fluorescência (Luminex, Millipore, EUA), seguindo orientações dos protocolos fornecidos pelo fabricante (Linco/Millipore). As amostras de soro foram aplicadas em placas multiposos, juntamente com o tampão específico fornecido pela Linco/Millipore, e, em seguida, foram adicionados *beads* acoplados com anticorpos específicos para essas proteínas.

O tempo de incubação mínimo foi de 3hs, à 4 °C e, após este período, a placa foi lavada três vezes com tampão. Foram adicionados os anticorpos de detecção e, novamente, feita incubação por 120 min. Após este período, foi adicionado o reagente *streptavidin-phycoerithrin* e feita a incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes com tampão. A leitura de fluorescência foi realizada em equipamento de citometria de fluxo de fluorescência (Luminex), calculando-se os valores desses fatores, em soro, segundo software XPonent (Luminex, Millipore, EUA), utilizado com o equipamento Luminex.

3.6. Análises bioquímicas

Atividade enzimática tecidual

Para análise das atividades enzimáticas (*chymotrypsin-like*, calpaína, catepsinas B e H e fosfatase alcalina) dos músculos gastrocnêmios, esses foram homogeneizados em tampão HB (20mM Tris, 1mM DTT, 2mM ATP e 5mM MgCl₂), na proporção 1:5, seguindo o procedimento abaixo:

- cerca de 100mg do tecido muscular foi homogeneizado por 30 segundos em gelo; aguardando-se 10 segundos de descanso em banho de gelo (para que o tecido não tivesse grande variação de temperatura), seguido de nova homogeneização, em gelo, por mais 30 segundos. Os tempos foram controlados para garantia de homogeneização similar para todos os animais; após o qual, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. Antes das dosagens das atividades enzimáticas, as

amostras foram descongeladas em gelo e então centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens enzimáticas e para dosagem da proteína muscular dos animais jovens e adultos (BRADFORD, 1976).

Atividade da enzima chymotrypsin-like

Foram utilizados 10µL do homogeneizado muscular e 100µL de solução Substrato-Tris (preparada da seguinte forma: solução 1 corresponde a 10mg de substrato SucLlevy + 600µL de DMSO; solução 2 compreende 10µL da solução 1 acrescida de 1mL de Tris-HCl 100mM pH 8,0). A atividade enzimática das amostras foi determinada através de leitura fluorimétrica (360nm de excitação e 460nm de emissão), em intervalos de 1 minuto, durante 25 minutos. Os dados estão expressos em unidades de fluorescência/peso do músculo/min, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES & TISDALE (2002).

Atividade da enzima calpaína

Foram utilizados 30µL do homogenizado muscular e 150µL de substrato (50mM imidazol-HCl pH 7,5, 10mM B-mercaptoetanol, 4mg/mL de caseína, 1mM NaN₃), incubados à 25°C por 5min. Após este período, foram acrescentados 20µL de CaCl₂ 50mM em todas as amostras e foram feitas leituras em intervalos de 1 minuto, durante 20 minutos, segundo método descrito por JIANG *et al.* (1997).

Atividade da enzima catepsina B

Foram utilizados 10µL do homogeneizado muscular e 90µL de substrato Z-Phe-Arg-Nmec 0,02mM (diluído em Brij35 0,1%). Através de fluorescência (340nm de excitação e 460nm de emissão) foi determinada a atividade da catepsina B, conforme descrito por BARRETT (1980).

Atividade da enzima catepsina H

Para a análise da atividade da catepsina H foram utilizados 10µL do homogeneizado muscular e 90µL de substrato L-Arg-Nmec 0,02mM (diluído em

200mM KH_2PO_4 e 200mM NA_2HPO_4 , pH 6,8) e feita a leitura através de fluorescência (340nm de excitação e 460nm de emissão), conforme descrito por BARRETT (1980).

Fosfatase Alcalina

Para análise da atividade da fosfatase alcalina foram utilizados 5 μL do homogeneizado muscular em solução reagente de p-NPP (4-nitrofenil fosfato disódio) à 37mM. A atividade da enzima foi determinada nos tempos 0, 30 e 60 minutos em nmol/ μg de proteína, segundo método descrito por MARTINS *et al.* (2001).

3.7. Western blot da presença da subunidade proteossômica 20S

Para a preparação das amostras para o *Western blot*, foram colocados 25 μL do homogeneizado muscular e 25 μL de *loading buffer*, em eppendorfs que foram mantidos durante 5 minutos em banho seco à 100°C. Após este tempo, os *eppendorfs* passaram por processo de choque térmico para que a reação fosse cessada e as amostras foram congeladas à -20°C. Posteriormente, foi utilizado o método de eletroforese Laemmli SDS-PAGE, utilizando-se concentração de 5% gel de empilhamento e 12% gel de resolução, sendo aplicados 40 μg de proteína por poço, para separação das proteínas por peso molecular. Os géis foram transferidos em membrana de nitrocelulose 0,45 μm . As membranas, após a transferência, foram colocadas em leite (5g de leite Mólico desnatado, 100mL de PBS Tween 0,1%).

Posteriormente, as membranas foram lavadas com PBS Tween 0,1% e depois foi colocado o anticorpo primário (*Mouse monoclonal antibody* contra proteossomo 20S (Biomol, EUA), diluído 1:500 em PBS Tween 0,1%. Após o tempo necessário para o *binding*, foi retirado o anticorpo primário das membranas e estas foram lavadas com PBS Tween 0,1%. Foi colocado, então, o anticorpo secundário (*antibody goat anti-mouse*, diluição 1:1500, (Zymed, EUA). As membranas foram novamente lavadas com PBS Tween 0,1% e depois reveladas por reação de quimioluminescência realizada com o reagente ECL (Amersham, EUA), utilizando-se membrana de Raio-X, filme hipersensível.

3.8. Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real – PCR-RT

Amostras de músculo gastrocnêmio (cerca de 30mg) foram coletadas em 700 μ L de Tri[®] Reagente (Sigma-Aldrich, EUA). A extração do RNA total foi feita de acordo com as especificações do fabricante. O teste de pureza e integridade do RNA foi feito através de eletroforese em gel de agarose 1% em Tris borato, pH 8,3 e coloração com brometo de etídio (MEADUS, 2003). Após a verificação da integridade do RNA das amostras, o RNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro *GeneQuant* (Pharmacia Biotech, EUA) para comprimento de onda a 260nm.

Para a preparação do cDNA utilizamos 3 μ g de RNA total e o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), conforme especificações do fabricante.

Após a preparação do cDNA, foi feito teste para verificação da funcionalidade dos cDNAs produzidos, utilizando 0,5 μ L de cDNA e o gene β -actina, em PCR semi-quantitativo.

O PCR em tempo real foi realizado no termociclador *StepOne* (Applied Biosystems) nas condições: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10s e 60°C por 30s. O gene *gapdh* foi utilizado como controle interno. Os dados foram analisados usando o software 7500 v.2.0.5 (Applied Biosystems).

4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro-padrão das médias. Utilizou-se análise de variância ANOVA *one-way* e para determinação de variação entre os diferentes grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5% (GAD & WEIL, 1994). Além disso, utilizamos teste *t* para determinar se houve diferença estatística entre os grupos tratados com EPA quando comparados aos respectivos grupos não tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, pudemos verificar que o crescimento neoplásico influenciou diferentemente o processo de caquexia, quanto às respostas celulares, em animais jovens quando comparados aos adultos e que houve modulação pelo tratamento com ácido eicosapentaenóico (EPA), verificado principalmente nas análises da musculatura esquelética, em resposta aos efeitos tumorais. Além disso, os resultados do presente trabalho mostraram a influência dos efeitos deletérios do crescimento tumoral sobre os parâmetros corporais e perfis séricos de hormônios relacionados ao processo de crescimento (como IGF-1 e leptina), e também ao estado caquético, além de resultados moleculares do músculo gastrocnêmio (expressão gênica das subunidades das vias proteossômicas e genes de fatores de inicialização da síntese protéica), influenciados pelos efeitos deletérios do crescimento tumoral.

1. Indução da caquexia em ratos adultos inoculados com o tumor de Walker 256

Os animais que foram inoculados com tumor, tanto na região do peritônio quanto no subcutâneo, apresentaram severa redução do ganho de peso corpóreo quando comparados aos grupos controles. Como podemos ver na Tabela 1, a evolução tumoral foi mais severa nos animais subcutâneos, pois apresentam período de crescimento tumoral mais longo, do que nos intraperitônios, uma vez que os animais intraperitônios apresentaram redução de peso menos acentuada que os grupos subcutâneos. Esses dados corroboram com os dados da literatura, mostrando que o carcinossarcoma de Walker é um modelo experimental de caquexia (EMERY, 1999) e que, com a evolução tumoral, há intensa perda de massa corpórea de forma involuntária, ou seja, sem haver redução na quantidade de alimento ingerido.

Outro parâmetro importante para avaliarmos o estado caquético dos animais é o peso relativo da carcaça, que apresentou redução significativa em todos os grupos inoculados com tumor (IpA=15,5%, IpA-E=17,0%, ScA=19,7% e ScA-E=23,2%), quando comparados aos controles (Tabela 1).

Na intenção de avaliarmos os efeitos do implante tumoral e a instalação do processo caquético, foram analisados os pesos relativos dos seguintes órgãos: coração, fígado, adrenais, gordura perirrenal e músculo gastrocnêmio. Embora não haja relatos na literatura quanto ao peso do coração em animais portadores de tumor, não observamos diferença estatística significativa em relação ao peso relativo desse órgão entre os grupos experimentais, embora exista discreta tendência de redução dos pesos nos grupos IpA, ScA e ScA-E (3,8%, 7,7% e 3,8%, respectivamente) (Tabela 1). Contrariamente aos dados da literatura, não houve diferença estatística significativa em relação ao peso relativo do fígado entre os grupos experimentais (Tabela 1). Embora esses dados estejam discordantes dos resultados obtidos inicialmente durante os experimentos prévios com animais adultos e também em outros experimentos, o efeito tumoral melhor visualizado em animais experimentais corresponde ao aumento do peso relativo hepático, em função do aumento da atividade e secreção de proteínas C reativa (TISDALE, 2004; ARGILÉS *et al.*, 2005), porém este aumento não foi visualizado de forma expressiva, apenas tendência, como verificado para os grupos adultos ScA e ScA-E. Todos os grupos de animais adultos implantados com o tumor de Walker 256, independente do tratamento a que foram impostos ou implante tumoral (IpA, IpA-E, ScA, ScA-E) apresentaram aumento significativo do peso relativo das adrenais (60,0%, 60,0%, 60,0% e 80,0%, respectivamente) quando comparados ao seus respectivos controles (Tabela 1). O aumento do peso relativo das adrenais pode estar relacionado à maior sobrecarga pela liberação de glicocorticóides.

Houve também tendência de redução do peso relativo da gordura perirrenal em todos os grupos inoculados com tumor quando comparados aos controles (IpA=15,8%, IpA-E=7,1%, ScA=20,6% e ScA-E=58,1%) (Tabela 1), mostrando que a evolução tumoral promove espoliação do tecido adiposo, uma das características do processo de caquexia.

A massa corpórea magra é intensamente espoliada durante a caquexia, dessa forma, verificamos redução significativa do peso relativo do músculo gastrocnêmio, nos grupos IpA, ScA e ScA-E (14,3%, 27,0% e 28,6%, respectivamente), como mostrado na Tabela 1. Não houve diferença estatística no peso do tecido muscular entre os grupos IpA-E e controles (CA e CA-E), mostrando que o EPA estaria protegendo contra a

espoliação do tecido muscular. Novamente, concordante com a literatura, a evolução tumoral impõe intensa espoliação da carcaça do hospedeiro, principalmente da massa magra corpórea, como é o caso do menor peso relativo do músculo gastrocnêmio, e também do tecido adiposo, como verificado na redução da gordura perirrenal (CAMPS *et al.*, 2006; BOSSOLA *et al.*, 2006).

Com o objetivo de avaliarmos o tecido muscular, quanto à sua resposta celular em função do desenvolvimento neoplásico, avaliamos a também a atividade da fosfatase alcalina, que é uma hidrolase que atua na desfosforilação de certas moléculas e por isso é considerada por muitos autores como medida da atividade celular (CALHAU *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 2008). A análise dos grupos adultos mostrou que apenas o grupo ScA apresentou redução significativa da atividade dessa enzima em relação aos demais grupos experimentais (Figura 2), sugerindo que nesses animais há intenso efeito deletério induzido pela evolução tumoral mais longa. Além disso, podemos observar que o tratamento com EPA preveniu contra a redução da atividade dessa enzima.

A análise da concentração de proteínas totais presentes no homogeneizado muscular não mostrou diferença estatística entre os grupos experimentais, porém pôde-se notar tendência à redução do conteúdo protéico nos animais ScA e ScA-E (Figura 3).

Para avaliarmos ainda a caquexia, analisamos também a concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). O IGF (*insulin-like growth factor*), hormônio polipeptídico secretado por muito tecidos em resposta ao estímulo do hormônio de crescimento (GH), é responsável pela atuação indireta do GH, correspondendo à homeostase glicêmica e ao efeito anabólico. Dessa forma, relacionamos a avaliação dos aspectos diretamente influenciados pela idade do portador de câncer, além dos efeitos impostos pelo crescimento tumoral. Como mostrado na Figura 4, podemos ver que os animais adultos implantados com tumor apresentaram redução significativa da concentração de IGF-1 no soro. Esse dado é bastante interessante, uma vez que o IGF-1 exerce papel crítico na homeostase muscular como hipertrofia e regeneração. A superexpressão do IGF-1 na musculatura, como encontrado na terapia gênica, resulta em reversão da hipotrofia muscular

secundária em condições catabólicas e também promove aumento da massa e da força muscular (ADAMS, 2010).

Sabendo-se que a leptina, importante hormônio secretado pelo tecido adiposo, tem papel principal na regulação da ingestão e também do dispêndio energético (BRENNAN & MANTZOROS, 2006), a avaliação desse hormônio permite importante correlação com a espoliação de gordura, ou seja, com o principal estoque energético, extremamente influenciado pelo crescimento tumoral. Com relação aos grupos de animais adultos, provavelmente em função do erro padrão encontrado e também devido ao fato de não haver redução da ingestão alimentar, não foram verificadas diferenças estatísticas, porém ressaltamos para a tendência à diminuição no CA-E e ScA-E quando comparado ao grupo controle CA (Figura 5).

A leptina corresponde à resposta a adiposidade e os níveis circulantes são proporcionais a gordura corpórea, porém é conhecido que a leptina está envolvida na regulação da resposta inflamatória (FANTUZZI & FAGGIONI, 2000), além de assemelhar-se, estruturalmente, a interleucina 6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória. A leptina afeta o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse, similar ao estresse crônico imposto pelo desenvolvimento do tumor. No presente estudo, nota-se a evidente associação entre leptina, a espoliação do estoque de gordura e o estresse (aumento do peso relativo da adrenal), presente na caquexia associada ao câncer.

Ainda avaliando os efeitos do crescimento tumoral, o carcinossarcoma de Walker 256 é um modelo experimental de rápida evolução, culminando em morte dos animais dependendo do tipo de inoculação e conseqüentemente do tempo de evolução. Assim, a análise do peso relativo do tumor nos grupos adultos mostrou que essa neoplasia tem evolução bastante acelerada nos animais implantados no peritônio (IpA e IpA-E), pois a sobrevivência desses animais foi bastante reduzida em relação aos animais com tumor no subcutâneo (Tabela 1). Embora, esperava-se que a modulação quanto à evolução tumoral fosse mais expressiva em função do tratamento com ácido eicosapentaenóico, conforme a literatura (KHAL & TISDALE, 2008), verificou-se que houve discreta modulação para os animais adultos implantados com tumor no peritônio, onde a evolução tumoral foi mais agressiva e em período mais curto, embora não haja diferença estatística significativa quanto à sobrevivência dos animais tratados com o ácido

eicosapentaenóico (EPA) quando comparados aos respectivos grupos não tratados (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados das análises morfométricas dos grupos experimentais adultos.

	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	CA	CA-E	IpA	IpA-E	ScA	ScA-E
Ganho de peso (g)	18,63 ± 19,21	19,05 ± 12,66	-28,15 ± 10,40 *	-30,35 ± 17,54 *	-50,76 ± 13,76 *	-76,57 ± 22,41 *
Carcça (PR, %)	85,14 ± 2,81	84,61 ± 1,97	71,91 ± 2,62 *	70,66 ± 3,19 *	68,40 ± 7,83 *	65,34 ± 4,47 *
Coração (PR, %)	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,03
Fígado (PR, %)	3,28 ± 0,31	3,09 ± 0,27	2,96 ± 0,22	3,25 ± 0,32	3,42 ± 0,51	3,11 ± 0,29
Baço (PR, %)	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,70 ± 0,27 *	0,54 ± 0,20 *
Adrenais (PR, %)	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,016 ± 0,002 *	0,016 ± 0,002 *	0,016 ± 0,002 *	0,018 ± 0,005 *
Gordura perirrenal (PR, %)	1,84 ± 0,52	1,67 ± 0,38	1,55 ± 0,27	1,71 ± 0,40	1,46 ± 0,65	0,77 ± 0,22 *
Músculo gastrocnêmio (PR, %)	0,63 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,54 ± 0,07 *	0,58 ± 0,06	0,46 ± 0,05 *	0,45 ± 0,04 *
Tumor (PR, %)	-	-	7,45 ± 1,85	5,01 ± 1,72 □	18,14 ± 3,28	18,05 ± 2,93
Sobrevida dos animais (dias)	-	-	7 ± 0,52	7 ± 2,13	17 ± 0,46	17 ± 1,73

Legenda: CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio; IpA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; ScA – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo; ScA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA; PR = peso relativo; * P<0,05 quando comparado aos seus respectivos controles; □ P<0,05 quando comparado ao intraperitônio não tratado com EPA.

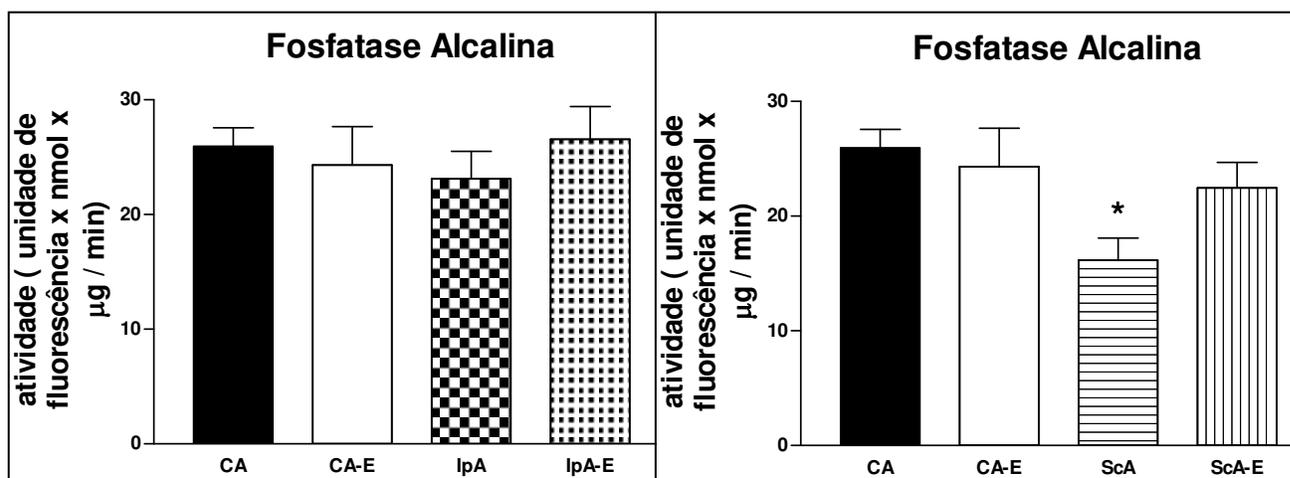


Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina do músculo gastrocnêmio nos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * P<0,05 quando comparado ao controle CA; n=8.

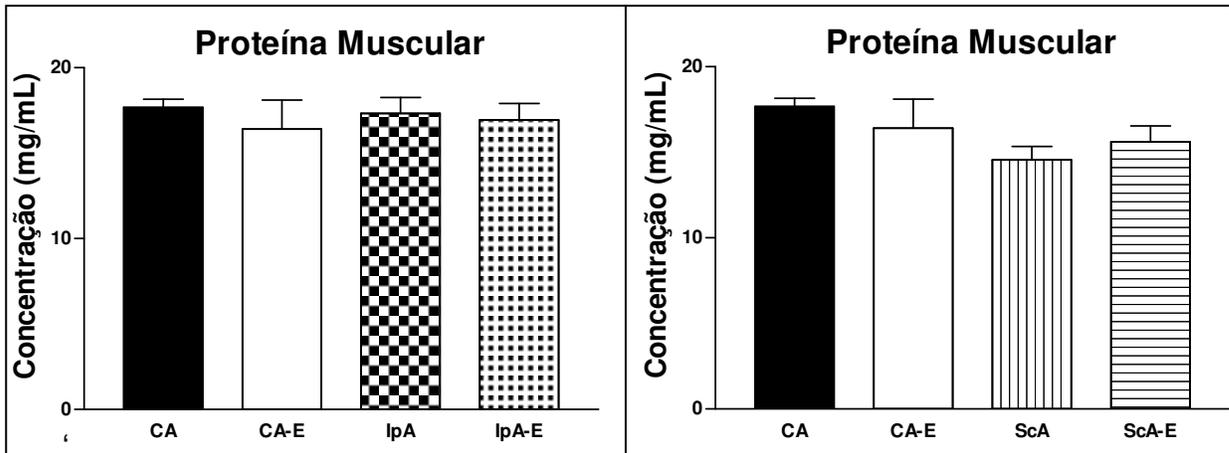


Figura 3. Concentração de proteína do músculo gastrocnêmico dos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle CA; $n=8$.

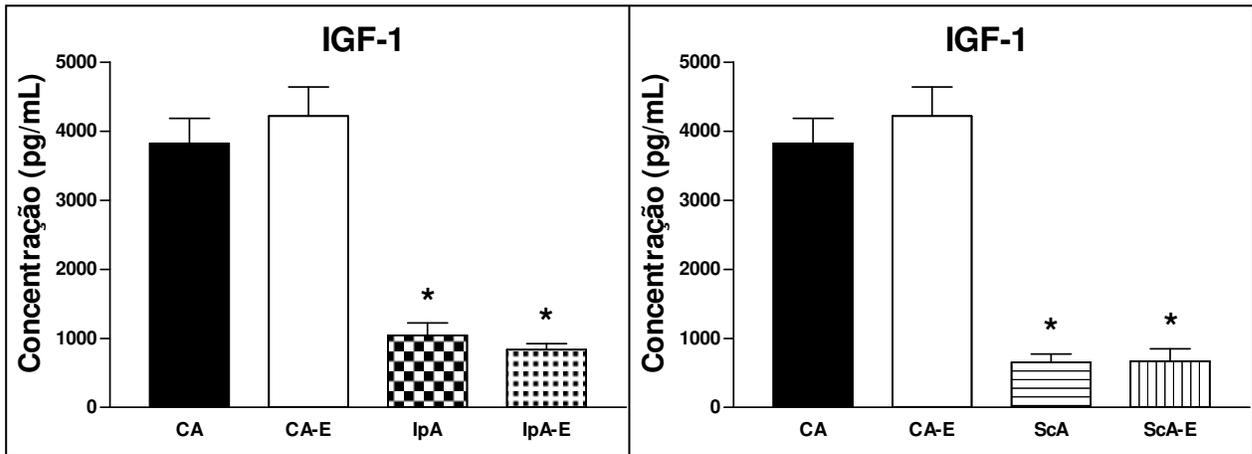


Figura 4. Concentração sérica de IGF-1 dos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * $P < 0,05$ quando comparados aos respectivos controles; $n=5$.

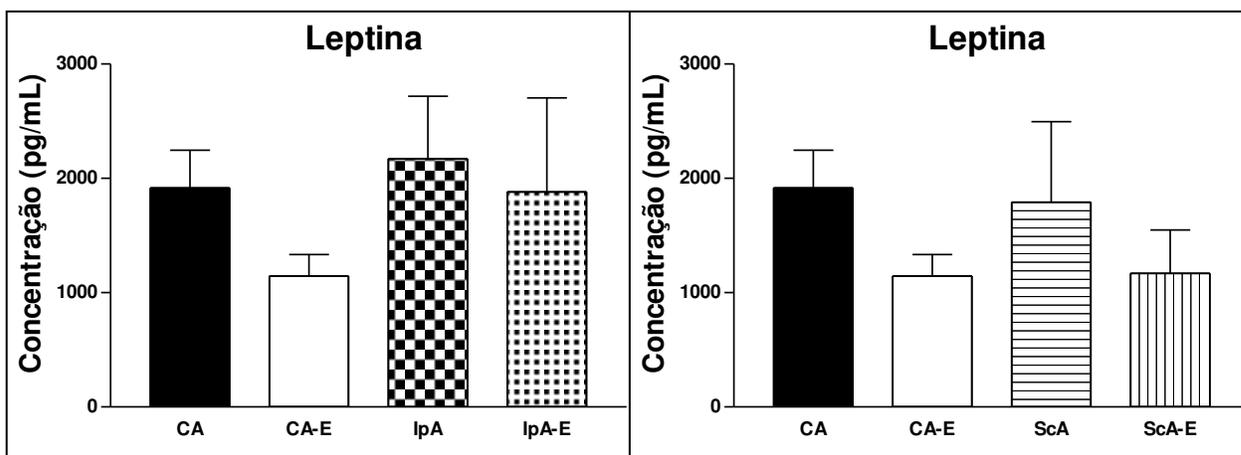


Figura 5. Concentração sérica de leptina dos diferentes grupos de animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA; n=6.

1.1. Efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) em relação à caquexia nos animais adultos

No presente estudo, não houve efeito modulatório sobre a perda de peso dos animais com tumor em resposta ao tratamento com o ácido eicosapentaenóico, ou seja, o EPA, nessas condições experimentais, não conseguiu reverter a perda de peso causada pelo processo de caquexia devido ao implante tumoral. Além disso, quando analisamos o peso relativo da carcaça, outro parâmetro importante para a visualização do quadro de caquexia, também não observamos nenhuma modulação em função do tratamento com EPA (Tabela 1).

Não observamos também efeito modulatório do tratamento com EPA no peso relativo do coração, do fígado e das adrenais em relação aos grupos não tratados (Tabela 1). Além do aumento do baço como característica dos efeitos da evolução tumoral, outro parâmetro bastante impactante é a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O aumento do peso relativo das adrenais corresponde à maior sobrecarga pela liberação de glicocorticóides, que neste caso, não apresentou melhoria nos grupos implantados com tumor tratados com EPA, sugerindo ainda intenso processo de estresse imposto pelo crescimento tumoral, independente do

tipo de evolução (subcutâneo ou intraperitônio) e tratamento a que foram submetidos.

Em relação ao peso relativo da gordura perirrenal, não houve diferença estatística entre o grupo intraperitônio tratado com EPA (IpA-E) e o grupo não tratado (IpA), entretanto houve pequena recuperação desse parâmetro no grupo tratado (IpA-E), aproximando-se mais dos valores encontrados nos grupos controles. Em contrapartida, o grupo inoculado no subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) apresentou redução significativa do peso relativo da gordura perirrenal quando comparado ao grupo não tratado (ScA) e aos grupos controles. Esses dados foram inesperados, pois esperávamos encontrar preservação do estoque de gordura, pois na literatura existem relatos de que o EPA protege contra a espoliação tanto de tecido muscular quanto de tecido adiposo (BECK *et al.*, 1991) (Tabela 1). A modulação positiva do peso relativo da gordura perirrenal apenas no grupo IpA-E sugere-nos que, ainda que por mecanismos não conhecidos, o EPA, quando administrado por um período mais longo, caso do grupo ScA-E, pode estar promovendo maior espoliação do tecido adiposo ao invés de recuperá-lo.

Quando analisamos o peso relativo do músculo gastrocnêmio, observamos que o grupo inoculado no peritônio tratado com EPA (IpA-E) apresentou melhora desse parâmetro, ou seja, a redução do peso muscular teve menor proporção no grupo tratado do que no grupo não tratado (redução de 8% no grupo IpA-E em contrapartida aos 14% no IpA, quando comparados aos controles). Porém, os efeitos modulatórios do EPA sobre o tecido muscular foram discretos quando comparados a dados da literatura, que indicam que o EPA promove proteção da espoliação induzida pelo crescimento tumoral (KHAL & TISDALE, 2008). Além disso, a recuperação do peso muscular não foi observada no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E), que apresentou resultados similares ao grupo não tratado (ScA), sugerindo que a resposta adaptativa à evolução tumoral foi distinta para os animais subcutâneos em relação aos intraperitônios. Esse fato pode ter ocorrido devido a diferença do tempo de tratamento com EPA a que esses grupos foram submetidos.

Em relação à atividade da fosfatase alcalina, observamos que o grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) não apresentou redução significativa da

atividade dessa enzima, diferentemente do grupo que não recebeu tratamento (ScA; Figura 2).

Os grupos intraperitônio e subcutâneo tratados com EPA (IpA-E, ScA-E) apresentaram valores de concentração de proteínas totais semelhantes aos encontrados para os grupos não tratados (IpA, ScA), ou seja, o EPA não foi capaz de reverter a perda de proteína muscular nesses grupos (Figura 3).

O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) inibe a ativação da proteína-quinase dependente de RNA (PKR) através do aumento da expressão da proteína fosfatase 1 (PP1), que desfosforila a PKR. Dessa forma, o IGF-1 é importante na atenuação da degradação protéica existente no processo de cachexia (TISDALE, 2009). Através da análise sérica do IGF-1 podemos observar que o tratamento com EPA não apresentou nenhuma modulação nos grupos com implante tumoral, apresentando dados semelhantes aos grupos tumorais não tratados. Apesar de não ser significativo, podemos ver que o grupo controle tratado com EPA (CA-E) apresentou aumento de cerca de 10% da concentração sérica de IGF-1 em relação ao grupo controle não tratado (Figura 4).

O tratamento com EPA não apresentou resultados significativamente diferentes em relação à concentração sérica de leptina nos grupos com tumor, entretanto podemos observar tendência de redução da concentração de leptina nos grupos CA-E e ScA-E, podendo estar relacionados ao menor peso relativo da gordura perirrenal, uma vez que os níveis circulantes de leptina são proporcionais à gordura corpórea (Figura 5).

O grupo inoculado no peritônio tratado com EPA (IpA-E) apresentou menor peso relativo do tumor (32,7% menor) em relação ao grupo não tratado (IpA), sugerindo efeito modulatório do EPA sobre o crescimento tumoral (Tabela 1). Já nos grupos subcutâneos, não houve diferença do peso tumoral entre o tratado com EPA (ScA-E) e o não tratado (ScA), como mostrado na Tabela 1.

As divergências dos dados apresentados nesse trabalho em relação aos dados da literatura sobre a preservação de tecidos muscular e adiposo pelo EPA podem ser decorrentes do tempo experimental, da dose administrada diariamente e

também da espécie utilizada, mostrando que, nessas condições experimentais, o EPA não foi capaz de modular ou reverter o processo de caquexia.

2. Indução da caquexia em ratos jovens inoculados com o tumor de Walker 256

Os animais jovens que foram inoculados com células tumorais no peritônio e no subcutâneo tiveram menor ganho de peso, em cerca de 57% e 70%, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (Tabela 2). Além disso, todos os grupos inoculados com Walker 256 (IpJ, IpJ-E, ScJ, ScJ-E) apresentaram redução significativa do peso relativo da carcaça (19,7%, 18,7%, 34,1% e 33,3%, respectivamente) quando comparados aos respectivos controles (Tabela 2), ressaltando para a redução mais expressiva nos animais implantados no subcutâneo, mostrando que a evolução tumoral promoveu a instalação do quadro de caquexia, principalmente quando a evolução tumoral foi mais longa.

O processo de caquexia também promove alterações em determinados tecidos e, na intenção de avaliar os efeitos do local de implante tumoral sobre parâmetros corporais dos animais e se há alteração desses parâmetros quando há suplementação com ácido eicosapentanoico, os órgãos e tecidos dos animais jovens foram avaliados quanto ao peso relativo. A inoculação do tumor induziu a redução do peso relativo do coração nos animais jovens (IpJ-E=13,2%, ScJ= 20,0% e ScJ-E=17,1%), em relação aos grupos controles (Tabela 2). Contrariamente aos dados da literatura, o grupo jovem implantado com tumor no subcutâneo não tratado (ScJ) apresentou redução do peso relativo do fígado (9,6%) quando comparado ao grupo controle subcutâneo (Tabela 2). Embora esses dados, para alguns grupos aqui estudados (ScJ e ScJ-E), estejam discordantes dos resultados obtidos inicialmente durante nossos experimentos prévios, o efeito tumoral melhor visualizado em animais experimentais corresponde ao aumento do peso relativo hepático, em função do aumento da atividade e secreção de proteínas C reativa (TISDALE, 2004; ARGILÉS *et al.*, 2005), porém este aumento não foi visualizado nos grupos jovens. Concordante com a literatura, todos os grupos implantados com o tumor de Walker 256, (IpJ, IpJ-E, ScJ, ScJ-E) apresentaram

aumento significativo do peso relativo das adrenais (52,2%, 43,5%, 47,6%, 42,9%, respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 2).

Quanto ao peso relativo da gordura perirrenal, parâmetro que também nos auxilia na comprovação do processo de caquexia, houve redução em todos os grupos implantados com tumor (IpJ=20,8%, IpJ-E=14,6%, ScJ=74,6% e ScJ-E=64,4%), mas apenas os grupos ScJ e ScJ-E apresentaram redução significativa, como mostrado na Tabela 2.

Além disso, houve redução significativa do peso relativo do músculo gastrocnêmio nos grupos IpJ, ScJ e ScJ-E (12,1%, 30,4% e 26,1%, respectivamente) quando comparados aos respectivos controles, mostrando que a evolução tumoral é responsável pela depleção tanto do tecido muscular, quanto do tecido adiposo (Tabela 2).

Ainda com o objetivo de avaliar o tecido muscular, quanto à resposta celular, avaliamos a atividade da fosfatase alcalina também nos grupos de animais jovens. Presente em todos os tecidos corpóreos, a fosfatase alcalina, uma hidrolase, tem como principal função desfosforilar certas moléculas, isto é, remover os grupos fosfatos de moléculas como nucleotídeos, proteínas e alcalóides. Assim, como apontado anteriormente para os grupos adultos, muitos autores consideram que a partir da medida de sua atividade é possível inferir a avaliação da atividade celular (CALHAU *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 2008). Analisando-se o músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos experimentais quanto à atividade da fosfatase alcalina, observou-se que, embora não haja diferença estatística da atividade dessa enzima, os grupos jovens controles apresentaram tendência a aumento da atividade ao longo do período experimental (C_{IpJ} < C_{ScJ}), sugerindo que o processo de crescimento e diferenciação tecidual implica em maior atividade celular (Figura 6). Por outro lado, também observamos o mesmo padrão para os grupos jovens quando tratados com o ácido eicosapentaenóico (C_{IpJ} < C_{IpJ-E} e C_{ScJ} < C_{ScJ-E}). Os animais jovens implantados com tumor também apresentaram tendência de aumento da atividade dessa enzima, sendo em parte relacionado ao local de implante tumoral (ScJ > IpJ) e ao tratamento (EPA > não tratado) (Figura 6). A análise desse parâmetro pôde nos sugerir que houve mecanismos distintos de adaptação da musculatura esquelética entre os animais jovens

e adultos, em resposta aos efeitos deletérios do crescimento tumoral, onde o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ScJ > IpJ e jovem tratado com EPA > jovem não tratado) pode estar associado ao elevado dispêndio energético com sobrevida mais abreviada nesses animais.

Apenas o grupo inoculado no peritônio sem tratamento (IpJ) apresentou redução significativa da concentração de proteínas totais presentes no homogeneizado do músculo gastrocnêmio, como mostrado na Figura 7. O grupo intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E) apresentou concentração de proteína semelhante aos grupos controles (CipJ e CipJ-E). Apesar da evolução tumoral, mais prolongada nos animais implantados no subcutâneo (ScJ e ScJ-E), não observamos grandes alterações na concentração de proteínas totais musculares, em relação aos respectivos controles (Figura 7).

A concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) apresentou redução significativa em todos os grupos inoculados com tumor de Walker 256, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 8), sugerindo que os efeitos tumorais induziram a redução expressiva da concentração de IGF-1, relacionada aos efeitos da depleção da musculatura esquelética no processo de caquexia. Além disso, verificamos que animais jovens, não portadores de tumor, que encontram-se em pleno crescimento, apresentam aumento da concentração de IGF-1 em relação aos grupos adultos controles (comparação dos valores entre as Figuras 4 e 8), sendo que os grupos CipJ e CScJ-E apresentaram aumento significativo (teste *t*) da concentração de IGF-1, quando comparados ao controle adulto (CA, Figura 4).

Embora não haja diferença estatística na concentração de leptina sérica, verificamos que nos grupos portadores de tumor houve tendência ao decréscimo, independente do local do implante (intraperitônio ou subcutâneo), sugerindo correlação com a redução da porcentagem de gordura corpórea (redução do peso relativo da gordura perirrenal) (Tabela 2 e Figura 9).

Ainda analisando os efeitos do crescimento tumoral sobre os animais jovens, verificamos que o peso relativo do tumor foi bastante elevado nos grupos implantados com tumor no subcutâneo em relação ao intraperitoneal (Tabela 2). O tumor de Walker 256 apresenta evolução bastante acelerada e dessa forma verificamos reduzido tempo de sobrevida dos animais implantados com tumor intraperitônio, em relação aos grupos

implantados no subcutâneo. Verificamos, também, que essa neoplasia é bastante agressiva, como modelo experimental, já que o tempo de sobrevivência de todos os grupos jovens foi significativamente reduzido em relação aos grupos de animais adultos (Tabela 1 e 2).

Tabela 2. Resultados das análises morfométricas dos grupos experimentais jovens

	ClpJ	ClpJ-E	IpJ	IpJ-E	CScJ	CScJ-E	ScJ	ScJ-E
Ganho de peso (g)	53,50 ± 4,22	48,67 ± 4,57	24,15 ± 6,63 *	21,62 ± 10,25 *	105,80 ± 11,80	105,00 ± 13,00	27,49 ± 7,60 *	34,37 ± 9,79 *
Carcaça (PR, %)	109,60 ± 3,84	109,20 ± 4,12	88,01 ± 5,25 *	89,10 ± 5,21 *	141,50 ± 7,44	140,20 ± 9,75	93,29 ± 6,41 *	94,38 ± 7,06 *
Coração (PR, %)	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,02 *	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,28 ± 0,03 *	0,29 ± 0,03 *
Fígado (PR, %)	4,63 ± 0,42	4,41 ± 0,24	4,61 ± 0,28	4,29 ± 0,45	4,50 ± 0,20	4,34 ± 0,35	4,07 ± 0,25 *	4,18 ± 0,23
Baço (PR, %)	0,40 ± 0,05	0,42 ± 0,06	0,39 ± 0,10	0,38 ± 0,06	0,36 ± 0,05	0,35 ± 0,06	0,56 ± 0,17 *	0,71 ± 0,16 *
Adrenais (PR, %)	0,023 ± 0,002	0,024 ± 0,002	0,035 ± 0,007 *	0,033 ± 0,002 *	0,021 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,031 ± 0,006 *	0,030 ± 0,005 *
Gordura perirrenal (PR, %)	0,48 ± 0,13	0,44 ± 0,16	0,38 ± 0,12	0,41 ± 0,12	0,59 ± 0,14	0,56 ± 0,16	0,15 ± 0,04 *	0,21 ± 0,11 *
Músculo gastrocnêmio (PR, %)	0,58 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,51 ± 0,04 *	0,55 ± 0,02 □	0,69 ± 0,07	0,70 ± 0,05	0,48 ± 0,03 *	0,51 ± 0,05 *
Tumor (PR, %)	-	-	8,79 ± 1,13	8,12 ± 1,32	-	-	21,18 ± 3,49	20,56 ± 1,98
Sobrevivência dos animais (dias)	-	-	6 ± 0,49	6 ± 1,13	-	-	13 ± 0,49	13 ± 0,38

Legenda: **ClpJ** – controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio; **IpJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo; **ScJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA; **PR** = peso relativo; * P<0,05 quando comparado aos seus respectivos controles; □ P<0,05 quando comparado ao intraperitônio não tratado com EPA

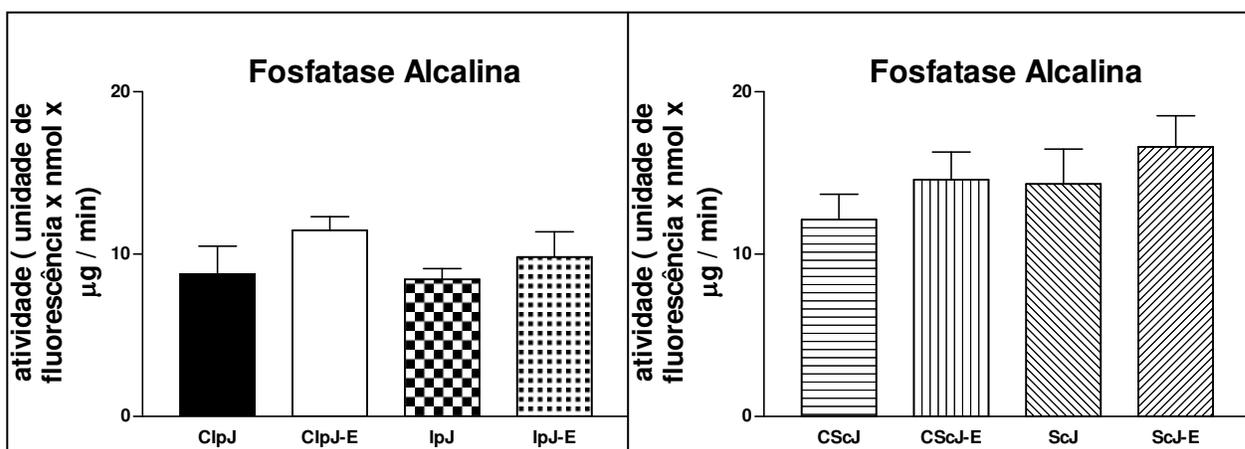


Figura 6. Atividade da fosfatase alcalina do músculo gastrocnêmio em jovens. **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA; n=8 (ClpJ, ClpJ-E, CScJ e CScJ-E) e n=7 (IpJ, IpJ-E, ScJ e ScJ-E).

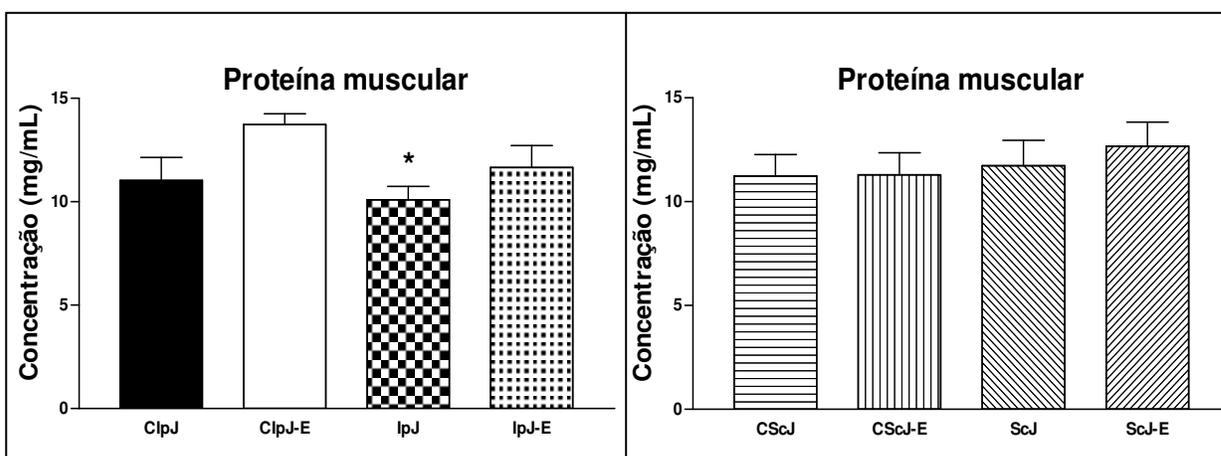


Figura 7. Concentração de proteína do músculo gastrocnêmico dos animais jovens. **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * $P < 0,05$ quando comparado ao ClpJ-E; n=8 (ClpJ, ClpJ-E, CScJ e CScJ-E) e n=7 (IpJ, IpJ-E, ScJ e ScJ-E).

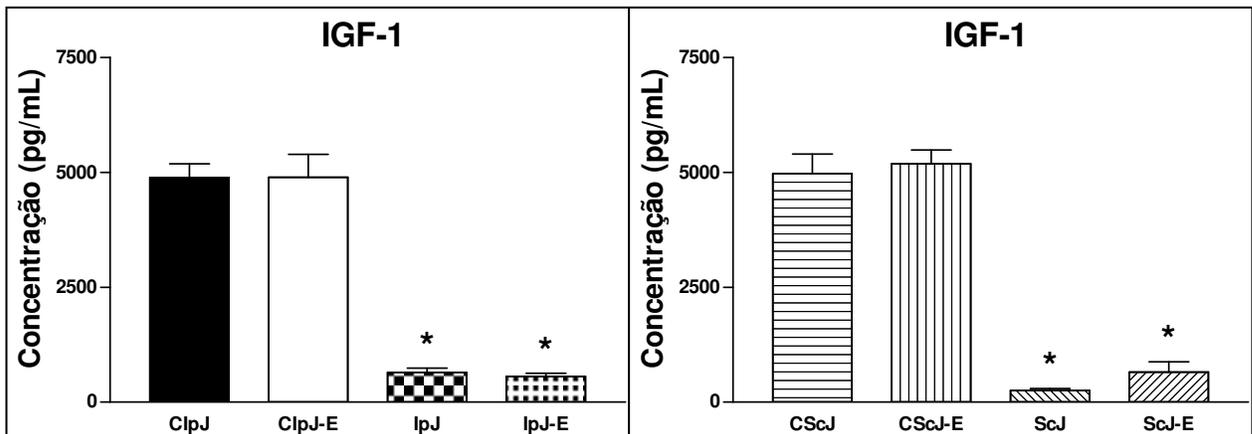


Figura 8. Concentração sérica de IGF-1 dos animais jovens (n=6). **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * P<0,05 quando comparado aos respectivos controles.

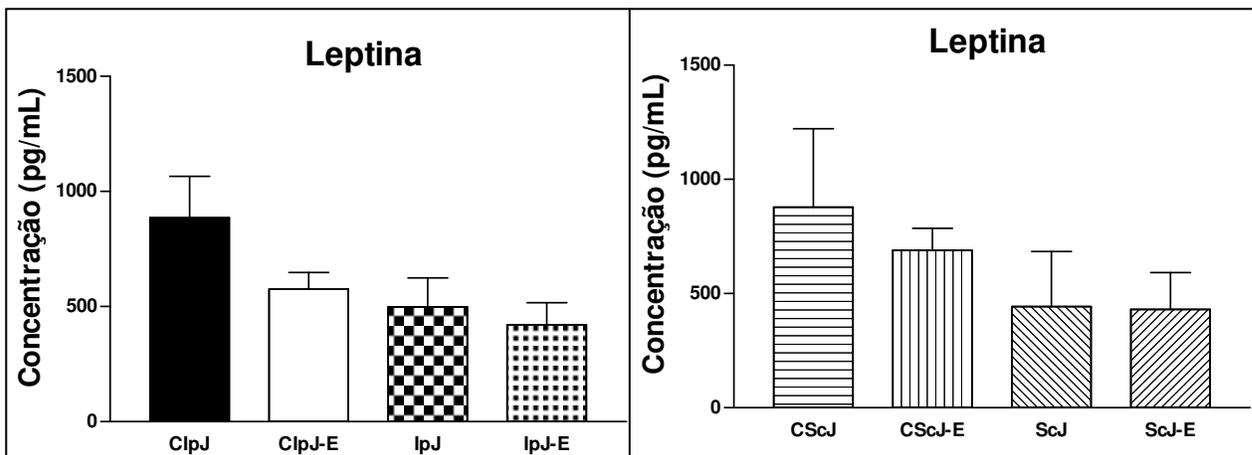


Figura 9. Concentração sérica de leptina. **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA; n=6.

2.1. Efeitos do ácido eicosapentaenóico (EPA) em relação à caquexia nos animais jovens

O tratamento com ácido eicosapentaenóico não proporcionou resposta modulatória em relação ao ganho de peso e nem ao peso relativo da carcaça, ou seja, os animais tratados com EPA (ClpJ-E, IpJ-E, CScJ-E e ScJ-E) apresentaram

resultados similares aos respectivos grupos não tratados (C1pJ, 1pJ, CScJ e ScJ, respectivamente) (Tabela 2).

O tratamento com o EPA não reverteu o quadro de redução do peso relativo do coração quando comparados animais tratados com não tratados (Tabela 2). Além disso, não observamos efeito modulatório do EPA sobre o peso relativo das adrenais nos animais tratados quando comparados aos grupos não tratados (Tabela 2).

Em relação ao peso relativo da gordura perirrenal, não houve diferença estatística entre o grupo intraperitônio tratado com EPA (1pJ-E) e o grupo não tratado (1pJ), assim como também não houve diferença estatística entre o grupo subcutâneo tratado (ScJ-E) e o não tratado (ScJ). Entretanto, os grupos ScJ-E e 1pJ-E apresentaram discreta elevação da porcentagem de gordura perirrenal em relação aos respectivos grupos (ScJ e 1pJ). Esses dados foram inesperados, pois na literatura existem registros de que o EPA protege contra a espoliação do tecido adiposo (BECK *et al.*, 1991) (Tabela 2). O período experimental, a dosagem administrada e a evolução tumoral podem ter influenciado nesses dados.

A espoliação do tecido muscular no grupo intraperitônio tratado com EPA (1pJ-E) foi significativamente menor (peso relativo do músculo cerca de 8% maior e concentração de proteínas totais cerca de 15% maior) que a espoliação do grupo não tratado (1pJ), como podemos ver na Tabela 2 e na Figura 7, sugerindo que o ácido eicosapentaenóico promoveu modulação, embora discreta, em relação à espoliação do tecido muscular, corroborando com os dados da literatura (KHAL & TISDALE, 2008). Porém, não observamos modulação no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E), que apresentou resultado muito semelhante ao grupo não tratado (ScJ) (Tabela 2 e Figura 7).

Em relação à atividade da fosfatase alcalina, não observamos diferença estatística entre os grupos tratados com EPA e os não tratados, entretanto, pudemos observar que todos os grupos tratados com EPA apresentaram tendência de aumento na atividade da fosfatase alcalina quando comparados aos grupos não tratados (Figura 6). A análise desse parâmetro pôde nos sugerir que houve mecanismos distintos de adaptação da musculatura esquelética entre os animais

jovens e adultos, em resposta aos efeitos deletérios do crescimento tumoral, onde o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ScJ > IpJ e jovem tratado com EPA > jovem não tratado) pode estar associado ao elevado dispêndio energético com sobrecarga mais abreviada nesses animais.

Também observamos ausência de efeito modulatório do EPA em relação à concentração sérica do IGF-1 e da leptina quando comparados os grupos tratados com os não tratados (Figuras 8 e 9).

Embora não diferente estatisticamente, os grupos tratados com EPA apresentaram tendência de redução do peso tumoral, sugerindo que o EPA estaria modulando o crescimento tumoral (Tabela 2).

Como já mencionado anteriormente, os dados apresentados nesse trabalho em relação à modulação do EPA no processo de caquexia podem ter sido divergentes dos dados encontrados na literatura, devido ao tempo experimental e à dosagem administrada diariamente. Dessa forma, no presente trabalho, obtivemos efeitos discretos em relação à modulação do processo de caquexia pelo tratamento com EPA.

3. Efeito da inoculação do tumor de Walker 256, em ratos adultos, sobre o processo de degradação protéica

O principal sistema proteolítico celular compreende a via ubiquitina-proteossomo, formada por um complexo de proteínas localizadas no citoplasma, cuja principal função é degradar proteínas não necessárias ou danificadas por processos como estresse oxidativo, entre outros (BAUGH *et al.*, 2009). Esse sistema de degradação proteossomal é essencial para muitos processos celulares, incluindo ciclo celular, regulação da expressão gênica e também respostas a situações com intensa demanda de aminoácidos, como no caso da caquexia (ORLOWSKI & WILK, 2003). As proteínas a serem degradadas são ligadas a pequenas proteínas chamadas ubiquitinas, que sinalizam para o complexo proteossômico. O complexo proteossômico, conhecido como unidade proteossômica 26S, é formado por uma subunidade principal – 20S – e duas subunidades regulatórias – 19S e 11S. A subunidade 20S é composta por subunidades

alfa e por subunidades catalíticas denominadas subunidades β , que compreendem as unidades *chymotrypsin-like*, *trypsin-like* e *post-glutamyl peptide hydrolase-like* (PGPH) (ADAMS, 2003).

A unidade catalítica *chymotrypsin-like* é a que exerce maior atividade dentro do conjunto todo de ativações do sistema proteossomal e por isso analisamos, entre outros parâmetros, a atividade dessa enzima no tecido muscular para verificarmos se houve aumento dessa via de degradação protéica em resposta à evolução tumoral. Apesar da não diferença estatística da atividade da enzima *chymotrypsin-like* entre os grupos inoculados com tumor (intraperitônio e subcutâneo) e os controles, podemos visualizar tendência de aumento na atividade dessa enzima nos animais implantados com tumor (Figura 10), sugerindo aumento da atividade da via de degradação protéica ubiquitina-proteossomo, corroborando com dados da literatura que mostram aumento da ativação dessa via em resposta ao implante tumoral (TISDALE, 2009).

Para confirmarmos se a via ubiquitina-proteossomo estava realmente mais ativada nos animais com implante tumoral, analisamos também, através de Western Blot, a subunidade proteossômica 20S. Embora estatisticamente não significativo, entre os grupos inoculados com tumor e os controles (Figura 11), observamos tendência de aumento dessa subunidade proteossômica em todos os grupos implantados com tumor. Esses dados são condizentes com os da literatura, onde a expressão da subunidade 20S encontra-se aumentada em animais portadores de tumor (KHAL *et al.*, 2005).

Ainda em relação à via proteolítica ubiquitina-proteossomo, avaliamos também a expressão das subunidades proteossômicas PC5 e PC2. A expressão da subunidade proteossômica PC5, apresentou redução significativa em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo CA (Figura 12). Quanto à análise da subunidade PC2, os grupos CA-E, IpA, IpA-E e ScA apresentaram redução significativa (Figura 12) quando comparados ao grupo CA. Esses resultados não eram esperados uma vez que os animais com tumor apresentaram tendência de aumento da atividade da *chymotrypsin-like* e da expressão da subunidade 20S, sugerindo que a via ubiquitina-proteossomo estaria mais ativa nos animais portadores de tumor. São necessários novos estudos para melhor entendermos, nesse modelo experimental, o mecanismo bioquímico e

molecular de regulação da expressão dessas subunidades PC5 e PC2, do sistema ubiquitina-proteossômico, nos grupos experimentais.

Outra via de degradação protéica importante é a via de degradação dependente de cálcio, envolvida em processos como motilidade celular, progressão do ciclo celular e também fusão celular, no caso de diferenciação de mioblastos. Embora o seu papel ainda não esteja bem definido, a calpaína, que é uma enzima citosólica pertencente à família das proteases não lisossomais dependentes de cálcio, está envolvida na quebra de proteínas da musculatura esquelética, principalmente no exercício físico e em estados nutricionais alterados (BELCASTRO *et al.*, 1996). Por esse motivo, também analisamos a atividade da enzima calpaína no tecido muscular, que não apresentou diferença estatística entre os animais com tumor intraperitônio e os controles (Figura 13), apesar da tendência de aumento da atividade dessa enzima nos animais com implante no peritônio. Em relação ao implante tumoral no subcutâneo, apenas o grupo tratado (ScA-E) apresentou aumento significativo da atividade da calpaína quando comparado ao controle tratado (CA-E) (Figura 13). Esses dados foram divergentes dos dados encontrados na literatura, que afirmam que a principal via de degradação protéica da musculatura envolve a via proteossomal e, em alguns casos, também a via lisossomal (BECHET *et al.*, 2005 a,b). São necessários mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos moleculares dessa via de degradação protéica, para o melhor entendimento da possível ativação nesse modelo experimental, principalmente no grupo com tumor subcutâneo (ScA-E).

Como citado anteriormente, segundo a literatura, outra via de degradação protéica que também pode estar envolvida com a depleção do tecido muscular é a via lisossomal, por isso analisamos também as catepsinas B e H, que são proteases encontradas no interior dos lisossomos, estruturas que têm papel vital no *turnover* celular. Dentre essas proteases, as catepsinas L, B, D e H compreendem as mais importantes, determinando a capacidade proteolítica dos lisossomos (BECHET *et al.*, 2005a). O sistema proteolítico lisossomal é, em determinadas condições patológicas, ativado na musculatura estriada (BECHET *et al.*, 2005a). Assim, embora a quantidade de catepsinas seja baixa na musculatura, a presença do câncer impõe, em muitos casos, o processo de macroautofagia através da ativação dessa via proteolítica. A

atividade da enzima catepsina B, uma das proteínas lisossomais presentes principalmente na região perinuclear, que está relacionada ao processo de degradação protéica e a alguns processos referentes ao ciclo celular, foi menor em todos os grupos implantados com tumor, porém apenas nos grupos com implante intraperitônio essa redução foi significativa (Figura 14). A protease lisossomal catepsina H é uma aminopeptidase das proteinases cisteínicas mais importante da degradação lisossomal e a atividade dessa enzima foi significativamente maior apenas no grupo implantado com tumor subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) quando comparado ao grupo controle (CA) (Figura 15), embora haja tendência de elevação nos grupos com tumor intraperitônio (IpA, IpA-E) e também no grupo com tumor subcutâneo (ScA). Esses dados são concordantes com os dados encontrados na literatura, mostrando que nesses animais experimentais a via de degradação protéica lisossomal apresentou moderada ativação, principalmente em relação à catepsina H, em resposta à evolução tumoral. Embora na literatura haja menção para a ativação da via lisossomal nos processos de proteólise na vigência do câncer, no presente estudo foi discreta a participação dessa via, com exceção para os animais ScA-E, contrariando a literatura de que o ácido eicosapentaenóico atuaria modulando os processos de degradação protéica (BECHET *et al.* 2005a).

Com base nas análises feitas nos grupos adultos em relação à degradação protéica, podemos observar que, mesmo que de uma forma não tão expressiva, os grupos inoculados com tumor apresentaram maior degradação protéica em resposta a evolução tumoral.

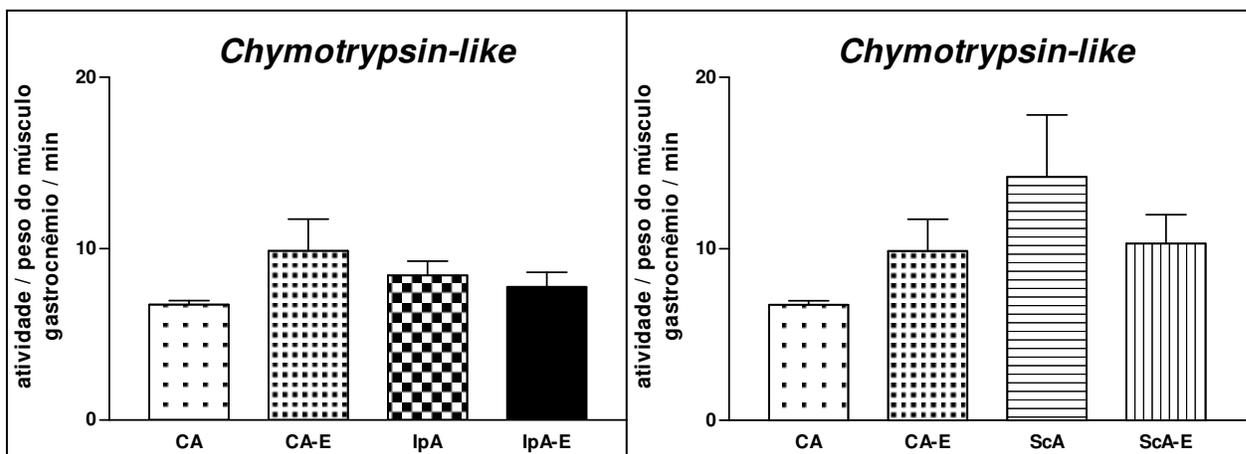


Figura 10. Atividade da enzima *chymotrypsin-like* no músculo gastrocnêmio dos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio; IpA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; ScA – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo; ScA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA; n=8.

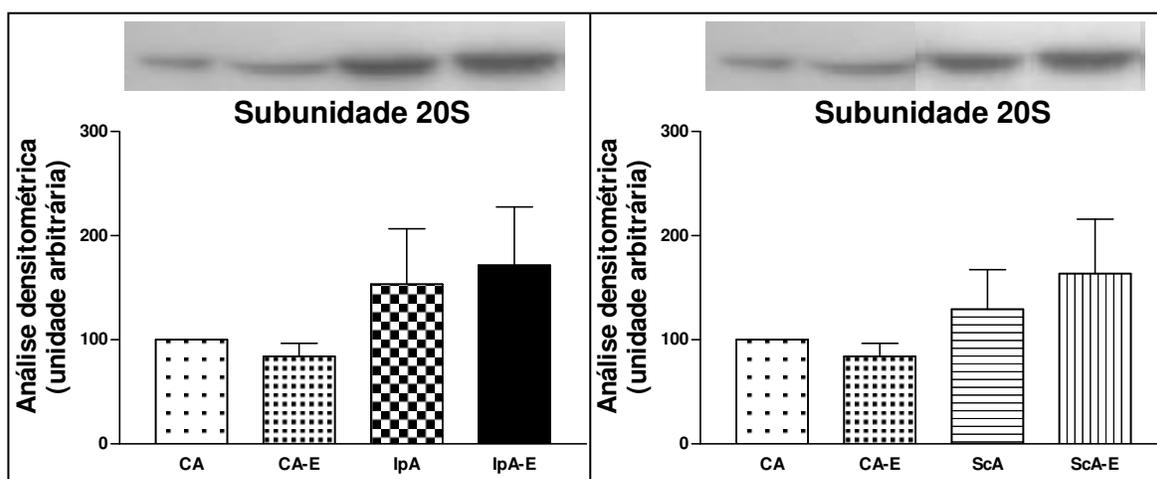


Figura 11. Expressão da subunidade 20S nos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio; IpA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; ScA – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo; ScA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA; n=4.

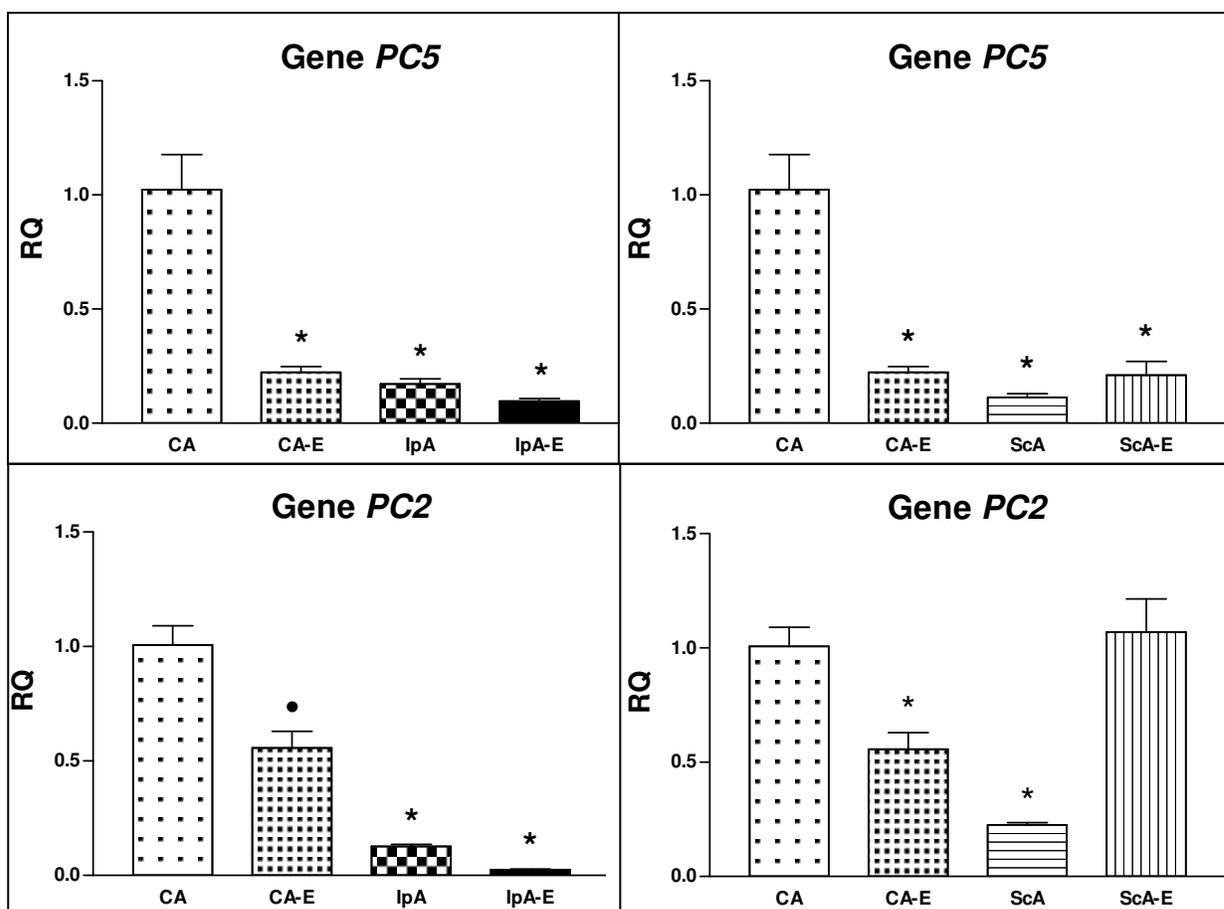


Figura 12. Expressão das subunidades proteossômicas PC5 e PC2 nos animais adultos (n=3). **Legenda:** CA—controle adulto; CA-E—controle adulto tratado com EPA; IpA—grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio; IpA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; ScA – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo; ScA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA. * = diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao CA. • = grupo estatisticamente diferente em relação aos demais grupos.

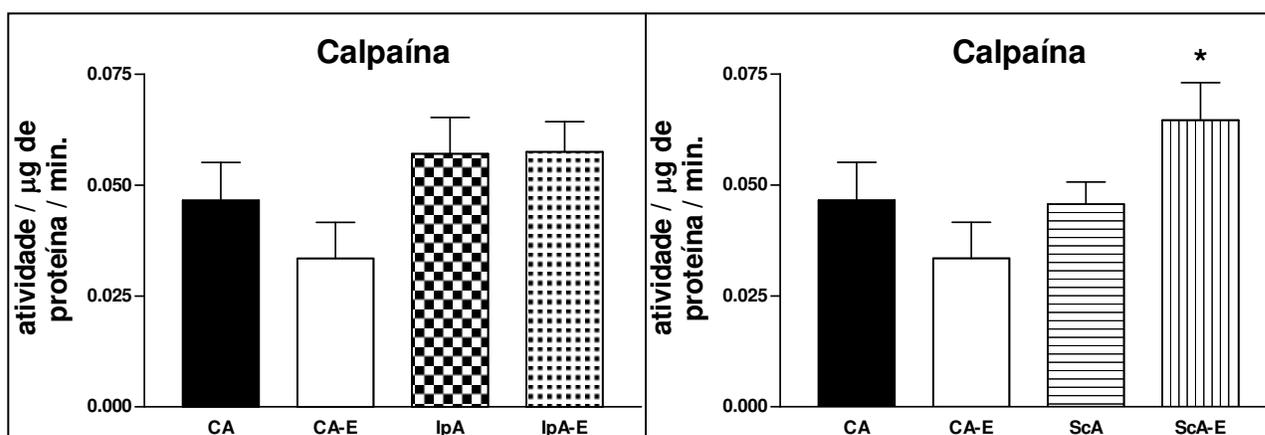


Figura 13. Atividade enzimática da calpaína no músculo gastrocnêmio dos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * = diferença significativa em relação do grupo CA-E; n=8.

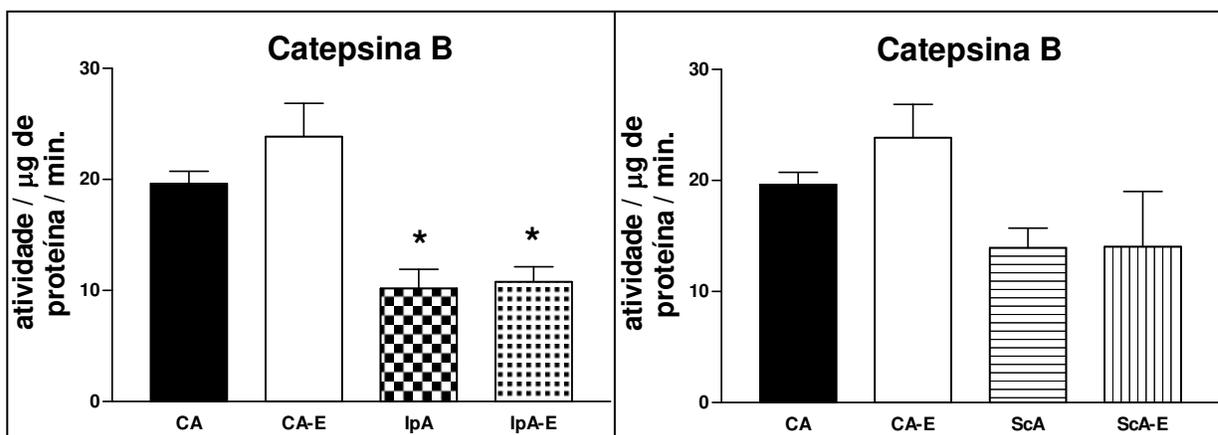


Figura 14. Atividade da enzima cathepsina B no músculo gastrocnêmio dos animais adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * $P < 0,05$ quando comparado ao CA; $n=8$.

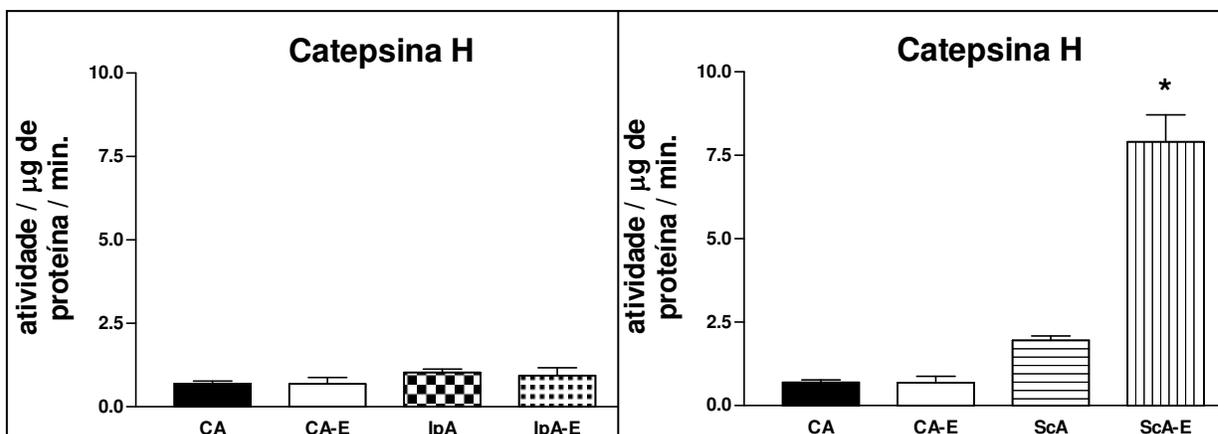


Figura 15. Atividade da enzima cathepsina H no músculo gastrocnêmio de ratos adultos. **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * $P < 0,05$ - diferença significativa quando comparado ao controle; $n=8$.

3.1. Modulação da degradação protéica pelo EPA, nos animais adultos

Conforme proposto como objetivo inicial desse estudo a avaliação da modulação do EPA, principalmente quanto à degradação protéica induzida pela evolução tumoral, no presente estudo não houve modulação expressiva da atividade da *chymotrypsin-like* nos grupos tratados com EPA quando comparados aos grupos

não tratados (Figura 10). Porém, podemos observar que o grupo subcutâneo tratado (ScA-E) apresentou tendência a menor atividade dessa enzima quando comparado ao grupo não tratado (ScA), o que poderia representar discreta modulação do EPA em relação à ativação dessa subunidade catalítica devido ao tratamento mais prolongado, uma vez que a evolução tumoral subcutânea é mais lenta que a evolução do tumor intraperitônio. Além disso, observamos também que houve aumento da atividade da *chymotrypsin-like* no grupo controle tratado com EPA (CA-E), divergindo dos dados da literatura que relatam o EPA como um modulador do processo de proteólise.

A análise da expressão da subunidade 20S também não apresentou modulação devido ao tratamento com EPA, ou seja, não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados (Figura 11). Inclusive, esse dado mostrou tendência divergente da encontrada para a atividade da *chymotrypsin-like*, que apresentou tendência de menor atividade no grupo ScA-E em relação ao ScA, enquanto que houve tendência de aumento da expressão da subunidade 20S no ScA-E em relação ao ScA. Padrão semelhante também podemos observar no grupo CA-E, que também apresentou tendência de aumento da atividade da *chymotrypsin-like* e redução da expressão da subunidade 20S.

Os resultados obtidos na análise das expressões das subunidades PC5 e PC2 (Figura 12) servem-nos como confirmação das tendências observadas em relação à subunidade 20S, uma vez que as expressões das subunidades PC5 e PC2 da via proteossômica apresentaram redução significativa no grupo CA-E quando comparado ao grupo não tratado (CA). Além disso, houve aumento significativo da expressão da subunidade PC2 e tendência de aumento da subunidade PC5 no grupo subcutâneo tratado (ScA-E) quando comparado ao grupo não tratado (ScA), corroborando com os dados encontrados nesse trabalho em relação à subunidade 20S. Através da análise estatística *teste t*, encontramos também redução significativa das expressões das subunidades PC5 e PC2 no grupo IpA-E quando comparado ao grupo não tratado (IpA). Esses dados sugerem que o tratamento com EPA modulou a expressão das subunidades PC5 e PC2, reduzindo a expressão nos

grupos controle e intraperitônio tratados, e aumentando no grupo subcutâneo tratado quando comparados aos respectivos grupos não tratados.

Apesar da não diferença estatística entre os grupos tratados e os não tratados em relação à atividade da calpaína, enzima da via de degradação dependente de cálcio, podemos observar na Figura 13 que houve tendência de redução da atividade dessa enzima no grupo controle tratado (CA-E) quando comparado ao grupo não tratado (CA). Além disso, observamos também que houve tendência de aumento da atividade da calpaína no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) quando comparado ao grupo não tratado (ScA).

Por outro lado, observamos ausência de modulação em função do tratamento com EPA, em relação à atividade da enzima catepsina B, envolvida na via de degradação lisossomal (Figura 14). Contrariamente à literatura, observamos tendência de aumento da atividade dessa enzima no grupo controle tratado (CA-E) quando comparado ao controle sem tratamento (CA), mostrando que o EPA atuou, de forma ainda a ser estudada, na maior ativação da via de degradação lisossomal.

Apenas o grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) apresentou modulação da atividade da enzima catepsina H, uma das proteases mais importantes da via de degradação lisossomal, quando comparado ao grupo não tratado (ScA), mostrando que essa enzima está mais ativa no grupo que recebeu EPA (Figura 15).

4. Efeito da inoculação do tumor de Walker 256, em ratos jovens, sobre o processo de degradação protéica

Como descrito anteriormente para os animais adultos, a via proteolítica ubiquitina-proteossomo é a principal via de degradação protéica celular e por isso analisamos a atividade da enzima *chymotrypsin-like*, a expressão da subunidade 20S e as expressões gênicas das subunidades PC5 e PC2 em relação aos grupos experimentais. A atividade da enzima *chymotrypsin-like* não foi significativamente diferente entre os grupos com tumor e seus respectivos controles. Porém, como podemos observar na Figura 16, que os grupos inoculados com tumor apresentaram tendência de aumento da atividade dessa enzima quando comparados aos seus

respectivos controles, como também observamos nos grupos adultos com tumor. Esses dados são condizentes com os dados da literatura, no qual mostra que há aumento da proteólise associada ao aumento da atividade do sistema ubiquitina-proteossomo (VENTRUCCI *et al.*, 2004, 2007; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2002, 2003; TISDALE, 2005b; ELEY & TISDALE, 2007; TISDALE, 2009).

Não houve diferença estatística da expressão da subunidade 20S quando comparados os grupos intraperitônios (IpJ e IpJ-E) com os grupos controles intraperitônios (ClpJ e ClpJ-E), entretanto houve tendência de aumento na expressão dessa proteína no grupo intraperitônio não tratado (IpJ) quando comparado ao ClpJ (Figura 17), corroborando com os dados da literatura e com os dados encontrados em relação à atividade da enzima *chymotrypsin-like*. Esses dados foram semelhantes aos dados encontrados para os grupos adultos. A expressão da subunidade 20S apresentou redução significativa nos grupos subcutâneos (ScJ e ScJ-E) quando comparados ao CScJ (Figura 17). Esse dado não era esperado, pois diverge da literatura e também do grupo subcutâneo adulto, que apresentou aumento da expressão da subunidade 20S. Além disso, esse dado contradiz o que foi encontrado para a atividade da *chymotrypsin-like* nos grupos de jovens com tumor.

A análise da expressão gênica da subunidade PC5 mostrou-nos que, conforme a Figura 18, não houve diferença estatística entre os grupos intraperitônios (IpJ e IpJ-E) e os grupos controles (ClpJ e ClpJ-E), entretanto houve tendência de aumento da expressão da subunidade PC5 nos grupos ClpJ-E, IpJ e IpJ-E quando comparados ao controle (ClpJ). O grupo ScJ-E apresentou aumento significativo na expressão dessa subunidade quando comparado ao controle não tratado (CScJ), enquanto que o grupo controle tratado (CScJ-E) apresentou redução significativa quando comparado ao CScJ (Figura 18). Por outro lado, analisando-se a subunidade PC2, conforme apresentado na Figura 18, observamos que no grupo jovem inoculado com tumor intraperitônio (IpJ) houve aumento significativo da expressão desse gene em relação ao grupo ClpJ, em contrapartida, houve decréscimo da expressão do PC2 no grupo tratado com EPA (IpJ-E) em relação ao ClpJ e também ao IpJ, sugerindo efeitos do EPA em proteger a espoliação geral da musculatura em resposta aos efeitos deletérios do tumor (WHITEHOUSE *et al.*, 2001; KHAL & TISDALE, 2008). Quanto aos grupos com tumor

subcutâneo, observamos também aumento da expressão do gene PC2 em relação ao grupo CScJ (Figura 18). Esses dados sugerem que diferentes mecanismos estão envolvidos no processo de degradação protéica em resposta ao crescimento tumoral, sendo a evolução intraperitoneal mais acelerada e as respostas do hospedeiro distintas daquelas verificadas no implante subcutâneo (PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2008; PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2010).

Em relação à via proteolítica dependente de cálcio, não observamos diferença estatística na atividade da enzima calpaína em nenhum grupo inoculado com tumor quando comparados aos respectivos controles. Entretanto, houve tendência de aumento da atividade dessa enzima nos grupos intraperitônios (Figura 19). Em contrapartida, houve tendência de redução da atividade dessa enzima nos grupos controle e subcutâneos tratados (CScJ-E e ScJ-E) quando comparados ao CScJ (Figura 19).

A atividade da enzima catepsina B, que está relacionada ao processo de degradação protéica lisossomal e a alguns processos referentes ao ciclo celular, apresentou-se alterada nos grupos implantados com tumor (Figura 20). O grupo intraperitônio não tratado (IpJ) apresentou aumento significativo na atividade dessa enzima quando comparado ao respectivo controle (CIpJ). Os grupos implantados com tumor subcutâneo (ScJ e ScJ-E) apresentaram redução significativa na atividade dessa enzima quando comparados ao CScJ (Figura 20).

A atividade da enzima catepsina H não apresentou diferença estatística entre os grupos com tumor quando comparados aos controles, porém verificamos tendência de aumento nos grupos implantados no peritônio (IpJ e IpJ-E), no subcutâneo (ScJ) e no controle intraperitônio tratado (CIpJ-E) (Figura 21).

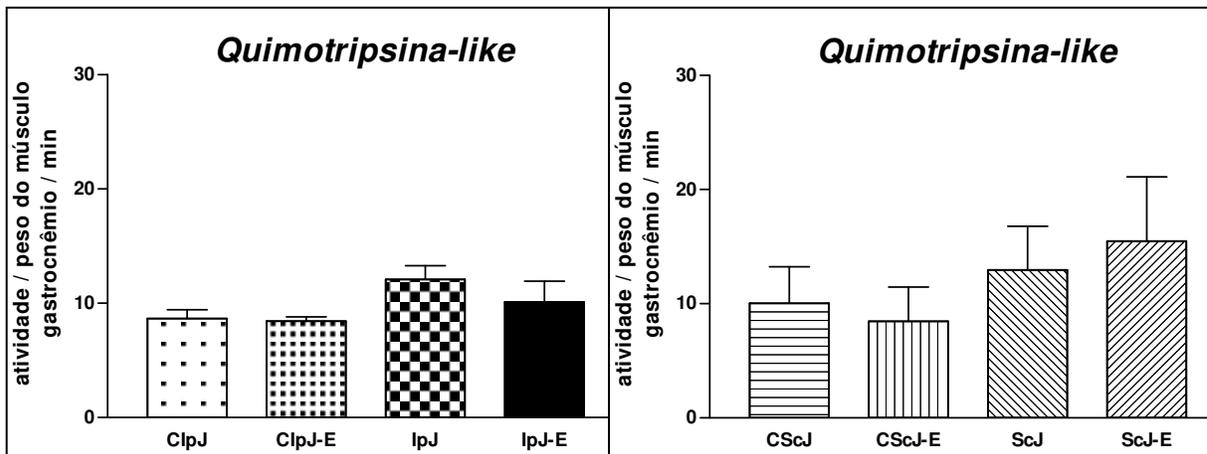


Figura 16. Atividade da enzima *chymotrypsin-like* no músculo gastrocnêmio dos animais jovens (n=7). **Legenda:** **ClpJ** –controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** –controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio; **IpJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo; **ScJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA.

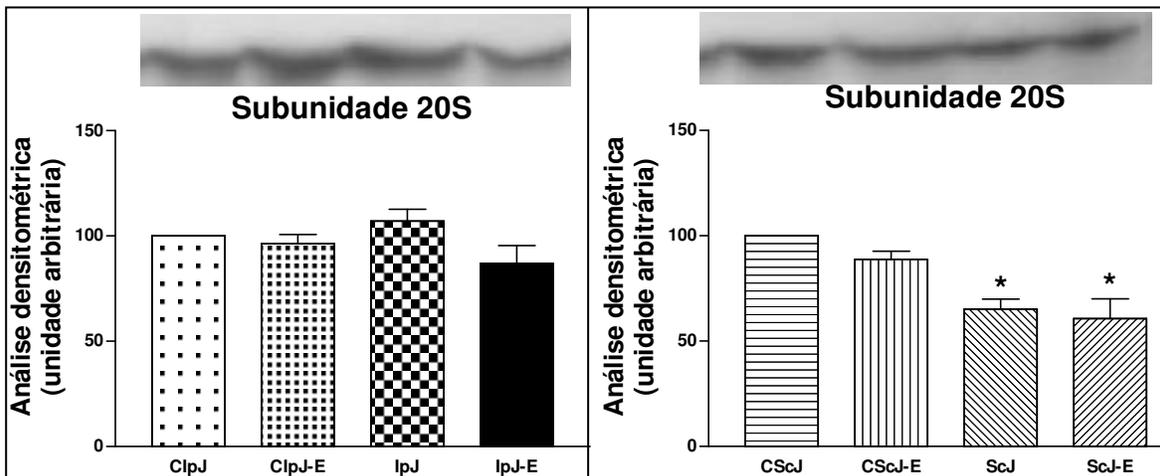


Figura 17. Expressão da subunidade 20S nos animais jovens (n=4). **Legenda:** **ClpJ** –controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** –controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio; **IpJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo; **ScJ-E** – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA. * $p < 0,05$ quando comparado ao CScJ.

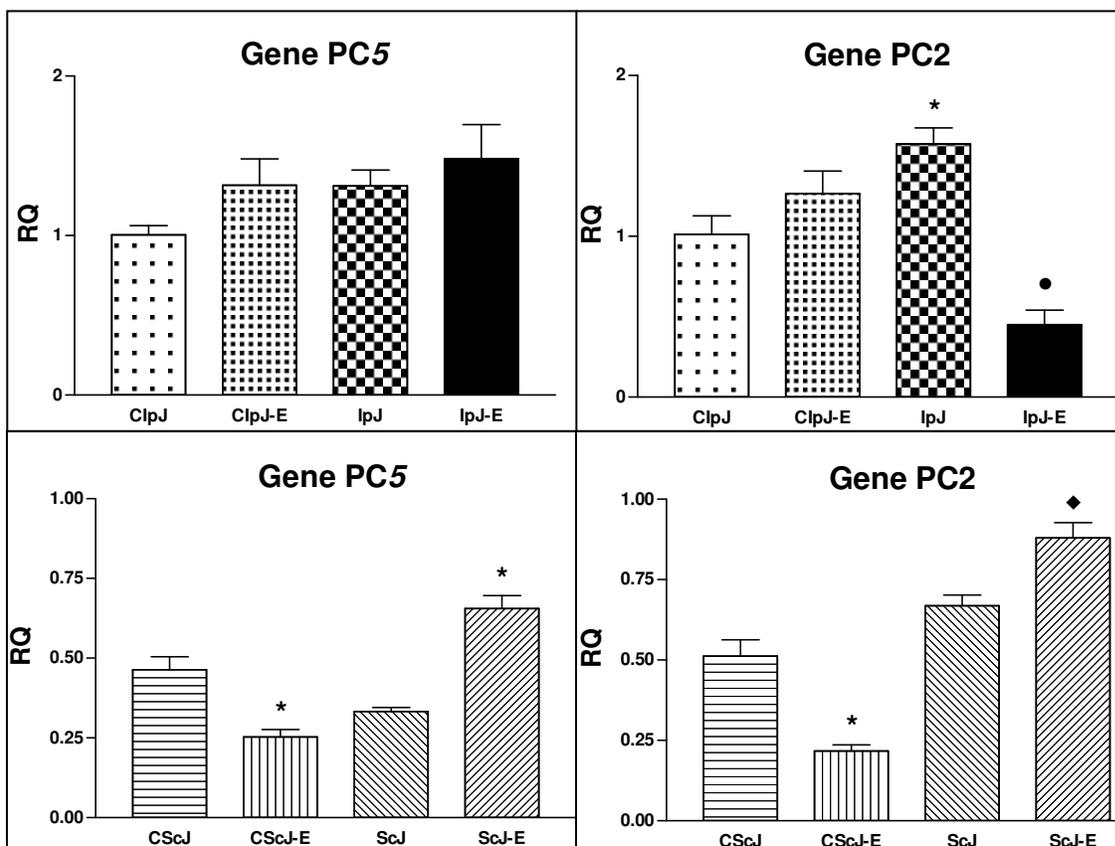


Figura 18. Expressão das subunidades proteossômicas PC5 e PC2 nos animais jovens (n=3). **Legenda:** ClpJ – controle intraperitônio jovem; ClpJ-E – controle intraperitônio jovem tratado com EPA; IpJ – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio; IpJ-E – grupo jovem portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; CScJ – controle subcutâneos jovem; CScJ-E – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; ScJ – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo; ScJ-E – grupo jovem portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA. * ♦ p<0,05 quando comparado ao ClpJ ou CScJ; • p<0,05 quando comparado ao ClpJ e ao ClpJ-E

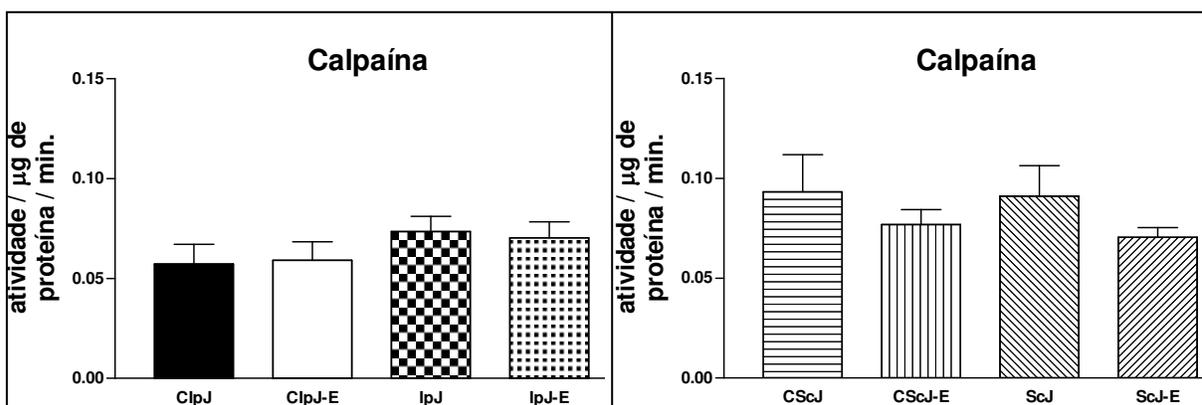


Figura 19. Atividade enzimática da calpaína no músculo gastrocnêmio dos animais jovens (n=8 para os grupos sem tumor e n=7 para os grupos com tumor). **Legenda:** ClpJ – grupo controle intraperitônio jovem; ClpJ-E – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; IpJ – grupo intraperitônio jovem; IpJ-E – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; CScJ – controle subcutâneos jovem; CScJ-E – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; ScJ – grupo subcutâneo jovem; ScJ-E – subcutâneo jovem tratado com EPA.

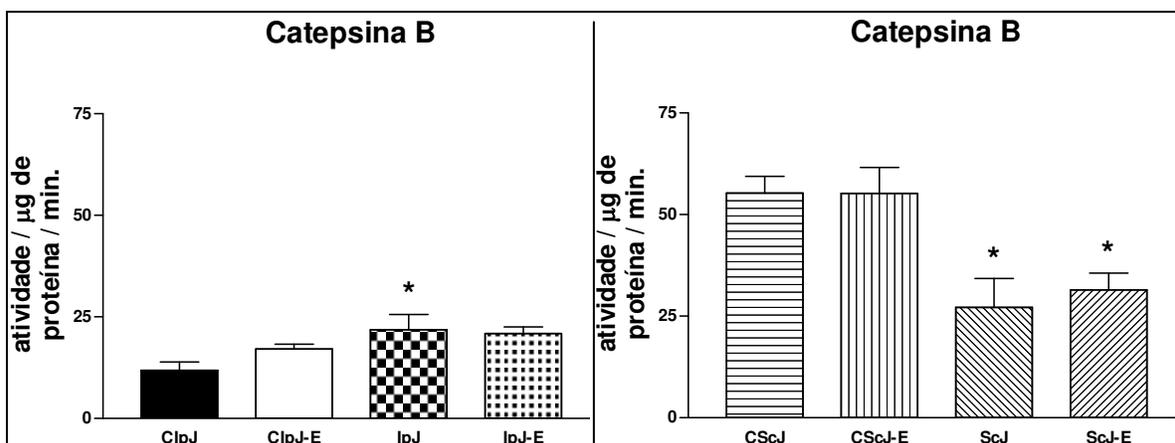


Figura 20. Atividade da enzima catepsina B no músculo gastrocnêmio dos animais jovens (n=8 para os grupos sem tumor e n=7 para os grupos com tumor). **Legenda:** ClpJ – grupo controle intraperitônio jovem; ClpJ-E – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; IpJ – grupo intraperitônio jovem; IpJ-E – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; CScJ – controle subcutâneos jovem; CScJ-E – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; ScJ – grupo subcutâneo jovem; ScJ-E – subcutâneo jovem tratado com EPA. * P<0,05 quando comparado ao controle.

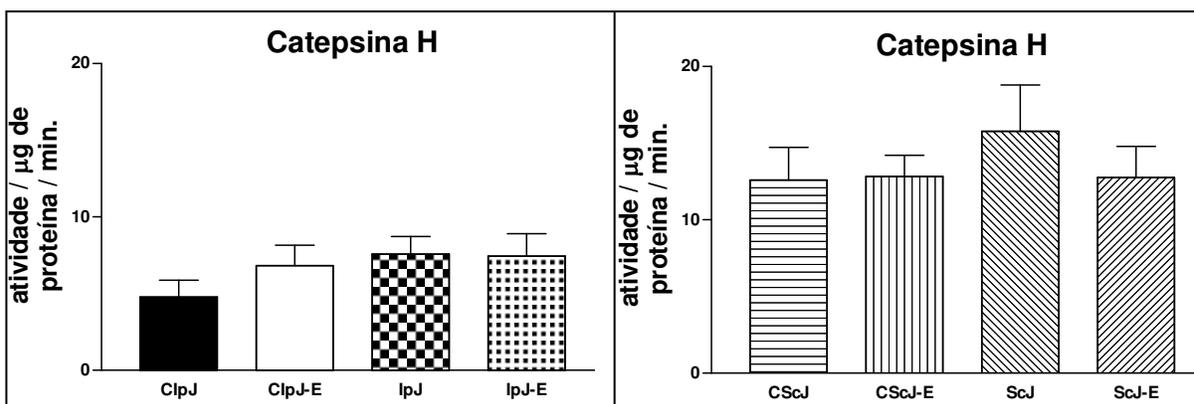


Figura 21. Atividade da enzima catepsina H no músculo gastrocnêmio de ratos jovens (n=8 para os grupos sem tumor e n=7 para os grupos com tumor). **Legenda:** ClpJ – grupo controle intraperitônio jovem; ClpJ-E – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; IpJ – grupo intraperitônio jovem; IpJ-E – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; CScJ – controle subcutâneos jovem; CScJ-E – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; ScJ – grupo subcutâneo jovem; ScJ-E – subcutâneo jovem tratado com EPA.

4.1. Modulação da degradação protéica pelo EPA, nos animais jovens

A degradação protéica decorrente da via ubiquitina-proteossomo não apresentou modulação significativa nos grupos tratados com EPA quando comparados aos grupos não tratados em relação à atividade da enzima

chymotrypsin-like (Figura 16) e da expressão da subunidade 20S (Figura 17). Entretanto, houve tendência de redução da atividade da *chymotrypsin-like* e da expressão da subunidade 20S nos grupos IpJ-E e CScJ-E quando comparados aos grupos não tratados IpJ e CScJ, respectivamente. Esses dados sugerem que o EPA estaria promovendo redução da atividade da via proteolítica ubiquitina-proteossomo, corroborando com dados da literatura. Em contrapartida, houve tendência de aumento na atividade da *chymotrypsin-like* no grupo inoculado no subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) quando comparado ao grupo não tratado (ScJ), sugerindo que nesse grupo o EPA não foi capaz de modular a atividade da *chymotrypsin-like*, entretanto esse dado foi divergente do encontrado para a expressão da subunidade 20S, que não apresentou diferença entre o grupo tratado (ScJ-E) e o não tratado (ScJ).

Os grupos controle subcutâneo e tumor subcutâneo tratados com EPA (CScJ-E e ScJ-E) apresentaram resposta modulatória significativa em relação à expressão gênica da PC5 (Figura 18), sendo que o grupo com tumor ScJ-E apresentou aumento da expressão (dado semelhante ao encontrado para *chymotrypsin-like*) e o grupo CScJ-E apresentou redução, corroborando com os dados encontrados para *chymotrypsin-like* e subunidade 20S. Além disso, houve tendência de aumento da expressão da PC5 nos grupos ClpJ-E e IpJ-E, sendo que esse dado mostrou-se divergente dos dados encontrados para a atividade da *chymotrypsin-like* e da subunidade 20S. Em relação à expressão gênica da PC2, houve modulação pelo tratamento com EPA nos grupos IpJ-E, CScJ-E e ScJ-E, sendo que os dois primeiros grupos apresentaram redução significativa quando comparados aos grupos não tratados (IpJ e CScJ, respectivamente), enquanto que o ScJ-E apresentou aumento significativo em relação ao grupo não tratado (ScJ-E) (Figura 18). Esses dados corroboram com os dados encontrados para *chymotrypsin-like* e para a subunidade 20S, mostrando que o EPA apresentou modulação da degradação protéica através da via ubiquitina-proteossomo nos grupos IpJ-E e CScJ-E, corroborando com dados da literatura que mostram efeitos do EPA em proteger a depleção da musculatura em resposta aos efeitos deletérios do tumor (WHITEHOUSE *et al.*, 2001; KHAL & TISDALE, 2008). Além disso, houve tendência

de aumento da expressão da PC2 no grupo ClpJ-E, semelhante ao que ocorreu na expressão da PC5.

Analisando a via de degradação protéica dependente de cálcio, observamos que não houve modulação significativa da atividade da enzima calpaína em resposta ao tratamento com EPA (Figura 19), entretanto, houve tendência de redução da atividade dessa enzima nos grupos tratados CScJ-E e ScJ-E quando comparados aos grupos não tratados CScJ e ScJ, respectivamente. Esse dado sugere que o EPA, de alguma forma, estaria modulando a resposta da via proteolítica dependente de cálcio nos grupos com maior período experimental.

Quando analisada a via proteolítica lisossomal, observamos resultados divergentes em relação à atividade da enzima catepsina B (Figura 20) e da catepsina H (Figura 21). O tratamento com EPA modulou a atividade da enzima catepsina B, aumentando-a significativamente no grupo ClpJ-E quando comparado ao grupo não tratado (ClpJ) e apresentou tendência de aumento no grupo ScJ-E. Em contrapartida, houve tendência de redução da atividade da catepsina H no grupo ScJ-E quando comparado ao ScJ, padrão oposto ao dado encontrado para a catepsina B. Também observamos tendência de aumento da atividade da catepsina H no grupo ClpJ-E, mostrando que de alguma forma o tratamento com EPA está modificando a atividade da via proteolítica lisossomal nesse grupo, uma vez que também encontramos aumento significativo na atividade da catepsina B.

5. Análise da síntese protéica, via fatores de iniciação eucarióticos, em ratos adultos inoculados com células de Walker 256

A expressão do fator de iniciação eucariótico 2, subunidade 1 alpha (eIF2S1, Figura 22), que juntamente com o GTP é responsável pelo fornecimento de energia para a formação da subunidade ribossomal 80S, apresentou-se aumentada significativamente no grupo ScA quando comparado ao grupo controle (CA). Além disso, houve tendência de aumento no grupo com tumor intraperitônio tratado com EPA (IpA-E) quando comparado ao grupo não tratado (IpA) e ao controle (CA). Já a expressão do fator de iniciação eucariótico 5 (eIF5, Figura 22), que é responsável pela

reciclagem do GDP em GTP, e com isso peça chave para o processo de reciclagem do fator eIF2, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Porém, houve tendência de redução nos grupos IpA, IpA-E e ScA-E quando comparados a grupo controle (CA).

Houve aumento significativo na expressão do fator de iniciação eucariótico 4 gama (eIF4G, Figura 22) nos grupos CA-E e ScA-E quando comparados ao grupo controle (CA). Além disso, observamos tendência de aumento nos grupos IpA e IpA-E, quando comparados ao controle (CA).

A expressão da proteína regulatória da tradução que se liga ao fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4EBP1, Figura 22) apresentou redução significativa nos grupos CA-E, IpA-E e ScA quando comparados ao grupo controle (CA).

A literatura relata que a evolução tumoral impõe, além do processo de degradação, diminuição da síntese protéica (TISDALE, 2002, 2003, 2009). Esses resultados, embora mostrem dados controversos quanto aos fatores de inicialização para o processo de proteogênese, sugerem que embora estejam elevadas as proteínas chaves (eIF2 α , necessária para início da formação da unidade ribossomal 40S, e eIF4G, essencial para formação do complexo ribossomal no processo de síntese) nos grupos subcutâneos e nos intraperitônios, provavelmente há outros mecanismos envolvidos e também outros fatores, não avaliados nesse estudo, que estejam diretamente relacionados à manutenção da síntese e /ou inibição da síntese de proteína (TISDALE, 2002, 2009).

5.1. Modulação da síntese protéica pelo EPA, nos animais adultos

Nos grupos IpA-E e ScA-E, mesmo havendo aumento do fator de inicialização (eIF2), que está diretamente relacionado ao processo de síntese protéica, observamos manutenção ou tendência à diminuição do eIF5, sugerindo que esteja ocorrendo modulação negativa do processo de síntese, como também do processo de degradação em função do tratamento (Figura 22). Porém, esses dados não estão condizentes com dados da literatura que reportam efetiva inibição do processo de

degradação e estimulação do processo de síntese quando administrado EPA (WHITEHOUSE *et al.*, 2001; KHAL & TISDALE, 2008).

Além disso, os grupos controle tratado com EPA (CA-E) e tumor subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) apresentaram aumento significativo da expressão do eIF4G quando comparados aos grupos não tratados (CA e ScA, respectivamente) (Figura 22). Esses dados sugerem que o EPA pôde aumentar a expressão do gene eIF4G na tentativa de aumentar a síntese protéica. Essa hipótese pode ser bastante consistente já que encontra-se nos grupos controle (CA-E) e tumor intraperitônio tratado com EPA (IpA-E) redução significativa na expressão do gene eIF4EBP1 em relação aos grupos não tratados (CA e IpA, respectivamente), enquanto que o grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) apresentou aumento significativo em relação ao grupo não tratado (ScA) (Figura 22). Embora não tenhamos verificado a fosforilação de determinados fatores, como por exemplo, a fosforilação da 4EBP1, o aumento da expressão do fator eIF4G, embora associado ao aumento do 4EBP1, sugere maior ligação do fator eIF4G com o eIF4E e com isso aumento da formação da subunidade ribossomal 80S (PROUD, 2005, 2006) e conseqüente melhora no processo de síntese protéica (WHITEHOUSE *et al.*, 2001; KHAL & TISDALE, 2008).

Por outro lado, se tivermos aumento da expressão do fator eIF4G associado à diminuição da expressão do eIF4EBP1, aventa-se a hipótese de que há maior quantidade de eIF4G, que por sua vez irá associar-se ao eIF4E, formando então o fator eIF4F, que se ligará ao eIF4A e eIF4B, formando então a subunidade ribossomal 80S. Assim, no caso do grupo CA-E, o aumento da expressão do eIF4G e a diminuição da expressão do eIF4EBP1 (corresponde à razão igual a 4) implicaria em maior estímulo para síntese protéica. Esse mesmo padrão corresponderia aos grupos IpA-E e ScA-E, pois a razão entre eIF4G/eIF4EBP1 corresponde a 3 e 1,6, respectivamente. Porém, associando-se os demais fatores, a razão entre eIF2/eIF5 foi igual a 2 e 3, para os grupos IpA-E e ScA-E, respectivamente. Por outro lado, condizente com a literatura, o grupo ScA pode apresentar menor síntese protéica, uma vez que apresentou razão igual a 1,3 dos fatores eIF4G e do eIF4EBP1, mesmo tendo elevação do fator eIF2, que apresenta razão eIF2/eIF5 igual a 1,9.

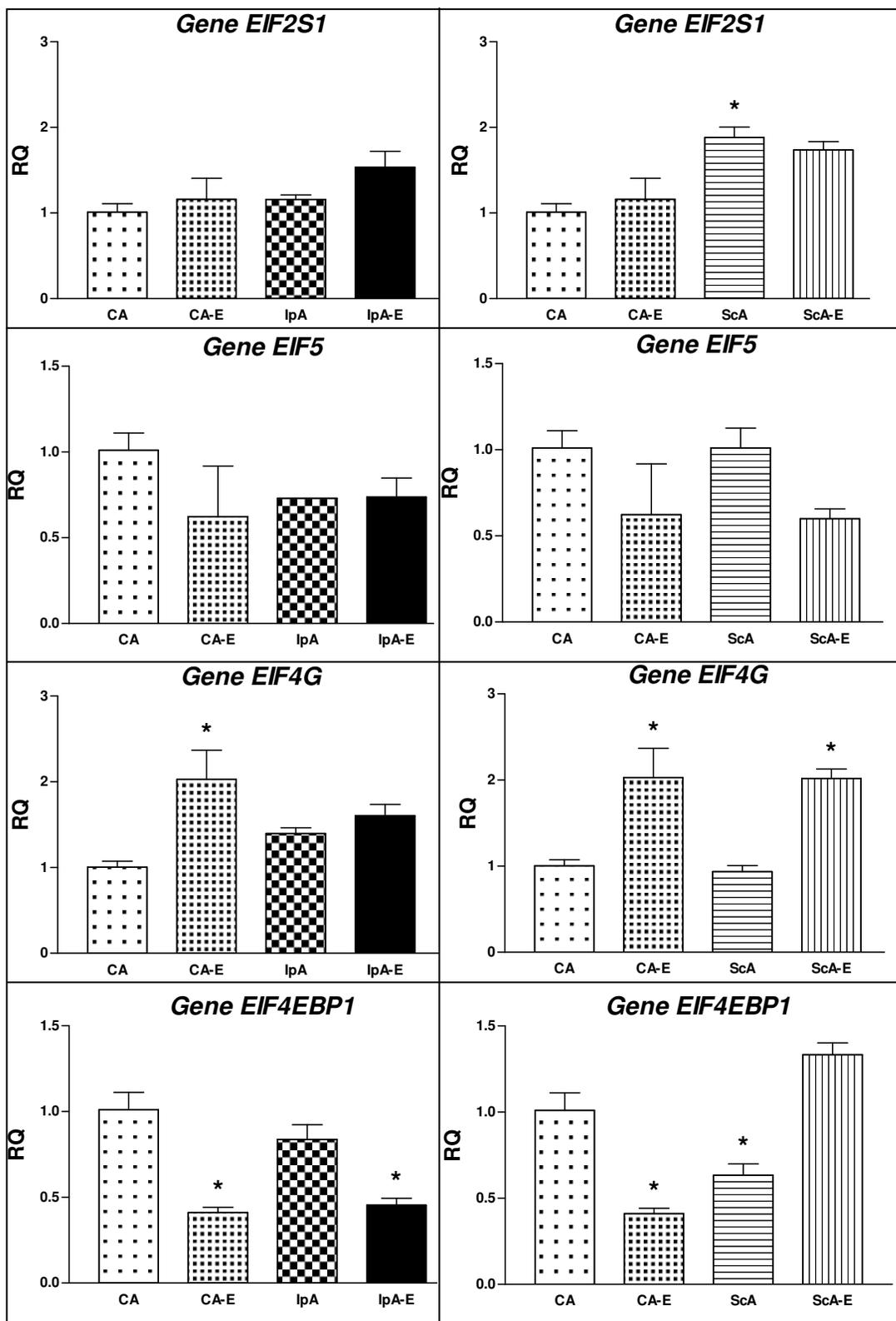


Figura 22. Expressão dos fatores de iniciação eucarióticos (n=3). **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio; IpA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no peritônio tratado com EPA; ScA – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo; ScA-E – grupo adulto portador de tumor implantado no subcutâneo tratado com EPA. * $p < 0,05$ em relação ao CA.

6. Análise da síntese protéica, via fatores de iniciação eucarióticos, em ratos jovens inoculados com células de Walker 256

Como explanado no item anterior, o processo de síntese protéica envolve vários fatores, inclusive os fatores eucarióticos de iniciação, para a formação da unidade ribossomal 80S, a qual será responsável pela tradução protéica. Dentre os fatores de iniciação que participam da montagem da subunidade ribossomal 43S está o fator eIF2, responsável por promover a ligação do Met-tRNA, na presença de GTP, à subunidade 40S do ribossomo, formando então o complexo 43S (ALBERTS, 2004). No presente estudo, houve aumento significativo na expressão do fator de iniciação eucariótico 2, subunidade 1 alpha (eIF2S1) nos grupos implantados com tumor intraperitônio (IpJ e IpJ-E) quando comparados ao grupo controle (CIpJ), sugerindo que neste grupo o processo de síntese está sofrendo alguma modificação (Figura 23). Já os grupos implantados com tumor subcutâneo (ScJ e ScJ-E) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (CScJ), entretanto podemos observar tendência de redução da expressão do eIF2S1 no grupo ScJ e tendência de aumento no grupo ScJ-E (Figura 23).

A expressão do fator de iniciação eucariótico 5 (eIF5), que é responsável pela reciclagem do GDP em GTP, mostrou-se aumentada significativamente apenas no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) quando comparado ao grupo controle (CScJ). Houve tendência de aumento nos grupos IpJ e IpJ-E quando comparados ao controle CIpJ, enquanto que observamos tendência de redução nos grupos CScJ-E e ScJ em relação ao controle CScJ (Figura 23).

Embora não haja diferença estatística significativa na expressão do fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) entre os grupos com implante tumoral intraperitônio (IpJ e IpJ-E) e os respectivos controles CIpJ e CIpJ-E, houve tendência de aumento na expressão desse gene no grupo IpJ, enquanto houve tendência de redução no grupo IpJ-E (Figura 23). Apesar de não termos observado diferença estatística entre os grupos com tumor subcutâneo (ScJ e ScJ-E) e o controle (CScJ), podemos observar que o grupo ScJ apresentou tendência de redução na expressão do eIF4G, enquanto

que o ScJ-E apresentou tendência de aumento, quando comparados ao controle (CScJ) (Figura 23).

A proteína regulatória da tradução, proteína ligante do fator de iniciação 4E (4EBP1), liga-se ao fator eIF4E formando o complexo eIF4E/4EBP1 que por sua vez inibe o fator eIF4E; assim quando a proteína 4EBP1 é fosforilada há o desligamento do fator eIF4E, permitindo sua ligação ao fator eIF4G para a formação do complexo eIF4F, que juntamente com os fatores eIF4A e eIF4B formam a subunidade ribossomal 80S. Nesse estudo, avaliamos a expressão gênica dessa proteína regulatória da tradução (4EBP1) que apresentou-se aumentada, significativamente, em todos os grupos implantados com tumor quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 23).

Através da análise das expressões gênicas dos fatores de iniciação eucarióticos, podemos sugerir que houve inibição da síntese protéica em todos os grupos implantados com Walker 256. Uma vez que, no processo de síntese protéica é necessária a formação da subunidade ribossomal 40S, seguida da formação do complexo eIF4F (que é composto pelos fatores eIF4E e eIF4G junto com os fatores eIF4A e eIF4B) para a formação da unidade ribossomal 80S, se analisarmos a razão entre os fatores eIF4G e 4EBP1, que está muito reduzida (cerca de 0,2 entre eIF4G/4EBP1) nos animais com tumor, supomos que há menor disponibilidade do fator eIF4G para a formação da unidade ribossomal, independente da razão entre eIF2/eIF5 (cerca de 0,9), já que essa razão entre os fatores eIF2 e eIF5 revela o início do processo de síntese. Esses dados corroboram com dados da literatura que mostram que a evolução tumoral promove redução da síntese protéica, além de aumentar a degradação das proteínas (TISDALE, 2002, 2003, 2009; KIMBALL, 1999).

6.1. Modulação da síntese protéica pelo EPA, nos animais jovens

Em relação à expressão gênica do eIF2S1, apenas o grupo controle subcutâneo tratado com EPA (CScJ-E) apresentou modulação significativa devido ao tratamento quando comparado ao grupo não tratado (CsJ), sendo que houve

redução expressiva na expressão desse gene no CScJ-E. Os grupos ClpJ-E e ScJ-E apresentaram tendência de aumento da expressão do fator eIF2S1 em relação aos grupos não tratados (ClpJ e ScJ), indicando que o EPA poderia estar atuando, mesmo que de forma moderada, na expressão gênica desse fator (Figura 23).

O grupo tumor inoculado no subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) apresentou aumento significativo na expressão do gene eIF5 quando comparado ao grupo não tratado (ScJ). Além disso, observamos tendência de redução na expressão desse gene nos grupos IpJ-E e CScJ-E quando comparados ao IpJ e CScJ, respectivamente (Figura 23). A expressão do fator eIF4G apresentou aumento significativo no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) quando comparado ao grupo subcutâneo não tratado (ScJ). A análise estatística (*teste t*) mostrou que o grupo intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E) teve redução significativa da expressão do eIF4G em relação ao grupo não tratado (IpJ). Além disso, observamos tendência de redução da expressão desse gene nos grupos controles tratados (ClpJ-E e CScJ-E) quando comparados aos grupos controles não tratados (ClpJ-E e CScJ-E, respectivamente), como mostrado na Figura 23. Não observamos nenhuma modulação significativa dos grupos tratados com EPA quando comparados aos grupos não tratados em relação à expressão gênica do 4EBP1, mostrando que o EPA não promoveu nenhuma alteração na expressão desse gene (Figura 23).

Assim, como comentado anteriormente, o processo de síntese protéica envolve várias etapas, incluindo vários fatores e proteínas sinalizadoras que podem ser moduladas negativamente na presença da evolução tumoral, como aventada pela apresentação dos dados encontrados no presente trabalho. Entretanto, contrariamente ao apresentado na literatura, o tratamento com EPA não apresentou expressiva estimulação do processo de síntese e/ou diminuição do processo de degradação. Embora tenhamos observado que o tratamento com EPA, apenas nos animais jovens implantados no subcutâneo, tenha induzido ao aumento da expressão das proteínas chaves para o processo de síntese – eIF2 α , eIF5, eIF4E – aventamos que haja aumento da síntese protéica muscular nesses animais em relação aos não tratados. Porém, estudos adicionais são necessários para quantificação de outras proteínas sinalizadoras, fosforiladas ou não, e também

quantificação do processo de síntese, estabelecida por incorporação de aminoácidos marcados com trício (VENTRUCCI *et al.*, 2004, 2007; GONÇALVES & GOMES-MARCONDES, 2010) para que possamos certificar os efeitos benéficos do EPA, conforme relatos na literatura (WHITEHOUSE, 2003).

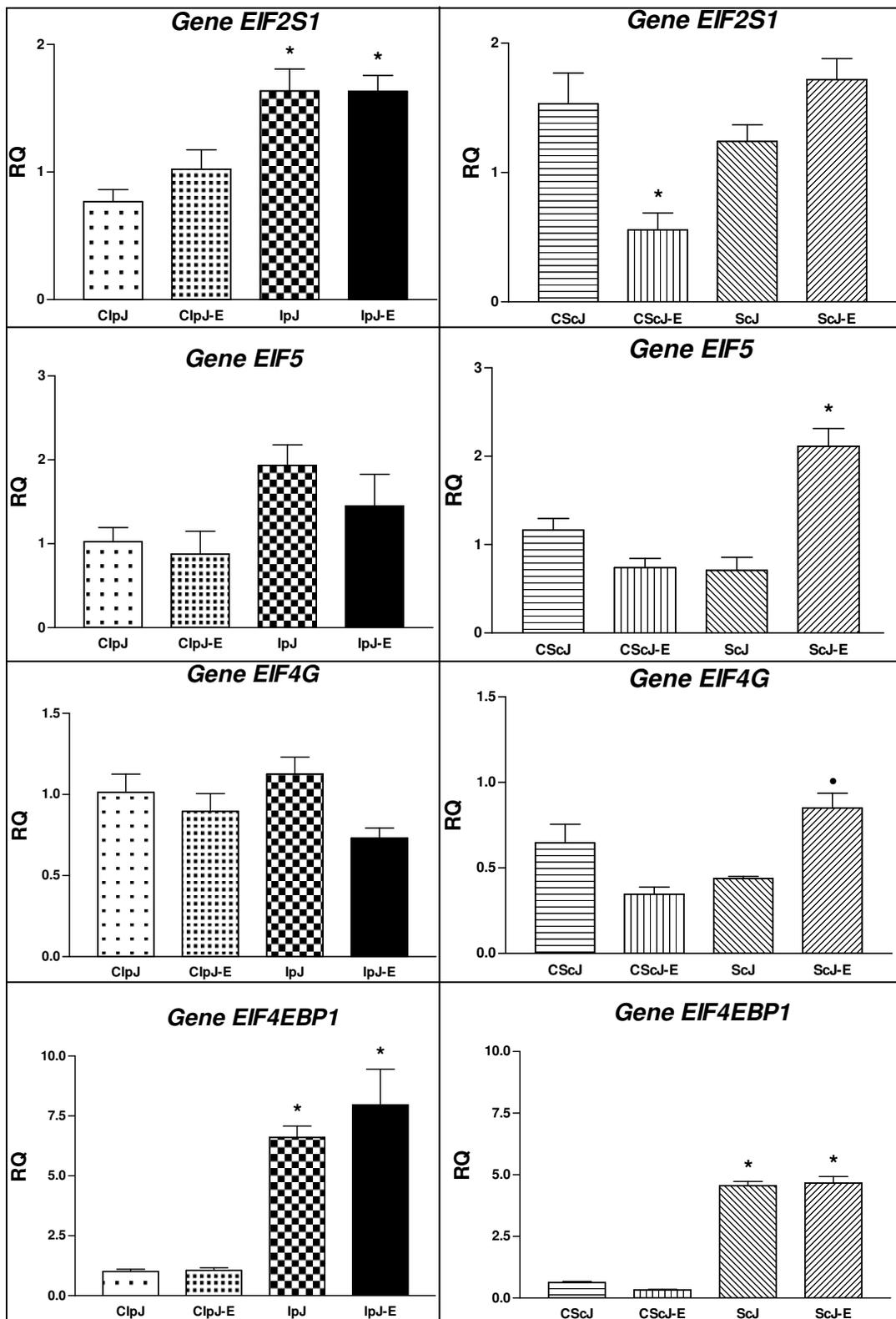


Figura 23. Expressão dos fatores de iniciação eucarióticos (n=3). **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * P<0,05 quando comparado ao controle não tratado; ● P<0,05 em relação ao CScJ-E.

7. Concentração de citocinas pró e antiinflamatórias, em resposta à evolução do tumor de Walker 256 nos grupos adultos

Nesse trabalho, avaliamos o peso relativo do baço, uma vez que o aumento do peso absoluto e relativo desse órgão pode estar relacionado ao aumento do provimento de linfócitos T, associados à variação da concentração de citocinas circulantes, na tentativa de minimizar o processo inflamatório crônico, característico do estado caquético (TISDALE, 2010). Como podemos observar na Tabela 1, os grupos inoculados com tumor no subcutâneo apresentaram aumento significativo no peso relativo do baço (ScA=218,2% e ScA-E=145,4) quando comparados ao controle (CA). Esse dado corrobora com dados da literatura que mostram que um dos primeiros efeitos do crescimento tumoral, além da perda de peso corpóreo, é o aumento desproporcional do baço em resposta a evolução tumoral. Além disso, verificamos também que, dependendo do local de implante tumoral, houve resposta distinta em relação ao peso relativo do baço, provavelmente relacionada à resposta imunológica. Assim, os animais implantados com tumor intraperitônio podem sofrer da severidade dos efeitos tumorais sem haver resposta imunológica crônica, comparada àquelas observadas nos animais implantados com tumor no subcutâneo.

Para compreendermos melhor a resposta imunológica decorrente do implante tumoral e do processo de caquexia, analisamos também algumas citocinas que, além de apresentarem papel importante no processo de sinalização celular, estão envolvidas no estabelecimento do quadro de caquexia, sendo relacionadas ao prognóstico ruim da evolução dessa patologia (ARGILÉS *et al.*, 2007 e 2009).

Analisamos algumas citocinas da família das interleucinas, que estão relacionadas aos processos antiinflamatórios, como é o caso das interleucinas 4 e 10, e inflamatório, como é o caso da IL-6 e do IFN γ .

Quanto às citocinas antiinflamatórias, a concentração da IL-4 não apresentou diferença estatística em nenhum grupo com tumor quando comparado ao controle (CA) (Figura 24). Entretanto, podemos observar tendência de aumento dessa citocina no grupo IpA e, principalmente, no grupo ScA-E.

A interleucina 10, citocina antiinflamatória relacionada ao processo inflamatório crônico característico da caquexia (LIRA *et al.*, 2009), apresentou-se elevada

significativamente apenas no grupo ScA, entretanto, houve tendência à elevação em todos os demais grupos com tumor (Figura 25).

Na análise das citocinas pró-inflamatórias, como à concentração da interleucina 6, não foi observada diferença estatística entre todos os grupos experimentais. Porém, o grupo inoculado com tumor subcutâneo tratado com EPA (ScA-E) apresentou tendência de aumento dessa citocina (Figura 26). Esses dados mostraram que mesmo tendo modulação do sistema imunológico, as citocinas pró-inflamatórias também estavam aumentadas mesmo nos animais tratados com EPA, uma vez que, provavelmente esses animais também encontravam-se em processo inflamatório crônico, característico do processo de caquexia (TISDALE, 2010).

Com respeito às alterações metabólicas presentes no estado de caquexia, o interferon-gama (IFN γ), também relacionado como citocina pró-inflamatória, atua inibindo a atividade da lipase lipoprotéica, relacionada com o processo de lipogênese (TISDALE, 1999; MATTHYS & BILLIAU, 1997). Como podemos ver na Figura 27, não foi observada diferença estatística entre os grupos, embora haja tendência de aumento em todos os grupos portadores de tumor. Assim, coerente com a literatura e os dados encontrados quanto a gordura perirrenal, o aumento sérico do interferon-gama, como observado nos grupos com tumor, possivelmente está relacionado à atuação dessa citocina como estímulo do processo de lipólise, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (TISDALE, 1999; MATTHYS & BILLIAU, 1997).

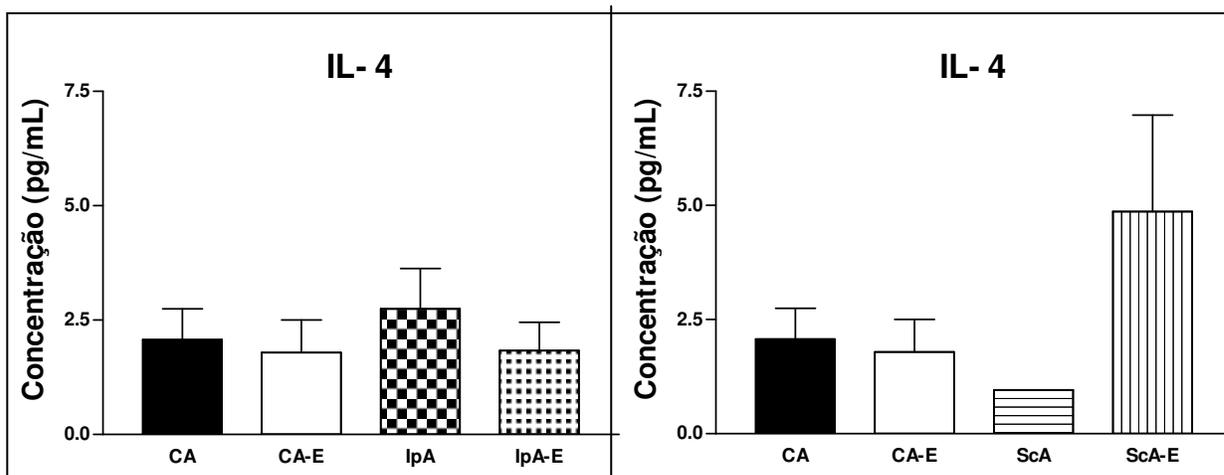


Figura 24. Concentração de IL-4 no soro nos animais adultos (n=6). **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA.

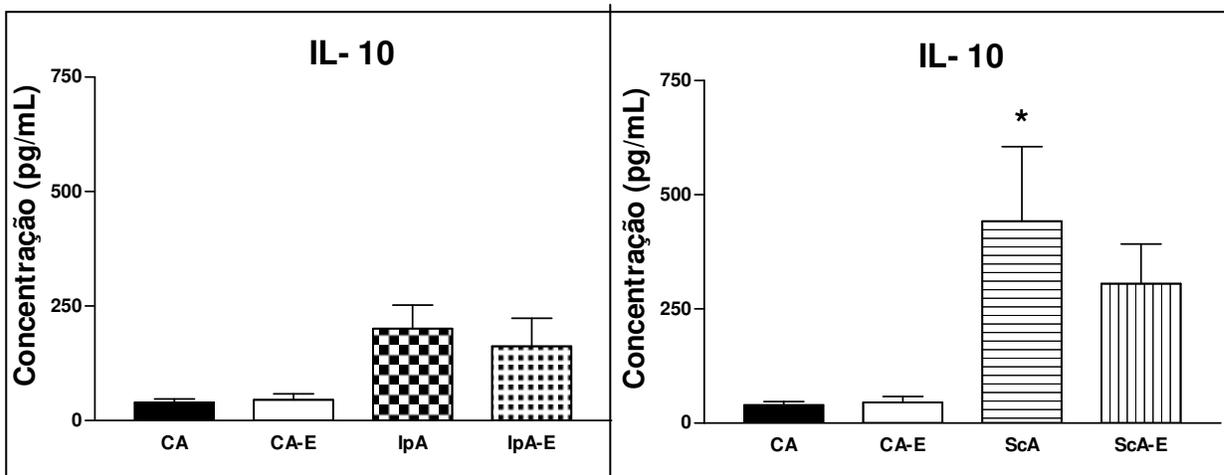


Figura 25. Concentração de IL-10 no soro nos animais adultos (n=6). **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA. * p<0,05 quando comparado ao CA.

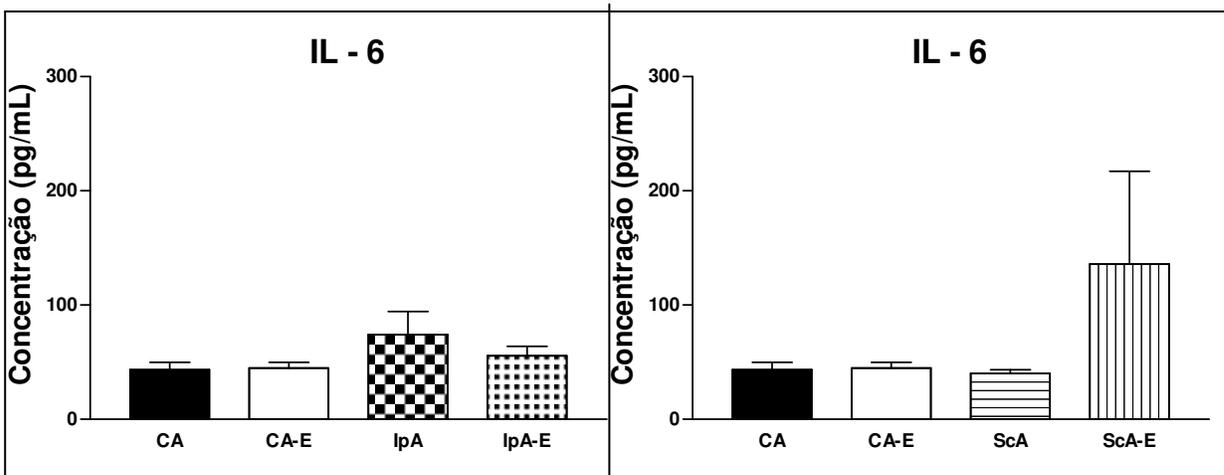


Figura 26. Concentração de IL-6 no soro nos animais adultos (n=6). **Legenda:** CA – controle adulto; CA-E – controle adulto tratado com EPA; IpA – grupo intraperitônio adulto; IpA-E – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; ScA - grupo subcutâneo; ScA-E – subcutâneo adulto tratado com EPA.

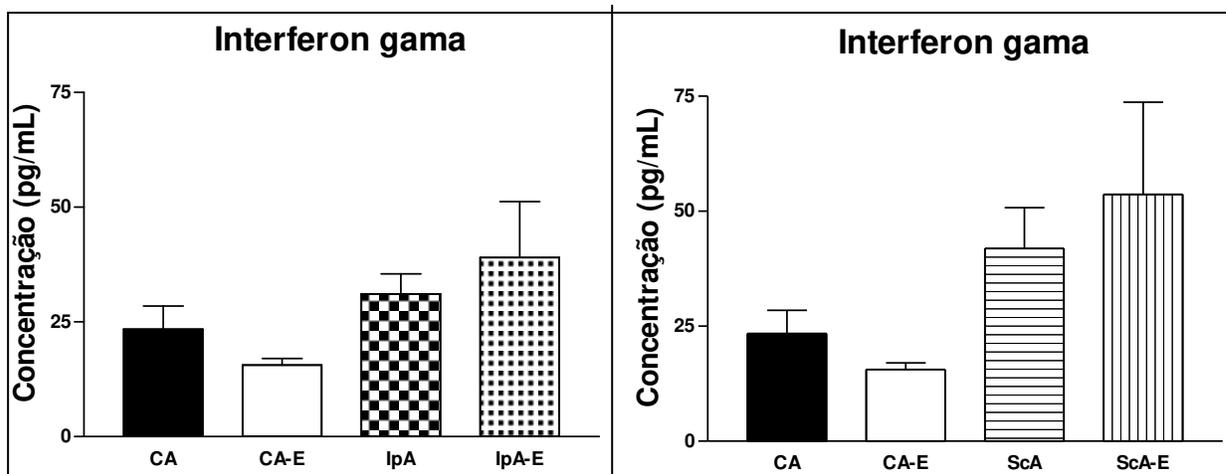


Figura 27. Concentração de interferon-gama no soro nos animais adultos (n=6). **Legenda:** **CA** – controle adulto; **CA-E** – controle adulto tratado com EPA; **IpA** – grupo intraperitônio adulto; **IpA-E** – grupo intraperitônio adulto tratado com EPA; **ScA** - grupo subcutâneo; **ScA-E** – subcutâneo adulto tratado com EPA.

7.1. Modulação da resposta inflamatória pelo EPA, nos animais adultos

Embora não haja diferença estatística do peso relativo do baço quando comparamos os grupos tratados com EPA com os grupos não tratados (Tabela 1), houve tendência de redução do peso desse órgão no grupo subcutâneo tratado (ScA-E) em relação ao grupo não tratado (ScA), mostrando pequena resposta modulatória do EPA nesse parâmetro.

O EPA também não modificou significativamente a concentração sérica de nenhuma das citocinas avaliadas (Figuras 24 a 27). Entretanto, o grupo subcutâneo tratado com EPA (ScA-E), apresentou tendência de aumento na concentração das citocinas IL-4, IL-6 e IFN γ e tendência de redução na concentração da IL-10 quando comparado ao grupo não tratado (ScA). Além disso, houve tendência de aumento da concentração do IFN γ no grupo intraperitônio tratado com EPA (IpA-E) quando comparado ao IpA, enquanto que no CA-E essa citocina apresentou-se ligeiramente reduzida em relação ao CA. Esses resultados sugerem que o tratamento com EPA não foi eficiente na modulação da resposta inflamatória crônica, observada no processo de caquexia, nos animais adultos, divergindo de dados da literatura que mostram o elevado potencial antiinflamatório dos ácidos graxos ômega-3 (WALL *et al.*, 2010).

8. Concentração de citocinas pró e antiinflamatórias, em resposta a evolução do tumor de Walker 256 nos grupos jovens

Como já descrito para os grupos adultos, fizemos também para os grupos jovens a análise das concentrações séricas de citocinas pró e antiinflamatórias, correlacionando-as com o principal órgão, o baço, relacionado à resposta inflamatória e responsivo à evolução neoplásica. Assim, analisamos também o peso relativo do baço nos animais jovens, uma vez que, na tentativa de minimizar o processo inflamatório decorrente da caquexia, esse órgão pode apresentar aumento de seu peso absoluto e relativo nos grupos com tumor. Através da análise morfométrica, observamos que os grupos inoculados no subcutâneo apresentaram elevação significativa do peso relativo desse órgão (ScJ=55,6% e ScJ-E=97,2%) quando comparados ao grupo controle subcutâneo (CScJ) (Tabela 2). Similarmente aos animais adultos, nos jovens implantados com tumor intraperitônio também não foi observada variação do peso relativo desse órgão em relação aos controles (CIpJ e CIpJ-E) (Tabela 2), sugerindo que em função do rápido período de evolução dessa neplasia as respostas do hospedeiro são distintas daquelas que ocorrem durante o longo período de evolução tumoral (Implante intraperitônio versus implante subcutâneo).

Em relação à concentração da interleucina 4, não observamos diferença estatística dessa citocina antiinflamatória, entre os grupos controles e os grupos com tumor, embora haja tendência de aumento de sua concentração nos grupos com tumor tratados com EPA (IpJ-E e ScJ-E), enquanto que os grupos com tumor não tratados (IpJ e ScJ) apresentaram tendência de redução na concentração da IL-4 (Figura 28) em relação aos respectivos controles.

A citocina antiinflamatória IL-10, como mencionado acima, está relacionada ao processo inflamatório crônico, no processo caquexia-câncer (LIRA *et al.*, 2009), e no presente estudo apresentou-se aumentada significativamente apenas no grupo inoculado com tumor intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E) quando comparado ao grupo controle (CIpJ), enquanto que o grupo correspondente sem tratamento (IpJ) apresentou tendência de aumento da concentração de IL-10 (Figura 29). O perfil sérico da IL-10 também tendeu a ser elevado nos grupos implantados com tumor no subcutâneo (ScJ e ScJ-E), quando comparados ao respectivo controle (Figura 29).

Houve aumento significativo da concentração da citocina pró-inflamatória IL-6, no grupo inoculado com tumor intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E), enquanto que o grupo correspondente sem tratamento (IpJ) apresentou discreta tendência de aumento, quando comparados ao controle ClpJ (Figura 30). Os grupos controle tratado com EPA (CScJ-E) e implantado com tumor no subcutâneo não tratado (ScJ) apresentaram tendência de redução na concentração dessa citocina quando comparados ao controle (CScJ-E, Figura 30).

Nos grupos jovens inoculados no peritônio, observamos aumento da concentração da citocina interferon-gama, sendo que esse aumento foi significativo apenas no grupo intraperitônio não tratado (IpJ), quando comparado ao controle (ClpJ) (Figura 31). Nos grupos com tumor inoculados no subcutâneo, observamos tendência de aumento do interferon-gama quando comparados ao controle (CScJ (Figura 31).

Embora em alguns resultados tenhamos tendência de aumento das citocinas pró e antiinflamatórias nos grupos portadores de tumor, verificamos que o local de implante tumoral foi determinante para distintas respostas quanto aos fatores humorais e adaptações teciduais à intensa evolução dessa neoplasia – tumor de Walker 256, bastante estudado no mecanismo de caquexia.

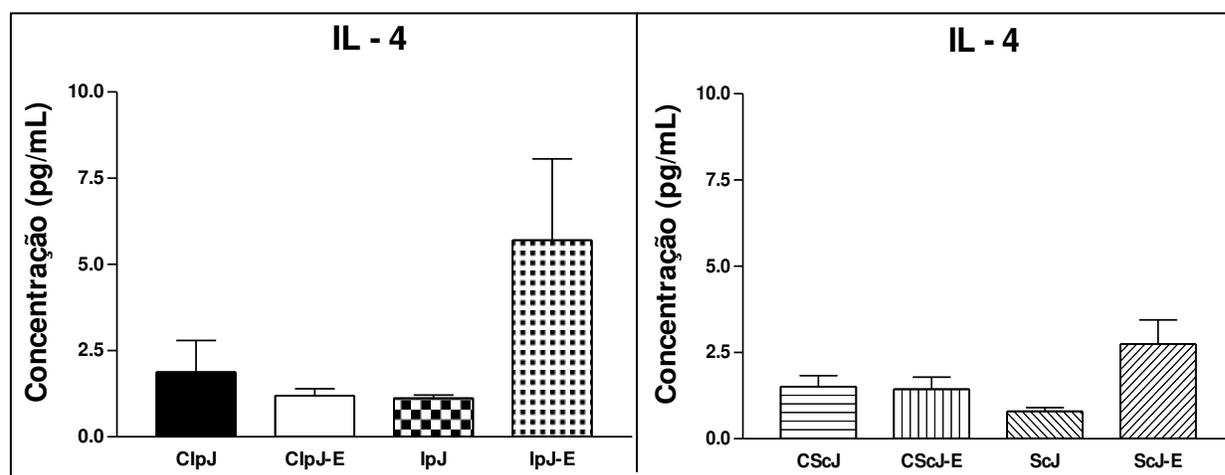


Figura 28. Concentração de IL-4 no soro nos animais jovens (n=6). **Legenda:** ClpJ – grupo controle intraperitônio jovem; ClpJ-E – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; IpJ – grupo intraperitônio jovem; IpJ-E – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; CScJ – controle subcutâneos jovem; CScJ-E – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; ScJ – grupo subcutâneo jovem; ScJ-E – subcutâneo jovem tratado com EPA. * P<0,05 quando comparado ao ScJ.

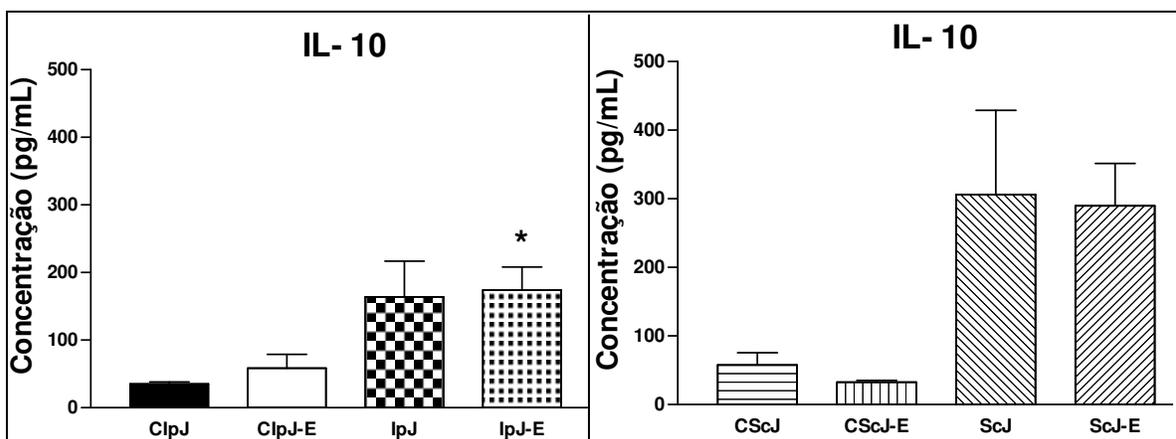


Figura 29. Concentração da interleucina-10 no soro dos ratos jovens (n=6). **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle.

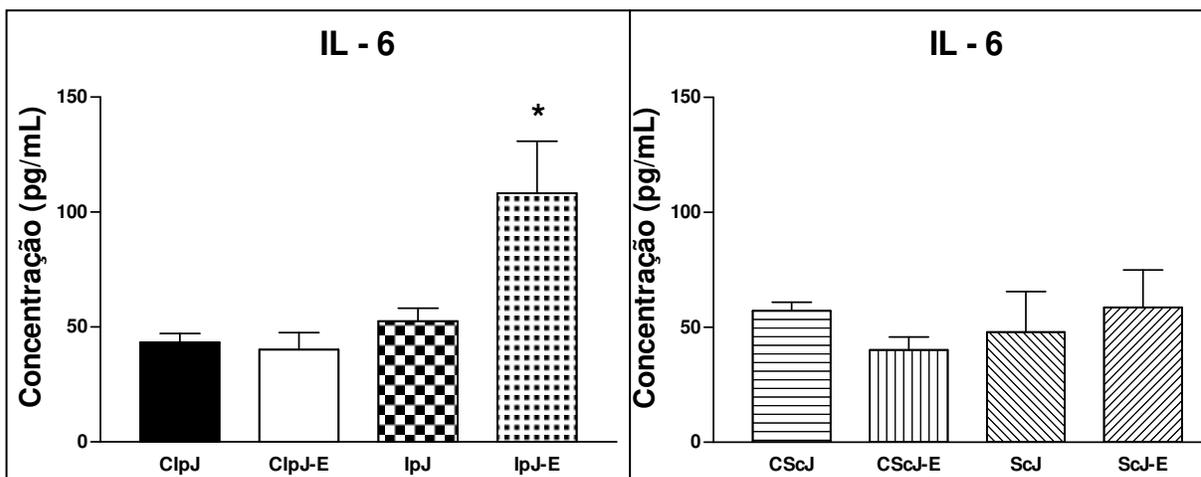


Figura 30. Concentração de IL-6 no soro dos animais jovens (n=6). **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * = diferença significativa quando comparado ao controle.

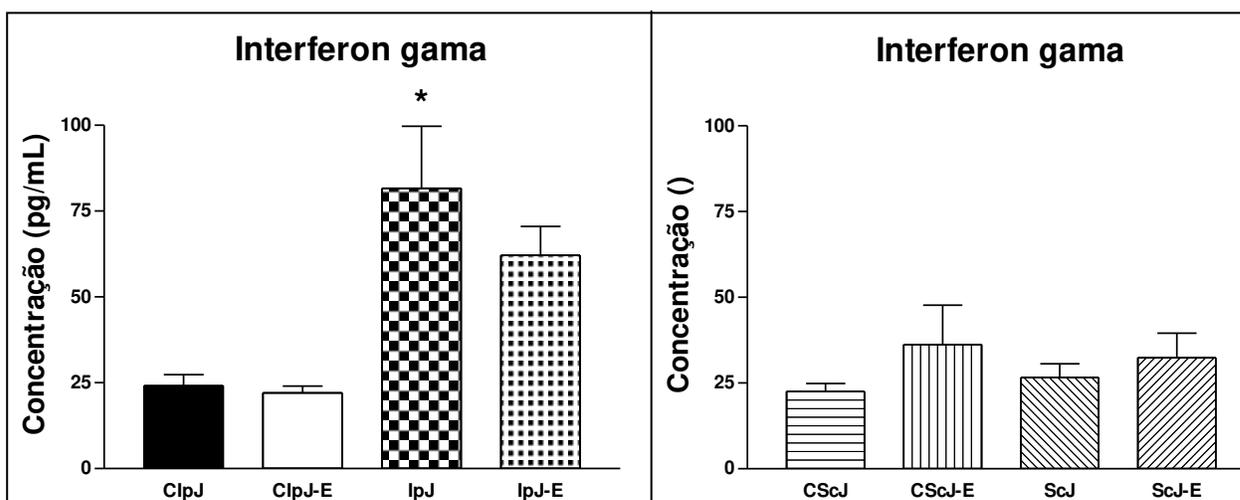


Figura 31. Concentração sérica de INF- γ nos animais jovens (n=6). **Legenda:** **ClpJ** – grupo controle intraperitônio jovem; **ClpJ-E** – grupo controle intraperitônio jovem tratado com EPA; **IpJ** – grupo intraperitônio jovem; **IpJ-E** – grupo intraperitônio jovem tratado com EPA; **CScJ** – controle subcutâneos jovem; **CScJ-E** – controle subcutâneo jovem tratado com EPA; **ScJ** – grupo subcutâneo jovem; **ScJ-E** – subcutâneo jovem tratado com EPA. * $P < 0,05$ diferença significativa quando comparado ao controle.

8.1. Modulação da resposta inflamatória pelo EPA, nos animais jovens

Embora não tenhamos observado diferença estatística no peso relativo do baço quando comparados os grupos tratados com EPA em relação aos grupos não tratados (Tabela 2), verificamos que, houve tendência de aumento do peso relativo do baço no grupo subcutâneo tratado (ScJ-E) quando comparado ao grupo não tratado (ScJ). Desse modo, supomos que o EPA, como relatado na literatura, tenha atuado de forma positiva na estimulação da resposta imunológica, aumentando o peso absoluto e relativo do baço, nesses animais tratados.

A concentração da citocina antiinflamatória IL-4 aumentou significativamente no grupo subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) quando comparado ao não tratado (ScJ), mostrando que o EPA pode estar modulando a produção dessa citocina em resposta à inoculação do tumor de Walker 256 (Figura 28). Além disso, houve tendência de aumento da concentração de IL-4 no grupo intraperitônio quando tratado com EPA (IpJ-E) em relação ao grupo não tratado (IpJ, Figura 28). Esse dado sugere a possível modulação do EPA sobre o sistema imunológico também

nesses animais com tumor, mostrando que a resposta modulatória pode ser de forma distinta em relação à evolução tumoral.

A concentração da interleucina 10, outra citocina antiinflamatória, não apresentou diferenças estatísticas em resposta ao tratamento com EPA em nenhum dos grupos experimentais (Figura 29). Embora tenhamos observado tendência de aumento dessa citocina no grupo controle intraperitônio tratado (ClpJ-E) em relação ao grupo não tratado (ClpJ) e tendência de redução no grupo subcutâneo tratado (CScJ-E) em relação ao não tratado (CScJ; Figura 29).

Quanto às citocinas pró-inflamatórias, tanto IL-6 quanto IFN γ , avaliadas no presente estudo, pudemos observar que o efeito do tratamento com EPA também foi distinto. O grupo intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E) apresentou aumento significativo da interleucina 6 quando comparado ao grupo não tratado (IpJ) (Figura 30). O grupo controle subcutâneo tratado (CScJ-E) apresentou redução significativa da concentração dessa citocina em relação ao grupo não tratado (CScJ; Figura 30). Além disso, houve tendência de aumento da concentração de IL-6 no grupo implantado com tumor no subcutâneo tratado com EPA (ScJ-E) quando comparado ao ScJ (Figura 30).

Novamente, não observamos diferença estatística da concentração do interferon-gama em resposta ao tratamento com EPA, entretanto, pudemos observar tendência de redução na concentração dessa citocina no grupo intraperitônio tratado com EPA (IpJ-E) quando comparado ao grupo não tratado (IpJ), mostrando discreta modulação do EPA sobre a síntese de interferon-gama, citocina pró-inflamatória (Figura 31). Em contrapartida, os grupos subcutâneo controle (CScJ-E) e subcutâneo tratado (ScJ-E) apresentaram tendência de elevação do interferon-gama em relação aos grupos não tratados (CScJ e ScJ, respectivamente) (Figura 31), sugerindo-nos que em determinadas condições pode ocorrer modulação distinta do sistema imunológico em função ou não do tratamento com o ácido eicosapentaenóico e, principalmente, dependendo do tempo de evolução tumoral.

Em suma, considerando-se todos os resultados aqui apresentados, verificou-se que a evolução tumoral promoveu alterações do peso corpóreo, juntamente com o peso relativo de determinados órgãos, mostrando que no organismo jovem o tumor apresentou efeitos bastante severos, principalmente, quando o implante tumoral foi na região do peritônio, como sobrevida, peso das adrenais, músculo gastrocnêmio, perda de peso da carcaça, além do crescimento tumoral e das variações hormonais e de citocinas, em relação aos parâmetros verificados nos adultos.

Verificamos também que os efeitos do crescimento tumoral sobre determinados parâmetros foram modulados quando houve administração do EPA. Por exemplo, o aumento do peso relativo do baço, nos animais inoculados com tumor e tratados com EPA, pode estar relacionado ao fato desse fármaco atuar sobre o sistema imunológico do hospedeiro, aumentando o provimento de células T, associado à variação da concentração das citocinas (aumento da IL-4, principalmente nos animais inoculados com tumor no subcutâneo, correspondendo ao processo de evolução tumoral por período mais longo), modulando o processo inflamatório crônico (CHAPKIN *et al.*, 2009). Esse fato também pode estar associado ao perfil de citocina IL-10, que também apresentou concentrações proporcionalmente mais elevadas nos animais com implante subcutâneo em relação a aqueles com implante no peritônio, corroborando os aspectos de processo inflamatório crônico característico da caquexia (ARGILÉS *et al.*, 2009; LIRA *et al.*, 2009).

Além disso, a maior sobrecarga da liberação de glicocorticóides, sugerindo intenso processo de estresse imposto pelo crescimento tumoral e pelo tratamento a que foram submetidos, promoveu aumento do peso relativo das adrenais nos animais com tumor, independente da idade do animal, local de implante tumoral ou tratamento a que foram submetidos. Contrariando dados da literatura que mostram que o EPA tem função na preservação do tecido adiposo, houve grande espoliação desse tecido nos animais ScJ-E e ScA-E, de modo similar ou ainda mais pronunciado que os outros grupos portadores de tumor, jovem ou adultos (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003). A redução no peso relativo muscular foi menor nos animais tratados com EPA do que nos animais não tratados, corroborando os resultados da literatura que indicam que o EPA protege o tecido muscular contra a espoliação induzida pela evolução tumoral.

A evolução tumoral quando acontece em um período mais curto, caso do implante intraperitônio, deve promover a ativação de outros mecanismos de degradação protéica, pois observamos menor atividade enzimática da *chymotrypsin-like* nesses grupos quando comparados ao implante subcutâneo, independente da idade do hospedeiro e com tendência de modulação pelo tratamento com EPA. Já a evolução tumoral por período mais longo, observada nos animais implantados no subcutâneo, promove grande ativação do sistema ubiquitina-proteossomo, observada através da atividade da *chymotrypsin-like*, sendo mais expressiva nos animais adultos e havendo modulação dessa via de degradação nos animais adultos tratados com EPA (PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2008; PERTILE & GOMES-MARCONDES, 2010). Já as outras vias de degradação protéica, como na dependente de cálcio, observamos tendência ao aumento, principalmente nos grupos implantados com tumor no peritônio, sugerindo novamente mecanismos distintos de ativação das vias de proteólise tanto nos animais jovens como nos adultos, sendo a atividade enzimática da calpaína mais intensa nos jovens do que nos adultos. Além disso, a via de degradação lisossomal também foi distinta entre jovens e adultos, principalmente para a catepsina B, onde houve maior intensidade nos animais implantados com tumor no subcutâneo, mostrando que há participação da via lisossomal no processo de proteólise muscular nos jovens em relação aos animais adultos. Por outro lado, a catepsina H também mostrou-se ativada nos animais jovens implantados com tumor no subcutâneo, com tendência a modulação pelo tratamento com EPA. Entretanto, nos animais adultos o implante subcutâneo, principalmente associado ao tratamento com EPA, promoveu ativação do sistema de degradação lisossomal. Assim, analisando as subunidades proteossômicas (PC2, PC5 e 20S), observamos que o implante tumoral intraperitônio, que apresenta evolução por período mais curto, promoveu a degradação protéica através de outras vias de degradação (calpaína e catepsinas B e H), assim como observamos na atividade da *chymotrypsin-like*, pois esses animais não apresentaram aumento expressivo das subunidades envolvidas na via de degradação ubiquitina-proteossomo. Já nos animais com implante tumoral subcutâneo, que apresentam evolução tumoral por período mais longo, a principal via de degradação protéica, provavelmente, foi a via ubiquitina-proteossomo, uma vez que a expressão das

subunidades proteossômicas, assim como a atividade enzimática da *chymotrypsin-like*, apresentou-se mais aumentada nesses grupos experimentais. Ressalta-se, então, que nos animais jovens, o mecanismo imposto pelo desenvolvimento tumoral causou ativação do sistema de degradação protéica diferentemente, dependendo o local de implante tumoral e também em função do tratamento a que foram submetidos, tratados ou não com EPA, que de acordo com a literatura, modularia os processos de proteólise, melhorando assim o estado caquético do animal (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003). No presente trabalho, os mecanismos envolvidos nos processos de proteólise foram, de certa forma, alterados pelo tratamento com EPA, sendo que em determinados situações, como atividade da *chymotrypsin-like*, calpaína e catepsina H, houve efeito benéfico do tratamento.

Verificamos que os animais jovens, não portadores de tumor, que encontravam-se em pleno crescimento, apresentaram elevada concentração de IGF-1 (DUPONT & ROITH, 2001; COCHILLO *et al.*, 2007) . Por outro lado, os efeitos do tumor induziram a expressiva redução da concentração de IGF-1, relacionando aos efeitos de depleção da musculatura esquelética, que, provavelmente, estava acontecendo nos diferentes grupos experimentais desse trabalho, estando diretamente associado ao processo de caquexia.

Dados encontrados para as interleucinas 4 e 10, citocinas antiinflamatórias, sugerem possível modulação do EPA sobre o sistema imunológico dos animais com tumor, entretanto, apesar das citocinas pró-inflamatórias, interleucina 6 e IFN γ , também estarem aumentadas nesses animais tratados, provavelmente houve modulação a partir do tratamento com EPA, uma vez que, esses animais também encontravam-se em processo inflamatório crônico devido ao processo de caquexia. Para alguns parâmetros, pudemos correlacionar o efeito protetor do EPA sobre os efeitos deletérios do tumor, como por exemplo menor espoliação de proteína (conteúdo de proteína e peso muscular semelhante ao controle; elevação da atividade da fosfatase alcalina; menor peso relativo do tumor nos adultos inoculados no peritônio).

Os hospedeiros adultos com implante intraperitônio não apresentaram inibição do processo de síntese, quanto à avaliação, pelo menos parcial, dos fatores de iniciação eucaritóticos. Sendo que o tratamento com EPA provavelmente modulou positivamente

o processo de síntese (aumentando a relação da expressão dos fatores eucarióticos (razão eIF4G/eIF4EBP1 e eIF2/eIF5)). Nos animais adultos com implante subcutâneo houve modulação negativa do processo de síntese, independente do tratamento ou não com EPA. Esses dados contrapõem aqueles verificados na literatura em que o ácido eicosapentaenóico age modulando a atuação de citocinas e também de fatores como o fator nuclear κ B (NF κ B), favorecendo o processo de síntese protéica e minimizando o processo de degradação (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003; ZHAO *et al.*, 2004). A evolução tumoral nos hospedeiros jovens implicou em modulação negativa do processo de síntese, independente do local de implante tumoral e do tratamento ou não com EPA, em relação aos respectivos controles, já que o aumento bastante expressivo da proteína reguladora do processo de formação da unidade ribossomal 80S, o fator eucariótico 4EBP1, supera em muito as relações entre os outros fatores eucarióticos que estimulariam a síntese protéica. Esses dados levam mais a suposição de que o tratamento com EPA ou a idade do hospedeiro seria determinante para as respostas aos efeitos deletérios da evolução tumoral.

CONCLUSÕES

A influência do crescimento tumoral sobre o hospedeiro de câncer relaciona-se muitas vezes com o processo de evolução da neoplasia e também com fatores que possam modular os processos de sinalização celular. Assim, concluímos que:

1. A evolução do tumor quando ocorre em período mais curto – implante intraperitoneal – promove ativação de mecanismos distintos de degradação protéica, em função da menor ativação da *chymotrypsin-like* e da expressão das subunidades proteossômicas, com tendência de modulação pelo tratamento com EPA;
2. A evolução do crescimento tumoral em período mais longo, visto nos animais com implante subcutâneo, promove ativação principalmente do sistema ubiquitina-proteossomo;

3. Os hospedeiros adultos com implante intraperitônio não apresentaram inibição do processo de síntese, quanto à avaliação, pelo menos parcial, dos fatores de iniciação eucarióticos. Sendo que o tratamento com EPA provavelmente modulou positivamente o processo de síntese, pois aumentou a relação da expressão dos fatores eucarióticos (razão eIF4G/eIF4EBP1 e eIF2/eIF5);
4. Nos animais adultos com implante subcutâneo houve modulação negativa do processo de síntese, independente do tratamento ou não com EPA;
5. O crescimento tumoral em hospedeiros jovens implicou em modulação negativa do processo de síntese, independente do local de implante tumoral e do tratamento ou não com EPA, em relação aos respectivos controles;
6. A evolução tumoral nos grupos adultos e jovens promoveu alterações nas concentrações das citocinas pró e antiinflamatórias, sendo que houve tendência de aumento tanto das citocinas antiinflamatória quanto das pró-inflamatórias, sugerindo que a evolução tumoral promove resposta inflamatória crônica. Porém, o EPA não modificou significativamente a concentração sérica de nenhuma das citocinas avaliadas nos grupos adultos, sugerindo que o tratamento com EPA não foi eficiente na modulação da resposta inflamatória crônica nesses animais. Já nos grupos jovens, o EPA promoveu maior síntese de IL-4, sugerindo em determinadas condições pode ocorrer modulação distinta do sistema imunológico em função ou não do tratamento com o ácido eicosapentaenóico e, principalmente, dependendo do tempo de evolução tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Adams G.R. *Insulin-Like Growth Factor I Signaling in Skeletal Muscle and the Potential for Cytokine Interactions*. **Med. Sci. Sports Exerc.** **42(1)**: 50-57, 2010;
2. Adams J. *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. **Cancer Treatment Reviews** **29 (1 Suppl)**: 3-9, 2003;
3. Alberts, B. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004;
4. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. *The role of cytokines in cancer cachexia*. **Curr Opin Support Palliat Care.** **3(4)**: 263-268, 2009;
5. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. *Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia*. **Curr Opin Support Palliat Care.****1(4)**: 293-298, 2007;
6. Argilés JM, Busquets S, Felipe A, López-Soriano FJ. *Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** **37**:1084–1104, 2005;
7. Baeurele PA, Baltimore D. *NF- κ B: ten years after*. **Cell** **87**: 13–20, 1996;
8. Baracos VE, Mackenzie ML. *Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer*. **J Nutr.** **136(1 Suppl)**: 237S-42S, 2006;
9. Barrett AJ. *Fluorimetric assays for Cathepsin B and Cathepsin H with Methylcoumarylamide substrates*. **Biochem. J** **187**: 909-912, 1980;
10. Baugh, JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. *Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination*. **J. Mol. Biol.** **386(3)**: 814-827, 2009;
11. Béchet D, Tassa A, Combaret L, Taillandier D, Attaix D. *Regulation of skeletal muscle proteolysis by amino acids*. **J Renal Nut** **15(1)**: 18-22, 2005b;
12. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. *Lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. **Int J Biochem Cell Biol.** **37(10)**: 2098-2114, 2005a;
13. Beck SA, Smith KL, Tisdale MJ. *Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover*. **Cancer Res** **51**: 6089–6093; 1991;

14. Belcastro AN, Albisser TA, Littlejohn B. *Role of calcium-activated neutral protease (calpain) with diet and exercise.* **Can J Appl Physiol** **21(5)**: 328–346, 1996;
15. Belizario JE, Katz E, Chenker E, Raw I. *Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factors in the plasma proteins from cancer patients with weight loss.* **Br J Cancer** **63(5)**: 705-10, 1991;
16. Bossola M, Pacelli F, Tortorelli A, Doglietto GB. *Cancer Cachexia: It's Time for More Clinical Trials.* **Ann Surg Oncol.** **9**; 2006;
17. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.* **Anal Biochem**, **72**:248-254, 1976;
18. Brennan AM, Mantzoros CS. *Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology-emerging clinical application.* **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.** **2(6)**: 318–27, 2006;
19. Calhau C, Hipolito-Reis C, Azevedo I. *Alkaline phosphatase and exchange surfaces.* **Clin Biochem** **32(2)**: 153–154, 1999;
20. Camps C, Iranzo V, Bremnes RM, Sirera R. *Anorexia-Cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway.* **Support Care Cancer.** **14(12)**:1173-83, 2006;
21. Chapkin RS, Kima W, Luptona JR, McMurraya DN. *Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation.* **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** **81(2-3)**: 187–191, 2009;
22. Cochillo M, Prieto J, Quiroga J. *Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis.* **Rev Esp Enferm Dig** **99 (3)**:156-164, 2007;
23. Colomer R, Moreno-Nogueira JM, García-Luna PP, García-Peris P, García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, Quecedo L, Llano J, Usán L, Casimiro C. *n-3 Fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature.* **British Journal of Nutrition** **97**: 823–831, 2007;
24. Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, Marinkovich MP, Tao S, Lin Q, Kubo Y, Khavari PA. *NF- κ B blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia.* **Nature** **421**: 639–643; 2003;

25. Dupont J, Roith DL. *Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects.* **J Clin Pathol:Mol Pathol** **54**: 149-154, 2001
26. Eden E, Ekman L, Bennegard K, Lindmark L and Lundholm K. *Whole body tyrosine flux in relation to energy expenditure in weight-losing cancer patients.* **Metabolism** **33**: 1020–1027, 1984;
27. Eley HL, Tisdale MJ. *Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation.* **J Biol Chem.** **282(10)**: 7087-97, 2007;
28. Emery PW. *Cachexia in experimental models.* **Nutrition** **15(7-8)**: 600–603, 1999;
29. Fantuzzi G, Faggioni R. *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis.* **J. Leukoc. Biol.** **68(4)**: 437–446, 2000;
30. Fearon KCH, McMillan DC, Preston T, Winstanley FP, Cruickshank AM and Shenkin A. *Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer.* **Ann Surg** **213**: 26–31, 1991;
31. Fearon KC, Voss AC, Hustead DS; Cancer Cachexia Study Group. *Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis.* **Am J Clin Nutr.** **83(6)**:1345-50, 2006;
32. Gad SC & Weil CS: *Statistic for toxicologists.* In: Wallace H (editor), Principles and Methods of toxicology. Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994;
33. Gomes-Marcondes MC, Honma HN, Areas MA, Cury L. *Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats.* **Braz J Med Biol Res.** **31(10)**:1345-8, 1998;
34. Gomes-Marcondes MC 2003, Smith HJ, Cooper JC, Tisdale MJ. *Development of an in-vitro model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor.* **Br J Cancer** **20;86(10)**:1628-33, 2002;
35. Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. *Induction of protein catabolism and the ubiquitin proteasome pathway by mild oxidative stress.* **Cancer Lett.** **6;180(1)**:69-74, 2002;

36. Gomes-Marcondes MC, Ventrucchi G, Toledo MT, Cury L, Cooper JC. *A leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats.* **Braz J Med Biol Res.** **36(11)**:1589-1594, 2003;
37. Gonçalves EM, Gomes-Marcondes MC. *Leucine affects the fibroblastic Vero cells stimulating the cell proliferation and modulating the proteolysis process.* **Amino Acids.** **38(1)**:145-153, 2010;
38. Jiang ST, Wang JH, Chang T, Chen CS. *A continuous method for measuring calpain activity.* **Analytical Biochemistry,** **244**: 233-238, 1997;
39. Khal J, Wyke SM, Russell ST, Hine AV, Tisdale MJ. *Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia.* **Br J. Cancer** **93(7)**: 774-780, 2005;
40. Khal J, Tisdale MJ. *Downregulation of muscle protein degradation in sepsis by eicosapentaenoic acid (EPA).* **Biochem Biophys Res Commun.** **375(2)**: 238-240, 2008;
41. Kimball SR. *Eukaryotic initiation factor eIF2.* **Int J Biochem Cell Biol.** **31(1)**: 25-29, 1999;
42. Langstein HN, Norton JA. *Mechanisms of cancer cachexia.* **Hematol Oncol Clin North Am.** **5(1)**:103-23, 1991;
43. Li Y-P, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. *Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumour necrosis factor α .* **FASEB J** **12**: 871–880, 1998;
44. Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr, Seelaender M. *Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise.* **Cell Biochem Funct.** **27(2)**: 71-75, 2009;
45. Lorite MJ, Cariuk P, Tisdale MJ. *Induction of muscle protein degradation by a tumour factor.* **Br J Cancer** **76**: 1035–1040; 1997;
46. Marks F, Klingmuller U, Muller-Decker K. *Mitogen activated protein kinase and nuclear factor κ B modules.* IN: *Cellular Signal Processing. An introduction to the molecular mechanisms of signal transduction.* Ed. Garland Science, cap 11, p389, 2009;

47. Martins MJ, Negrao MR & Hipolito-Reis. *C Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated*. **Clin Biochem** **34**: 463–468, 2001;
48. Matthys P, Billiau A. *Cytokines and cachexia*. **Nutrition**. **13(9)**:763-770, 1997;
49. Meadus WJ. *A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression*. **Biol Proced Online**, **5**:20-28, 2003;
50. Mota A, Silva P, Neves D, Lemos C, Calhau C, Torres D, Martel F, Fraga H, Ribeiro L, Alçada MN, Pinho MJ, Negrão MR, Pedrosa R, Guerreiro S, Guimarães JT, Azevedo I, Martins MJ. *Characterization of rat heart alkaline phosphatase isoenzymes and modulation of activity*. **Braz J Med Biol Res**. **41(7)**: 600-609, 2008;
51. Muszbek L, Laposata M. Covalent modification of proteins by arachidonate and eicosapentaenoate. **J Biol Chem** **268**: 18243–18248, 1993;
52. Orłowski M, Wilk S. *Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome*. **Arch Biochem Biophys**. **415(1)**: 1-5, 2003;
53. Pertile T, Gomes-Marcondes MCC. *Different tumoral evolution induces increase of proteolysis-inducing factor (PIF) and alteration of the proteolytic system activities in young tumor-bearing rats*. **Cytokine** **43**: 256, 2008;
54. Pertile T, Gomes-Marcondes MCC. *Tumoural growth evolution induces different muscle protein degradation*. **EJC Supplements** **8 (5)**: 191-192, 2010;
55. Proud CG. *eIF2 and the control of cell physiology*. **Seminars in Cell & Development Biology** **16**: 3-12, 2005;
56. Proud CG. *Regulation of protein synthesis by insulin*. **Biochemical Society Transactions** **34(2)**: 213-216, 2006;
57. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey J. *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet*. **J. Nutr.** **123**: 1939-1951, 1993;
58. Smith HJ, Tisdale MJ. *Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes*. **Br J Cancer** **89(9)**:1783-8, 2003;
59. Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, Fischer JE. *Effects of increased beta 2-agonist dose in tumor-bearing animals*. **Nutr Cancer** **20(3)**:251-60, 1993;

60. Stouthard JM, Romijn JA, Van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJ, Veenhof CH, Sauerwein HP. *Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans*. **Am J Physiol.** **268(5 Pt 1)**: E813-9, 1995;
61. Suárez-Mahecha H, Francisco A, Beirão LH, Block JM, Saccol A, Pardo-Carrasco S. *Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana*. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, **28(1)**: 101 - 110, 2002;
62. Tessitore L, Costelli P, Baccino FM. *Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats*. **Br. J. Cancer** **67**: 15-23, 1993;
63. Tisdale MJ. *Cancer Cachexia: metabolic alteration and clinical manifestations*. **Nutrition** **13(1)**: 1-7, 1997;
64. Tisdale MJ. *Wasting in cancer*. **J Nutr.** **129(1S Suppl)**: 243S-246S, 1999;
65. Tisdale MJ. *Cachexia in cancer patients*. **Nat Rev Cancer** **2(11)**:862-71, 2002;
66. Tisdale MJ. *The 'cancer cachectic factor'*. **Support Care Cancer** **11(2)**:73-8. 2003;
67. Tisdale MJ. *Cancer cachexia*. **Langenbecks Arch Surg** **389**: 299–305, 2004;
68. Tisdale MJ. *Molecular pathways leading to cancer cachexia*. **Physiology (Bethesda)** **20**: 340-8, 2005a;
69. Tisdale MJ. *The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting*. **J Support Oncol.** **3(3)**: 209-17, 2005b;
70. Tisdale MJ. *Mechanisms of cancer cachexia*. **Physiol Rev** **89(2)**: 381-410, 2009;
71. Tisdale MJ. *Cancer cachexia*. **Curr Opin Gastroenterol.** **26(2)**:146-151, 2010;
72. Todorov PT, McDevitt TM, Cariuk P, Coles B, Deacon M, Tisdale MJ. *Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product*. **Cancer Res.** **56(6)**: 1256-61, 1996;
73. Vale C, Stewart L, Tierney J, UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer. *Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials*. **Br. J. Cancer.** **92(5)**:811-814, 2005;
74. Ventrucchi G, Mello MAR, Gomes-Marcondes MCC. *Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats a leucine-rich diet*. **Endocrine-Related Cancer** **11**: 887–895, 2004;

75. Ventrucchi G, Mello MAR, Gomes-Marcondes MCC. *Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats.* **BMC Cancer 7:** 42, 2007;
76. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. *Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids.* **Nutr Rev. 68(5):** 280-289, 2010;
77. Watchorn TM, Waddell ID, Dowidar N, Ross JA. *Proteolysis inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF- κ B and STAT3.* **FASEB J 15:** 562–564; 2001;
78. Whitehouse AS, Smith HJ, Drake JL, Tisdale MJ. *Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid.* **Cancer Res 61:** 3604–3609; 2001;
79. Whitehouse As, Tisdale MJ. *Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B.* **Br. J.Cancer, 89:** 1116-1122, 2003;
80. Wyke Sm, Russell ST, Tisdale MJ. *Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation.* **Br J Cancer 91(9):**1742-50, 2004;
81. Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. *Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation.* **J Am Coll Nutr. 23(1):** 71-78, 2004.