

Alessandra Archilha Vido

**Estudo do componente hemolítico da anemia do
câncer: efeito do estresse osmótico e metabólico
nos eritrócitos de ratos portadores de tumor de
Walker 256**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Alessandra Archilha Vido
e aprovada pela Comissão Julgadora
30/11/2000 T.C. Cavalcanti

Tese apresentada ao Curso de Biologia
Funcional e Molecular do Instituto de
Biologia/UNICAMP para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e Molecular na
área de Bioquímica.

Orientadora:

Profa. Dra. Tereza Cristina Samico Cavalcanti

CAMPINAS
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE



UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
V.669e	
V.	Ex.
TOMBO BC/	43819
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	20/02/01
N.º CPD	

CM-00153676-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

V669e Vido, Alessandra Archilha.

Estudo do componente hemolítico da anemia do câncer : efeito do estresse osmótico e metabólico nos eritrócitos de ratos portadores de tumor de Walker 256 / Alessandra Archilha Vido. -- Campinas, SP : [s.n.], 2000. 87f. : il.

Orientadora: Tereza Cristina Samico Cavalcanti.

Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer - Anemia. 2. Efeitos sistêmicos. 3. Glicose - Consumo.
4. Tumor de Walker 256. I. Cavalcanti, Tereza Cristina Samico.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

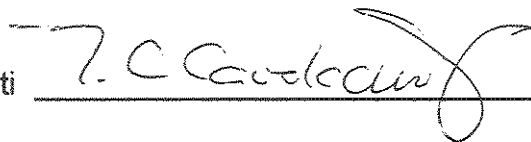
DATA: Campinas, 30 de Novembro de 2000.

BANCA EXAMINADORA:

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Profa. Dra. Tereza Cristina Samico Cavalcanti

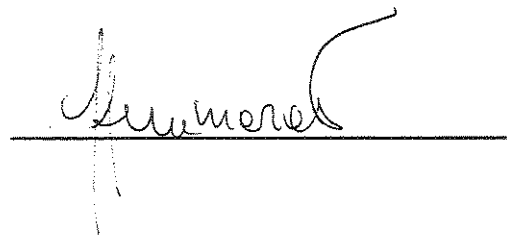
(Orientadora)



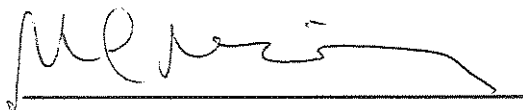
Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé



Prof. Dr. Fernando Guimarães



Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***"A coisa mais bonita que podemos
experimentalizar é o mistério. Ele é a fonte de toda a
verdadeira arte e da ciência".***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, confiança e incentivo que sempre depositaram em mim.

À Dra. Tereza Cristina Samico Cavalcanti pela amizade, incentivo, ensinamentos e por sempre exigir o melhor ao longo deste trabalho.

À Dra. Nilce Correa Meirelles, Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé e Dr. Fernando Guimarães pelas sugestões na pré-banca.

À Dra. Ana Neuza Vieira Matos e ao Dr. Ovídio Rettori pelo acompanhamento do projeto e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Sr. Amilton Garcia, pela amizade, apoio, lavagem de vidrarias e cuidado dos animais.

Ao Luiz Carlos Borges da Silva, supervisor do setor de diagnóstico do Laboratório de Citopatologia CAISM/UNICAMP, pelo uso do computador.

À Claudia, Paulino, Dulcinéia, Bia, Sílvia, Dani, Fer, Alex e Marilda grandes amigos, pelos "bate-papos" e desabafos.

Ao Cláudio pelo apoio e compreensão ao longo destes anos.

À Andréia, Marina e Míriam, secretárias do Departamento Bioquímica/IB/UNICAMP, pela colaboração ao longo destes anos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

vi

	Pag
Abreviaturas	x
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Resumo	xvi
1- Introdução	1
2 - Objetivos	7
3 - Material e Métodos	
3.1. Animais	7
3.2. Controle da ingestão alimentar e peso corporal	8
3.3. Manutenção da linhagem do tumor de Walker 256	8
3.4. Obtenção do inóculo das células de Walker 256	9
3.5. Administração das células tumorais de Walker 256	9
3.6. Grupos experimentais	9
3.6.1. Grupo controle dia zero	9
3.6.2. Grupo controle sob restrição alimentar	10
3.6.3. Grupo portador de tumor de Walker 256	10
3.6.4. Grupo doador de hemácias normais e plasma controle (PLc)	10
3.6.5. Grupo doador de plasma Walker 256 e líquido ascítico	10
3.7. Protocolo experimental	11
3.7.1. Coleta de sangue	11
3.7.2. Hemograma	12

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3.7.3. Determinação da concentração de hemoglobina	12
3.7.4. Estudo da fragilidade osmótica (F.O.)	12
3.7.4.1. Preparação da solução tampão (estoque) para o teste de F.O.	12
3.7.4.2. Teste de F.O. de hemácias de ratos	12
3.7.4.3. Meios de incubação das hemácias de rato	14
3.8. Determinação da glicose	15
3.8.1. Glicose plasmática	15
3.8.2. Consumo de glicose	15
3.8.3. Fundamento da reação da glicose oxidase	16
3.8.4. Procedimento da reação	16
3.8.5. Cálculo da concentração de glicose	17
3.8.6. Cálculo do consumo de glicose pelas hemácias	18
3.9. Determinação do conteúdo de ATP	19
3.9.1. Fundamento da reação	20
3.9.2. Procedimento da reação	20
3.9.3. Cálculo da concentração de ATP	21
3.10. Autópsia	22
3.11. Análises estatísticas	22
4 - Resultados	
4.1. Desenvolvimento dos tumores	23

4.2. Evolução da ingestão alimentar e peso corporal dos animais portadores de tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar	23
4.3. Evolução dos níveis de Hb no sangue (anemia)	26
4.4. Alteração da % FCM e do VCM (fL) das hemácias frescas de animais portadores de tumor de Walker 256 e de seus controles sob restrição alimentar	29
4.5. Resistência ao estresse metabólico das hemácias de ratos portadores de tumor de Walker 256	34
4.6. Busca de atividades capazes de alterar a F.O. das hemácias normais no plasma e líquido ascítico de ratos portadores de tumores	36
4.7. Consumo de glicose nas hemácias dos ratos controles e portadores de tumor	39
4.8. Conteúdo de ATP das hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256	40
4.9. Autópsias	41
5 – Discussão	
5.1. Desenvolvimento dos efeitos sistêmicos do tumor de Walker 256	41
5.2. Desenvolvimento da anemia	42
5.3. Alterações da F.O. de hemácias induzidas pelo tumor de Walker 256	43

5.4. Efeito do estresse metabólico sobre as hemácias de ratos portadores de tumor de Walker 256	45
5.5 Consumo de glicose e conteúdo de ATP das hemácias de animais portadores de tumor de Walker 256	47
6 - Conclusões	48
7- Summary	50
8 - Referências bibliográficas	52
9 - Anexo	59

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ABREVIATURAS

ADC= anemia de doenças crônicas

ATP= adenosina-5'- trifosfato

BSA= soro albumina bovina

C= animais controles

°C = graus centígrados

CP= período clínico

D.O.= densidade óptica

Δ = delta

D= densidade óptica da amostra testada

dL= decilitro

EDTA= ácido etilenodiaminotetracético

EP= erro padrão

F.O.= fragilidade osmótica

Fc= fator de correção

FCM= fragilidade corpuscular média

g= grama

g = gravidade

G= glicose

GAPD= gliceraldeído fosfato dehidrogenase

gCP= fase grave do período clínico

GOD= glicose oxidase

h= horas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Hb= hemoglobina

HCT= hematócrito

ip= intraperitoneal

KU= mil unidades

L= litro

LA= líquido ascítico

mCP= fase moderada do período clínico

Mg^{++} =íon magnésio

mg= miligrama

NaCl= cloreto de sódio

NAD^{+} = nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada

NADH= nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida

NaH_2PO_4 =fosfato de sódio monobásico

Na_2HPO_4 =fosfato de sódio dibásico

nm= nanômetro

P= padrão

%= percentagem

PGA= ácido pteroilglutâmico (ácido fólico)

PGK= fosfoglicerato fosfoquinase

PLA= plasma autólogo

PLc= plasma controle

PLw= plasma Walker 256

POD= peroxidase

RL= Ringer-lactato

sc= subcutânea

sCP= fase subclínica do período clínico

T= animais portadores de tumor

TCA= ácido tricloroacético

TRIS= tris[hidroximetil]aminometano

μ mol= micro mol

VCM= volume corpuscular médio

—

X= média

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	Título
1	25	Evolução da ingestão alimentar e peso corporal dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar.
2	27	Variação da concentração de Hb (g/dL) nos animais portadores de tumor de Walker 256 (4 inoculações sc) e controles submetidos a restrição alimentar.
3	28	Comparação entre a concentração de Hb dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar nos diferentes períodos da doença.
4	31	Comparação entre a variação da fragilidade osmótica das hemácias a fresco dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e de seus respectivos controles sob restrição alimentar.
5	32	Variação da FCM de hemácias de ratos portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar .
6	33	Variação do VCM (fL) das hemácias de ratos portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus controles sob restrição alimentar nos diferentes dias da doença.

Figura Página Título

7	35	Efeito do estresse metabólico da FCM das hemácias de animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus controles sob restrição alimentar após 4 horas de incubação em diferentes meios.
8	37	Efeito dos meios de incubação sobre hemácias de ratos normais submetidas a estresse metabólico.
9	39	Consumo de glicose das hemácias dos animais portadores de tumor 10 dias após a inoculação sc multifocal (4 inoculações) do tumor de Walker 256.
10	40	Variação no conteúdo de ATP ($\mu\text{mol/gHb}$) das hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256 quando comparado com os controles 10 dias após a inoculação sc e multifocal (4 inoculações) do tumor de Walker 256.

LISTA DE TABELAS

Tabelas Página Título

- | | | |
|---|----|--|
| 1 | 11 | Tempo de coleta de sangue após a inoculação das células tumorais ou placebo nos grupos de animais estudados. |
| 2 | 38 | Comparação estatística entre a FCM de hemácias de ratos normais submetidas a diferentes meios e tempos de incubação. |

RESUMO

A anemia do câncer é classificada como a anemia de doenças crônicas, embora às vezes seja o primeiro sintoma do câncer. Anemia do câncer inclui um componente hemolítico importante na fase terminal mesmo quando células transfundidas são destruídas rapidamente. A presença de um componente crônico e as complicações terminais da doença limita o estudo do componente hemolítico. O modelo multifocal (várias inoculações simultâneas de células tumorais de Walker 256) de crescimento tumoral foi usado aqui para simular a fase de disseminação metastática terminal. O componente hemolítico da anemia iniciou 3-4 dias após as inoculações em 100% dos ratos e após isto progrediu rapidamente: os níveis de Hb diminuíram de $14,9 \pm 0,02$ para $8,7 \pm 0,06$ g/dL entre os dias 7 e 11 (~ 5 vezes a taxa fisiológica normal em ratos) na ausência de hemorragia. O desenvolvimento de anemia foi correlacionado ($r^2=0,86$) com o desenvolvimento de outros efeitos sistêmicos como a anorexia. Houve um decréscimo significativo na fragilidade osmótica dos eritrócitos circulantes: a concentração de NaCl que causou 50% lise foi reduzida de $4,52 \pm 0,06$ para $4,10 \pm 0,01$ g/L ($P < 0,01$) no dia 7, indicando uma redução no volume dos eritrócitos. Porém, com moderado estresse metabólico (4h de incubação a 37°C), os eritrócitos mostraram um maior aumento na fragilidade osmótica que nos controles, sugerindo uma marcada alteração na homeostasia dos eritrócitos. Também foi observado aumento significativo na fragilidade osmótica das hemácias de ratos normais quando incubadas com o líquido ascítico (baixa

concentração de glicose e provavelmente alta de moléculas produzidas pelo tumor). Outros resultados significativos encontrados foram o aumento do consumo de glicose e conteúdo de ATP das hemácias dos animais portadores de tumor em relação aos controles. Estes efeitos podem ser devido a alterações primárias na membrana plasmática (transporte e/ou permeabilidade e/ou pode ser secundário às mudanças metabólicas). Este modelo multifocal é adequado para o estudo do componente hemolítico da anemia do câncer visto que ele é rápido, altamente reprodutível e causa sofrimento mínimo ao animal.

1. Introdução

O Brasil classifica-se entre os países com maior taxa de incidência de câncer em todo o mundo. Estima-se que ao longo de 1998 tenham sido diagnosticados, no país, 269.000 casos novos de neoplasias malignas sendo 140.705 (52,3%) em mulheres e 128.295 (47,7%) em homens (INCA, 1999).

Esta doença é caracterizada pela formação de uma população anormal de células, derivada de uma única célula normal, que cresce desordenadamente por escapar do controle de crescimento e supervisão da imunidade (WEINBERG, 1996).

O termo usado para indicar o desenvolvimento das neoplasias é carcinogênese, a qual pode ser induzida por agentes químicos, físicos, biológicos ou genéticos, apresentando três estágios de desenvolvimento bem caracterizados: iniciação, promoção e progressão (PITOT & DRAGAN, 1991).

Os tumores cancerígenos manifestam considerável complexidade estrutural e funcional, sendo a heterogenicidade a característica fundamental deste sistema biológico e o fator limitante para a compreensão do comportamento de neoplasias sólidas teciduais, nos níveis celular, genético e na resposta ao tratamento adjuvante (REW, 1998). Frequentemente os tumores sólidos são caracterizados por agressividade biológica, a qual se manifesta pela desregulação do crescimento celular, invasão e danos locais (obstrução), efeitos sistêmicos (anorexia, perda de peso, anemia, alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios), alterações funcionais sobre diversos órgãos, astenia,

hemorragia, hemólise e metástase (WARBURG,1956; THEOLOGIDES,1972; TOOMEY, et al.,1995; MOLITERNO & SPIVAK, 1996 e REW, 1998).

Com relação a anemia, vários mecanismos foram propostos para explicar seu desenvolvimento no câncer, como: diminuição da vida útil das hemácias, níveis inadequados de eritropoietina, reutilização defeituosa de ferro, perda de sangue intrínseca ou iatrogênica ou falência da medula óssea, dentre outros (TEMPLE & STUCKEY, 1986; SPIVACK, 1994 e MOLITERNO & SPIVAK, 1996). No câncer de humanos e de animais esta anemia, incluída entre as anemia de doenças crônicas (ADC), muitas vezes é o primeiro sintoma que indica o desenvolvimento da patologia (BODEY & FREI, 1974). Além disso, a destruição das hemácias na fase avançada do câncer não é revertida mesmo que os pacientes sejam transfundidos, chamando a atenção para a presença de um componente hemolítico importante e que não está bem caracterizado neste processo patológico (HYMAN, 1953; HYMAN & HARVEY, 1955 e ZUCKER, et al., 1977). Observações prévias realizadas no LPB/CAISM (dados não publicados de Vieira Matos e Rettori) e de outros laboratórios que utilizam o tumor de Walker 256 (ZUCKER et al.,1977 e GUAITANI et al., 1983) mostram o desenvolvimento de anemia em ratos portadores de tumor.

Este tumor espontâneo foi inicialmente observado por George Walker (1928) na região da glândula mamária de uma rata albina prenhe, o qual regredia totalmente durante o período de lactação mas voltava a crescer, rapidamente, após o desmame da prole. Naquela ocasião, foi classificado histologicamente como carcinoma e testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de fragmentos do tumor original crescerem em ratos recebedores

(EARLE, 1935). Uma outra característica é que a inoculação das células de Walker 256 por via subcutânea (sc) induz a formação de tumores inicialmente firmes a palpação, encapsulados e de forma arredondada, que ao longo de seu desenvolvimento podem infiltrar-se na pele e musculatura adjacente, sendo a disseminação metastática mais freqüente para os nódulos linfáticos regionais, periaórticos, retroperitoneais, inguinais e axilares (EARLE, 1935 e IWAMA et al., 1974).

No modelo experimental de Walker 256, após uma inoculação subcutânea de células tumorais tomadas a partir de uma mesma suspensão e administradas em um grupo homogêneo de ratos, observou-se uma grande variabilidade no tempo para que os hospedeiros manifestem os efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor. Como consequência, a evolução clínica de ratos portadores de tumor de Walker 256 (linhagem A) ocorre de modo não linear ou seja, com um período inicial de duração variável designado de subclínico (sCP), no qual o tumor cresce aparentemente sem causar qualquer distúrbio fisiopatológico no hospedeiro, passando subitamente para um período designado como clínico (CP), quando ocorriam mudanças rápidas e severas alterações homeostáticas que levavam o hospedeiro à morte (RETTORI et al., 1995). Ainda neste tipo de experimento, no qual uma única inoculação sc com células tumorais de Walker 256 foi utilizada, o desenvolvimento da anemia apresentou as características gerais de ADC (ZUCKER et al., 1977 e GUAITANI et al., 1982).

Por outro lado, a grande variabilidade observada no tempo de aparecimento dos efeitos sistêmicos em ratos com uma inoculação sc de células tumorais foi contornado através do modelo de múltiplas inoculações sc proposto

por RETTORI et al., 1995. Após a inoculação sc multifocal com células tumorais de Walker 256 foi observado a antecipação e sincronização do início (3 a 4 dias após inoculação) dos efeitos sistêmicos observada na fase final dos cânceres. Este modelo também possibilitou a observação que o período clínico (CP) apresentava duas fases importantes: a moderada (mCP) com progressão lenta da anorexia acompanhada por ganho de peso corpóreo, devido a retenção de fluidos e a fase grave (gCP) com perda rápida de apetite e decréscimo do peso corpóreo (RETTORI, et al., 1995 e GUIMARÃES, et al., 1999).

O modelo de inoculações multifocais faz com que os animais desenvolvam rapidamente a anemia, pois cerca de 20% das hemácias são destruídas diariamente por hemólise (RETTORI, et al., 1998). Este fato é semelhante ao que acontece com pacientes com diversos tipos de câncer como, por exemplo, linfomas e leucemias, que em sua fase avançada apresentam anemia importante decorrente de hemólise, visto que a medula óssea apresenta eritropoiese normoblástica e não se tem evidências laboratoriais ou clínicas de perda de sangue (HYMAN, 1953).

Um dos parâmetros importantes no estudo de qualquer tipo de anemia hemolítica é a fragilidade osmótica de hemácias que está baseado na resistência destas células à hipotonicidade e que reflete, alterações de volume induzidas por mudanças no metabolismo, deformabilidade, permeabilidade e/ou transporte de íons através da membrana plasmática (DACIE et al., 1984).

Alterações hereditárias de enzimas glicolíticas como a deficiência de piruvato quinase, é um exemplo de como mudanças primárias do metabolismo de células vermelhas podem induzir anemia associada à diminuição do volume

celular em hemácias frescas (diminuição da fragilidade) e após incubação por 24 h a 37 °C diminuição da resistência ao estresse metabólico (aumento da fragilidade osmótica) . Por outro lado, defeitos hereditários e adquiridos pela membrana das hemácias são também conhecidos por causarem diminuição do volume das hemácias com conseqüente diminuição da fragilidade osmótica (DACIE et al., 1984).

Desde a década de 50 foi aventada a hipótese que fatores humorais seriam os responsáveis pela anemia desenvolvida em pacientes com neoplasias avançadas (HYMAN, 1953) . No entanto, ainda é controvertido o papel desenvolvido por estas substâncias humorais, que podem induzir anemia no câncer avançado; havendo a possibilidade de que o plasma destes pacientes contenha substâncias que promovam anemia por diminuição da resistência osmótica das hemácias (ISHIKO et al., 1987 e HONDA et al., 1995).

Alterações metabólicas induzidas pelo câncer são bem conhecidas. CORI & CORI (1925) e WARBURG et al., (1927) foram os primeiros a observar em sarcomas de ratos e de galinhas a captação aumentada de glicose pelos tumores com aumento de liberação de ácido láctico. A glicose metabolizada no tecido tumoral, predominantemente por anaerobiose tem como conseqüência a liberação de lactato, o qual é transportado pela circulação para ser metabolizado no fígado e rim gerando novamente glicose através de um processo dependente de energia (WARBURG, 1931). O consumo aumentado da glicose foi observado nas células cancerosas e aparentemente é essencial para o crescimento e progressão do tumor primário. A combinação entre a produção de energia anaeróbica pelo tumor e a reconversão do lactato ou outro precursor

resultando em glicose, via gliconeogênese, nos tecidos normais é considerada o circuito metabólico pelo qual o corpo perde sua energia mantendo, assim, o quadro de caquexia (GOLD, 1968 e HOLROYDE et al., 1975).

A regulação do metabolismo energético dos eritrócitos tem sido extensivamente estudada. O controle deste metabolismo visa estabilizar a concentração de ATP intracelular para assegurar o funcionamento ajustado das inúmeras reações onde este nucleotídeo está envolvido, como por exemplo: o conteúdo dos intermediários glicolíticos e dos nucleotídeos das células vermelhas em diferentes condições ou a correlação que existe entre a permeabilidade da membrana à cátiões e a sobrevivência das hemácias (MINAKAMI & YOSHIKAWA, 1965 e BLUM et al., 1969 e ATAULLAKHANOV et al., 1981).

Já que, em humanos, o transporte da glicose é um processo passivo, infere-se que o movimento transmembrana desta molécula não necessite de energia, logo, não estaria associado ao metabolismo celular e ao consumo de ATP (JENSEN & BRAHM, 1987). Entretanto, há trabalhos que relatam que o ATP intracelular pode agir como uma molécula estimuladora ou inibidora do transporte de açúcares em eritrócitos humanos (JACQUEZ, 1983; HEBERT & CARRUTHERS, 1986 e HELGERSON et al., 1989).

O ATP também correlaciona-se com outras propriedades celulares. Em diferentes tipos de células, o *swelling* induzido tem a capacidade de abrir os canais de Cl^- na presença do ATP intracelular (FATHERAZI et al., 1994 e BEST et al., 1996), o que é atribuído a ação de proteínas quinases ou a proteínas regulatórias de canais (HARDY et al., 1995 e VERDON et al., 1995). Também há evidências de que o ATP pode funcionar do lado externo da célula como um fator

autócrino para aumentar a permeabilidade da membrana aos íons Cl^- através da estimulação de receptores P_2 (AL-AWQATI, 1995).

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho, foi obter maiores informações sobre o componente hemolítico da anemia do câncer, através do estudo das alterações da fragilidade osmótica de hemácias a fresco e após estresse metabólico por incubação em diferentes meios (indução indireta de alterações funcionais), bem como, alterações no consumo de glicose e conteúdo de ATP (alterações metabólicas) em ratos submetidos a múltiplas inoculações subcutâneas de tumor de Walker 256.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos e fêmeas, albino, Wistar de 8 a 9 semanas de idade. Estes animais foram criados e estavam alojados no Biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas/CAISM/UNICAMP em gaiolas plásticas (5 animais/gaiola) com cama de maravalha de pinho, ambientados à temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h e recebendo água e dieta comercial (Labina/Purina/Campinas/SP) para ratos *ad libitum*.

3.2. Controle da ingestão alimentar e do peso corporal

A ração presente em cada gaiola dos grupos portadores de tumor ou controle foi pesada diariamente, afim de estabelecer a quantidade ingerida pelos animais de cada grupo. A ração oferecida ao grupo controle sob restrição alimentar foi igual a quantidade de ração ingerida no dia anterior, pelos ratos portadores de tumor. Todos os ratos foram pesados individual e diariamente.

3.3. Manutenção da linhagem do tumor Walker 256

A linhagem A do carcinoma de Walker 256 foi doada pela Dra. Maria Cristina Cintra Gomes do Departamento de Fisiologia e Biofísica/IB/Unicamp, obtida originalmente do Nacional Cancer Institute Bank, Cambridge, MA/ USA. Essa linhagem esta sendo mantida no LPB/CAISM, congelada em nitrogênio líquido ou em ratos através de passagens consecutivas subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip).

As células tumorais de Walker 256 A crescem como células ascíticas quando inoculadas na cavidade peritoneal de ratos, sendo facilmente mantida através de passagens sucessivas entre indivíduos. Estas células ainda podem ser estocadas e congeladas em nitrogênio líquido quando misturadas à glicerina (5:1v/v). Para a reativação das células tumorais congeladas, todo o conteúdo de um frasco (1,0 mL), descongelado à temperatura ambiente, deve ser inoculado na cavidade peritoneal de um rato. A proliferação das células, tumorais, que no início desse processo é mais lenta, exige pelo menos 4 passagens sucessivas entre os ratos hospedeiros para expressar o máximo da atividade proliferativa na cavidade peritoneal, quando as células tumorais passam a se duplicar a intervalos de 14 a

16 h.

3.4. Obtenção do inóculo de células de Walker 256

Neste trabalho, as suspensões de células tumorais de Walker 256 foram obtidas retirando-se líquido ascítico da cavidade peritoneal de ratos doadores utilizado para a sua manutenção. Após retirado, o líquido ascítico foi prontamente diluído em aproximadamente três vezes o seu próprio volume com solução Ringer-lactato. Tal diluição preveniu a formação de coágulos, mantendo a suspensão homogênea. O número e a viabilidade das células tumorais foram determinados através de contagem em hemocítômetro empregando-se solução 0,01% de azul de Tripán. A concentração de trabalho definitiva foi igual a 20×10^6 células/mL e foi preparada diluindo-se a suspensão de células tumorais em solução de Ringer-lactato.

3.5. Administração das células tumorais de Walker 256

As células tumorais de Walker 256 A foram administradas através de múltiplas inoculações simultâneas (4/rato) de 0,25 mL da suspensão descrita acima (5×10^6 células por sítio de inoculação) no tecido subcutâneo do dorso dos ratos.

3.6. Grupos experimentais

3.6.1. Grupo controle dia zero

Neste trabalho o grupo controle dia zero (n=49) se refere a todo o conjunto de animais que antes da inoculação das células tumorais (grupo portador de tumor

ou controle) foram submetidos as determinações dos seguintes parâmetros : hemograma, concentração de hemoglobina [Hb], fragilidade osmótica (F.O.) de hemácias a fresco e incubadas em diferentes meios por 4 horas, concentração plasmática de glicose [G], consumo de glicose e conteúdo de ATP nas hemácias.

3.6.2. Grupo controle sob restrição alimentar

Foi composto por 22 ratos Wistar inoculados através da via sc, em quatro sítios dorso lombares com 0,25 mL de Ringer-lactato (placebo) e submetidos a restrição alimentar. Estes animais passaram a ingerir a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo portador de tumor com 24 h de atraso.

3.6.3. Grupo portador de tumor de Walker 256

Foi composto por 27 ratos Wistar inoculados em quatro sítios dorso lombares com 0,25 mL de suspensão de células tumorais de Walker 256 (5×10^6 células/sítio).

3.6.4. Grupo doador de hemácias normais e plasma controle (PLc)

Foi composto por 4 fêmeas Wistar normais, com a finalidade de doar as hemácias sadias e o plasma normal para o estudo de fragilidade osmótica de hemácias normais em diferentes meios, item 3.7.4.2. a, b.

3.6.5. Grupo doador de plasma Walker 256 e líquido ascítico

Foi composto por 4 fêmeas inoculadas através da via ip com dose única de 20×10^6 células de Walker 256, sendo sacrificados 4 dias após a administração do

inóculo. Este plasma foi utilizado para o estudo descrito no item 3.7.4.2 b.

3.7. Protocolo experimental

3.7.1. Coleta de Sangue

As amostras de sangue correspondentes ao dia zero (item 3.6.1.) foram obtidas através do plexo retro-orbital (0,7 mL de sangue em 0,05 mL de heparina sódica, 5000 U.I./mL).

As amostras de sangue foram obtidas 4, 7 e 11 dias após a inoculação das células tumorais (item 3.6.3.) ou solução placebo (3.6.2.) segundo descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Tempo de coleta de sangue após a inoculação das células tumorais ou placebo nos grupos de animais estudados.

Grupo de animais	Tempo (dias)		
	4	7	11
Controle sob restrição alimentar	n=5	n=5	n=12
Portador de tumor de Walker 256	n=5	n=5	n=17

Neste sentido, a cada tempo experimental, os animais foram anestesiados com éter para abertura cirúrgica do tórax e exposição do coração. Após incisão do coração o sangue foi coletado da cavidade torácica (6,0 mL de sangue em 0,3 mL de heparina sódica 5000 U.I./mL) com auxílio de uma seringa.

3.7.2. Hemograma

Os hemogramas das amostras de sangue foram realizados no Hemocentro/Unicamp, utilizando-se os métodos de impedância e cianometahemoglobina para o Cell-dyn 1600 (Operation Reference Manual for Cell-dyn 1600 and Cell-dyn 1600 CS—Hematology Analyzis Unipath,1989). Foi empregado fator de correção (Fc) para a heparina adicionada :

$$F_c = \frac{\text{volume total da amostra (mL)}}{\text{volume total da amostra (mL)} - \text{volume de heparina (mL)}}$$

3.7.3. Determinação da concentração de Hb ([Hb])

A [Hb] foi determinada por regra de três simples que correlacionou as absorvâncias das amostras de sangue testadas (540 nm) de uma suspensão de hemácias cujo hematócrito a 40,2% tinha uma concentração de 17,2 g Hb/dL.

3.7.4. Estudo da fragilidade osmótica (F.O.)

3.7.4.1. Preparação da solução tampão (estoque) para o teste de F.O.

Foi empregado solução salina tamponada (1,71 mol/L pH 7,4): 90 g de NaCl + 34,4 g de Na₂HPO₄.12 H₂O + 2,15 g de NaH₂ PO₄ . 2 H₂O, qsp 1,0L com água deionizada .

3.7.4.2. Teste de F.O. de hemácias de ratos (Dacie et al., 1984)

a. **Hemácias a fresco:** 25,0 μ L de sangue total foram adicionados a 2,5 mL de salina tamponada em diferentes concentrações (3,5 - 6,5 e 9,0 g/L), obtidas a partir da solução estoque do item 3.7.4.1.

b. **Hemácias em diferentes meios de incubação :** 150,0 μ L de papa de hemácias obtidas pela centrifugação do sangue total a 978 g/5'/temperatura ambiente + 0,5mL ou 1,0 mL dos diferentes meios de incubação (descrito em 3.7.4.3). Após a incubação retirou-se 25,0 μ L desta suspensão que foi adicionada a 2,5 mL de salina tamponada em diferentes concentrações (3,5 - 6,5 e 9,0 g/L).

Após a adição de 25,0 μ L de sangue total (3.7.4.2 a) ou 150,0 μ L de papa de hemácias (3.7.4.2.b) aos tubos de ensaio contendo a solução de salina tamponada em diferentes concentrações foram gentilmente homogeneizados, mantidos em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos centrifugados a 978 g/5 minutos. O sobrenadante obtido foi lido a 540 nm de absorvância em espectrofômetro Beckmam DU-70 em cubetas de plástico (3,0 mL) com 1,0 cm de caminho óptico.

c. *Cálculo para a obtenção da fragilidade osmótica*

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{leitura da amostra} - \text{leitura do tubo c/ 9,0 g/L NaCl}}{\text{leitura do tubo com H}_2\text{O}} \times 100$$

Onde:

- tubo com NaCl a 9,0 g/L : tubo branco
- 100: ajuste do valor obtido em porcentagem
- tubo com H₂O: 100% de hemólise

d. Cálculo para a obtenção da fragilidade corpuscular média (FCM)

A FCM foi definida como a concentração de NaCl na qual 50,0% dos eritrócitos foram hemolisados e calculada através de interpolação dos pontos imediatamente superior e inferior ao 50% de hemólise.

3.7.4.3. Meios de incubação das hemácias de rato

a) Incubação por 4 h : foram usados para a determinação da F.O. das hemácias de ratos portadores de tumor e seus respectivos controles os seguintes meios de incubação: 1,0 mL Ringer-lactato (RL); 1,0 mL Ringer-lactato + 2,0 mg/ de glicose (RL+G); 1,0 mL de plasma autólogo (Pla) e 1,0 mL plasma autólogo + 1,0 mg de glicose (Pla + G).

b) Incubação por 30, 120 e 240 minutos: foram usados para a determinação da F.O. das hemácias de ratos normais os seguintes meios de incubação: 0,5 mL Ringer-lactato+ 1,0 mg BSA (RL+ BSA); 0,5 mL Ringer-lactato + 1,0 mg BSA + 1,0 mg de glicose (RL+ BSA + G) ; 0,5 mL de plasma de rato controle (Plc); 0,5 mL plasma de rato portador de tumor de Walker 256 (PLw); 0,5 mL de líquido ascítico (LA) e 0,5 mL de líquido ascítico + 1,0 mg de glicose (LA+G).

3.8. Determinação da glicose

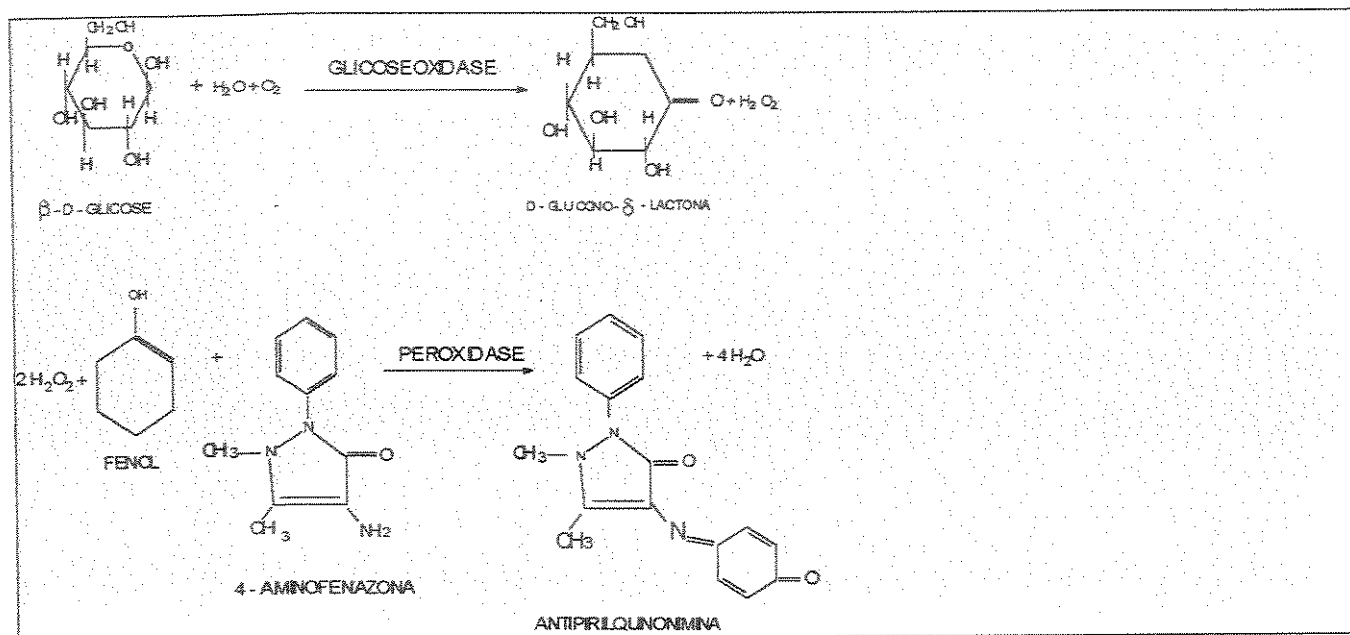
3.8.1. Glicose plasmática

As amostras de sangue referentes ao tempo zero e 10º dia após inoculação das células tumorais e placebo foram centrifugadas a 690g/10 minutos/temperatura ambiente. Foi retirado 20,0 µL plasma com auxílio de uma pipeta, o qual foi utilizado para a determinação da concentração de glicose (Kit Laborlab, Barueri, SP).

3.8.2. Consumo de glicose

Com uma micropipeta foram retirados 0,15 mL de hemácias empacotadas resultantes da centrifugação anteriormente descrita, as quais foram posteriormente suspensas em 0,35 mL do próprio plasma (para um hematócrito de 15,0 %). Esta suspensão foi incubada em banho-maria a 37°C por 4 horas, juntamente com 2,0 mg (ratos portadores de tumor) ou 1,0 mg (ratos controles sob restrição alimentar) de glicose. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Incibrás Spin III a 978g/5minutos/temperatura ambiente. No sobrenadante obtido foi determinado a concentração de glicose (Kit Laborlab, Barueri, SP).

3.8.3. Fundamento da reação da glicose oxidase



A β -D-glicose é oxidada pela glicose oxidase (GOD) à D-glucono- δ -lactona. O peróxido de hidrogênio produzido na reação de oxidação da glicose em presença de 4-aminofenazona, fenol e peroxidase produz o corante antipirilquinonimina. A quantidade do corante formado é proporcional a concentração de glicose da amostra (Kunst, et al., 1988).

3.8.4. Procedimento da reação

a) Preparo do reativo de cor

Reativo 1 (*)	Água	Reativo 2 (**)	Reativo enzimático(***)
5,0 mL	90,0 mL	5,0 mL	0,30 mL

(*)Reativo de cor 1: 4-aminofenazona 0,025 mol/L + tampão TRIS 0,92 mol/L,

(**)Reativo de cor 2: fenol 0,055 mol/L.

(***) Reativo enzimático : glicose oxidase 1KU/mL + peroxidase 0,15 KU/mL

b) Ensaio:

Plasma	Branco	Padrão (*)	Amostra
Padrão (μL)	_____	20,0	_____
Amostra (μL)	_____	_____	20,0
H ₂ O (μL)	20,0	_____	_____
Reativo de cor (**) (mL)	2,0	2,0	2,0

(*) Solução padrão: solução de glicose 100mg/dL, pH 7,4.

(**) Reativo de cor: 0,025 mol/L 4-aminofenazona + 0,055 mol/L fenol + 0,92 mol/L tampão TRIS.

Todos os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 37°C/10 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Beckman D.U.-70 a 505 nm de absorvância em cubetas de quartzo de 3,0 mL, com 1,0 cm de caminho óptico.

3.8.5. Cálculo da [G]

$$\text{Glicose mg/dL} = D \times f$$

$$f = \frac{100 \text{ mg glicose/dL}}{P}$$

Onde:

D= densidade óptica da amostra

f= fator de correção

P= densidade óptica do padrão de glicose

Valores para ratos normais: 56,0 a 76,0 mg/mL

3.8.6. Cálculo do consumo de glicose pelas hemácias

a) Cálculo do hematócrito a 15,0 %

O cálculo do hematócrito a 15,0 % foi realizado com a finalidade de que o sangue total de todos os animais tivessem o mesmo volume celular, expresso em percentagem de sangue total, que está correlacionado com uma mesma concentração de Hb.

A 20,0 μ L de papa de hemácias foi adicionado 2,0 mL de água deionizada. Esta suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 626g/5 minutos/temperatura ambiente. O sobrenadante obtido (Hb) foi lido a 540 nm de absorvância em espectrofômetro Beckman DU-70, em cubetas de plástico de 3,0 mL com 1,0 cm de caminho óptico.

Sabendo-se que em média a D.O. da hemoglobina de hemácias de ratos normais a 540 nm é 1,29 e que este valor equivale a um hematócrito de 38,0%, pode-se calcular qualquer hematócrito de qualquer amostra, como no exemplo abaixo descrito:

D. O		HCT
1,29	→	38,0%
0,51	→	X
HCT= 15,0 %		

b) *Cálculo do consumo de glicose* (μmol por mL eritrócito por h)

Este cálculo foi realizado a partir do que se segue:

$$\text{mg glicose/g Hb/h} = \frac{A \times B}{C \times D}$$

Onde :

A= consumo de glicose (mg/mL/h)

B= volume de plasma adicionado (mL) para um determinado hemátocrito

C= volume de papa de hemácias (mL) para um determinado hematócrito

D= concentração de hemoglobina: gHb/1,0 mL de hemácias

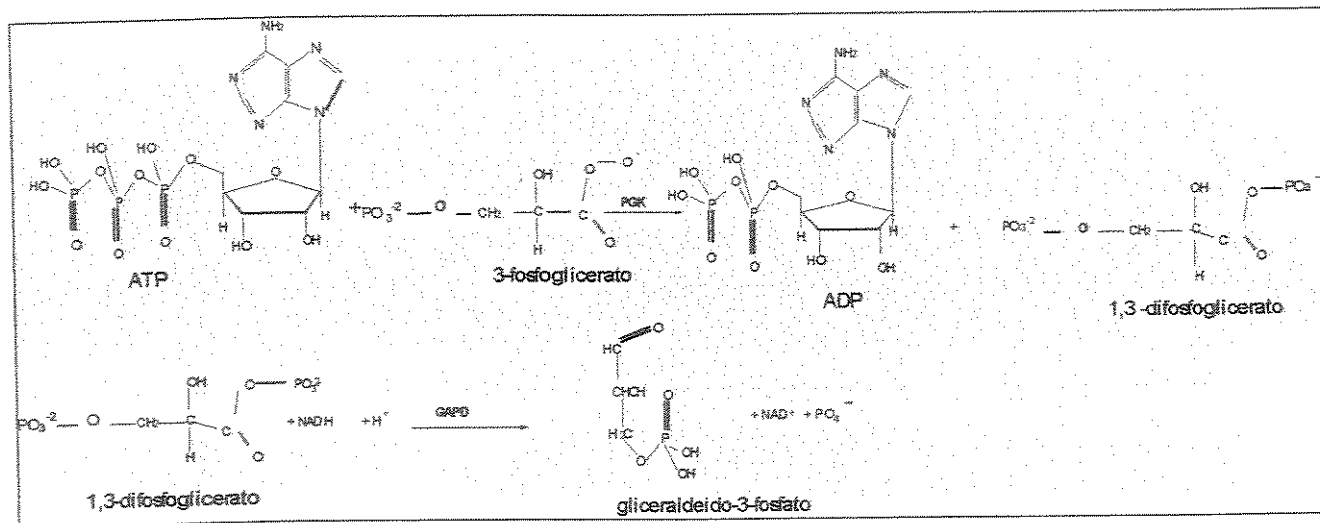
Obtido este valor efetuou-se a transformação de mg glicose/gHb/h para μmol/mL eritrócito/h.

3.9. Determinação do conteúdo de ATP

A determinação do ATP foi realizada nos dias zero e 10 nos animais portadores de tumor e seus respectivos controles sob restrição alimentar, pelo método enzimático da fosfoglicerato quinase (Kit Sigma St. Louis/USA).

3.9.1. Fundamento da reação

As enzima fosfoglicerato fosfoquinase (PGK) e a gliceraldeído fosfato dehidrogenase (GAPD), são usadas para catalizar a seguinte reação:



PGK= suspensão em sulfato de amônio da 3-fosfoglicerato fosfoquinase de levedura (450 unidades/mL).

GAPD= suspensão em sulfato de amônio de 800 unidades/mL da gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (músculo de coelho).

A medida da quantidade de ATP originalmente presente na amostra de plasma foi obtida pela determinação da diminuição na absorvância a 340 nm quando o NADH é oxidado a NAD⁺.

3.9.2. Procedimento da reação

a. Preparação do sobrenadante livre de proteínas

1- Em um tubo de centrífuga, foi pipetado 1,0 mL de TCA 12,0 % + 1,0 mL de sangue total. Misturou-se bem e deixou-se descansar por aproximadamente 5 minutos em banho de gelo.

2- Centrifugou-se a 978g/10 minutos para a obtenção do sobrenadante claro.

b. Ensaio

1- No frasco que continha 0,3 mg de NADH pipetou-se na ordem indicada:

1,0 ml da solução tampão PGA (sol. tampão com 18 mmol/L ácido fosfoglicérico + Mg^{2+} + EDTA)

1,5 ml de água deionizada

0,5 ml do sobrenadante livre de proteínas

Tampou-se os frascos e inverteu-se várias vezes para misturar o NADH.

2- Decantou-se todo o conteúdo em uma cubeta. Leu-se contra água a 350 nm (**absorvância inicial A**) .

3- Na cubeta foi pipetado 40,0 μ L da mistura de enzimas GAPD/PGK. Misturou-se bem por inversão.

4- No mesmo comprimento de onda foi realizado nova leitura durante 10 minutos (**absorvância final A**).

As leituras foram realizadas no espectrofotometro Beckman D.U.-70 em cubetas de quartzo de 3,0 mL, com 1,0 cm de caminho óptico.

3.9.3. Cálculo da concentração de ATP

$$\mu\text{mol ATP/g Hb} = \frac{\Delta A \times 195}{\text{Hb (g/dL)}}$$

$$195 = \frac{3,04 \times 100}{6,22 \times 0,25}$$

Onde:

ΔA = Leitura inicial A - Leitura final A

3,04= volume do líquido na cubeta

100= conversão da concentração de mL para dL.

6,22= absorvância milimolar do NADH⁺ a 340 nm de absorvância

0,25= volume da amostra

Valores normais em humanos = 3,64 a 4,45 $\mu\text{mol ATP/g Hb}$

3.10. Autópsias

Foram feitas em todos os animais portadores de tumor de Walker 256 e em seus respectivos controles sob restrição alimentar. Atenção especial foi dada para eventual presença de metástases, invasão de tecidos e hemorragia.

3.11. Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos com $\bar{X} \pm EP$. O teste "t" de Student foi empregado nas análises comparativas entre os animais portadores de tumor e seus respectivos controles (peso, ingestão alimentar, concentração de Hb, variação da FCM de hemácias fresca nos períodos sCp, mCP e gCP) e entre os controles aos 30, 120 e 240 minutos de incubação sob meios de estresse metabólico. O teste "t" pareado foi usado nas comparações entre os dias zero, 4,

7 e 11 nos animais portadores e nos controles sob restrição alimentar (concentração de Hb, FCM, FCM incubada por 4 horas). O teste de correlação foi empregado na análise do VCM das hemácias de animais controles e portadores de tumor de Walker 256. O teste de Mann-Whitney no consumo de glicose e conteúdo de ATP entre os animais portadores de tumor e seus controles. As diferenças nos diferentes testes empregados, foram assumidas como nível crítico de 95% ($P < 0,05$) (VIEIRA, 1981).

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento dos tumores

Os tumores sc cresceram em todos os sítios inoculados (4 sítios/ratos). Foram palpáveis a partir do 3º dia e no momento do sacrifício dos animais o peso médio foi de $0,7 \pm 0,1$ g no 4º dia (sCP), $2,8 \pm 0,2$ g no 7º dia (mCP) e $10,3 \pm 0,6$ g no 11º dia (gCP).

4.2. Evolução da ingestão alimentar e peso corporal dos animais portadores de tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar

A figura 1 mostra a ingestão alimentar e o peso dos animais empregados neste trabalho. No primeiro dia da sCP os animais portadores de tumor de Walker 256 ingeriram menor quantidade de ração, provavelmente devido a anestesia para a inoculação sc das células tumorais (21,0 g para 17,0 g). A partir do segundo dia a ingestão se normalizou (22,6 g/dia) e do 3º dia até o início da gCP, houve um decréscimo da ingestão alimentar, sendo o consumo médio de alimento igual a

21,8 g/dia. A partir do 8º dia (gCP) até o momento do sacrifício os animais passaram a ingerir uma quantidade ainda menor de ração, que variou entre 17,2 a 6,3 g/dia.

Nestes mesmos animais registrou-se, um efeito paradoxal com relação ao ganho de peso, quando a partir do 8º dia (gCP) até o sacrifício houve aumento significativo do peso corpóreo ($p < 0,05$) associado à redução da ingestão alimentar (Figura 1).

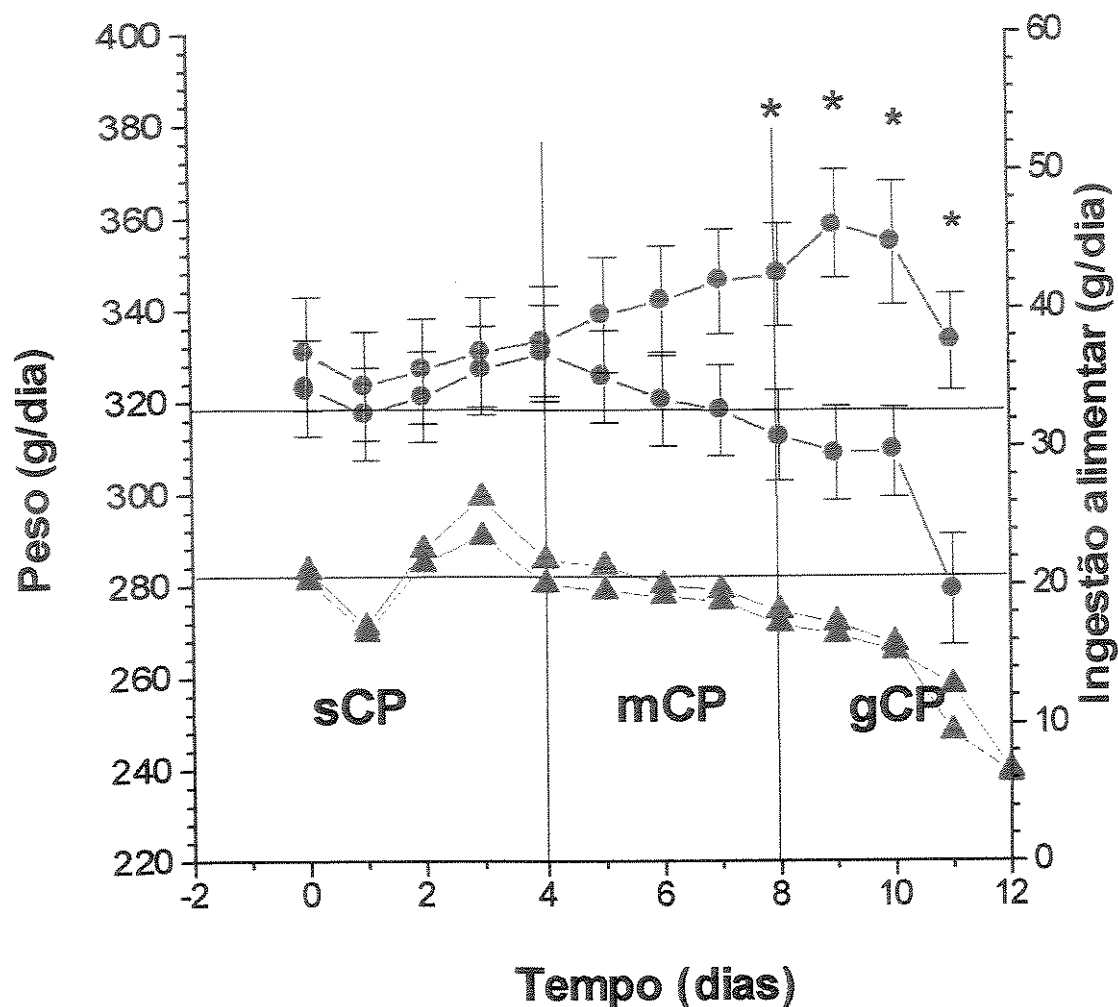


Figura 1 – Evolução da ingestão alimentar e do peso corporal dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar. Ganho de peso: (●—●) animais portadores de tumor; n=5 (sCP e mCP) e n=17 (gCP); (●—●) animais sob restrição alimentar; n=5 (sCP e mCP) e n= 12 (gCP). Ingestão alimentar : (▲—▲) animais portadores de tumor de Walker 256; n=5 (sCP e mCP) e n=17 (gCP); (▲—▲) animais sob restrição alimentar (controles); n=5 (sCP e mCP) e n=12 (gCP). sCP =Período subclínico; mCP= período clínico fase moderada e gCP= período clínico fase grave. * Teste “t” de Student ($P < 0,05$).

4.3.Evolução dos níveis de Hb no sangue (anemia)

A figura 2 mostra a variação da concentração de Hb (g/dL) nos animais portadores do tumor ou nos controles sob restrição alimentar nos períodos sCP (4° dia), mCP (7° dia) e gCP (11° dia) da doença comparados aos valores obtidos nestes mesmos animais no dia zero (ver material e métodos).

Houve uma diminuição significativa ($P<0,05$) na concentração da Hb dos animais portadores de tumor nas fases mCP e gCP (Figura 2 A). Nos últimos 4 dias esta variação foi de $14,9 \pm 0,2$ para $8,7 \pm 0,6$ o que foi eqüivalente a uma redução de 1,55 g/dL/dia. As autopsias realizadas nestes animais mostraram que a diminuição da Hb cursou na ausência de hemorragias internas ou externas. O grupo controle submetido a restrição alimentar não mostrou diferença significativa no conteúdo de hemoglobina das hemácias (Figura 2 B).

Posteriormente, foi realizado o estudo comparativo entre a concentração de Hb dos animais portadores de tumores e seus respectivos controles nos diferentes períodos da doença, mostrando que houve diminuição significativa ($P<0,05$) nos valores deste parâmetro em todos os períodos estudados (Figura 3).

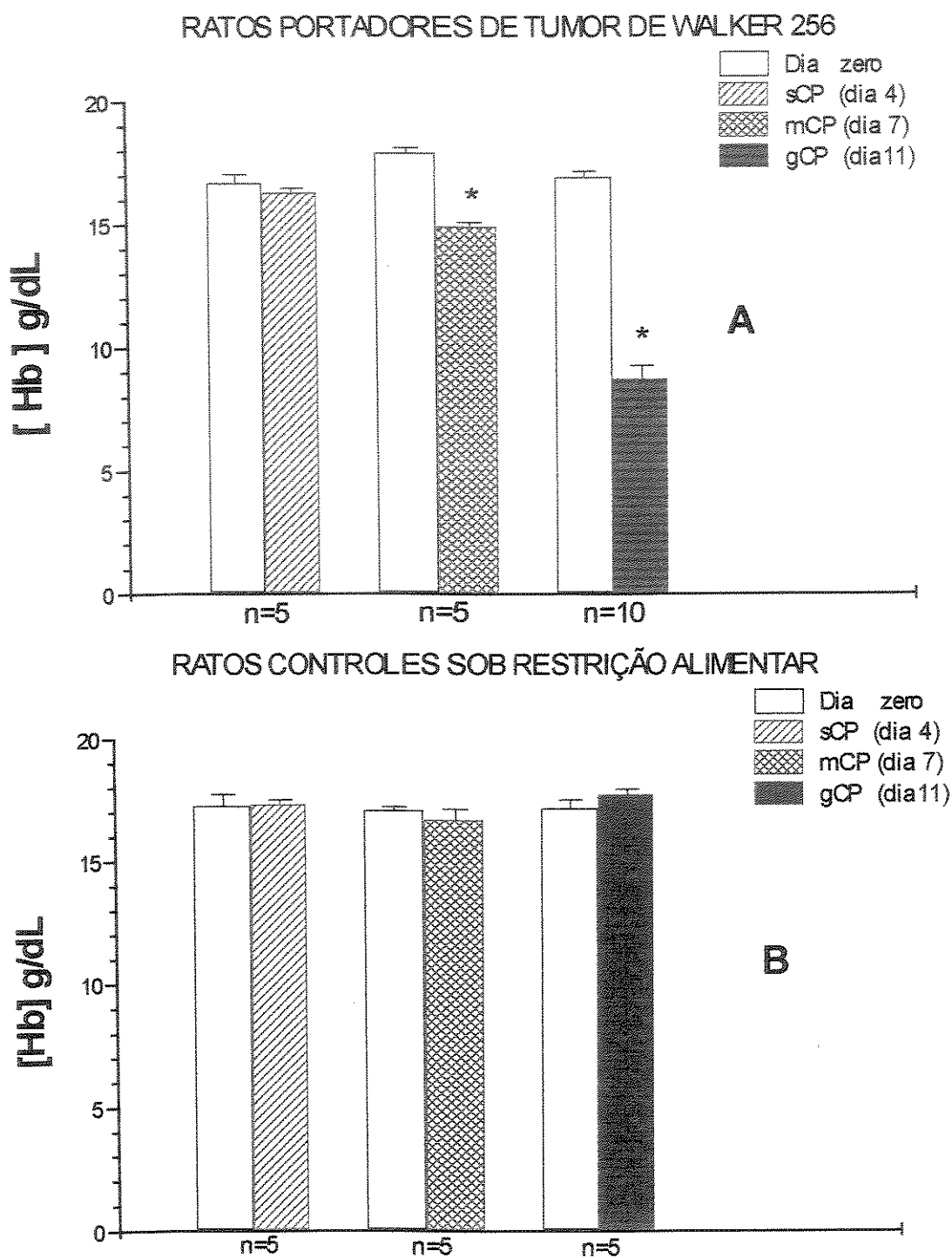


Figura 2- Variação da concentração de Hb (g/dL) nos animais portadores de tumor de Walker 256 (4 inoculações sc) e controles submetidos a restrição alimentar. sCP= período subclínico; mCP= período clínico fase moderada e gCP= período clínico fase grave. n= número de animais empregado no estudo. * Teste "t" de Student pareado ($P < 0,05$).

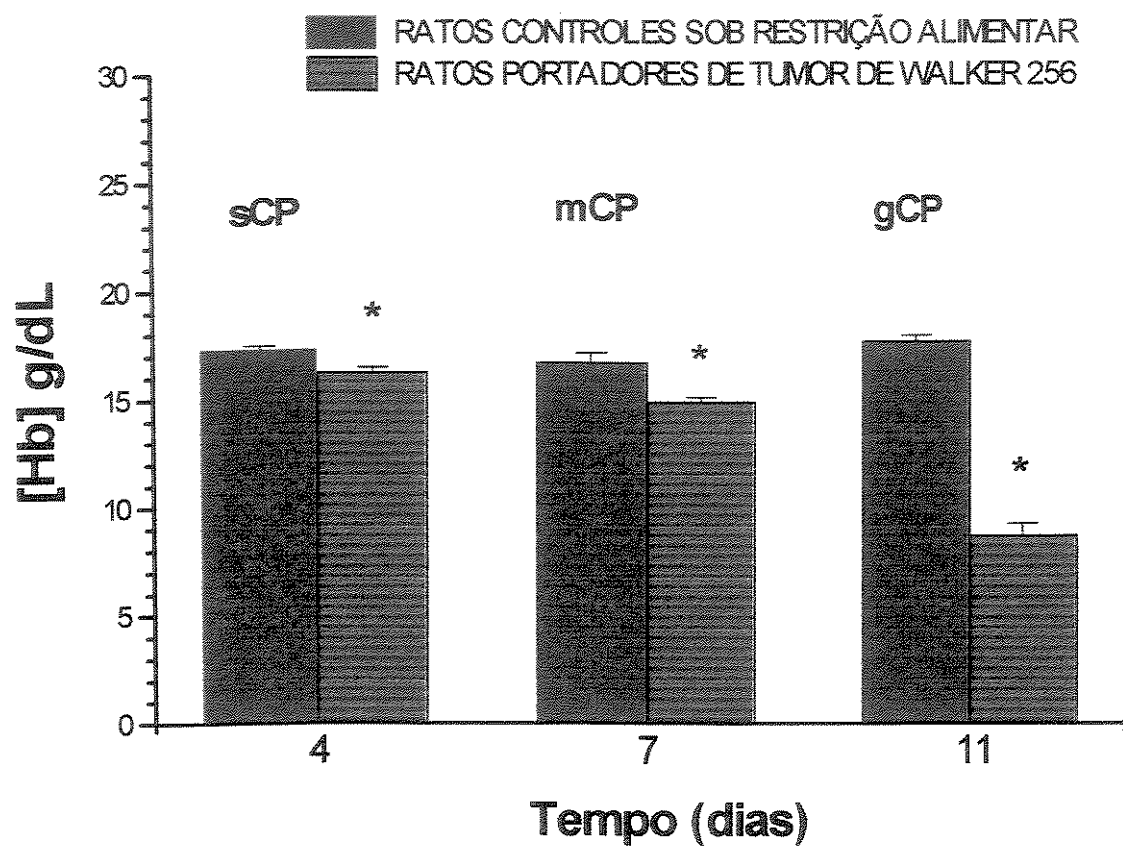


Figura 3- Comparação entre a concentração de Hb dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar nos diferentes períodos da doença. Animais portadores de tumor n=5 (sCP e mCP) e n=10 para gCP. Animais sob restrição alimentar n=5 (sCP, mCP e gCP). sCP = período subclínico; mCP= período clínico fase moderada e gCP= período clínico fase grave. * Teste "t" de Student (P<0,05).

4.4. Alteração da % FCM e do VCM (fL) das hemácias frescas de animais portadores de tumor de Walker 256 e de seus controles sob restrição alimentar

A figura 4 mostra as curvas de hemólise das hemácias frescas dos animais portadores de tumor de Walker 256 e de seus respectivos controles sob restrição alimentar no período sCP e nas fases mCP e gCP, comparando-as com suas próprias curvas de hemólise obtidas no dia zero (descrito em material e métodos).

Foi observado desvio significativo ($P < 0,05$) à esquerda na curva de hemólise nos animais portadores de tumor (Figuras 4A, 4B e 4C), que expresso em diferenças na FCM foi respectivamente: $-0,25 \pm 0,04$ (dia zero – sCP), $-0,42 \pm 0,06$ (dia zero – mCP) e $-0,36 \pm 0,07$ (dia zero – gCP) g/L NaCl. Os animais submetidos a restrição alimentar mostraram um desvio significativo à esquerda ($P < 0,05$) durante o período sCP – $0,11 \pm 0,02$ (dia zero – sCP) (Figura 4D) e nenhuma mudança nas outras fases da doença (Figura 4D, 4E e 4F).

Outra alteração observada foi que na gCP (11º dia) houve o decréscimo na inclinação da curva da F. O. das hemácias de ratos portadores de tumor. A percentagem máxima da variação de lise das hemácias (valor máximo da derivada) foi de $51,0 \pm 1,8$ % no dia zero para $36,0 \pm 2,1$ % no 11º dia (Figura 4C). Sob as mesmas condições não ocorreu mudanças significativas nas derivadas do grupo controle submetido a restrição alimentar ($52,0 \pm 2,4$ para $48,0 \pm 1,0$ % por g/L) (Figura 4F).

As variações entre as diferenças da FCM dos animais com tumor e de seus controles sob restrição alimentar nos diferentes períodos da doença em relação ao dia zero foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) desde a sCP até a gCP (Figura 5).

Consistente com as alterações acima descritas observou-se diminuição significativa ($P < 0,05$) no volume corpuscular médio (VCM) das hemácias de animais portadores de tumor de Walker 256 nos diferentes dias da doença em relação ao dia 4 cujos valores foram: 53,2 fL com variação de 53,0 a 54,0 na sCP; 51,6 fL com variação de 51,0 a 52,0 na mCP e 50,0 fL com variação de 49,0 a 52,0 na gCP, com $r^2 = 0,77$ e $P < 0,001$. No grupo de animais controles não foi observada nenhuma alteração significativa e os valores obtidos foram: 51,6 fL com variação de 51,0 a 53,0 na sCP; 51,8 fL com variação de 50,0 a 53,0 na mCP e 50,2 fL com variação de 49,0 a 52,0 na gCP com $r^2 = 0,21$ não significativo (Figura 6).

RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256

RATOS CONTROLES SOB RESTRIÇÃO ALIMENTAR

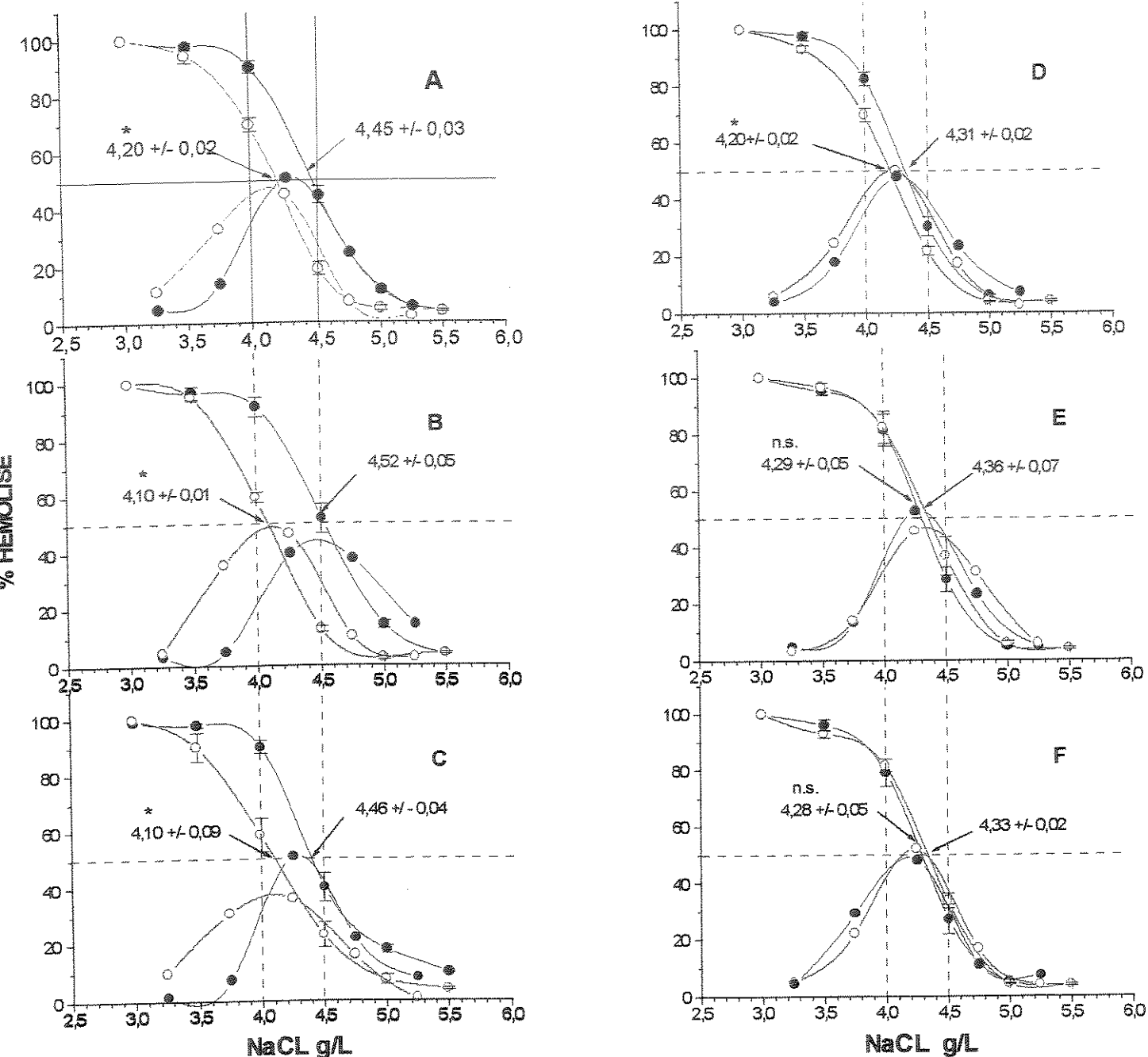


Figura 4- Comparação entre a variação da fragilidade osmótica das hemácias a fresco dos animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e de seus respectivos controles sob restrição alimentar. Animais portadores de tumor: (●—●) dia zero: A e B n=5 e C n=10; (○—○) A e B n=5 e C n=10. Animais controle sob restrição alimentar: (●—●) dia zero n=5; (○—○) D, E e F n=5. A e D (período subclínico - dia 4); B e E (período clínico fase moderada dia - 7) e C e F (período clínico fase grave - dia 11) * Teste "t" de Student pareado ($P < 0,05$).

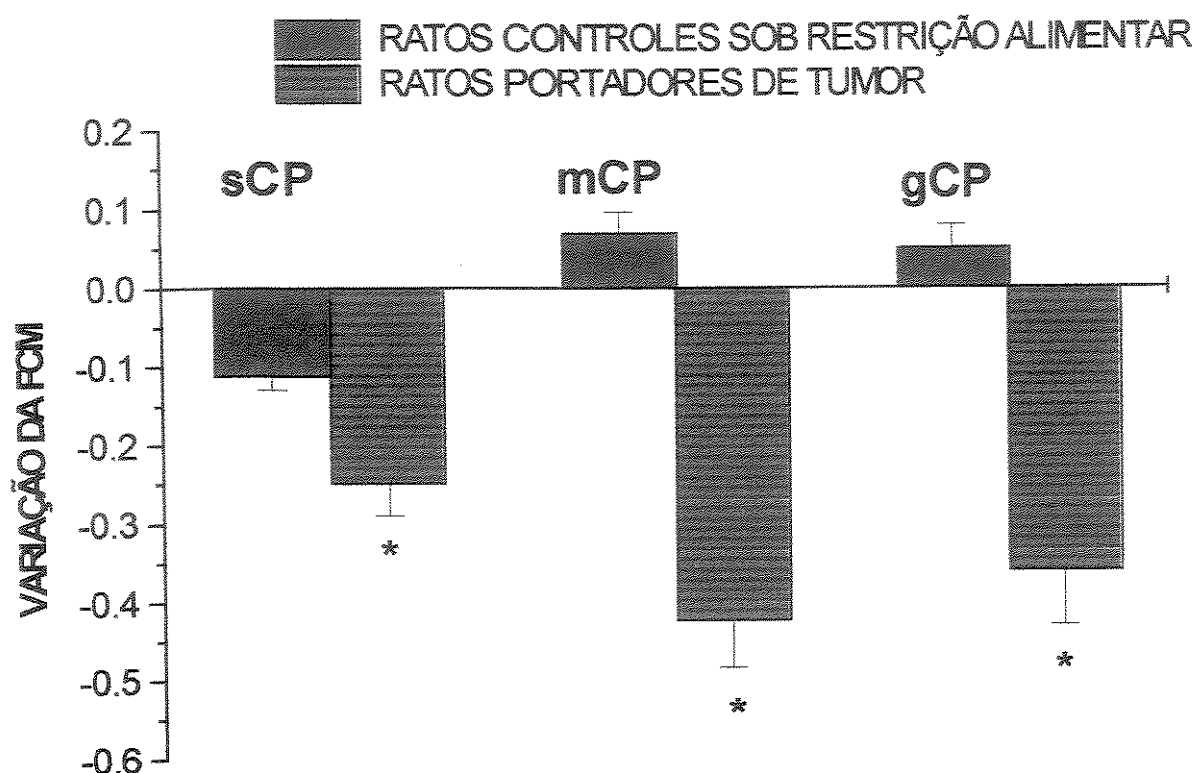


Figura 5- Variação da FCM de hemácias de ratos portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus respectivos controles sob restrição alimentar. Animais portadores de tumor $n=5$ (sCP e mCP) e $n=10$ gCP. Animais controles sob restrição alimentar $n=5$ sCP; mCP e gCP. sCP= período subclínico; mCP= período clínico fase moderada e gCP= período clínico fase grave. * Teste "t" de Student ($P<0,05$).

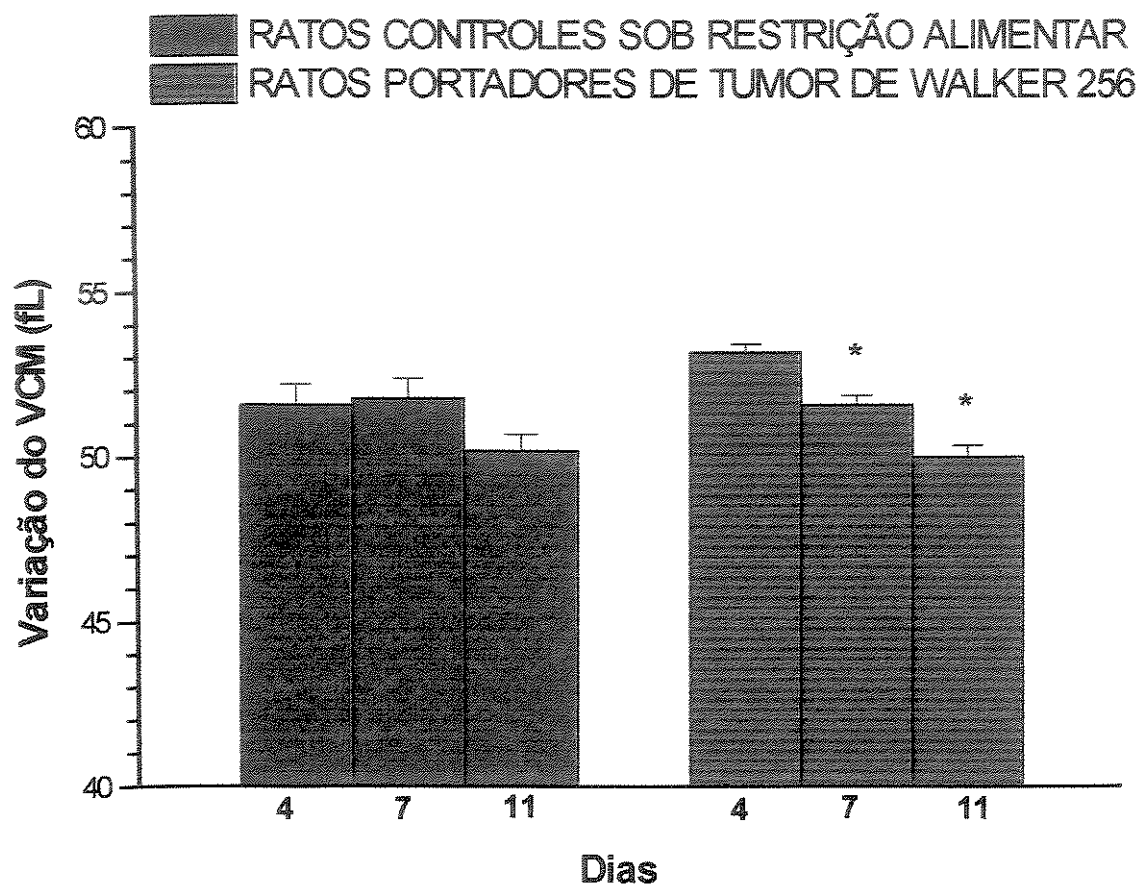


Figura 6- Variação do VCM (fL) das hemácias de ratos portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus controles sob restrição alimentar nos diferentes dias da doença. Ratos portadores de tumor de Walker 256 n=5 para os dias 4 e 7 e n=9 para o dia 11. Ratos controles sob restrição alimentar n=5 para todos os dias da doença. * Teste de correlação ($P < 0,05$).

4.5. Resistência ao estresse metabólico das hemácias de ratos portadores de tumor de Walker 256

Em vista dos resultados obtidos na determinação da FCM de hemácias frescas de animais portadores de tumor de Walker 256 nos períodos sCP, mCP e gCP que caracterizam aumento da resistência dessas hemácias à hemólise se fez necessário o estudo da resistência dessas hemácias ao estresse metabólico através da incubação destas células em diferentes meios (RL, RL+G, PLA e PLA+G).

A glicose foi adicionada aos meios RL e PLA (RL+G e PLA+G, respectivamente) para impedir o esgotamento da fonte energética das hemácias com conseqüente falha da bomba Na^+/K^+ , o que levaria ao aumento da lise celular (Dacie, 1984).

Na fase sCP as hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256 apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) da FCM nos meios: RL, PLA e PLA+G; na fase mCP somente no meio PLA e na fase gCP em todos os meios de incubação quando comparados com os controles sob restrição alimentar (Figura 7).

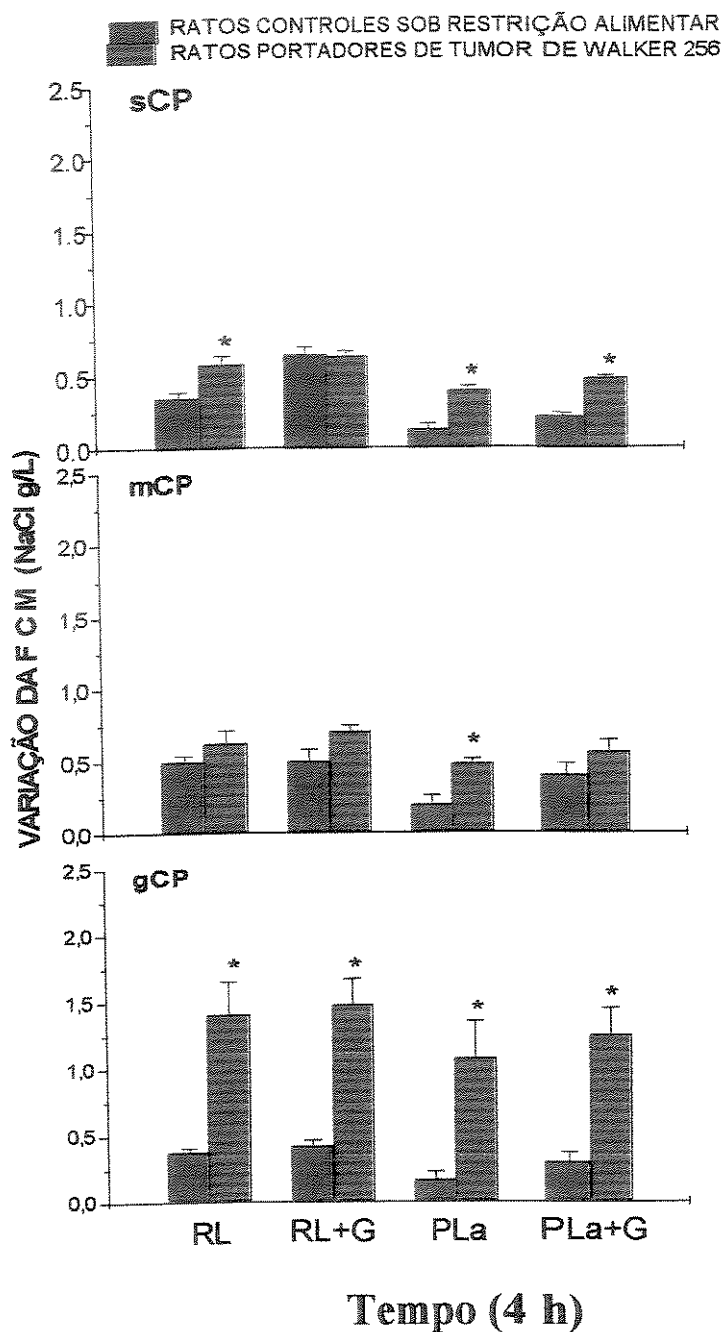


Figura 7- Efeito do estresse metabólico da FCM das hemácias de animais portadores de 4 inoculações sc do tumor de Walker 256 e seus controles sob restrição alimentar após 4 horas de incubação em diferentes meios. Animais portadores de tumor de Walker 256 n= 5 (sCP e mCP) e n=9 gCP. Animais controles sob restrição alimentar n=5 (sCP, mCP e gCP). sCP= período subclínico; mCP= período clínico fase moderada e gCP= período clínico fase grave. RL (Ringer-lactato), G (glicose) e PLa (plasma autógeno). *Test "t" Student pareado (P<0,05).

4.6. Busca de atividades capazes de alterar a F.O. das hemácias normais no plasma e líquido ascítico de ratos portadores de tumores

A figura 8 mostra os valores da F.O. de hemácias normais quando foram incubadas em: meios controles (RL+BSA, RL+BSA+G e PLc) e meios experimentais (PLw, LA e LA+G). A adição de BSA (soro albumina bovina) no meio RL serviu para estabilizar a membrana das hemácias e tornar este meio o mais semelhante possível ao PLc.

Os resultados observados com a incubação de hemácias normais a 37°C por 30, 120 e 240 minutos em diferentes meios foram os seguintes:

- a) aumento significativo da F.O. aos 120 minutos ao compararmos todos os meios testados com LA e LA + G.
- b) aumento significativo da F.O. aos 240 minutos ao compararmos todos os meios testados com LA .
- c) nenhuma alteração na F.O. foi observada nos meios controles utilizados (Figura 8 e Tabela 2).

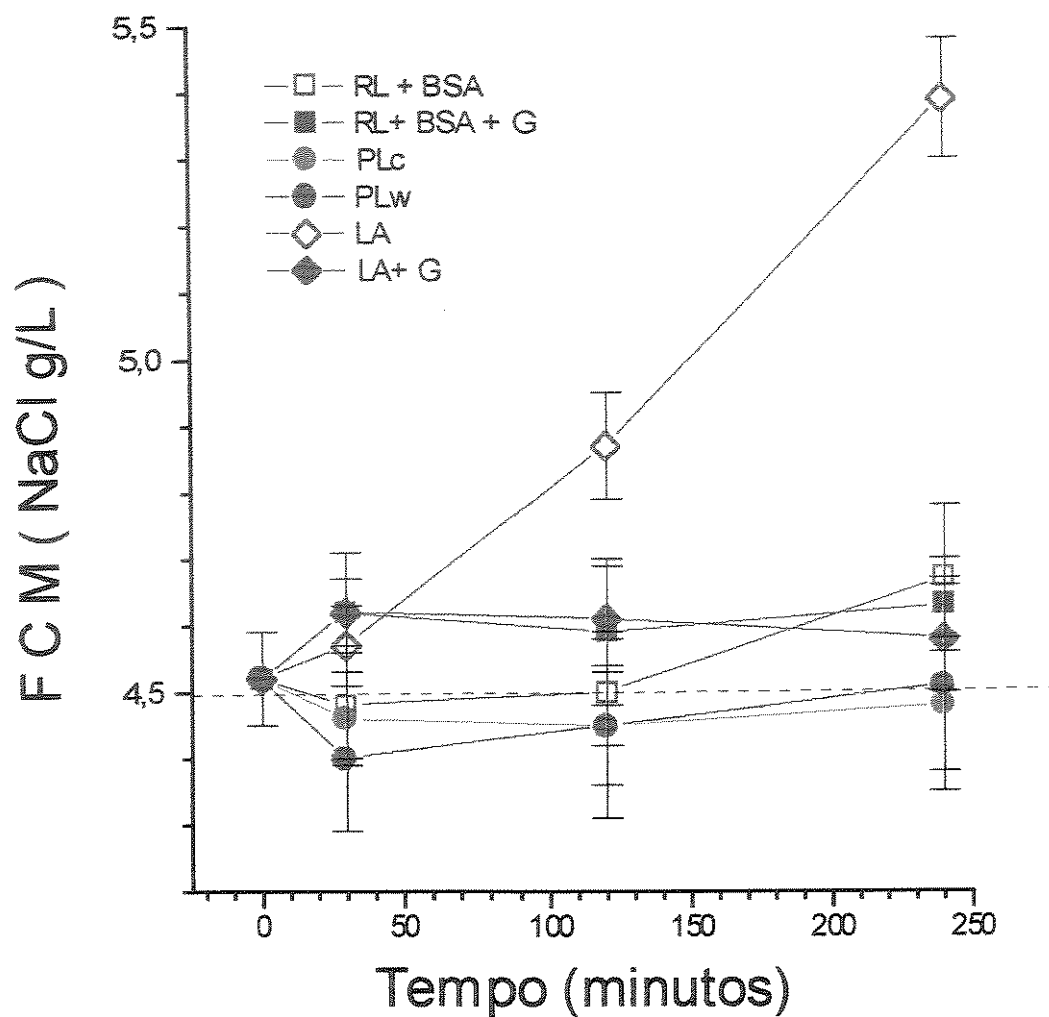


Figura 8- Efeito dos meios de incubação sobre as hemácias de ratos normais submetidas a estresse metabólico. n=5 em todos os meios. RL (Ringer-lactato), BSA (soro albumina bovina), G (glicose), PLw (plasma Walker 256), PLc (plasma controle) e LA (líquido ascítico).

Tabela 2- Comparação estatística entre a FCM de hemácias de ratos normais submetidas a diferentes meios e tempos de incubação.

FCM (NaCL g/L)						
Meios de incubação						
Tempo (minutos)	RL+BSA X±EP (n=5)	RL+BSA+G X±EP (n=5)	PLc X±EP (n=5)	PLw X±EP (n=5)	LA X±EP (n=5)	LA+G X±EP (n=5)
30	4,48 ± 0,08 _a	4,62 ± 0,09 _a	4,46 ± 0,07 _a	4,40 ± 0,11 _a	4,57 ± 0,06 _a	4,62 ± 0,05 _a
120	4,50 ± 0,08 _b	4,59 ± 0,11 _{ab}	4,45 ± 0,09 _b	4,45 ± 0,14 _b	4,87 ± 0,08 _a	4,61 ± 0,08 _a
240	4,67 ± 0,11 _b	4,63 ± 0,11 _b	4,48 ± 0,10 _b	4,51 ± 0,16 _b	5,39 ± 0,09 _a	4,58 ± 0,08 _b

RL= Ringer-lactato, PLc= plasma controle, PLw= plasma Walker , LA= líquido ascítico, G= glicose. Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem significativamente. ^{ab} Teste "t" de Student (P> 0,05).

4.7. Consumo de glicose nas hemácias dos ratos portadores de tumor de Walker 256 e seus controles

O objetivo deste estudo foi obter informações sobre o estado metabólico das hemácias de ratos portadores de tumor de Walker 256 bem como saber se havia alguma correlação destes resultados com os resultados das alterações da F.O. de ratos com tumor.

A figura 9 mostra aumento significativo ($P < 0,05$) no consumo da glicose nas hemácias dos animais portadores de tumor 10 dias em relação aos animais controles após a inoculação multifocal e sc do tumor de Walker 256.

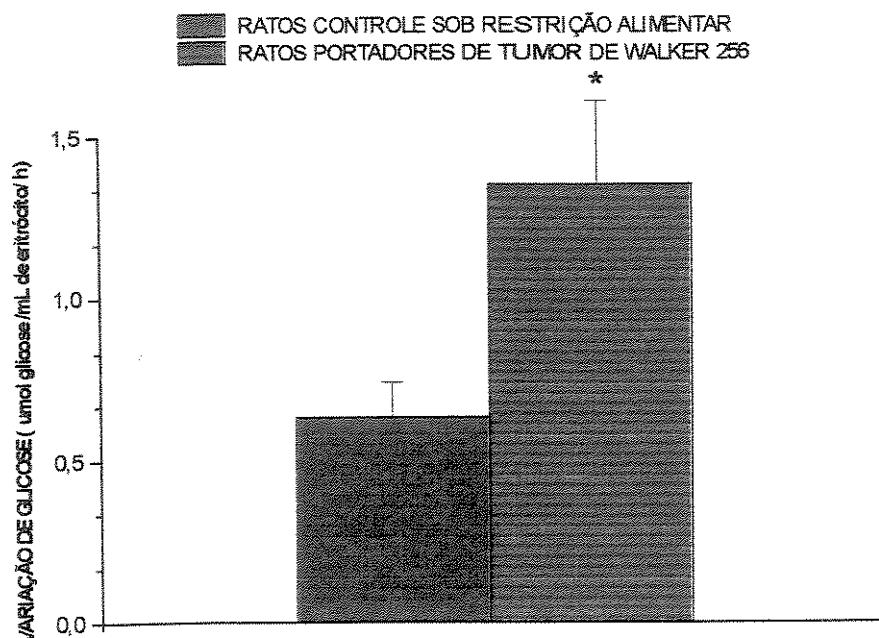


Figura 9 – Consumo de glicose das hemácias dos animais portadores de tumor 10 dias após a inoculação sc multifocal (4 inoculações) do tumor de Walker 256. Animais portadores de tumor de Walker 256 $n=7$ e animais controles sob restrição alimentar $n=7$. * Teste Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4.8. Conteúdo de ATP das hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256

A figura 10 mostra a diferença significativa ($P < 0,05$) da variação do conteúdo de ATP ($\mu\text{mol/g/Hb}$) das hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256 e de seus respectivos controles sob restrição alimentar 10 dias após a inoculação sc e multifocal (4 inoculações) do tumor de Walker 256.

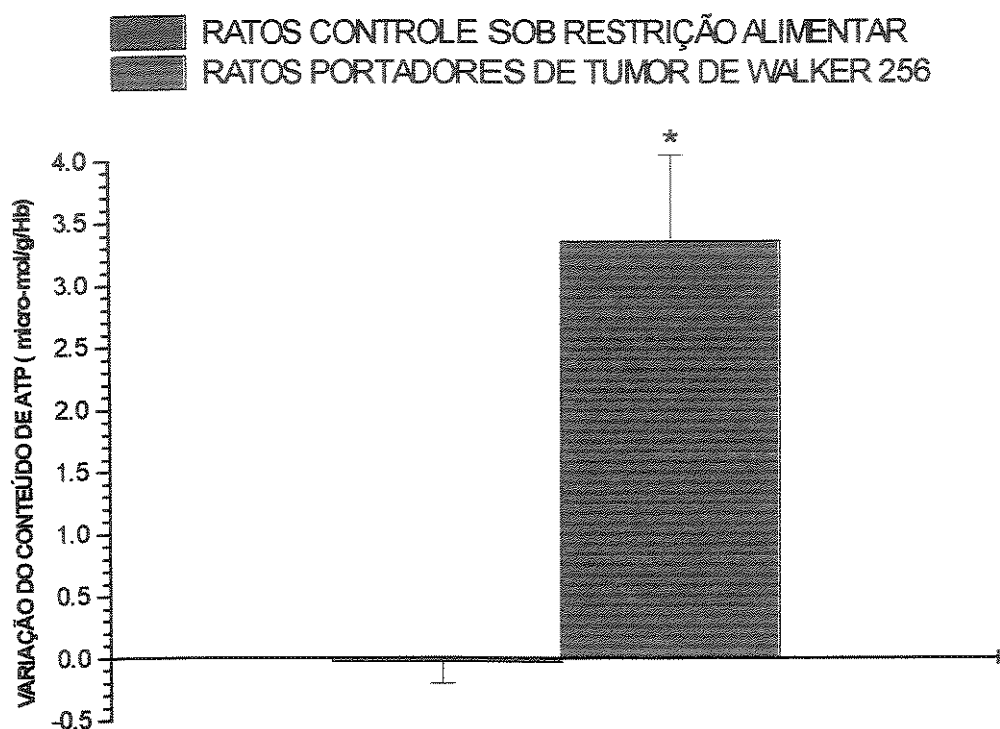


Figura 10- Variação no conteúdo de ATP ($\mu\text{mol/g/Hb}$) das hemácias dos animais portadores de tumor de Walker 256 quando comparado com os controles 10 dias após a inoculação sc e multifocal (4 inoculações) do tumor de Walker 256. $n=7$ para os grupos controle e portador de tumor de Walker 256. * Teste Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4.9. Autópsias

Não foram encontrados sinais de hemorragia ou metástases viscerais macroscópicas. Somente foi observado entumecimento em linfonodos regionais, retroperitôneais e ao redor do timo. Em nenhum instante os tecidos vizinhos ao tumor foram invadidos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento dos efeitos sistêmicos do tumor de Walker 256

Após a inoculação multifocal de células tumorais de Walker 256 os tumores cresceram em todos os sítios inoculados e todos os animais desenvolveram, rápida e sincrônicamente, vários sintomas que iniciaram-se no 4º dia e progrediram até a gCP como: aumento de peso corpóreo, anorexia e anemia, os quais apareceram na ausência de hemorragia, presença de metástases incipientes nos linfonodos comprovados pelas autópsias.

O modelo de inoculações multifocais sc favorece o estudo da fisiopatologia do câncer, pois os sintomas da doença desenvolvem-se em todos os animais e ao mesmo tempo, antecipando os efeitos sistêmicos visto que neste modelo as múltiplas inoculações simulam as metastases na fase final da doença. Com uma única inoculação, todos os animais experimentais com tumor também, em um determinado momento apresentaram, sintomas induzidos pelo tumor, porém, em períodos muito variáveis no

tempo (6 a 40 dias após a inoculação). Esta variabilidade individual na evolução da doença dificulta estudos, nos quais os dados são coletados a partir de observações transversais e que, conseqüentemente, mascaram informações importantes sobre os efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor (GUAITANI et. al., 1982 e 1983; RETTORI, et. al., 1995 e GUIMARÃES et al., 1999).

Os animais portadores de tumor de Walker 256 apresentaram um efeito paradoxal, visto que, a medida que a doença se agravava e, conseqüentemente, diminuía a ingestão de alimento foi observado ganho significativo do peso corpóreo (Figura 1). Este resultados corroboram com as observações anteriores realizadas no LPB onde o aumento de peso nos animais portadores de tumor seria precoce (visualizado a partir do início da mCP ou seja do 4º dia após a inoculação multifocal das células tumorais) e estaria relacionado com mecanismos renais de controle de sódio fazendo com que houvesse a retenção de líquidos e, conseqüentemente, aumento de peso corpóreo (RETTORI et al., 1995 e GUIMARÃES et al., 1999).

5.2. Desenvolvimento da anemia

As figuras 2 e 3 mostraram diminuição precoce e rápida dos níveis de Hb nos animais submetidos a inoculações sc e multifocais do tumor de Walker contribuindo para o desenvolvimento da anemia aguda na ausência de hemorragia, sendo que a destruição das hemácias foi 5 vezes maiores que os níveis fisiológicos (RETTORI et. al., 1999).

A anemia em humanos portadores de tumores malignos tem sido classificada como de doenças crônicas, cujo mecanismo, ainda, não está claro (LEE, 1983 ; SPIVAK, 1994 e MOLITERNO & SPIVAK, 1996).

HYMAN & HARVEY (1955) já haviam demonstrado a importância da anemia no câncer e chamaram atenção para a presença de um importante componente hemolítico, ao mostrarem que, quando hemácias de indivíduos saudáveis eram transfundidas para pacientes no estágio final da doença estas eram rapidamente destruídas. Vários autores sugeriram que este provável componente hemolítico plasmático poderia ser produzido pelo tumor e/ou pelo hospedeiro (citoquinas, fator de necrose tumoral, entre outros) que seria capaz de se ligar a membrana das hemácias, causando mudanças nas diferentes propriedades destas células (deformabilidade e/ou metabolismo), fazendo com que as mesmas fossem destruídas pelo SRE e, portanto, acarretando a anemia (OH-UTI et al., 1968; ISHIKO et al., 1987; COHEN, et al., 1988 e HONDA et al., 1995). Tais substâncias foram isoladas no sangue humano como proteínas, cujo peso molecular variava de 50.000 a 100.000 Kd, e estão presentes tanto no citosol como no núcleo das células neoplásicas (HONDA et al., 1995).

5.3. Alterações da F.O . de hemácias induzidas pelo tumor de Walker 256

A permeabilidade seletiva característica da membrana dos eritrócitos faz de cada célula um osmômetro que muda seu volume com as mudanças na concentração osmótica do meio em que se encontra. Um eritrócito normal é discoidal e preserva sua forma quando suspenso no plasma ou salina isotônica. Todavia, quando suspenso em água ou em salina hipotônica passa à forma esférica

e é lisado. A lise ocorre quando excesso de água entra na célula e distende a membrana celular a ponto de permitir a saída da hemoglobina (STELLA, 1998). Portanto, o teste de fragilidade osmótica reflete alterações do volume celular das hemácias frente a diferentes concentrações de cloreto de sódio e é indicado para o estudo de anormalidades relacionadas com estas alterações (DACIE et al., 1984).

Neste trabalho o desenvolvimento da anemia (Figuras 2 e 3) nos animais portadores de tumor progrediu com o agravamento da doença (sCP a gCP) e foi paradoxalmente, acompanhado pela diminuição da F.O. das hemácias frescas observado pelo deslocamento à esquerda da curva de hemólise (Figuras 4A a 4C e 5), indicando redução do volume dos eritrócitos circulantes, fato também comprovado pelo hemograma que mostrou que o VCM (Figura 6) das hemácias dos animais anêmicos estava significativamente reduzido.

A maior resistência à hemólise (redução da F.O.) de hemácias dos animais portadores de tumores (Figuras 4 A a 4 C e 5) , provavelmente decorra da alteração de algum componente da membrana celular, o qual regula a permeabilidade a cátions e água ou distensão da célula (DUMONT et al., 1977). Todavia, devemos também levar em consideração que, animais quando inoculados com células tumorais desenvolvem hipercolesterolemia e este aumento na concentração do colesterol nas membranas das hemácias pode ser responsável pela redução da fragilidade osmótica (COOPER & JANDL, 1969; BRENNEMAN et al., 1975 e RAY & CHOWDHURY, 1989). Contudo não podemos afirmar que a redução na F.O. observada nos animais portadores de tumor de Walker 256 possa ser decorrente da hipercolesterolemia, visto que o colesterol não foi dosado na membrana destes animais.

5.4. Efeito do estresse metabólico sobre as hemácias de ratos portadores de tumor de Walker 256

A fragilidade osmótica das hemácias incubadas é também um reflexo da relação entre seu volume e sua área de superfície mas os fatores que alteram esta relação são mais complicados e são, principalmente, causados pelo *swelling* das células que está associado ao acúmulo de sódio que excede a perda de potássio. Esta troca de cátions também é determinada pelas propriedades de membrana dos eritrócitos, que controlam o fluxo passivo de íons e a competência metabólica das células a qual determina a atividade da bomba de cátions contra o gradiente de concentração (DACIE et. al , 1984).

Também nas hemácias incubadas de pacientes cancerosos foi, observado aumento da fragilidade osmótica. Este fenômeno foi atribuído ao aparecimento na circulação de substâncias indutoras de anemia que aumentavam com a progressão da doença e ao se ligarem aos glóbulos vermelhos produziram o aumento deste parâmetro F.O. , fazendo com que ocorresse a lise das hemácias (ISHIKO et al., 1987 e TATSUTA et al., 1989). Posteriormente, estes achados foram confirmados em experimentos com animais de laboratório através de inoculações multifocais de células do tumor de Walker 256 (RETTORI et al., 1998 e 1999).

Moléculas circulantes de origem tumoral e/ou do hospedeiro podem estar envolvidas neste processo, atuando sobre o metabolismo e/ou membrana plasmática das hemácias (RAY & CHOWDHURY, 1989).

Neste trabalho as hemácias de animais anêmicos portadores de tumor quando incubados em diferentes meios a 37°C/4 h e em relação a seus controles, apresentaram aumento da fragilidade osmótica. Este efeito foi pequeno nas fases sCP e mCP da doença mas marcante na fase gCP, onde a diferença foi significativa em todos os meios empregados (Figura 7). Provavelmente este efeito é um efeito de desenvolvimento lento e acumulativo, visto que as hemácias tem uma incapacidade intrínseca em corrigir as alterações de suas proteínas.

Com base na diferença significativa da F.O. mostradas na figura 7 e na tentativa de observar se o tumor estava produzindo alguma substância capaz de alterar este parâmetro, ratos Wistar foram inoculados intraperitonealmente com células de Walker. As células tumorais de Walker 256 quando inoculadas por via ip duplicam-se entre 16 a 17 horas, quase todas são proliferantes atingindo ± 2 bilhões de células entre o 4º e 5º dia após a inoculação ($\pm 3,0$ g) (RETTORI & VIEIRA-MATOS dados não publicados).

Através desta via de inoculação poderíamos obter fatores de origem tumoral em alta concentração, o que seria ideal para o estudo das alterações da F.O. de hemácias normais. Além disto, também tínhamos observado que o LA apresenta baixa concentração de glicose sendo, portanto, um excelente meio para o estudo do efeito de alterações metabólicas sobre a F.O. das hemácias.

Os dados apresentados na figura 8 e tabela 2 mostraram que, provavelmente fatores presentes no LA possam provocar aumento na permeabilidade e/ou poderiam estar associados ao aumento do consumo da glicose, sendo primariamente produzido por fatores de origem tumoral que atuariam sobre a

membrana plasmática alterando a permeabilidade e/ou transporte e secundariamente o metabolismo ou vice-versa. Além disso, este meio poderia ser empregado como um bioteste bastante sensível para o isolamento e identificação do fator de origem tumoral responsável pelas alterações na fragilidade osmótica.

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam a idéia de que as células tumorais produzem substância (as) que agiram sobre a membrana plasmática das hemácias acarretando aumento da resistência osmótica ao estresse osmótico. Todavia, o comprometimento metabólico não deve ser esquecido, visto que a adição de glicose, mantenedora do metabolismo das hemácias, aos meios de incubação RL e LA (Figura 8 e Tabela 2) impede a lise das hemácias.

5.5. Consumo de glicose e conteúdo de ATP das hemácias de animais portadores de tumor de Walker 256

As alterações da F.O. podem ser decorrentes de efeitos diretos de fatores circulantes sobre a membrana plasmática dos eritrócitos mas também podem ser decorrentes de efeitos indiretos por alterações do metabolismo das hemácias. Também é possível que as alterações diretas sobre a membrana plasmática gerem secundariamente, alterações metabólicas das hemácias. Portanto, se fez necessário obter informações preliminares sobre o conteúdo de ATP e estado metabólico das hemácias dos ratos com tumor avaliado pelo consumo de glicose, melhor maneira de detectar-se defeitos metabólicos (DACIE et. al., 1984).

Neste trabalho foi verificado aumento significativo ($P < 0,05$) do consumo de glicose (Figura 9). Por outro lado outros autores ao estudarem o metabolismo

energético nas RBC de pacientes com câncer na fase terminal, observaram que o influxo de glicose através da membrana destas células estava diminuído em 25% quando comparado com pacientes saudáveis. Foi sugerindo que tal decréscimo seria decorrente de substâncias indutoras de anemia presentes no plasma destes pacientes, as quais teriam a propriedade de se ligar a membrana das células vermelhas acarretando a supressão do influxo de glicose transmembrana com diminuição da atividade da enzima fosfoquinase, bem como alterações físicas nesta células acarretando sua destruição pelo sistema retículo endotelial (ISHIKO et. al., 1987). Contudo nossos resultados mostraram efeito antagônico, aumento do consumo de glicose pelos animais portadores de tumor de Walker 256, sugerindo a existência de fatores presentes na circulação sanguínea, capazes de alterar o metabolismo destas células acarretando o aumento deste parâmetro.

Neste trabalho também foi observado que a variação no conteúdo de ATP das hemácias entre os dias 0 e 10 (gCP) aumentava significativamente quando comparado com os controles (Figura 10). Este dado foi semelhante ao observado nas hemácias circulantes de camundongos portadores do tumor de Ehrlich em diferentes períodos do crescimento tumoral, onde se sugere que este nucleotídeo seja requerido para a proliferação das células tumorais (SIEMS et al., 1993).

6. CONCLUSÕES

- 1- O modelo de inoculações multifocais sc simula, adequadamente, o estágio final da disseminação metastática do câncer e dissocia os componentes hemolítico e do crônico da anemia do câncer.

- 2- A alta correlação ($r^2 = 0,86$) entre o desenvolvimento da anemia hemolítica e outros efeitos sistêmicos bem conhecidos induzidos pelo câncer, tais como a anorexia, ganho de peso, sugerem a possibilidade de bases moleculares comuns para estas alterações homeostáticas graves e letais que acontecem no estágio final do câncer.
- 3- A anemia hemolítica seria decorrente da liberação de moléculas produzidas pelo tumor ou hospedeiro os quais seriam capazes de alterar a função da membrana plasmática (transporte e/ou permeabilidade) direta ou indiretamente através de alterações no metabolismo nas hemácias.
- 4- O aumento da resistência das hemácias ao estresse osmótico é um efeito de desenvolvimento rápido e, provavelmente, deva estar associado à ação imediata das moléculas que desencadeiam o processo. Porém a diminuição da resistência das hemácias observada durante o estresse metabólico é um efeito de desenvolvimento lento, provavelmente acumulativo, devido a incapacidade intrínseca das hemácias em corrigir as alterações de suas proteínas.
- 5- A indução simultânea de aumentos do consumo de glicose e do conteúdo de ATP nas hemácias dos ratos portadores de tumor de Walker 256 sugere que o aumento do metabolismo possa ser a alteração primária destas células.

7 - SUMMARY

Cancer anemia is an anemia of chronic diseases, although it is sometimes the first symptom of cancer. Cancer anemia includes a hemolytic component, important in the terminal stage when even transfused cells are rapidly destroyed. The presence of a chronic component and the terminal complications of the illness limit studies of the hemolytic component. A multifocal model of tumor growth was here to simulate the terminal metastatic dissemination stage (several simultaneous inoculations of Walker 256 cells). The hemolytic component of anemia began 3-4 days after inoculations in 100 % of the rats and progressed rapidly thereafter: Hb levels dropped 14.9 ± 0.2 to 8.7 ± 0.6 g/dL from days 7 to 11 (~ 5 times the physiological rate in rats), in the absence of bleeding. The development of anemia was correlated ($r^2=0.86$) with the development of other systemic effects such as anorexia. there was a significant decrease in the osmotic fragility to circulating erythrocytes: the NaCl concentration causing 50% lysis was reduced from -0.42 ± 0.06 g/L, ($P<0.01$), on day 7, indicating a reduction in erythrocyte volume. However, with mild metabolic stress (4 h- incubation at 37°C), the erythrocytes showed a greater increase in osmotic fragility than the controls, suggesting marked alteration of erythrocyte homeostasis. It was also observed a significative increase in osmotic fragility of normal donors red blood cells when incubated with ascitic liquid (low glucose concentration, and probably, a high concentration of molecules produced by tumor). These effects may be due to primary plasma membrane alterations (transports and/or permeability) and/or be secondary to

metabolic changes. This multifocal model is adequate for studying the hemolytic component of cancer anemia since it is rapid, highly reproducible causes minimal animal suffering. Another observed significant results were the increase of glucose consumption and red blood cells ATP content in tumor bears animals.

8. Referências bibliográficas (*)

- AL-AWQATI, Q. – Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. **Science**, **269**: 805-6, 1995.
- ATAULLAKHANOV, F.I.; VITVITSKY, V. M.; ZHABOTINSKY, A.M.; PICHUGIN, A.V.; PLATONOVA, O.V.; KHOLODENKO, B. N.; EHRLICH, L.I. – The regulation of glycolysis in human erythrocytes. The dependence of glycolytic flux on the ATP concentration. **Eur. J. Biochem.**, **115**: 359-65, 1981.
- BEST, L.; SHEADER, E.A.; BROWN, P.D. – A volume-activated anion conductance in insulin-secreting cells. **Eur. J. Physiol.**, **431**: 363-70, 1996.
- BLUM, S. F.; SHOHET S. B.; NATHAN, D. G.; GARDNER, F. H. – The effect of amphotericin B on erythrocyte membrane cation permeability: its relation to *in vivo* erythrocyte survival. **J. Lab. Clin. Med.**, **73**: 980-7, 1969.
- BODEY, G.P. & FREI, III. E- Medical therapy of cancer. In: Wintrobe M.M.; Thorn G.W.; Adams R.D.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Petersdorf, R.G. eds. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 1974. 7th ed. McGraw-Hill Book Company, New York.

(*) Estas referências foram citadas segundo as normas da BIREME, 1990.

- BRENNEMAN, D.E.; MATHUR, S.N.; SPECTOR, A. .A.– Characterization of the hyperlipidemia in mice bearing the Ehrlich ascites tumor. **Eur. J. Cancer**, **11**:225-30, 1975.
- COHEN, R.; CONTINO, M.; HENSEN, D.K.; TEREM, T.M.; IBSEN, K. I.; GRANGER, G.A.; WILE A. G. – Heterogeneity of soluble supressor factors in rat malignant ascites. **Oncology**, **45**: 230-35, 1988.
- COOPER, R. A. & JANDL, J.H. – The selective and conjoint loss of red cell lipids. **J. Clin. Invest.**, **48**:906-14, 1969.
- CORI, C. F. & CORI, G. T. – The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid, and CO₂-combining power of blood passing through a tumor. **J. Biol. Chem.**, **66**: 397-405, 1925.
- DACIE, J. V.; LEWIS, S. M.; GORDON-SMITH. E. C. - Investigation of hereditary haemolitic anaemias. In: Dacie, J. V. & Lewis, S. M. (eds.) - **Pratical Hematology**. 6 ed. Edinburgh, Churchill Livinstone, 1984. p 152-178.
- DUMONT, A.E.; NACHBAR, M. S.; MARTELLI, A. B. – Altered erythrocyte osmotic fragility in mice with Ehrlich ascites tumor. **J. Natl. Cancer. Inst.**, **59**: 989-91, 1977.
- EARLE, W. R. - A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, *in vivo and in vitro*. **Am. J. Cancer**, **24**: 566-612 , 1935.
- FATHERAZI, S.; IZUTSU, K. T.; WELLNER, R.B.; BELTON, C. M. – Hypotonically activated chloride currents in HSG cells. **J. Membrane Biol.**, **142**: 181-93, 1994.

- GOLD, J. - Proposed treatment of cancer by inhibition of gluconeogenesis. **Oncology**, **22**: 185-207, 1968.
- GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. - Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, **39**: 173-8, 1982.
- GUAITANI, A.; DELLA TORRE, P.; MORASCA L. ; PINTUS C.; BARTOSEK I. - Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**, **69**: 1-9, 1983.
- GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIERIA-MATOS, A. N.; FERNANDES, G. A. -The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 309-17, 1999.
- HARDY, S.P.; GOODFELLOW, H.R.; VALVERDE, M.A.; GILL, D.R.; SEPULVEDA, F.V.; HIGGINS, C.F. - Protein-kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug-resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. **EMBO J.**, **14**: 68-75, 1995.
- HEBERT, D. N. & CARRUTHERS, A. - Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts. **J. Biol. Chem.**, **261**: 10093-9, 1986.
- HELGERSON, A. L.; HEBERT, D. N.; NADERI, S.; CARRUTHERS, A. - Characterization of two independent modes of action of ATP on human erythrocyte sugar transport. **Biochemistry**, **28**: 6410-7, 1989.

- HOLROYDE, C. P.; GABUZDA, T. G.; PUTNAM, R. C.; PAUL, P.; REICHARD, G. A. – Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. **Cancer Res.**, **35**: 3710–4, 1975.
- HONDA, K.; ISHIKO, O.; TATSUTA, I.; DEGUCHI, M.; HIRAI, K.; NAKATA, S-i.; SUMI, T.; YASUI, T.; OGITA, S. - Anemia-inducing substance from plasma of patients with advanced malignant neoplasms. **Cancer Res.**, **55**: 3623–8, 1995.
- HYMAN, G. A. – Studies on anemia of disseminated malignant neoplastic disease. I. The hemolytic factor. **Blood**, **9**: 911–9, 1953.
- HYMAN, G. A. & HARVEY J. E. - The pathogenesis of anemia in patients with carcinoma. **Am. J. Med.**, **19**:350–6, 1955.
- INCA. Relatório de atividades 1998. Principais realizações. Informações e vigilância epidemiológica (1999) <http://www.inca.org.br/inca/relatório/rel_98/ive.html> data do acesso 4/11/99)
- ISHIKO, O.; SUGAWA, T.; TATSUTA, I.; SHIMURA, K.; NAKA, K.; DEGUCHI, M.; UMESAKI, N. - Anemia-inducing substances (AIS) in advanced cancer: inhibitory effect of AIS on the function of erythrocytes and immunocompetent cells. **Jpn. J. Cancer Res. (Gann)**, **78**: 596–606, 1987.
- IWAMA, M.C.F.; de FRANCO, M. F.; BASSO, N.A. . – Histopatologia dos nódulos linfáticos regionais e distantes de ratos transplantados com tumor de Walker. **Cien. Cult.**, **26**: 175–9, 1974.
- JACQUEZ, J. A. – Modulation of glucose transport in human red blood cells by ATP. **Biochim. Biophys. Acta**, **727**: 367–78, 1983.

- JENSEN, M. R. & BRAHM, J. – Glucose transport in human red cell membranes. Dependence of age, ATP, and insulin. **Biochim. Biophys. Acta**, **900**: 282-90, 1987.
- KUNST, A.; DRAEGER, B.; ZIEGENHORN, J. - Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J.; Graßl, M. ed. **Methods of Enzymatic Analysis**. 3. Weinheim, VCH. Verlags VI, 1988. p.178-85.
- LEE, G.R. – The anemia of chronic disease. **Sem. Hematol.**, **20**: 61-80, 1983.
- MINAKAMI, S. & YOSHIKAMA, H. – Studies on erythrocyte glycolysis. III . The effects active cation transport, pH and inorganic phosphate concentration on erythrocyte glycolysis. **J. Biochem.**, **59**: 145-150, 1965.
- MOLITERNO, A. R. & SPIVAK, J. L. - Anemia of cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North America**, **10**: 345-363, 1996.
- OH-UTI, K.; SHINDO, K.; TAMURA, Y.; OBARA, K.; NUMATA, T.; YAMAGATA, N.; KITAJIMA, S. –The influence of anemia-inducing organ extracts on osmotic fragility of the rabbit red cells in vitro. **Tohoku J. Exp. Med.**, **95**: 393-402, 1968.
- PITOT, H. C. & DRAGAN, Y. P. – Facts and theories concerning the mechanisms of carciogenesis. **FASEB J.**, **5** : 2280-86, 1991.
- RAY, M. R. & CHOWDHURY, J. R. – Osmotic fragility, sialic acid content and survival of circulating erythrocytes in anemic tumor-bearing mice. **Neoplasma**, **36**: 155-60, 1989.

- RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N.; TAHIN, Q. S. - Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. **Tumori**, **81**: 370-7, 1995.
- RETTORI, O.; dos SANTOS, I. C.; VIEIRA-MATOS, A. N. - Early synchronized development of cancer anemia. Reversibility of RBC life span reduction & osmotic fragility alterations. **FASEB J.**, **12**: A-476, 1998.
- RETTORI, O.; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA-MATOS, A.N. - RBC's osmotic fragility studies during the induction of the hemolytic component of cancer anemia . **FASEB J.**, **13**: A-914, 1999.
- REW, D. A. - Cell and molecular mechanisms of pathogenesis and treatment of cancer. **Postgrad. Med. J.**, **74**:77-88, 1998.
- SIEMS, W.G.; GRUNE, T.; SCHMIDT, H.; TIKHONOV, Y.V.; PIMENOV A. M. - Purine nucleotide levels in host tissues of Ehrlich ascites tumor-bearing mice in different growth phases of the tumor. **Cancer Res.**, **53**: 5143-7, 1993.
- SPIVAK, J. L. - Cancer-related anemia: its causes and characteristics. **Sem. Oncol.**, **21**: 3-8, 1994.
- STELLA, M. B. - **Estudo da membrana eritrocitária em β talassemia heterozigótica**. Campinas, 1998. [Tese Doutorado- IB-UNICAMP].
- TATSUTA, I.; ISHIKO, O.; NAKA, K.; DEGUCHI, M.; SUGAWA, T. - Studies on the pathogenesis of cancer anemia. **Adv. Obstet. Gynecol.**, **41**: 293-303, 1989.
- TEMPLE, J.J. & STUCKEY, W.J. - Mechanisms contributing to the anemia associated with a localized solid tumor. **Am. J. Med. Sci.**, **292**: 277-81, 1986.

- THEOLOGIDES, A. - Pathogenesis of cachexia in cancer. A review and a hypothesis. **Cancer**, **29**: 484-8, 1972.
- TOOMEY, D.; REDMOND, H. P.; BOUCHIER-HAYES, D. - Mechanisms mediating cancer cachexia. **Cancer**, **76**: 2418-26, 1995.
- VERDON, B.; WINPENNY, J.P.; WHITFIELD, K.J.; ARGENT, B.E.; GRAY, M.A. - Volume-activated chloride currents in pancreatic duct cells. **J. Membrane Biol.**, **147**: 173-83, 1995.
- VIEIRA, S. -.Introdução à bioestatística. In: O teste t. 1.ed. Rio de Janeiro, Campus, 1981. p. 205-220.
- WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. - The metabolism of tumors in the body. **J. Gen. Physiol.**, **8**: 519-30, 1927.
- WARBURG, O. - The metabolism of tumors . Constable Press, London, Smith, New York, 1931 .
- WARBURG, O. - On the origin of cancer cells. **Science**, **123**: 309-14, 1956.
- WEINBERG, R. A. - How cancer arises. **Sci. Am.**, **275**: 32-40, 1996.
- ZUCKER, S.; LYSIK, R.M.; DI STEFANO, J. - Pathogenesis of anemia in rats with Walker 256 carcinosarcoma. **J. Lab.Clin. Med.**, **90**: 502-11, 1977.

9. ANEXO

Trabalho publicado

VIDO, A . A; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F; VIEIRA-MATOS, A .N.;
RETTORI, O. The hemolytic component of cancer anemia: osmotic and
metabolic stress effects on erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations
of the Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**:815-22, 2000.

Resumo apresentado em Congresso

VIDO, A . A; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F; VIEIRA-MATOS, A .N.;
RETTORI, O. The hemolytic component of cancer anemia: osmotic and
metabolic stress effects on erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations
of the Walker 256 tumor. **II Congresso de Oncologia do Hospital Sta. Rita,**
Porto Alegre/ RS, 11 a 13 de agosto de 2000.

The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor

A.A. Vido¹, T.C. Cavalcanti²,
F. Guimarães²,
A.N. Vieira-Matos²
and O. Rettori²

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, and
²Laboratório de Pesquisas Bioquímicas, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Abstract

Correspondence

O. Rettori
Laboratório de Pesquisas
Bioquímicas, CAISM, UNICAMP
Caixa Postal 6151
13081-970 Campinas, SP
Brasil
Fax: +55-19-788-9383
E-mail: rettori@caism.unicamp.br

A.A. Vido was the recipient of a
CAPES fellowship. Publication
supported by FAPESP.

Received September 24, 1999
Accepted March 10, 2000

Cancer anemia is classified as an anemia of chronic diseases, although it is sometimes the first symptom of cancer. Cancer anemia includes a hemolytic component, important in the terminal stage when even transfused cells are rapidly destroyed. The presence of a chronic component and the terminal complications of the illness limit studies of the hemolytic component. A multifocal model of tumor growth was used here to simulate the terminal metastatic dissemination stage (several simultaneous inoculations of Walker 256 cells). The hemolytic component of anemia began 3-4 days after inoculation in 100% of the rats and progressed rapidly thereafter: Hb levels dropped from 14.9 ± 0.02 to 8.7 ± 0.06 from days 7 to 11 (~5 times the physiologically normal rate in rats) in the absence of bleeding. The development of anemia was correlated ($r^2 = 0.86$) with the development of other systemic effects such as anorexia. There was a significant decrease in the osmotic fragility of circulating erythrocytes: the NaCl concentration causing 50% lysis was reduced from 4.52 ± 0.06 to 4.10 ± 0.01 ($P < 0.01$) on day 7, indicating a reduction in erythrocyte volume. However, with mild metabolic stress (4-h incubation at 37°C), the erythrocytes showed a greater increase in osmotic fragility than the controls, suggesting marked alteration of erythrocyte homeostasis. These effects may be due to primary plasma membrane alterations (transport and/or permeability) and/or may be secondary to metabolic changes. This multifocal model is adequate for studying the hemolytic component of cancer anemia since it is rapid, highly reproducible and causes minimal animal suffering.

Key words

- Hemolytic component
- Cancer anemia
- Osmotic fragility
- Systemic effects
- Walker 256 tumor

Introduction

Cancer anemia is usually classified as an anemia of chronic diseases (ACD), but is sometimes the first symptom to appear and therefore not necessarily a chronic manifes-

tation of cancer (1-3). Cancer anemia includes a hemolytic component which markedly increases in the final stage of the illness, when even transfused red blood cells (RBC) are rapidly destroyed (4,5).

The mechanisms underlying the hemolytic

component are not well understood, and their study is difficult because of the simultaneous presence of a chronic component, and because of ethical difficulties, treatments and other complications, particularly in the terminal stages.

In experimental studies such as those previously performed with the Walker 256 tumor inoculated at a single subcutaneous (sc) site, the development of anemia showed the general characteristics of ACD (5,6). However, if instead of the usual unifocal tumor growth model, the studies are initiated using multifocal simultaneous tumor inoculations (simulating the metastatic dissemination of the final stage), the systemic effects of cancer, including anemia, appear rapidly and synchronously in all animals (7,8). The development of anemia under these conditions is similar to that found in terminal cancer patients, in which the rate of RBC destruction is very high (4,9). This multifocal model using the Walker 256 tumor therefore seems to be particularly suited for the study of the hemolytic component of cancer anemia.

In the present study, we examined the time-course of the changes occurring in hemoglobin levels (Hb) and RBC osmotic fragility (OF) and correlated them with other systemic effects of cancer such as anorexia. The OF was studied in fresh whole blood samples and in the same RBC after metabolic stress (*in vitro* incubation at 37°C).

Material and Methods

Tumor and animals

The Walker 256 "A" tumor line was kindly provided by Dr. Maria C. Cintra Gomes, Department of Physiology, IB/UNICAMP. The line originally came from the National Cancer Institute Bank, Cambridge, MA, USA. The tumor is currently kept in the laboratory under liquid N₂ and is maintained through intraperitoneal or sc pas-

sages in rats.

Thirty-five 9-week-old male Wistar rats were used. The animals were housed at controlled temperature (21°C), on a 12-h light-dark cycle and fed a commercial rat diet (Labina/Purina, Campinas, SP, Brazil). The rats were randomly divided into experimental (tumor) and pair-fed control groups of 20 and 15 animals, respectively. The tumor bearers were allowed free access to food, while the pair-fed controls were allowed to eat only the amount ingested the day before by the tumor bearers. Both had free access to water. Tumor-bearing rats received four dorsal sc inoculations of 5×10^6 tumor cells each in 0.25 ml of Ringer-lactate spaced at least 1 cm apart. Healthy tumor cells with 98% viability (assessed by Trypan blue) were obtained from the ascitic fluid of a donor rat. Control rats received four identical inoculations of vehicle only.

The general UKCCR guidelines for animal welfare were followed (10). One of the authors was responsible for the daily clinical evaluation of the animals. Somatic and visceral pain was explored by palpation and gentle compression of the limbs and axillary, inguinal, tumoral, peritoneal and thoracic regions. No animal needed to be sacrificed before the end of the experiment.

Experimental design

Before tumor inoculation, the rats were anesthetized with ether and a 0.7-ml blood sample was collected from the suborbital plexus into 0.05 ml heparin (5000 IU/ml). The tumor bearers were sacrificed on days 4, 7 and 11 (5, 5 and 10 rats, respectively) after tumor inoculation, and the pair-fed controls on days 5, 8 and 12 (5, 5 and 5 rats, respectively). At sacrifice, the thorax was opened under deep ether anesthesia and a large (~6 ml) blood sample was collected into 0.3 ml of heparin, via direct heart puncture with an 18 G needle. All blood samples were used for hemograms and OF determinations.

Hemogram

Hemograms were performed using a Cell-dyn 1600 apparatus and the results were corrected for the relative volume of heparin present in each blood sample.

Osmotic fragility and RBC incubation tests

Red blood cell OF was determined as described by Dacie et al. (11). Packed RBC obtained from tumor bearers and controls (0.2 ml, followed by a 5-min centrifugation at 978 g) at sacrifice were incubated for 4 h at 37°C after resuspension in different media: a) RL (1.0 ml of Ringer-lactate), b) RL + G (1.0 ml of Ringer-lactate + 2 mg of glucose), c) PLa (1.0 ml of autologous plasma) and d) PLa + G (1.0 ml of autologous plasma + 1 mg of glucose). After incubation, the OF was again determined. To facilitate data analysis the median corpuscular fragility (MCF) was often used. MCF has been defined as the NaCl concentration (g/l) causing 50% of RBC lysis (11).

Autopsy

Autopsies were performed on all tumor-bearing rats. The tumors were dissected and weighed, and special attention was paid to the eventual presence of metastases, the invasion of important tissues and bleeding.

Statistical analysis

The results are reported as means $\pm$ SEM. The statistical significance of the changes in fresh blood was determined by the Student paired *t*-test. The significance of the metabolic stress studies was tested by ANOVA and by the paired Student *t*-test (12).

Results

Tumor development

Tumors grew at all inoculated sites (4/

rat) and were palpable within 3 days. Their mean weights were 2.8 ± 0.2 g and 10.3 ± 0.6 g on days 7 and 11, respectively.

Development of anemia

Figure 1 shows the time-course of the changes in Hb and food intake during the experiment. The Hb levels decreased rapidly ($P < 0.001$) in tumor bearers, dropping from 14.9 ± 0.2 to 8.7 ± 0.6 g/dl in the last 4 days (1.55 g dl⁻¹ day⁻¹, about 5 times the normal rate of RBC destruction in rats). The decrease in Hb levels was correlated with the decrease in food intake: on days 4, 7 and 11 Hb levels decreased 2.3 ± 2.1 , 16.7 ± 1.1 and $48.3 \pm 3.3\%$, while the respective average food intake decreased 27, 34 and 72% ($r^2 = 0.86$, $P < 0.001$).

Osmotic fragility changes in fresh RBC

Figure 2 shows the OF curves of fresh RBC from tumor bearers and pair-fed controls, 4, 7 and 11 days after tumor inoculation. A significant shift to the left was observed in all tumor bearers (Figure 2A, B and C) which, expressed in MCF, corresponded to -0.25 ± 0.04 , -0.42 ± 0.06 and -0.36 ± 0.07 g/l, respectively ($P < 0.01$ in all instances). In the control rats there was a slight shift to the left on day 4 but no changes on days 7 and 11

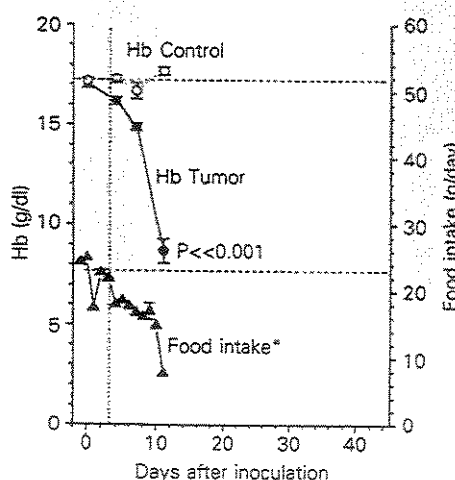


Figure 1 - Changes in the hemoglobin levels and daily food intake of rats with multifocal inoculations of the Walker 256 tumor and of their pair-fed controls. The pair-fed control data were shifted backwards one day in order to cancel the methodological delay in the protocol (see Material and Methods). *Tumor-bearing and pair-fed control animals.

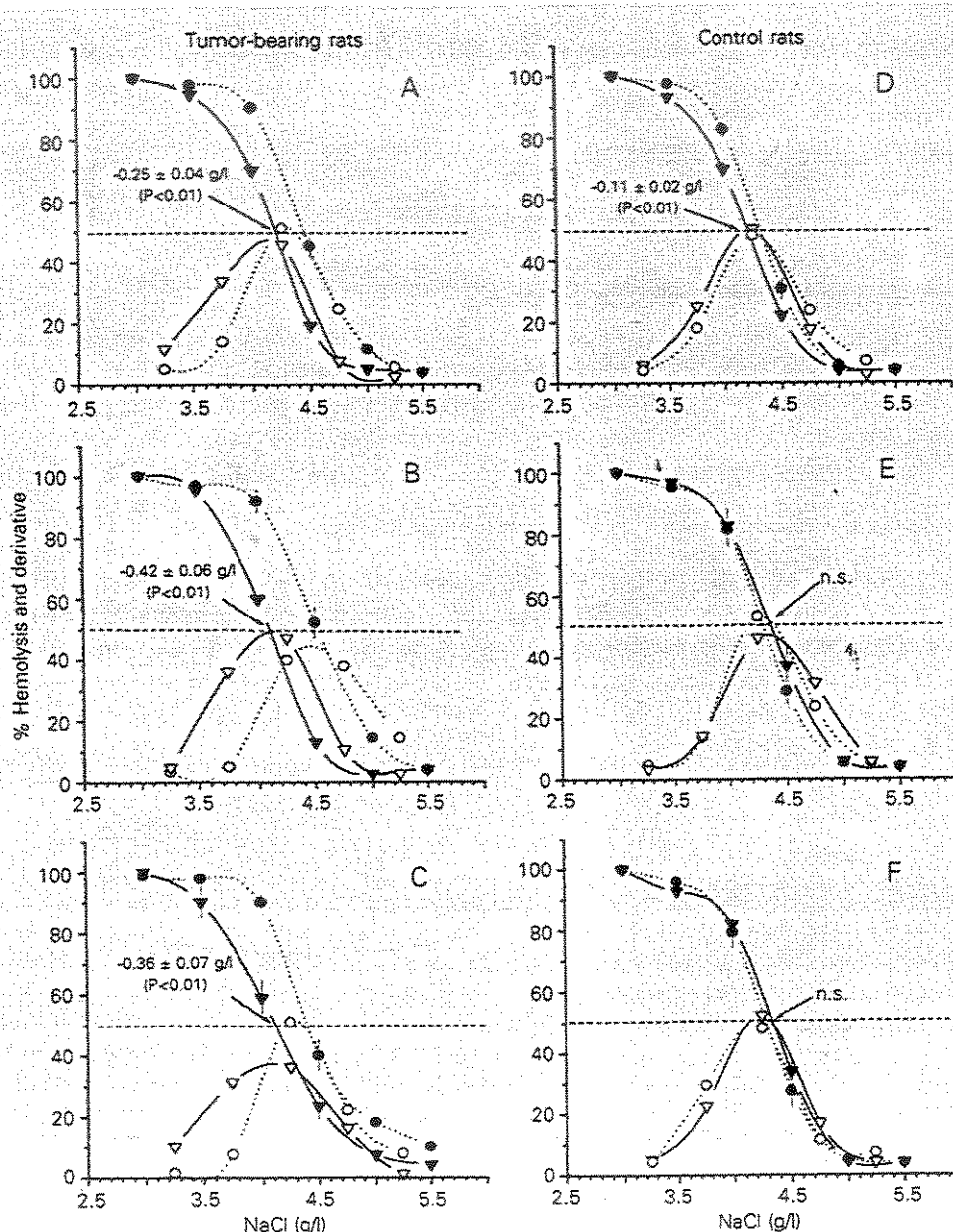
(Figure 2D, E and F).

Consistent with the changes in OF the hemogram showed a decrease in median RBC corpuscular volume, expressed as fl, with values of 53.2 (range 53-54), 51.6 (range 51-52) and 50.0 (range 49-52) for tumor bearers on days 4, 7 and 11 after tumor inoculation, respectively ($r^2=0.77, P<0.001$). In the control group, the values were 51.6 (range 51-53), 51.8 (range 50-53) and 50.2

(range 49-52), respectively ($r^2 = 0.21$, not significant).

Another change observed on day 11 was the decrease in the slope of the RBC OF curves (Figure 2C). The maximal derivative value, which corresponds to the maximal percent variation in RBC lysis, induced by a change of 0.5 g/l in NaCl concentration dropped from $51.7 \pm 1.8\%$ on day zero to $43.7 \pm 2.1\%$ per 0.5 g/l on day 11 ($-8.0 \pm$

Figure 2 - Osmotic fragility curves for fresh RBC from rats multifocally inoculated with Walker 256 tumor (left) and for the pair-fed controls (right) sacrificed on days 4 (A and D), 7 (B and E) and 11 (C and F) after inoculation. Filled symbols: % hemolysis. Open symbols: derivative values (difference between two consecutive points on the hemolysis curve). Broken lines and circles: mean values on day zero. Solid lines and inverted triangles: mean values on the day of sacrifice. n.s.: Nonsignificant.



2.1% per 0.5 g/l, $P < 0.01$). Under the same conditions the changes in the control group were not significant, i.e., 52.0 ± 2.4 to $48.0 \pm 1.0\%$ per 0.5 g/l ($-4.0 \pm 2.2\%$ per 0.5 g/l).

Osmotic fragility after *in vitro* incubation

The sensitivity of RBC from tumor-bearing rats and their pair-fed controls to the metabolic stress induced by incubation at 37°C for 4 h was tested using Ringer-lactate buffer as incubation medium and autologous plasma with or without glucose addition. This treatment caused only a small increase in the MCF of RBC from the pair-fed controls, whereas RBC from tumor bearers were more sensitive to the stress, particularly 11 days after tumor inoculation when the increase in MCF was marked and the difference, compared with the controls, was significant for all incubation media tested (Figure 3).

Autopsy

There were no signs of bleeding or macroscopic visceral metastases. Only some enlarged regional lymph nodes were observed, particularly in the retroperitoneum and around the thymus, but in no instance were neighboring tissues invaded.

Discussion

All rats rapidly and synchronously developed anemia and anorexia, the systemic effects characteristic of the final stage of cancer, after multifocal tumor inoculation. The effects began 3-4 days after inoculation and progressed rapidly thereafter, and would have resulted in death 8-9 days later (7,8) if the rats had not been sacrificed at fixed times according to the experimental protocol. The effects developed in the absence of complications such as bleeding, invasions or visible metastases, as confirmed at autopsy. The early onset, rapid course and magnitude of

the decrease in Hb levels in the tumor bearers indicated an acute form of anemia which, in the absence of bleeding, could only be explained by the rapid destruction of RBC. Based on the rate of decrease in Hb levels, the RBC destruction in the final four days was about five times the normal physiological rate for this phenomenon.

The rapid progress of the anemia seen with multifocal tumor inoculation is quite different from the progress observed after unifocal inoculation. Figure 4 shows unpublished data (Vieira-Matos AN and Rettori O) from our laboratory similar to those reported by others using the unifocal Walker 256 model (5,13). The average results obtained under these conditions suggest that this cancer causes moderate chronic anemia and mild temporary anorexia. These conclusions can be partially explained by the fact that in this model the periodic transverse averaging

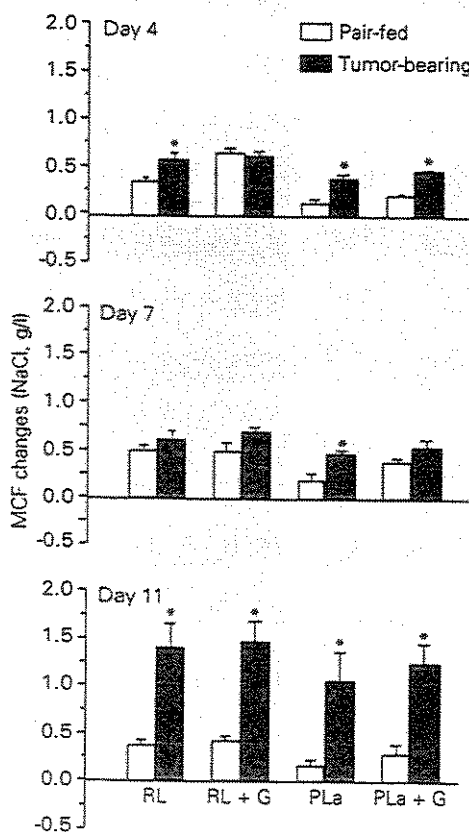


Figure 3 - Effect of a 4-h incubation at 37°C on the osmotic fragility of RBC from tumor-bearing and pair-fed control rats in different incubation media: RL: Ringer-lactate; RL + G: Ringer-lactate + glucose (2 mg/ml); PLa: autologous plasma; PLa + G: autologous plasma + glucose (1 mg/ml). MCF: Median corpuscular fragility = NaCl concentration (g/l) causing 50% of RBC lysis. * $P < 0.05$ (paired Student *t*-test).

of data mixes values from groups of animals at very different stages of the illness with data from animals with still undetectable homeostatic alterations. In addition, the exclusion of animals that died at the end of the experiment, together with the survival of some resistant animals generates an artifact that suggests an apparent improvement in the illness condition. Guaitani et al. (13) recognized these influences while studying the anorexia induced by the Walker 256 tumor and suggested a different treatment of the data, in which the independent variable was changed. Instead of time, this author proposed the use of "the percentage of the survived time". Using this approach, at the time of death (100% of survived time) for example, all animals in the group were totally anorectic. A further improvement in the handling of this problem was described by Rettori et al. (7). The multifocal tumor model avoids all of these problems by synchronizing the onset and progress of the systemic effects of the final stage of cancer among the individuals of the experimental group (7,8). Under the latter conditions, the hemolytic component of cancer anemia is of particular importance as described for humans by Hyman and Harvey in the early 50s (4). These authors demonstrated what is generally recognized in oncology, namely, that in terminal cancer patients even the half-life of

transfused RBC is markedly reduced, so that frequent transfusions are of little help in maintaining reasonable Hb levels.

The increased importance of the hemolytic component of the anemia of terminal cancer patients is probably associated with metastatic dissemination. In this regard, the multifocal inoculation model simulates the terminal stage of cancer, with the advantage of dissociating the hemolytic component of anemia from the chronic complications that mask it.

Changes in red blood cell osmotic fragility induced by the Walker 256 tumor

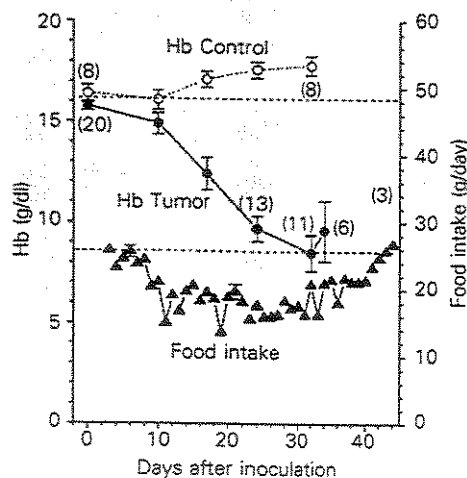
The OF of fresh RBC reflects their ability to take up water without lysis and is determined by their volume-surface area ratio (11).

In the present study, the development of acute anemia was accompanied by a decrease in the OF of RBC (a shift to the left in the OF curves), indicating a reduction in the volume of circulating erythrocytes. Indeed, the blood count showed that the mean corpuscular volume of RBC from tumor-bearing rats was significantly reduced compared with control RBC. On the other hand, the higher increases in MCF after a 4-h incubation at 37°C when compared with pair-fed controls indicated that the RBC of tumor bearers had an increased propensity to swell during incubation, thus decreasing the resistance to metabolic stress. This effect was cumulative since it became marked only on day 11 and was absent or slight on days 4 and 7. The complexity of the factors associated with the changes in OF induced by this tumor was further suggested by the reduction in the slope of the OF curve on day 11.

Mechanisms involved in RBC alterations

The above results shed little light on the molecular basis of the observed phenomenon. Hereditary alteration in RBC glycolytic

Figure 4 - Changes in hemoglobin levels and daily food intake of rats bearing unifocal inoculations of the Walker 256 tumor (Vieira-Matos AN and Rettori O, unpublished results similar to those reported by others, see text). (n): Number of individuals in the group or remaining in it.



enzymes, such as pyruvate kinase deficiency, is an example of how a primary alteration in RBC metabolism is able to induce anemia associated with a decrease in the volume (decreased OF) and resistance to metabolic stress (marked OF increase after incubation) of fresh RBC. On the other hand, hereditary and acquired membrane defects are also known to decrease the RBC volume-surface area ratio, and hence decrease the OF (11). In contrast, the induction of cell volume changes leads to important cellular metabolic alterations (14) such that circulating molecules of tumor and/or host origin, cytokines or other effector molecules (15) acting on RBC metabolism and/or its plasma membranes may be involved in inducing the observed phenomenon. This hypothesis is supported by observations that the tumor-induced OF effects seen in the present study may be reproduced under special conditions by incubating normal RBC with plasma from tumor anemic animals (Vieira-Matos AN and Rettori O, unpublished results). A reduction in RBC OF in anemic tumor-bearing mice has been reported, and may be caused by structural alterations in the RBC (16). We have also observed a marked decrease in RBC OF associated with anemia in rats bearing DMBA-induced mammary cancer (Cavalcanti TC and Rettori O, unpublished results).

Relevance of the present observations

The high correlation ($r^2 = 0.86$) between the development of anemia and other well-known systemic effects such as anorexia induced by cancer suggests the possibility of a common molecular basis for the serious homeostatic alterations occurring in the final stage of cancer. Recent studies have proposed an imbalance between catabolic and anabolic hormones and cytokines of tumor and/or host origin as the molecular basis for cancer cachexia (15). A main role has been suggested for the following cyto-

kines: IL- α , IL- β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- α and γ , but conclusive data are often lacking (17,18), and because the circulating levels usually do not correlate well with cachexia, an alternative model of abnormal generalized high local production of cytokines through positive feedback systems has been proposed (17).

The possibility should be explored that the study of the alterations in the RBC plasma membrane and/or metabolism could help to identify these molecules and to explain the mechanism of cancer anemia, cachexia and the so-called multiple organ failure syndrome, frequently referred to as the cause of death in cancer patients.

The multifocal tumor inoculation model

The explanation as to why several small tumors (little more than 100 mg each on days 3-4) were more effective in inducing the systemic effects of cancer than a single large tumor (sometimes 40 g or more) is probably related to the "cell kinetics" of tumor growth. Studies in this field suggest that the sum of proliferative tumor cells (PTC) in several small tumors is larger and increases faster than that of a single, big tumor, in which most cells are non-proliferative (NPTC). Recent work has demonstrated that in tumors of up to 100 mg (days 3-4 in our model) about 90% of the mass would be PTC and would grow fast (exponentially), but they would rapidly reach an almost steady state of about 1-2 g (19). One explanation for this, consistent with the current concepts of tumor cell proliferation (20), would be that, due to the rapidly increasing irrigation deficit, about half of the new cells formed after each replication would stay in G_1 or go to G_0 , with many of the latter progressing to apoptosis or necrosis. Thus tumors larger than 1-2 g would grow mainly at the expense of NPTC, i.e., cells that are not effective in inducing the systemic effects of cancer. In the final stage, when metastatic dissemina-

tion occurs, the multiple small foci of neoplastic growth, each bearing high relative populations of PTC, would produce a high enough "total" rate of PTC growth to induce the serious homeostatic alterations that culminate in host death.

In addition to the already mentioned advantages of the multifocal model (synchronism among individuals, rapidity, reproducibility and absence of complications), this

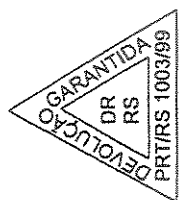
model also involves minimal animal suffering.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. S. Hyslop for his careful reading of the paper and correction of the language. We also thank A. Garcia for the animal care.

References

1. Moliterno AR & Spivak JL (1996). Anemia of cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10: 345-363.
2. Temple JJ & Stuckey WJ (1986). Mechanisms contributing to the anemia associated with a localized tumor. *American Journal of Medical Sciences*, 292: 277-281.
3. Bodey GP & Frei III E (1974). Medical therapy of cancer. In: Wintrobe MM, Thorn GW, Adams RD, Braunwald E, Isselbacher KJ & Petersdorf RG (Editors), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 7th edn. McGraw-Hill Book Company, New York.
4. Hyman GA & Harvey JE (1955). The pathogenesis of anemia in patients with carcinoma. *American Journal of Medicine*, 19: 350-356.
5. Zucker S, Lysik RM & Di Stefano J (1977). Pathogenesis of anemia in rats with Walker 256 carcinosarcoma. *Journal of Clinical Medicine*, 90: 502-511.
6. Guaitani A, Recchia M, Carli M, Rocchetti M, Bartosek I & Garattini S (1982). Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. *Oncology*, 39: 173-178.
7. Rettori O, Vieira-Matos AN & Tahin OS (1995). Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori*, 81: 370-377.
8. Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos AN & Fernandes GA (1999). The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 309-317.
9. Hyman GA (1953). Studies on anemia of disseminated malignant neoplastic disease. *Blood*, 9: 911-919.
10. UKCCR (1988). United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Laboratory Animals*, 22: 195-201.
11. Dacie JV, Lewis SM & Gordon-Smith EC (1984). Investigation of hereditary haemolytic anaemias. In: Dacie JV & Lewis SM (Editors), *Practical Hematology*. 6th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
12. Vieira S (1981). *Introdução à Estatística*. 1st edn. Editora Campos, Rio de Janeiro.
13. Guaitani A, Torre PD, Morasca L, Pintus C & Bartosek I (1983). Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. *Tumori*, 69: 1-9.
14. Lang F, Busch GL, Völkl H & Häussinger D (1995). Cell volume: a second message in regulation of cellular function. *News in Physiological Sciences*, 10: 18-22.
15. Tessitore L, Castelli P & Baccino FM (1993). Humoral mediation for cachexia in tumor-bearing rats. *British Journal of Cancer*, 67: 15-23.
16. Ray MR & Chawdhury R (1989). Osmotic fragility, sialic acid content and survival of circulating erythrocytes in anemic tumor bearing mice. *Neoplasma*, 36: 155-160.
17. Plata-Salaman CR (1998). Cytokins and feeding. *News in Physiological Sciences*, 13: 298-304.
18. Tisdale MJ (1997). Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition*, 13: 1-7.
19. Bassukas ID & Maurer-Schultze B (1990). Growth of metastases of the mouse adenocarcinoma EO771: an allometric relationship between growth of the primary tumors and their metastases. *Clinical and Experimental Metastasis*, 8: 329-343.
20. Tannock IA (1992). Cell proliferation. In: Tannock IF & Hill RP (Editors), *The Basic Science of Oncology*. 2nd edn. MacGraw Hill, Toronto.



P E S Q U I S A M É D I C A

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE

Porto Alegre, Brasil, Volume 34 (1) - Edição Especial, 2000

ISSN0048.3567

Sumário.....	3
Expediente.....	4-5

Editorial

Revista Pesquisa Médica.....	6
------------------------------	---

Referencial Histórico

Hospital Santa Rita - O Hospital do Câncer do Rio Grande do Sul.....	7
--	---

II Congresso de Oncologia do Hospital Santa Rita

RESUMO DE TEMAS LIVRES.....	8-43
Aparelho Digestivo.....	8
Cabeça e Pescoço.....	16
Ginecologia.....	18
Mama.....	24
Melanoma/Sarcoma.....	30
Urologia.....	35
Miscelânea.....	37

RESUMO DE TEMAS LIVRES.....	44-82
Aparelho Digestivo.....	44
Cabeça e Pescoço.....	47
Ginecologia.....	50
Mama.....	59
Melanoma/Sarcoma.....	66
Melanoma/Sarcoma.....	69
Urologia.....	73
Miscelânea.....	74

Instruções aos Autores

83-86

provocar mudanças no sentido de repensar, em nível preventivo, o trabalho nesta área.

Tentativa de suicídio em pacientes oncológicos - Coleffi J - Pesqui. Méd. (Porto Alegre) 21(RX), 34(1):44-52

Arteterapia educativa no Hospital Santa Rita

Autor: Prof^o Dr(da). Ormezzano G.

Instituições: Programa de Pós-Graduação em Educação
- Faculdade de Educação - PUCRS/ Hospital Santa Rita
- ISCMPA.

A arteterapia educativa se fundamenta na idéia de que a produção de imagens viso-espaciais é uma parte importante do funcionamento mental, e que as pessoas podem projetar seu mundo interior, consciente e inconscientemente, em formas visuais externas. O processo da arteterapia educativa está baseado na propriedade terapêutica do fazer artístico e da relação intersubjetiva, envolvendo várias dimensões: a expressiva, a criadora, a simbólica, a cognitiva, a afetiva e a interpretativa. O corpus teórico deste trabalho está composto com base nos estudos realizados em arteterapia por Païm e Jarreau (1996) e, mais especificamente, em arteterapia e psico-oncologia por Luzzato e Gabriel (1998); procura uma compreensão mais aprofundada do humano à luz da psicologia analítica de Jung (1975, 1995) e da socioantropologia do imaginário de Durand (1995, 1997); o tema desta investigação sobre qualidade de vida está fundamentado em Batel-Copel et al. (1997), Grassi (1997) e Simonton (1995).

Os objetivos desta pesquisa qualitativa e interpretativa foram: desvelar a implicação da arteterapia educativa em diversos espaços do Hospital Santa Rita; evidenciar as transformações vivenciadas pelos participantes durante os encontros; e, oferecer subsídios para melhorar a qualidade de vida dos pacientes oncológicos. A arte, limitada aqui, à expressão plástica, reorganiza as imagens existentes em nossa história pessoal e na história da humanidade, trazendo à tona, sentimentos e emoções, expressos por meio do desenho, da colagem e da modelagem em argila. Os encontros foram realizados em forma de treinamento com dois grupos de voluntárias do hospital, a arteterapia educativa foi usada como suporte na promoção e integração desta equipe e, também, como preparo para intervenções rápidas com pacientes em sala de espera e no leito hospitalar.

Uma oficina de cinco encontros fez parte do tratamento multidisciplinar do grupo de pacientes com câncer de mama, coordenado pela assistente social do hospital, estas sessões foram eficazes, ampliando nas

participantes o seu autoconhecimento, possibilitando uma maior integração subjetiva e social, passando a agir com mais criatividade e autorrealização, melhorando sua qualidade de vida após a mastectomia. Intervenções rápidas, a pacientes e acompanhantes, em sala de espera da radioterapia e no pátio do hospital, evidenciaram que os materiais artísticos utilizados contribuem na exploração das imagens do mundo interior, traduzindo as emoções e fantasmas ameaçadores da interioridade, diminuindo o stress e a ansiedade, aumentando a esperança, o entendimento e a colaboração no tratamento médico.

Sem dúvida alguma, este trabalho apresenta limitações espaço-temporais, dependendo do local e do momento dos encontros, assim como, do empenho de cada participante.

Arteterapia educativa no Hospital Santa Rita - Prof^o Dr(da). Ormezzano G - Pesqui. Méd. (Porto Alegre) 21(RX), 34(1):44-52

The hemolytic component of cancer anemia - Osmotic and metabolic stress effects on erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the walker 256 tumor

Autores: Vido¹ AA, Cavalcanti² TC, Guimarães² Vieira-Matos² ANT, Rettori² O.

Instituição: ¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB/UNICAMP).

²Laboratório de Pesquisas Bioquímicas, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM/ UNICAMP)

Introduction: Cancer anemia is classified as an anemia of chronic diseases, although it is sometimes the first symptom of cancer. Cancer anemia includes a hemolytic component, important in the terminal stage when even transfused cells are rapidly destroyed. The presence of a chronic component and the terminal complications of the illness impair studies of the hemolytic component.

Material and Methods: In the present work, a multifocal model of tumor growth was used to simulate the terminal metastatic dissemination stage (several simultaneous inoculations of Walker 256 cells).

Results: In this model the hemolytic component of anemia began 3-4 days after inoculation in 100% of the rats and progressed rapidly thereafter: Hb levels dropped 1.55 g/dL from days 7-11 (~ 5 times the physiological rate in rats), in the absence of bleeding. The development of anemia was highly correlated ($r^2 = 0.86$) with

development of other systemic effects such as anorexia. Sequential measurements showed a significant decrease in the osmotic fragility (OF) of circulating erythrocytes: the NaCl concentration causing 50% lysis dropped 0.42 to 0.06 g/L ($P < 0.01$) on day 7, indicating a reduction in erythrocyte volume. However, with mild metabolic stress (4 h incubation at 37°C), the erythrocytes showed a greater increase in OF than the controls, suggesting marked alteration of the erythrocyte homeostasis.

Conclusions: These effects may result from primary plasma membrane alterations (transports and/or permeabilities) and/or may be secondary to metabolic changes. The multifocal model provides an adequate approach for studying the hemolytic component of cancer anemia since it is rapid, highly reproducible and causes minimal animal suffering.

Acknowledgments: A.A. Vido was the recipient of a fellowship from CAPES. Paper print was supported by FAPESP.

The hemolytic component of cancer anemia - Osmotic and metabolic stress effects on erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor - Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães Vieira-Muniz ANT, Returo O - Pesqui Méd (Porto Alegre) 2000; 34(1):44-52

NEATMO- Núcleo de estudos e assistência em transplante de medula óssea - relato de experiência

Autores: Cruz AL, Stein GM, Carvalho GP, Novo HM, Schneider I, Cardoso L, Silveira MEN, Bueno MLL, Pilati S.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução: O NEATMO é um grupo de estudos e assistência em transplante de medula óssea, fundado em 19 de agosto de 1997 no CTMO (Centro de Transplante de Medula Óssea) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela equipe de enfermagem. Vários aspectos contribuíram para a criação do NEATMO, entre eles verifica-se que a assistência ao paciente em CTMO é uma atividade especializada, relativamente nova em nosso meio e ainda pouco contemplada nos currículos de graduação. Por outro lado, observa-se uma crescente elevação no número de transplantes de medula óssea em nosso meio e a expansão de atividades em Unidades de Internação e Ambulatório do HCPA no cuidado ao paciente em TMO.

Estas condições aliadas ao contexto institucional que tem como missão "formar recursos humanos, gerar conhecimentos, prestar assistência e referência através da maximização do aproveitamento da infra-estrutura instalada, transpor seus objetivos próprios, atuando

decisivamente na transformação da realidade e no desenvolvimento pleno da cidadania, qualificando-se, desta forma, como Hospital de Atenção Múltipla" viabilizaram a necessidade de criação deste grupo de estudos.

Objetivo: O relato de experiência desse grupo de estudos tem por objetivos divulgar e sensibilizar outros profissionais que atuam no cuidado especializado em TMO.

Metodologia: Este relato de experiência compreende o período de agosto de 1997 até os dias atuais. O núcleo de estudos surgiu como uma meta do Planejamento Estratégico do CTMO para o ano de 1997. A partir desta data expandiu-se para os demais serviços e equipe de enfermagem de diferentes unidades de internação do HCPA. São realizados encontros quinzenais com discussão de casos, promoção de palestras, participação em cursos e eventos, intercâmbio com outras instituições e aquisição de material didático. Para sistematizar o funcionamento do núcleo de estudos, elaborou-se um regimento interno com o intuito de atualizar conhecimentos para adequarmos e dar subsídios para assistência em TMO.

Resultados: Foi realizado um curso de Atualização na Assistência em TMO com nove encontros; dez palestras envolvendo equipe multidisciplinar; participação na organização do 1º Encontro Gaúcho de Enfermagem em Hematologia; organização do 1º encontro de Hematologia Fani Job e participação em eventos nacionais.

Considerações: A partir da formação do Núcleo de Estudos torna-se possível a construção e socialização do conhecimento somado ao aperfeiçoamento no cuidado especializado em Transplante de Medula Óssea.

Neatmo - Núcleo de estudos e assistência em transplante de medula óssea - Relato de experiência - Cruz AL, Stein GM, Carvalho GP, Novo HM, Schneider I, Cardoso L, Silveira MEN, Bueno MLL, Pilati S - Pesqui. Méd. (Porto Alegre) 2000; 34(1):44-52

Anestesia em radioterapia pediátrica

Autores: Berton VR, Berton DC.

Instituição: Hospital Santa Rita da ISCMPA

Introdução: Crianças com menos de 5-6 anos, não conseguem imobilidade e afastamento dos pais, pelos dois a três minutos, necessários ao procedimento de radioterapia, dentro de uma sala fechada. Por isso é utilizada anestesia, exigindo do profissional médico