

C49238C
R 966762
02/02/99

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ESTAMPA FOTOGRÁFICA

02/02/99

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS COM
IMPLANTE GÁSTRICO DE CARCINOSSARCOMA 256**

DE WALKER SUBMETIDOS À HIPERTERMIA

FC-00006143-9

Sandra Maria Nunes

-ESE
616.994
Nº9280/
1998

Fortaleza - Ceará

Outubro - 1998

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS COM IMPLANTE
GÁSTRICO DE CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256
SUBMETIDOS À HIPERTERMIA**

Sandra Maria Nunes

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Fortaleza, 30 de outubro de 1998.



FICHA CATALOGRÁFICA

N928a Nunes, Sandra Maria

Alterações metabólicas em ratos com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à hipertermia / Sandra Maria Nunes. – Fortaleza, 1998.

114 f.: il

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Elisabete Amaral de Moraes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Carcinossarcoma 256 de Walker. estômago. 2. Neoplasias gástricas. 3. Hipertermia. 4. Metabolismo tumoral. I. Título.

CDD 616.994

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS COM IMPLANTE
GÁSTRICO DE CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256
SUBMETIDOS À HIPERTERMIA**

Sandra Maria Nunes

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Fortaleza, 30 de outubro de 1998.

Esta dissertação foi submetida como requisito parcial necessário à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados, na Biblioteca Central e na Secretaria do Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade supracitada.

A citação de um ou mais trechos desta Dissertação é permitida, considerando o seguimento das normas de ética científica.



Sandra Maria Nunes

Dissertação aprovada em 30 de outubro de 1998, pela seguinte banca examinadora:


Profª Drª Maria Elisabete Amaral de Moraes

Orientadora


Prof. Dr. Marcos Raimundo Vale

Examinador


Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Examinador

DEDICATÓRIAS

À Rosália, minha mãe, por me ensinar que o gosto pela leitura seria apenas o início das descobertas, e a José Nunes, meu pai, por mostrar-me que audácia e sensatez são imprescindíveis para qualquer descoberta e para todo investimento de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz e força propiciando que as realizações de minha existência sejam constituídas de amor pleno.

À Josefina, minha avó e aos meus irmãos Sofia, Junior e Sibele, por compreenderem minha ausência e por fortalecerem minhas decisões. E a minha sobrinha Mylena, alegria constante no retorno.

A minha Orientadora Professora Maria Elisabete Amaral de Moraes, exemplo de dedicação á Pesquisa Clínica, que estimulou- me a persistir em meus propósitos e a realizá-los criteriosamente.

Ao Professor Marcos Raimundo Vale, pela disponibilidade em dividir seus conhecimentos enriquecendo as discussões deste trabalho, e por mostrar- me que se é possível enxergar mais além.

Ao Professor Rui Curi (ICB-USP) pelas informações na determinação metodológica inicial desta Dissertação e por seu interesse continuado no desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Manoel Odorico de Moraes, pelo constante apoio e crédito em mim depositados.

Ao Professor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, por sua contribuição no início deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós Graduação por colaborarem com nossa formação e em especial à Professora Glauce Socorro Barros Viana, por sua inestimável contribuição para que adquiríssemos uma postura científica crítica e sensata.

Aos estudantes de Iniciação Científica Melissa Soares, Raquel Coelho, Felipe Santos, principalmente á Inácia Gonçalves por seu envolvimento durante todo o mestrado; à Andréa Alcântara e a José Ítalo, no início do Curso; e a todos que compõem o Laboratório de Farmacologia Clínica e Celular.

À Dr^a Artemiza Portela pela presteza em propiciar-nos animais em boas condições para efetuação dos experimentos, à Professora Gisela Camarão pelo empenho nestas melhorias, e a Sobrinho Cavalcante e ao Sr. Bento, pelo distinto atendimento nos assuntos referentes ao Biotério.

Aos colegas de turma Rômulo Feio, Chrystianne Calado, Ferdinando Oliveira, Cristiane Reis e Flávia Almeida, pela convivência fraterna e, em especial à Ana Rosa Almeida Alves e Ana Maria Sampaio Assreuy pela amizade, estímulo e cumplicidade.

Aos colegas de profissão Lília Campos, Francisca Lino, Maria José Oliveira e Janaína Brandão por compreenderem minha ausência temporária e a Ricardo Vasconcelos pelo apoio e disponibilidade no início do Mestrado. E a Jorge Luís Pereira Cavalcante pelo estímulo e carinho constantes, imprescindíveis neste momento. À Diretoria do Hospital Distrital Nossa Senhora da Conceição representada pela Dr^a Gardênia Amorim por apoiar o desenvolvimento técnico-científico na Instituição.

À família Sampaio pelo apoio e por fazer-me sentir em família.

Aos funcionários do Departamento Maria Tereza Rocha, Sílvia Lima, Vasco Diógenes, Haroldo Pinheiro e Flávia Martins pela interação alegre e incentivadora.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
I) INTRODUÇÃO	1
1) Epidemiologia do câncer e crescimento tumoral	1
2) Carcinossarcoma 256 de Walker	3
3) Regulação fisiológica do metabolismo	4
3.1) Metabolismo energético e via glicolítica	4
3.2) Metabolismo lipídico e β-oxidação	11
4) Metabolismo tumoral e resposta imune	14
5) Metabolismo do carcinossarcoma 256 de Walker e de seu hospedeiro	15
6) Hipertermia	17
6.1) Hipertermia isolada	20
6.2) Hipertermia associada	21
6.3) Mecanismos molecular e celular da hipertermia	23
6.4) Metabolismo energético e de glicose na hipertermia	26
6.4.1) Status metabólico e reação ao aquecimento	27
6.4.2) Níveis de glicose e de lactato após hipertermia	30
II) JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
III) MATERIAL E MÉTODOS	32
1) Animais experimentais	32
2) Grupos de estudo	32

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
I) INTRODUÇÃO	1
1) Epidemiologia do câncer e crescimento tumoral	1
2) Carcinossarcoma 256 de Walker	3
3) Regulação fisiológica do metabolismo	4
3.1) Metabolismo energético e via glicolítica	4
3.2) Metabolismo lipídico e β -oxidação	11
4) Metabolismo tumoral e resposta imune	14
5) Metabolismo do carcinossarcoma 256 de Walker e de seu hospedeiro	15
6) Hipertermia	17
6.1) Hipertermia isolada	20
6.2) Hipertermia associada	21
6.3) Mecanismos molecular e celular da hipertermia	23
6.4) Metabolismo energético e de glicose na hipertermia	26
6.4.1) Status metabólico e reação ao aquecimento	27
6.4.2) Níveis de glicose e de lactato após hipertermia	30
II) JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
III) MATERIAL E MÉTODOS	32
1) Animais experimentais	32
2) Grupos de estudo	32

3) Material	33
3.1) Enzimas e outras substâncias	33
3.2) Equipamento e instrumentos de laboratório	34
3.3) Material cirúrgico	35
4) Procedimentos	35
4.1) Transplante tumoral e procedimento cirúrgico	35
4.2) Protocolo experimental	40
5) Determinação de metabólitos	44
5.1) Piruvato e acetoacetato	44
5.2) Lactato	45
5.3) D-(-)Hidroxibutirato	46
5.4) D-Glicose	47
6) Cálculo dos metabólitos nas amostras	48
7) Determinação do estado redox	49
7.1) Estado redox citoplasmático	49
7.2) Estado redox mitocondrial	50
8) Análise estatística	50
 IV) RESULTADOS	51
1) Efeito do procedimento cirúrgico, da anestesia e do tratamento térmico na sobrevida de ratos.	51
2) Efeitos da hipertermia sobre a concentração sanguínea (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados pós termoterapia.	51
3) Efeitos da hipertermia sobre os níveis sanguíneos (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato e sobre a produção total de corpos cetônicos em ratos controle e em portadores de W256 avaliados após termoterapia.	57

4) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) de lactato, piruvato e glicose no tecido gástrico de ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados pós termoterapia.	61
5) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato e sobre a produção total de corpos cetônicos no tecido gástrico de ratos controle e de ratos portadores de W256 avaliados após termoterapia.	67
6) Efeitos da hipertermia sobre a concentração hepática (μM) de lactato, piruvato e glicose de ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256 e avaliados pós termoterapia.	73
7) Efeitos da hipertermia sobre as concentrações hepáticas (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato e sobre a produção total de corpos cetônicos em ratos controle e em ratos portadores de W256 avaliados após termoterapia.	79
8) Efeitos da hipertermia sobre os estados redox citoplasmático e mitocondrial em ratos controle e em ratos portadores de W256 avaliados após termoterapia.	85
V) DISCUSSÃO	85
VI) CONCLUSÕES	92
VII) MECANISMO PROPOSTO	93
VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alteração nas concentrações sanguíneas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos ($n=6$) *sham* operados e em portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 após normotermia ($37^\circ - 38^\circ \text{ C}$).

Tabela 2- Alteração nas concentrações sanguíneas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos ($n=6$) *sham* operados e em portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 pós hipertermia ($41^\circ - 42^\circ \text{ C}$).

Tabela 3- Alterações nas concentrações sanguíneas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (CC) nos tempos 0, 30 e 60 minutos após normotermia em ratos *sham* operados e portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Tabela 4- Alterações nas concentrações sanguíneas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (CC) nos tempos 0, 30 e 60 minutos após hipertermia em ratos *sham* operados e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Tabela 5-- Alteração nas concentrações (μM) de lactato, piruvato e glicose no estômago de ratos ($n=6$) *sham* operados e no de ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 após normotermia ($37^\circ - 38^\circ \text{C}$).

Tabela 6-- Alteração nas concentrações (μM) de lactato, piruvato e glicose no estômago de ratos ($n=6$) *sham* operados e no de ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 após hipertermia ($41^\circ - 42^\circ \text{ C}$).

Tabela 7- Alterações nas concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos no estômago de ratos *sham* operados e no de portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos após normotermia ($37^\circ - 38^\circ \text{ C}$).

Tabela 8- Alterações nas concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos no estômago de ratos *sham* operados e no de portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos após hipertermia ($41^\circ - 42^\circ \text{ C}$).

Tabela 9-- Alteração nas concentrações hepáticas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos ($n=6$) *sham* operados e em ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 após normotermia ($37^\circ - 38^\circ \text{ C}$).

Tabela 10-- Alteração nas concentrações hepáticas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos ($n=6$) *sham* operados e em ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 após hipertermia ($41^\circ - 42^\circ \text{ C}$).

Tabela 11- Alterações nas concentrações hepáticas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (KB) nos tempos 0, 30 e 60 minutos após normotermia ($37^\circ - 38^\circ \text{ C}$) em ratos *sham* operados e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Tabela 12- Alterações nas concentrações hepáticas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (KB) nos tempos 0, 30 e 60 minutos após hipertermia ($41^\circ - 42^\circ \text{ C}$) em ratos *sham* operados e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Tabela 13- Alterações do Estado Redox Citoplasmático (NAD^+/NADH) em ratos *sham* operados (controle) e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos pós normotermia e hipertermia.

Tabela 14- Alterações do Estado Redox Mitocondrial (NAD^+/NADH) em ratos *sham* operados (controle) e portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos pós normotermia e hipertermia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da glicólise e da oxidação de ácidos graxos.

Figura 2- Esquema representativo da redução do piruvato a lactato pela lactato desidrogenase.

Figura 3- Demonstração esquemática do complexo da piruvato desidrogenase.

Figura 4- A: Esquema representativo da conversão tecidual da glicose a glicose-6-fosfato. B: Esquema representativo da conversão hepática da glicose-6-fosfato a glicose.

Figura 5- Representação esquemática da síntese dos corpos cetônicos através da β -oxidação.

Figura 6- Esquema representativo da morte celular tumoral induzida pela hipertermia *in vivo* através da modulação da termossensibilidade.

Figura 7: 7A: Fotografia do procedimento cirúrgico com clampeadura da mucosa gástrica externa e implante tumoral de suspensão de células de W 256 através de sonda orogástrica; 7B: Coleta, *freeze-clamping* em nitrogênio líquido e acondicionamento das amostras em ácido perclórico 0,75 M.

Figura 8: Fotografias do sucesso do implante tumoral demonstrado macroscopicamente através do desenvolvimento neoplásico na mucosa do estômago (A) e, na parte externa da grande curvatura do estômago (B).

Figura 9: Fotografias do sucesso do implante tumoral demonstrado histologicamente através da infiltração de células tumorais no interstício entre as glândulas da mucosa gástrica (A) e na camada submucosa (B).

Figura 10: Fotografias (A e B) do sistema de termoterapia por infusão peritoneal contínua com drenagem abdominal.

Figura 11: Esquema representativo do sistema de termoterapia com perfusão peritoneal contínua com drenagem abdominal.

Figura 12: Representação gráfica das concentrações de lactato (μM) no sangue de ratos controle e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37°C) e hipertermia (42°C).

Figura 13: Representação gráfica da concentração de piruvato (μM) no sangue de ratos *sham* operados e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37°C) e hipertermia (42°C).

Figura 14: Representação gráfica da concentração de glicose (μM) no sangue de ratos controle e em portadores de implante gástrico de W256 avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após termoterapia.

Figura 15: Representação gráfica das concentrações de acetoacetato (μM) no sangue de ratos controle e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37°C) e hipertermia (42°C).

Figura 16: Representação gráfica das concentrações de β -hidroxibutirato (μM) no sangue de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 17: Representação gráfica das concentrações de lactato (μM) no estômago de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker e avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 18: Representação gráfica das concentrações de piruvato (μM) no estômago de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 19: Representação gráfica das concentrações de glicose (μM) no estômago de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados imediatamente (T0), aos trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós termoterapia.

Figura 20: Representação gráfica das concentrações de acetetoacetato (μM) no estômago de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 21: Representação gráfica das concentrações (μM) de β -hidroxibutirato no estômago de ratos controle e em ratos com implante gástrico de W256 avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 22: Representação gráfica das concentrações hepáticas (μM) de lactato em controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 23: Representação gráfica das concentrações hepáticas (μM) de piruvato em ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 24: Representação gráfica das concentrações hepáticas de glicose (μM) em ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 25: Representação gráfica das concentrações de acetetoacetato (μM) no estômago de ratos controle e no de ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

Figura 25: Representação gráfica das concentrações sanguíneas (μM) de β -hidroxibutirato em ratos controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia (37° C) e hipertermia (42° C).

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ATP	Trifosfato de adenosina
β -BDH	β -hidroxibutirato desidrogenase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
G ₆ PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
g	Gram
h	Hora
H ⁺	Íon hidrogênio
HT	Hipertermia
3-OH-BD	3 hidroxibutirato desidrogenase
K	Constante de equilíbrio
Kg	Quilograma
L	Levógira
LDH	Lactato desidrogenase
M	Molar
ml	Mililitro
mg	Miligrama
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
NAD ⁺	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nM	Nanomolar
NT	Normotermia
SHAM	Falsa cirurgia
TUM	Tumor

RESUMO

Alterações Metabólicas em Ratos com Implante Gástrico de Carcinossarcoma 256 de Walker Submetidos à Hipertermia. SANDRA MARIA NUNES. Dissertação apresentada ao Curso de Pós graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e de Farmacologia da Universidade do Ceará, como pré requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, Fortaleza (Ceará-Brasil), 1998. Orientadora: Maria Elisabete Amaral de Moraes.

Atualmente, no Ceará, o câncer gástrico é um problema de saúde pública com alta taxa de mortalidade. Considerando novas abordagens terapêuticas para o câncer gástrico, a hipertermia clínica tem sido bem estabelecida e proposta em outros países. A hipertermia (HT) pode afetar diretamente funções celulares ou danificar sistemas regulatórios e metabólicos, produzindo efeitos secundários. A sensibilidade térmica de tumores dependem do pH tumoral e do status energético e nutricional. Investigamos se o tumor *per si* e a HT afetam os processos metabólicos do portador de tumor. Tumores transplantáveis de Roedores têm sido utilizados na investigação de como os parâmetros fisiológicos tais como fluxo sanguíneo e pH tecidual ampliam a sensibilidade térmica. Aqui, estudamos o metabolismo no sangue, estômago e fígado de ratos portadores de carcinossarcoma 256 de Walker (W256) submetidos à perfusão hipertérmica peritoneal contínua. Implantaram-se células de W256 no estômago de ratos através de sonda orogástrica. Lesões na mucosa gástrica foram induzidas por clampeadura seguida de implante e crescimento tumoral. A cirurgia foi realizada sob anestesia com éter, sendo os animais *sham* operados utilizados como controles. Realizou-se a normotermia (NT → 37°-38°C) e HT (41°-42°C) sob anestesia com quetamina e xilazina, durante 60 minutos. Foram coletadas amostras de sangue arterial, estômago e fígado, imediatamente (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT ou HT. Os metabólitos foram extraídos em HClO₄ 0,75 M. Lactato, piruvato, D-glicose e corpos cetônicos (CC) foram determinados através de métodos enzimáticos padrões. A significância estatística foi avaliada usando ANOVA ($p<0,05$) e teste de Fisher. Encontramos aumento nos níveis totais de CC nas amostras de sangue ($0,48\pm0,03\mu\text{M}$), fígado ($0,89\pm0,02\mu\text{M}$) e estômago ($0,54\pm0,01\mu\text{M}$) de ratos com W256 sob HT; e declínio nas concentrações hepáticas de piruvato ($p<0,03$). Constatamos hiperglicemia ($12,90\pm0,45\mu\text{M}$) no grupo tumor (HT), sendo os níveis hepáticos ($22,12\pm0,17\mu\text{M}$) maiores no grupo *sham* operado (HT). Os níveis de lactato no estômago ($5,74\pm0,27\mu\text{M}$) elevaram-se em todos os ratos sob HT, especialmente no T30. Concluímos que a HT desequilibra a via glicolítica em ratos com W256 por aumentar principalmente as concentrações de lactato; elevando também níveis de β-hidroxibutirato e de acetacetato, sugerindo que, o ácido láctico aliado aos CC desempenham o principal papel para a acidificação no tumor aquecido e contribuem para a apoptose da célula tumoral.

ABSTRACT

Metabolic Alterations in Rats Bearing Tumor 256 Walker Implanted in Stomach And Submitted to Hyperthermia - SANDRA MARIA NUNES.
Paper presented to the Course of Post-graduation in Pharmacology of Department of Physiology and Pharmacology of Federal University of Ceará as prerequisite to acquire Master's title in Pharmacology, Fortaleza (Ceará-Brasil), 1998. Professor: Maria Elisabete Amaral de Moraes.

Nowadays, in Ceará, gastric cancer is a public health problem with high rate of mortality. Considering new therapeutic approaches for gastric cancer, clinical hyperthermia have been well established and proposed in other countries. Hyperthermia (HT) may directly affect cellular functions or damage regulatory and metabolic systems, producing secondary effects. Thermal sensitivity of tumors depends on tumor pH, energy and nutritional status. We investigated if the tumor *per se* and the HT affect the tumor host metabolic processes. Murines with transplantable tumors have been used aiming to investigate how these physiological parameters enhance thermal sensitivity. In this work, we studied the metabolism in blood, stomach and liver samples of rats bearing Walker 256 tumor (W256) with continuous peritoneal hyperthermic perfusion. Cells from W256 were injected in a tube along the esophagus to the stomach in rats. Mucosal lesions were induced by clamping the stomach followed by tumor implantation and growth. Rats were operated under ether anesthesia. Sham-operated animals were used as controls. Normothermia (NT → 37°-38°C) and the HT (41°-42°C) were performed under ketamine and xilazine anesthesia, during 60 minutes. Arterial blood, either stomach and liver samples was collected immediately (T0), thirty (T30), and sixty minutes (T60) after NT or HT. Metabolites were extracted in HClO₄ 0,75 M. Lactate, pyruvate, glucose and ketone bodies (KB) were measured using standard enzymatic methods. Statistical significance was examined using ANOVA ($p<0,05$) and Fisher's test. We found an increase on levels of total KB at blood ($0,48\pm0,03$ μM), hepatic ($0,89\pm0,02$ μM) and gastric ($0,54\pm0,01$ μM) samples in rats bearing W256 under HT; and a decreased ($p<0,03$) of pyruvate concentrations. We reported high glucaemia in tumor groups ($12,90\pm0,45$ μM) and the liver concentrations of glucose ($22,12\pm0,17$ μM) was much higher in sham operated (HT) group than tumor group after HT. The lactate level at stomach ($5,74\pm0,27$ μM) increased in all groups under HT, predominantly at T30. We concluded that HT induced an impairment on glycolytic pathway in rats bearing W256, and increased β-hydroxybutirate and acetoacetate levels; thus we suggest that lactic acid added to KB play the major role for the increased acidity in heated tumor and contributes to tumor cell apoptosis.

ABSTRACT

Metabolic Alterations in Rats Bearing Tumor 256 Walker Implanted in Stomach And Submitted to Hyperthermia - SANDRA MARIA NUNES.
Paper presented to the Course of Post-graduation in Pharmacology of Department of Physiology and Pharmacology of Federal University of Ceará as prerequisite to acquire Master's title in Pharmacology, Fortaleza (Ceará-Brasil), 1998. Professor: Maria Elisabete Amaral de Moraes.

Nowadays, in Ceará, gastric cancer is a public health problem with high rate of mortality. Considering new therapeutic approaches for gastric cancer, clinical hyperthermia have been well established and proposed in other countries. Hyperthermia (HT) may directly affect cellular functions or damage regulatory and metabolic systems, producing secondary effects. Thermal sensitivity of tumors depends on tumor pH, energy and nutritional status. We investigated if the tumor *per se* and the HT affect the tumor host metabolic processes. Murines with transplantable tumors have been used aiming to investigate how these physiological parameters enhance thermal sensitivity. In this work, we studied the metabolism in blood, stomach and liver samples of rats bearing Walker 256 tumor (W256) with continuous peritoneal hyperthermic perfusion. Cells from W256 were injected in a tube along the esophagus to the stomach in rats. Mucosal lesions were induced by clamping the stomach followed by tumor implantation and growth. Rats were operated under ether anesthesia. Sham-operated animals were used as controls. Normothermia (NT → 37°-38°C) and the HT (41°-42°C) were performed under ketamine and xilazine anesthesia, during 60 minutes. Arterial blood, either stomach and liver samples was collected immediately (T0), thirty (T30), and sixty minutes (T60) after NT or HT. Metabolites were extracted in HCLO₄ 0,75 M. Lactate, pyruvate, glucose and ketone bodies (KB) were measured using standard enzymatic methods. Statistical significance was examined using ANOVA ($p<0,05$) and Fisher's test. We found an increase on levels of total KB at blood ($0,48\pm0,03$ μM), hepatic ($0,89\pm0,02$ μM) and gastric ($0,54\pm0,01$ μM) samples in rats bearing W256 under HT; and a decreased ($p<0,03$) of pyruvate concentrations. We reported high glucaemia in tumor groups ($12,90\pm0,45$ μM) and the liver concentrations of glucose ($22,12\pm0,17$ μM) was much higher in sham operated (HT) group than tumor group after HT. The lactate level at stomach ($5,74\pm0,27$ μM) increased in all groups under HT, predominantly at T30. We concluded that HT induced an impairment on glycolytic pathway in rats bearing W256, and increased β-hydroxybutirate and acetoacetate levels; thus we suggest that lactic acid added to KB play the major role for the increased acidity in heated tumor and contributes to tumor cell apoptosis.

I- INTRODUÇÃO

1- Epidemiologia do câncer e crescimento tumoral

A luta contra o câncer é para a ciência uma busca incansável. A doença é a segunda causa de morte do planeta, sendo superada apenas pelas patologias cardiovasculares. O câncer gástrico destaca-se como a neoplasia que mais ocasionou óbitos (13.200) aos brasileiros em 1998 e, segundo o Instituto Nacional do câncer, possui a ocorrência de 20.665 novos casos. Comparado aos demais estados brasileiros no tocante à incidência do câncer de estômago o Ceará apresenta o maior índice de mortalidade, com dados que se assemelham àqueles encontrados em países de elevada incidência como o Japão, a Noruega e o Chile.

O principal determinante da morbi-mortalidade para pacientes com diagnóstico de tumores malignos encontra-se relacionado ao insuficiente controle da expansão e progressão do estabelecimento de colônias metastáticas. O risco de doenças neoplásicas varia de acordo com a região geográfica, fatores ambientais, com hábitos sócio-culturais, idade e a herança genética do indivíduo (FRANCO, 1994).

O termo **neoplasia**, literalmente, significa “novo crescimento” e um novo tecido é um “**neoplasma**”. O termo **tumor** foi originalmente aplicado a edemas causados por processos inflamatórios. **Câncer** (do grego *karkos*) é um termo comum para todos os tumores malignos, o qual apresenta crescimento anormal ou descoordenado de massa ou tecido, excedendo o dos tecidos normais, e persistindo mesmo após cessação do estímulo do qual evoca a alteração (em: ROBINS, 1994).

Todos os tumores malignos ou benignos possuem dois componentes básicos: 1) Constituídos por células neoplásticas que proliferam e por

parênquima; e 2) Estroma formado por tecido conectivo e vasos sanguíneos. Essa estrutura fornece sustentação e nutrição para a massa tumoral. A diferenciação dos tumores pode ser efetuada com base na morfologia e no comportamento biológico dos mesmos, considerando-se nível de diferenciação, taxa e velocidade de crescimento, local de invasão e ocorrência de metástases. A despeito de amplas variações quanto às características macro e microscópicas peculiares aos tumores malignos, as mesmas explicitam o crescimento e o comportamento tumoral.

Estímulos ambientais e mutações herdadas conduzem à alteração genômica celular ocasionando ativação de oncogenes produtores de crescimento, alterações nos genes que regulam a apoptose e a inativação de genes supressores. Estas ações induzem a expressão de produtos gênicos alterados e a perda de produtos gênicos regulatórios. Com isso, a expansão clonal ocasiona mutações adicionais (progressão) induzindo heterogeneidade celular e consequente formação de um neoplasma maligno (em: ROBINS, 1994).

No tocante às funções bioquímicas dos genes supressores de tumor, sabe-se que as vias de transdução de sinais de inibição do crescimento tumoral são menos compreendidas que àquelas para a progressão tumoral. Todavia, é razoável presumir que assim como os sinais mitogênicos, a sinalização inibitória do crescimento origina-se na superfície celular com a participação de receptores, transdutores de sinal e, reguladores transpcionais ao nível nuclear (GRAUBERT, 1996). Outros fatores além da cinética celular, como o suprimento sanguíneo podem alterar significantemente o crescimento tumoral (VAUPEL, 1993).

Fatores angiogênicos associados ao tumor podem ser produzidos por células tumorais ou pode ser derivados de macrófagos de infiltrado de tumores. Dentre os fatores de crescimento incluem-se os FGF (fator de crescimento de

fibroblastos), TGF (fator de crescimento de transformação) α e β , EGF (fator de crescimento epidermal) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular); e algumas citocinas como o TNF (fator de necrose tumoral) α e IL-1 (interleucina 1). Estas moléculas possuem ações quimiotática e mitogênica para células endoteliais, afetando também várias linhagens tumorais, como por exemplo a do carcinossarcoma 256 de Walker.

2- Carcinossarcoma 256 de Walker (W256)

Em se tratando de pesquisa experimental existe uma ampla variedade de tumores transplantáveis (STEWART et al., 1959) viabilizando testes farmacológicos e outros trabalhos envolvendo o tema câncer. Em 1928, na Universidade de John Hopkins, George Walker, observou a presença de um tumor na glândula mamária de uma rata albina prenha, cuja massa tumoral regredia e recrudescia, respectivamente, durante e após o período de lactação (EARLE, 1935). A histopatologia descreveu a massa tumoral como um adenocarcinoma; e sua transplantabilidade foi confirmada pelo próprio Walker com um índice de pega (sucesso do implante tumoral) de aproximadamente 56% em 16 ratos albinos. Na segunda geração as células epiteliais e a estrutura glandular do tumor se desorganizaram. Embora conservando as mesmas peculiaridades do tumor original, achavam-se circundadas por fibras e células do estroma. Estas últimas apresentavam tipos diversos no tocante ao volume e ao tamanho. Após sucessivos transplantes a neoplasia apresentou variações morfológicas (SCHREK & Avery, 1937; TALALAY et al., 1952 e FISHER et al., 1964). O tumor então foi caracterizado nas formas carcinomatosas, sarcomatosa e mista, carcinossarcomatosa. IWAMA DE MATTOS (1971 e 1980), observou em ratos metástases renal, hepática, pulmonar, sanguínea e cardíaca, entre outras. O tumor de Walker pode ser perpetuado através de várias técnicas: Inoculação de suspensão de células tumorais oriundas de fragmentos de tecido, ou utilizando suspensão de células em cultura ou ainda

suspensão na forma ascítica do tumor. As vias de inoculação podem ser a subcutânea, intraperitoneal, intrapleural, sanguínea e a intramuscular (SCHREK, 1935; TALALAY, 1952), sendo esta última a mais utilizada no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. CALDAROLA e colaboradores, em 1968 observaram ainda que o sexo dos animais também influencia o crescimento do tumor de Walker. Em 1979, FONTELES & MORAES, constataram um índice de pega de 100% (sucesso do implante) em ratos adultos jovens machos inoculados por via intramuscular.

TERGE BRØYN, em 1974, estudando o crescimento tumoral gástrico bem como a viabilidade e a facilidade de utilização de um método que reproduzisse o comportamento biológico tumoral gástrico, implantou uma suspensão de células tumorais de Walker em mucosa de estômago de ratos Wistar. Este método é viável e perfeitamente reproduzível (OLIVEIRA, 1997) para estudos relacionados à terapia do câncer gástrico (quimioterapia e hipertermia).

3- Regulação do metabolismo em condições fisiológicas

3.1- Metabolismo energético e via glicolítica

Para que tecidos normais ou hipercatabólicos possam crescer, os mesmos necessitam de energia. E para que se entenda como o tumor de Walker utiliza substrato energético para seu crescimento, faz-se necessário o esclarecimento da regulação, em condições fisiológicas, do metabolismo energético.

As etapas referentes à regulação do metabolismo de energia envolvem interrelações entre o cérebro, músculo, pâncreas e estoques energéticos tais como, tecido adiposo e glicogênio muscular e hepático. Estas relações são

alteradas em presença de atividade física (leve ou intensa), alimentação ou jejum, ou ainda na ocorrência de situações hipercatabólicas como o câncer.

O fluxo energético (estocagem ou oxidação) é controlado principalmente pela insulina e pelo glucagon. Ambos são polipeptídeos secretados na corrente sanguínea pelo pâncreas. A glicose é o principal regulador da secreção de insulina (aminoácidos específicos como a arginina possuem menor estímulo sobre a secreção). A secreção de glucagon é inibida pela glicose e pela insulina e, estimulada por aminoácidos (PHELIPPE, 1994). A hipoglicemia durante a atividade física intensa ou estresse catabólico elevam significativamente o consumo e a oxidação dos estoques de glicose corpóreos musculares e hepáticos. Tanto o estresse oriundo das patologias quanto a atividade física encontram-se relacionados à razão glucagon/insulina, e mais sutilmente, aos níveis de glucagon, os quais podem oscilar de maneira independente dos níveis de insulina.

Ainda com relação ao metabolismo energético deve-se mencionar os ácidos graxos como os principais combustíveis para a maioria dos órgãos. Até a completa oxidação da glicose e dos ácidos graxos a CO_2 , encontram-se envolvidos vários intermediários incluindo fosfoenolpiruvato, piruvato, lactato, acetil CoA e citrato. O modo pelo qual a energia é metabolizada difere de acordo com o órgão e sob diferentes condições: o cérebro, por exemplo, para a obtenção de energia converte glicose a CO_2 via glicólise através do ciclo de Krebs, e durante o jejum utiliza corpos cetônicos. As relações anteriormente descritas podem ser visualizadas na **figura 1**.

Os produtos intermediários são canalizados entre as enzimas glicolíticas e a glicólise é estreitamente regulada. Durante seus estudos sobre a fermentação da glicose por levedura, Louis Pasteur descobriu que, tanto a velocidade da fermentação quanto a quantidade total de glicose por ela consumida, eram muitas vezes maiores sob condições anaeróbicas do que sob

condições aeróbicas. Em estudos posteriores com músculos a mesma observação foi constatada. A base bioquímica para este fenômeno (efeito Pasteur) é a seguinte: o rendimento em ATP (adenosina trifosfato) da glicólise sob condições anaeróbicas é 18 vezes menor que o obtido na oxidação completa da glicose até CO_2 e H_2O em presença de oxigênio.

O fluxo de glicose através da via glicolítica é regulado para manter constante a concentração de ATP, bem como fluxos adequados de suprimentos dos intermediários glicolíticos que possuem destinos biossintéticos.

O piruvato, produto da glicólise, representa um ponto de junção importante no catabolismo dos carboidratos. Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado a acetato, o qual entra no ciclo de Krebs e é oxidado a CO_2 e água. O NADH (adenina dinucleotídeo – forma reduzida) formado pela desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato é reoxidado a NAD^+ (adenina dinucleotídeo – forma oxidada). Já em condições anaeróbicas o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo oxigênio. O NAD^+ portanto, é regenerado através de outras reações.

Quando os tecidos animais não podem ser supridos com oxigênio suficiente para suportar a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos pela glicólise, o NAD^+ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a lactato (**figura 2**). Embora existam dois passos de oxidação-redução quando a glicose é convertida a **lactato**, não há variação no estado de oxidação do carbono.

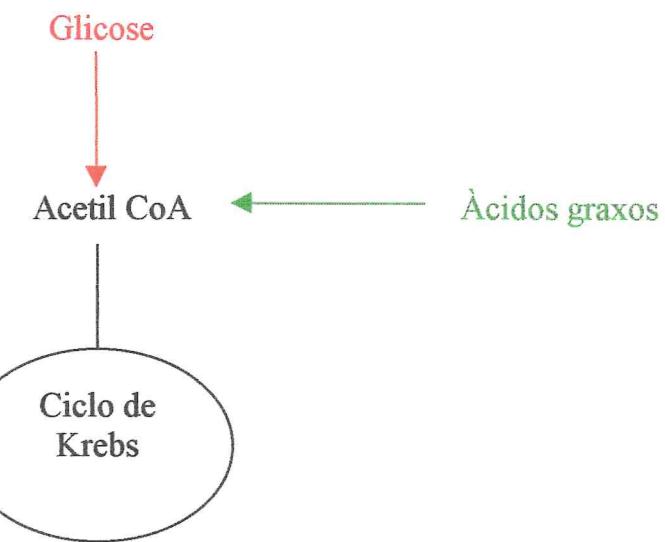


Figura 1: Representação esquemática da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, a acetil coA para o ciclo de Krebs.

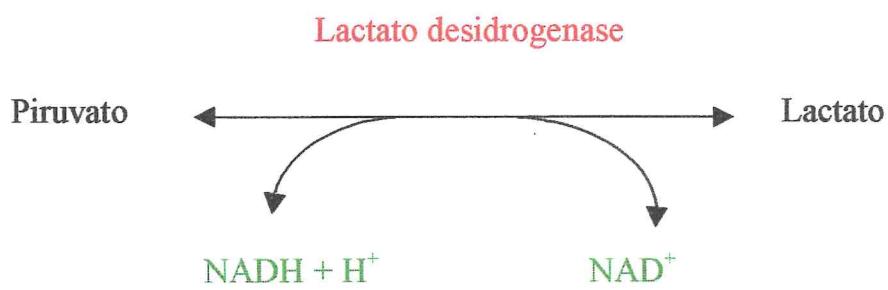


Figura 2: Redução de piruvato a lactato através da ação enzimática da lactato desidrogenase (LDH).

Nos organismos aeróbicos, a glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são oxidados, em última instância, a CO₂ e H₂O através do ciclo de Krebs. Para que possam entrar no ciclo, os esqueletos carbônicos dos açúcares e dos ácidos graxos necessitam ser degradados até o grupo acetila do acetil-CoA. Outros tecidos e tipos celulares também possuem lactato a partir da glicose, mesmo em condições aeróbicas. A redução do piruvato é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH) que forma o isômero L do ácido láctico (pH 7,0). Uma molécula de glicose é convertida em duas de lactato, com a geração de 2 moléculas de ATP e uma de glicose e ainda NAD⁺ e NADH são continuamente interconvertidos sem nenhum ganho ou perda global na quantidade de cada um deles. O lactato é o grande produto do metabolismo da glicose no eritrócito.

A desidrogenação e a descarboxilação combinadas do piruvato em acetil-CoA (**figura 3**), envolvem a ação seqüencial de três enzimas (complexo piruvato-desidrogenase) e de cinco coenzimas: Tiamina pirofosfato (PP), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), coenzima A (CoA), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), e lipoato. Quatro vitaminas diferentes requeridas na nutrição humana são componentes vitais deste sistema: Tiamina (TPP - tiamina pirofosfato); riboflavina (FAD), niacina (NAD⁺), e pantetonato (CoA). A reação completa catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase é a descarboxilação oxidativa (processo irreversível de oxidação).

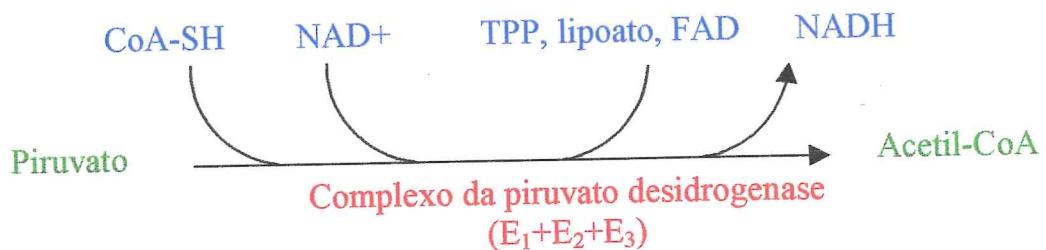
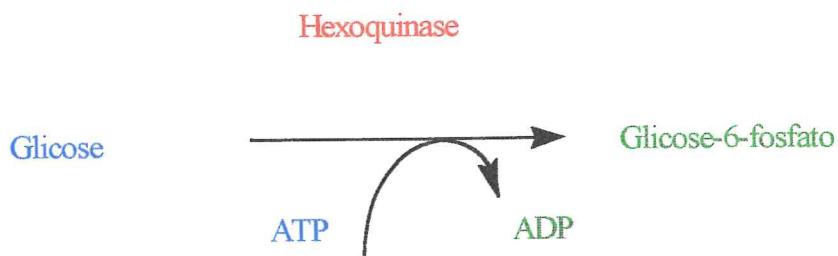


Figura 3: Complexo da piruvato desidrogenase e das coenzimas envolvidas nas ações enzimáticas deste complexo. E₁(Piruvato desidrogenase), E₂ (diidrolipoil transacetilase), E₃ (diidrolipoil desidrogenase).

A glicólise ocorre através de uma seqüência linear de etapas catalizadas enzimaticamente, enquanto que a seqüência de reações no interior da mitocôndria, é cíclica (ciclo de Krebs). Quatro das oito etapas do ciclo de Krebs são oxidações e a energia nelas liberada é utilizada com alta eficiência na formação de cofatores reduzidos (NADH E FADH₂). Nos tecidos a glicose é convertida a glicose-6-fosfato (G-6-P) pela ação da glicose-6-fosfato desidrogenase. As etapas citadas podem ser visualizadas a seguir na figura 4:

A)



B)

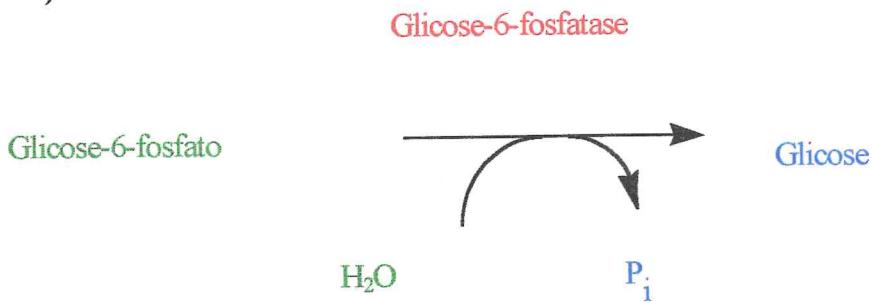
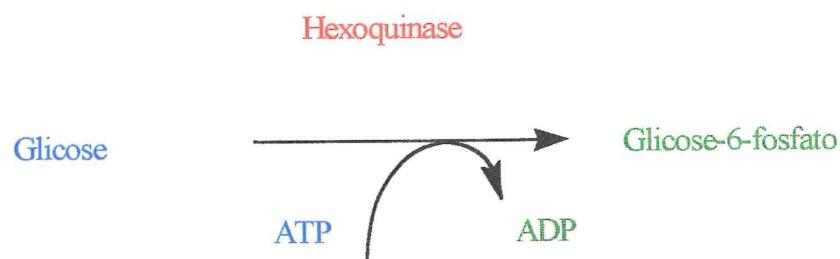


Figura 4: A – Conversão tecidual da molécula de glicose a glicose-6-fosfato.

B – Conversão hepática da molécula glicose-6-fosfato a glicose.

A)



B)

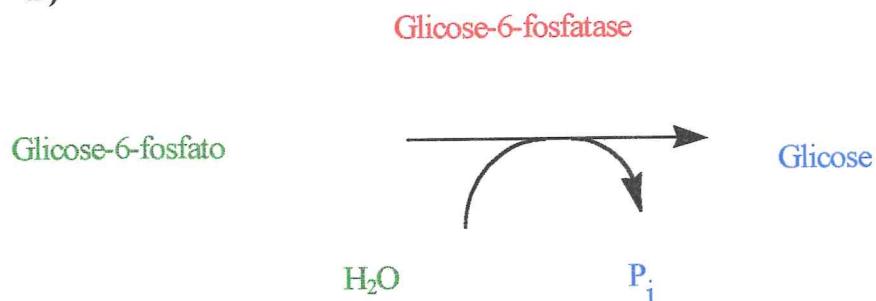


Figura 4: A – Conversão tecidual da molécula de glicose a glicose-6-fosfato.

B – Conversão hepática da molécula glicose-6-fosfato a glicose.

3.2– Metabolismo lipídico e β -oxidação

A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa em acetil CoA é uma via central liberadora de energia (síntese de ATP) nos animais, ocorrendo em situações especiais tais como jejum, cetoacidose diabética e atividade física intensa. O acetil CoA pode ser completamente oxidado até CO₂ através do ciclo de Krebs. No figado dos vertebrados, o acetil CoA pode ser convertido em corpos cetônicos (combustíveis hidrossolúveis quando a glicose não encontra-se disponível). O processo pelo qual os ácidos graxos são convertidos em acetil CoA é denominado β -oxidação (LEHNINGER et al., 1995).

No figado a oxidação dos ácidos graxos ocorre em três estágios: No **primeiro estágio** (β -oxidação) os ácidos graxos sofrem a remoção oxidativa de sucessivas unidades de 2 átomos de carbono na forma de acetil CoA. A formação de cada molécula de acetil CoA requer a ação de desidrogenases para a remoção de 4 átomos de H⁺ da porção acil-graxo da molécula. No **segundo estágio**, os resíduos acetila do acetil CoA são oxidados até CO₂ (no ciclo de Krebs), e as moléculas derivadas da oxidação dos ácidos graxos entram nesta via final de oxidação juntamente com as moléculas de acetil CoA derivadas da glicose, através da glicólise e da oxidação do piruvato. Os dois primeiros estágios do processo de oxidação de um ácido graxo produzem NADH E FADH₂ que, em um **terceiro estágio** transferem elétrons para a cadeia respiratória e desta para o oxigênio. Acoplado a este fluxo de elétrons está a fosforilação do ADP em ATP.

Durante a oxidação hepática dos ácidos graxos, em humanos e na maioria de outros mamíferos, a molécula de acetil CoA formado pode entrar no ciclo de Krebs ou pode ser convertido a corpos cetônicos (**acetoacetato, hidroxibutirato** e acetona). A acetona produzida é exalada e o acetoacetato assim como o hidroxibutirato são transportados pelo sangue até os tecidos extra

hepáticos para fornecer a maior parte da energia requerida por esses mesmos tecidos. No fígado, o acetoacetato é reduzido em D-β-hidroxibutirato através de uma reação reversível catalisada pela D-β- hidroxibutirato desidrogenase, uma enzima mitocondrial. Nos tecidos extra hepáticos, o hidroxibutirato é oxidado até acetoacetato também pela D-β- hidroxibutirato desidrogenase. A síntese de corpos cetônicos, sua exportação pelo fígado bem como a “desaceleração” do ciclo de Krebs pelo consumo de oxalacetato, aumentando a conversão do acetil-CoA em acetoacetato, podem ser visualizados no esquema da figura 5:

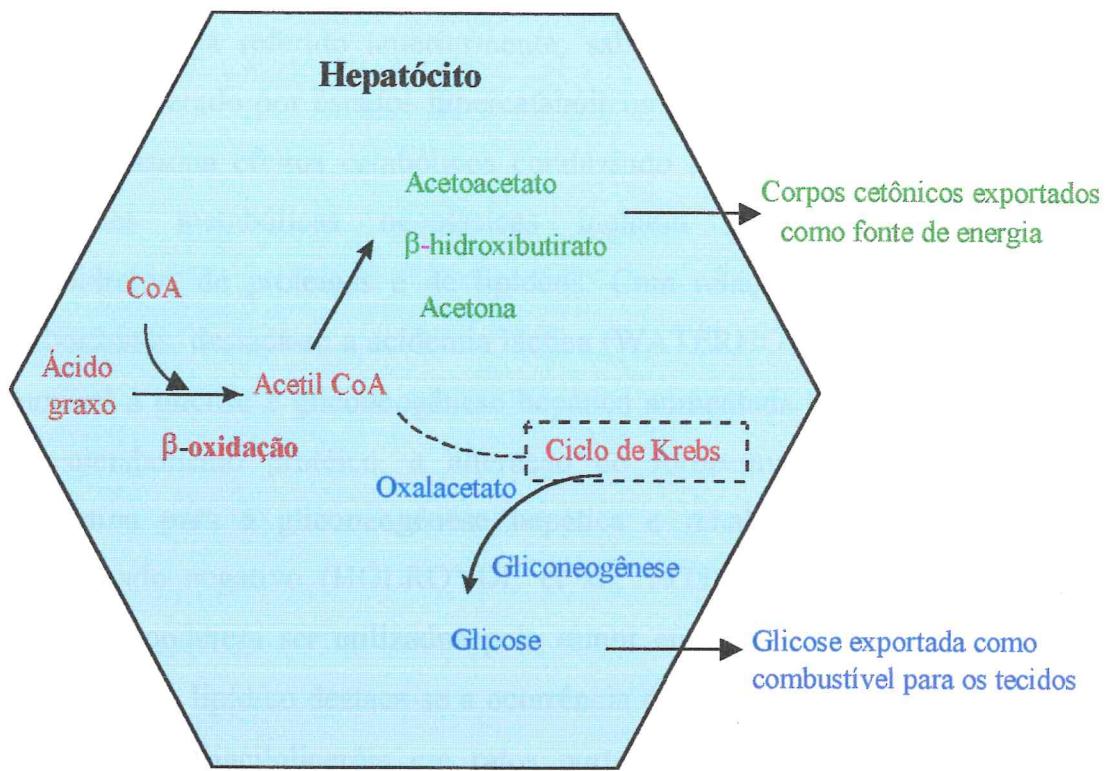


Figura 5: Representação esquemática da síntese dos corpos cetônicos através da β -oxidação com exportação hepática destes para os tecidos periféricos e, utilização de glicose como combustível a partir da gliconeogênese. As situações que aumentam a gliconeogênese (diabetes e jejum) desaceleram o ciclo de Krebs (pelo consumo do oxalacetato) e aumentam a conversão do acetil-CoA em acetoacetato. As moléculas de coenzima A liberadas permitem que a β -oxidação dos ácidos graxos ocorram continuadamente.

4- Metabolismo tumoral e resposta imune

Como já referido anteriormente, sabe-se que o metabolismo normal pode ser alterado por estados hipercatabólicos como o câncer. A presença do tumor ocasiona efeitos catabólicos conduzindo à anorexia e à caquexia. As alterações metabólicas neoplásicas incluem catabolismo intenso de carboidratos, de proteínas e de lipídeos. Com relação ao metabolismo dos carboidratos, destaca-se a acidemia láctica (WATERHOUSE, 1974), tolerância anormal à glicose e gliconeogênese hepática aumentada (HEYSE et al., 1996). No metabolismo protéico, a alteração no fornecimento de alanina e de glutamina para a gliconeogênese hepática e renal determina um balanço nitrogenado negativo (HOLROYDE et al., 1975), além de os aminoácidos liberados poderem ser utilizados pelo tumor em crescimento. No tocante ao metabolismo lipídico destaca-se a ocorrência de hiperlipidemia e depleção dos estoques de triacilgliceróis em ratos portadores de tumor (DEVEREAUX, 1984).

Patologias invasivas ou neoplásicas conduzem freqüentemente à alterações metabólicas que comprometem a integridade do organismo hospedeiro. Estas alterações são mediadas pelas células do sistema imunológico que, em resposta a uma variedade de estímulos, secretam citocinas (BLAKE, 1994) com capacidade de modificar o metabolismo do hospedeiro.

A resposta do sistema imune à infecção e à inflamação é mediada por citocinas. A infecção encontra-se associada a múltiplos distúrbios na estocagem e no metabolismo lipídico (DOERRLER, 1994), medeando então alterações metabólicas induzidas pelas citocinas, como o TNF α (fator de necrose tumoral α), IFN γ (interferon gama) e IL-1 (interleucina 1). Algumas citocinas induzem resposta catabólica coordenada em adipócitos, o que conduz a um decréscimo da estocagem de lipídeos (NEWSHOLME & CURI, 1987).

Linfócitos e macrófagos desempenham importante papel na resposta imune. A glicose é utilizada em altas taxas por estas células fornecendo intermediários para vias biossintéticas: a glicólise fornece glicose-6-fosfato para ribose-5-fosfato (requerido para a síntese de nucleotídeos), e o glicerol para síntese de fosfolipídeos. Entretanto, a atividade da glicólise encontra-se aumentada em excesso (cerca de 100 vezes) acima do requerimento normal para os processos biossintéticos normais. Isto sugere que estes processos também fornecem energia para a célula. Além deste fato, nos linfócitos e macrófagos, as taxas de utilização de glicose encontram-se aumentadas (CURI & NEWSHOLME, 1988), enquanto que a sua oxidação é apenas parcial: A glicose é convertida principalmente a lactato. Esta oxidação parcial é similar à daquelas células em divisão rápida como as células tumorais (ARDAWI & NEWSHOLME, 1982).

5- Metabolismo do carcinossarcoma 256 de Walker e de seu hospedeiro

TREDGET (1998) demonstrou uma complexa e alterada inter-relação entre as necessidades teciduais por vários metabólitos essenciais e, os hormônios circulantes no indivíduo portador de tumor. Isto pode não ocorrer apenas pela demanda de metabólitos essenciais para o crescimento do tecido tumoral, mas também pela ação direta de secreções tumorais sobre órgãos endócrinos deste indivíduo.

Em ratos portadores de tumor, as concentrações plasmáticas de glicocorticoides, catecolaminas e glucagon apresentam-se elevadas (VIRKAMAKI et al., 1995) e baixos níveis de insulina (FERNANDES et al., 1996b e NETO, 1996), desencadeando várias alterações metabólicas. As catecolaminas depletam glicogênio muscular enquanto que a hipoinsulinemia e

o aumento sérico de glucagon induzem mobilização do glicogênio hepático. A insulina e o glucagon podem ser degradados por um fator associado às células do carcinossarcoma 256 de Walker (ZEPP, 1986). Deve-se ainda mencionar que o fator de crescimento associado à insulina não é mitógeno para o carcinossarcoma 256 de Walker.

A glicogenólise hepática fornece glicose para o crescimento tumoral e para tecidos específicos do hospedeiro, tais como sistema nervoso, leito esplâncnico, células endoteliais, eritrócitos e leucócitos (GULLINO et al., 1967). As alterações metabólicas mencionadas acima ocorrem não somente em ratos portadores carcinossarcoma 256 de Walker. Estas alterações ocorrem tanto em animais portadores de outras linhagens de tumores espontâneos ou transplantáveis (SHAPOT, 1972 e SHAPOT & BLINOV, 1974), quanto em pacientes com vários tipos de neoplasias (REICHARDT et al., 1963 e FERNANDES, 1996a). Embora ainda não totalmente esclarecidos os fatores que conduzem a este quadro, sabe-se que concentrações plasmáticas aumentadas de PGE₂ (prostaglandina E₂) e de vasopressina (SIDIDIQUI & WILLIAMS, 1987) levam à redução da cetogênese. SAUER e colaboradores (1986), ao verificarem os efeitos do jejum em várias linhagens tumorais inclusive no carcinossarcoma 256 de Walker, constataram que havia uma resposta positiva para o crescimento tumoral ao se induzir lipólise e cetose no hospedeiro, aumentando desta forma os ácidos graxos livres e a concentração de corpos cetônicos no sangue arterial.

Em estudo metabólico com células do carcinossarcoma 256 de Walker e de sarcoma 45, KOLOMINA & VASIL'Eva (1982) observaram aumento na atividade da LDH no estágio avançado de crescimento do carcinossarcoma 256 de Walker (W256), porém não foram constatadas alterações significantes na reação histoquímica. Outras linhagens tumorais como o sarcoma de Jenssen, são consistentemente “fortes produtores” de lactato *in vivo*; no entanto, SAUER. & DAUCHY (1986) não foram capazes de reproduzir este fato. Em

investigações bioquímicas, SCHULZE e colaboradores (1976), verificaram que em ratos adultos portadores de W256 ocorreu perda de glicogênio hepático rápida, até completa depleção (em massas tumorais superiores a 40g/animal). Esta depleção era dependente do peso tumoral. Houve contribuição para pronunciada hipoglicemia sanguínea periférica no rato com acelerada gliconeogênese.

Ao avaliar o efeito da hiperglicemia na hemodinâmica sistêmica e da taxa de fluxo sanguíneo em ratos portadores de W256, DI-PIPETTE e colaboradores (1986) observaram que a redução do fluxo sanguíneo devido à hiperglicemia em tumores maiores que 0,6 g é primariamente atribuída à redução no débito cardíaco e aos efeitos local e sistêmico em tumores menores que 0,6g. A perfusão hipertérmica peritoneal pode também ocasionar alterações cardiovasculares (SHIME et al., 1994).

6- Hipertermia

O termo hipertermia é derivado do grego *hyper* (excessivo) e de *therme* (calor), distinguindo-se do termo febre, que deriva do latim *febris*. A hipertermoterapia vem sendo utilizada desde a antiguidade quando Hipócrates (460-370 a.c.) usava o calor para tratamento de tumores. OVERGAARD (1977) relata que no papiro de cirurgia de Smith (aparentemente o primeiro livro texto de medicina) encontra-se a descrição do tratamento térmico de uma paciente com tumor de mama.

No século XVI, os físicos renascentistas contribuíram com “novas estratégias” para o tratamento do câncer; a partir da diferenciação de tumores malignos e da ocorrência de metástases.

No período do illuminismo, no século XVII, o filósofo, matemático e físico francês René Descartes, evidenciou a abordagem lógica de tratamento do câncer (CA), com base na remoção de tumores primários juntamente com os linfonodos envolvidos. Uma importante contribuição também foi legada pelo clínico holandês Hermann Boëhaave, o qual considerou o câncer como uma irritação local; observação esta que evidenciou posteriormente vários tipos de neoplasias ocupacionais.

A ignorância óbvia e a confusão acerca do diagnóstico exato e o tratamento do câncer podem explicar alguns casos de "cura do câncer" por exposição ao calor, através de excisão da área afetada, cauterização com uso de ferro em brasa, dietas ou drogas e/ou sangramentos. Estas "abordagens terapêuticas" representam aplicações típicas de hipertermia local (a altas temperaturas em curtos espaços de tempo); e de hipertermia sistêmica (temperaturas moderadas sob longa duração).representada através do uso de banhos quentes ou indução de febre.

A temperatura corpórea pode ser aumentada por ação de pirógenos (toxinas bacterianas) ou por drogas. Ações regulatórias hipotalâmicas controlam este aumento propiciando vasodilatação e aumento da perfusão (BLIGHT, 1979). Esta regulação não acontece tão eficientemente na hipertermia maligna, uma vez que os mecanismos compensatórios de controle central e de *feedback* podem estar danificados; podendo a temperatura corporal atingir 42°C.

O aumento da temperatura pode ainda ser induzido através da transferência de calor do meio (água, ar, ondas eletromagnéticas). Quando da exposição à luz solar, o organismo pode acumular cerca de 150 quilocalorias/hora (kcal/h) ou ainda pode produzir metabolicamente 600-900 kcal/h através de intensa atividade muscular, trabalho este que chega aumentar a temperatura corporal até aproximadamente 40°C. Dentre os fatores que

intensificam a atividade metabólica e consequentemente a geração de calor, destacam-se os hormônios tireoidianos ativos, o efeito calorigênico dos alimentos, a contração involuntária e a própria febre (o aumento de 1º C na temperatura corpórea, eleva em de 10 % o metabolismo basal). No tocante aos mecanismos reguladores da temperatura corporal, pode-se mencionar dois sistemas de controle: um central (porção anterior do hipotálamo → áreas pré ópticas medial e posterior e núcleo paraventricular) e o outro periférico (sistema nervoso autônomo) com a participação de receptores térmicos sob a pele (GUYTON, 1992).

Atualmente a hipertermia em oncologia é utilizada na radiossensitização e/ou na quimioterapia. A termoterapia atinge temperaturas na faixa entre 41°-43°C, enquanto que temperaturas acima de 43°C, dependendo do tempo de exposição, podem induzir citotoxicidade (OVERGAARD, 1977).

Os métodos de termoterapia (associada ou isolada) são aplicados principalmente de acordo com a localização do tumor. Para aquecimentos mais profundos utiliza-se a hipertermia (HT) loco-regional ou regional, para tumores superficiais opta-se pela HT local (a pouca penetração de calor conduz ao hiperaquecimento do tecido adiposo limitando seu uso clínico); já a HT de corpo inteiro consiste num método invasivo de indução da elevação da temperatura sistêmica, sendo este aumento térmico dependente da dissipação de calor pelo corpo. A hipertermia (localizada ou sistêmica) pode ser aplicada clinicamente através do uso de água quente, de ondas eletromagnéticas de calor na faixa de 50-2450 megahertz (MHz), de radiofreqüência (0,5-27 MHz), de ondas ultrassônicas (0,5-5,0 MHz), de perfusão local e regional e de aquecimento sistêmico (para tumores avançados e metastáticos).

A pesquisa laboratorial acerca dos efeitos do calor foi iniciada no século XX. Cientistas avaliaram inicialmente a tolerância dos tecidos normais à diferentes graus de exposição térmica. HENRIQUES & MORITZ, em 1947

(em HILL, 1992), estabeleceram que a tolerância térmica de suínos era muito similar à da pele humana. Em 1964, BURGER & FUHRMANN (em HILL, 1992) evidenciaram uma marcante variação na resposta térmica entre os diferentes tecidos de mamíferos, dentro de uma mesma espécie e entre diferentes espécies entre si. Atualmente os achados de dose térmica e resposta à termoterapia em humanos são claramente refletidos nas “doses térmicas” propostas por SAPARETO & DEWEY (1984).

Uma revisão acerca dos efeitos da hipertermia nos diferentes órgãos de humanos foi proposta por FAJARDO (1984), o qual observou uma evidente relação entre as respostas obtidas com relação ao tempo de exposição e à duração do tratamento térmico. Até 1995, os efeitos da termoterapia sobre os vários tecidos humanos não haviam sido sistematicamente avaliados. Estudos patológicos sugerem a existência de susceptibilidade orgânica individual para diferentes exposições térmicas propiciando assim, danos miocárdico (ruptura de fibras musculares), cerebral (hemorragia difusa petequial), renal e hepático.

6.1- Hipertermia isolada

No tocante ao aquecimento isolado de tumores malignos, a sensibilidade térmica *in vivo* e *in vitro* foi estudada inicialmente por LOEB & JENSSSEN ,1903 (em HILL, 1992). Em 1903, LOEB (em HILL, 1992) constatou que células de sarcoma em roedores foram inativadas quando aquecidas à 45°C por 30 minutos. Outros investigadores confirmaram estas observações; porém nenhuma comparação foi feita entre diferentes tipos de tumores nem com relação aos tecidos justatumorais.

Em 1908, HAARLAND (em HILL, 1992) concluiu, a partir de seus experimentos animais, que células tumorais malignas possuem susceptibilidade específica ao calor. Em 1912, LAMBERT (em HILL, 1992) comparou a

sensibilidade térmica de diferentes células (normais e malignas) utilizando cultura de células em plasma. Após aplicar tratamento térmico (42° - 47°C) em diferentes intervalos de tempo, LAMBERT demonstrou que células normais tanto quanto células malignas são capazes de sobreviver quando expostas a 43°C por até 3 horas.

Em 1921, ROEDENBURG & PRIME (em HILL, 1992) constataram em tumores transplantáveis de roedores, uma rápida regressão tumoral após exposição térmica entre 42° - 46°C . Minuciosos estudos histológicos efetuados entre o 1º e o 6º dias após a exposição térmica revelou completa morte celular tumoral, enquanto que não foram observados efeitos deletérios evidentes nos tecidos normais. Este achado é outra indicação da alta sensibilidade das células tumorais quando comparadas às células normais. Deve-se considerar, no entanto, que a regressão tumoral ocorre na mesma extensão após 180 minutos a 44°C e após 90 minutos a 45°C , enquanto que os tecidos normais não sofrem danos sob estas mesmas condições. Outros investigadores confirmaram o potencial do calor em induzir declínio do crescimento tumoral *in vivo* independentemente da técnica de aquecimento utilizada.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a hipertermia pode atuar de duas formas nos tecidos alvo. Uma ação direta, letal ou subletal sobre a célula e, uma ação indireta através da potencialização do efeito da quimioterapia (HAHN, 1982; WALLNER & LI, 1987; em: HILL, 1992) e da radioterapia (OVERGAARD, 1985).

6.2- Hipertermia associada

Embora o calor tenha sido usado na terapia do câncer no início do século XX, apenas a partir de 1921 é que estudos emergiram em jornais científicos

abordando os efeitos da radiação e do calor em tumores malignos. Paralelamente às investigações do aquecimento isolado, ROEDENBURG & PRIME (1921) foram os primeiros a analisar os efeitos do uso associado do calor e da radiação no sarcoma 180 de Crocker, e em alguns outros tumores utilizando temperaturas entre 42° e 46°C. Eles observaram um efeito sinergístico acima de 42°C para o efeito associado. Antes, acreditava-se numa relação dose-resposta térmica entre os efeitos induzidos pelo o tempo de termoterapia e a intensidade de calor administrado. Atualmente, acredita-se que “baixas” temperaturas (41°C) são tão efetivas quanto “altas” (46°C), quando as “baixas” temperaturas são mantidas por tratamentos mais longos. Este achado foi exatamente confirmado por estudos mais recentes em termobiologia (DEWEY et al., 1989) e também, a partir destes trabalhos, foi proposto por SAPARETO & DEWEY (1984) o conceito de dose térmica.

A pesquisa acerca da hipertermia moderna teve início com os estudos experimentais de CRILE (1961-1963), os quais foram um marco nesta área de estudo. CRILE (1940) retomou trabalhos de outros pesquisadores e realizou uma série de experimentos em tumores transplantáveis de camundongos. Os fenômenos biológicos por ele descritos incluem (a) a citotoxicidade dependente de tempo e de temperatura; (b) a citotoxicidade e sensibilidade aumentadas *in situ* comparadas com tumores menores; e termotolerância dos tecidos normais e tumorais.

O uso associado do calor e de quimioterápicos tem sido investigado apenas na era moderna da pesquisa oncológica, quando os pesquisadores constataram que a hipertermia pode alterar a permeabilidade da membrana e a captação de agentes citotóxicos (SHINGLETON e al., 1961). As primeiras observações clínicas na aplicação associada de hipertermia e quimioterapia foram registradas, em 1960, por WOODHALL e colaboradores (em HILL, 1992) e por SHINGLETON e colaboradores (1961). Foram observadas respostas positivas em pacientes com tumor de cabeça e pescoço, utilizando

temperaturas entre 40° e 41°C. O aumento da morte celular em cerca de 100 (cem) vezes, foi induzido por GIOVANELLA e colaboradores (1979) quando da adição de um agente alcoólico específico. Em 1975, STHELIN e colaboradores, constataram um aumento na resposta tumoral entre 35% e 80% aplicando calor entre 40,5° e 41,5°C em conjunto com a infusão quimioterápica no tratamento regional metastático de melanoma. Deve-se ainda mencionar os efeitos citotóxico e antitumora sinergísticos quando do uso associado com a hipertermia e TNF recombinante humano (WATANABE, 1988). No entanto, o TNF endógeno atua com fator de resistência contra a citotoxicidade hipertérmica em células de carcinoma pancreático (WATANABE, 1997).

6.3- Mecanismos molecular e celular da hipertermia

O sucesso da terapia oncológica é determinado pela eficiência com a qual ocorre a morte de células tumorais é encontrada com o mínimo de lesão aos tecidos normais. A morte celular neste contexto então, significa que a clonogeneidade de células primárias é destruída por agentes como a radiação ionizante, químicos citotóxicos e calor. A hipertermia, na faixa de 40° e 45°C, pode atuar como agente sensibilizante em combinação com radiação ionizante ou drogas citotóxicas (STREFFER, 1990). Durante o aquecimento prolongado por várias horas acima de 42°C, e abaixo desta temperatura ou após choque térmico rápido, as células podem se tornar termoresistentes, adquirindo termotolerância. Na termotolerância encontram-se envolvidas proteínas denominadas hsp (do inglês *heat shock proteins*), as quais limitam os efeitos deletérios da hipertermia sobre os tecidos orgânicos (FUJIMORI et al., 1997) e modulam a expressão de metástase (ALBERTAZZI et al., 1998). As hsp são uma família de proteínas essenciais à sobrevida celular, sendo induzida sua

maior expressão durante vários estresses fisiológicos. Entre estas proteínas, a hsp70 (BEASLEY et al., 1997; MIRKES, 1997), hsp60 e hsp72 (OTAKA et al., 1997) são as que encontram-se mais envolvidas com o estresse metabólico ocasionado pela hipertermia. Sabe-se ainda que o estresse hipertérmico induz ativação de plaquetas circulantes (TAKE et al., 1996).

A aplicação da hipertermia possui uma longa história na terapia tumoral; entretanto, os mecanismos celulares e moleculares têm sido estudados apenas a partir da década de 70.

Sabe-se que o tratamento hipertérmico induz consideráveis alterações metabólicas e moleculares. Enquanto a radiação ionizante provoca principalmente dano ao DNA (OVERGAARD, 1977) levando à morte da célula reprodutiva, o mecanismo de morte celular pela hipertermia isolada é menos claro. Parece ser evidente que eventos citoplasmáticos são distintos dos que ocorrem no núcleo (HAHN 1982; STREFFER 1982, 1984). Nos níveis molecular e metabólico, o calor induz predominantemente dois efeitos: (a) Alterações conformacionais e desestabilização de macromoléculas e de estruturas moleculares; e (b) aumento das taxas de reações metabólicas durante a termoterapia, seguido de desregulação do metabolismo, principalmente após a hipertermia.

A conformação de macromoléculas biológicas é principalmente estabilizada por pontes de hidrogênio, interações com grupos iônicos e por interações hidrofóbicas e hidrofilicas dentro das macromoléculas e seu ambiente. As três classes de ligações e interações são comparativamente fracas sendo facilmente alteradas, por exemplo, por um aumento na temperatura. Para a atividade biológica de macromoléculas, a integridade das estruturas conformacionais é pré requisito. A conformação do DNA é irreversivelmente alterada apenas à temperaturas próximas daquelas que conduzem à morte celular (LEPOCK, 1991). A entalpia calculada por Arrhenius proposta para a

morte celular encontra-se na mesma faixa que a para ocorrência de desnaturação protéica (STREFFER, 1990). Soma-se a isso, o fato de que as alterações estruturais induzidas pelo calor em proteínas são extremamente dependentes do valor do pH (WIKI-HOOLE, 1984).

Uma significante desnaturação protéica é iniciada entre 40º e 41ºC, e de forma irreversível em mitocôndrias, núcleo celular, microssomos e frações citosólicas de proteínas solúveis. LEPOCK e colaboradores (1991) concluíram que as alterações conformacionais protécicas, são as responsáveis pelos efeitos observados durante o aquecimento nas membranas celulares. As membranas são os principais alvos celulares para a hipertermia tanto para bactérias quanto para mamíferos.

A bicamada fosfolipídica é uma parte essencial das membranas biológicas. A fluidez destas membranas influenciam significativamente a função e a estabilidade celular. A composição lipídica possui influência marcante na fluidez, sendo esta característica aumentada em função da elevação de temperatura (VAUPEL et al., 1987). TAYLOR e colaboradores (1992) propuseram que este efeito correlaciona-se com a apoptose. A ocorrência de termotolerância não induz da fluidez da membrana.

A hipertermia pode danificar não apenas a membrana plasmática mas também membranas intracelulares. As alterações da permeabilidade de membrana induzem alteração da permeabilidade iônica, aumentando o esfuxo de potássio e influxo de cálcio (EVANS, 1989 e DEWEY, 1977). Após a termoterapia, o influxo de cálcio se reduz e a concentração deste íon livre aumenta (DEWEY, 1989).

6.4- Metabolismo energético e da glicose na hipertermia

O metabolismo da glicose encontra-se intimamente ligado aos dos lipídeos e dos aminoácidos. Estes mecanismos metabólicos são dependentes dos meios intra e extra celulares. Existe uma variabilidade quanto à metabolização da glicose entre os diferentes tumores, considerando-se espécie e sítio de localização. Todavia, alguns padrões metabólicos podem ser característicos nas diversas linhagens.

A glicólise influencia o meio intracelular (KIM et al., 1978), sendo a sua taxa dependente de vários fatores (KELLEHER et al., 1995), tais como pH e a tensão de oxigênio (O_2). A hiperglicemias de ratos portadores de tumor reduz o pH nas áreas tumorais e normais adjacentes ao tumor. Este processo conduz ao acúmulo de ácido láctico em tecidos aquecidos (SAUER et al., 1986).

O potencial hidrogeniônico encontra-se fortemente associado à relação lactato/piruvato nas células (STREFFER, 1988). LEE e colaboradores (1986) estudando o tumor de camundongo SCK, observaram um aumento considerável (cerca de duas vezes) dos níveis de lactato, após aquecimento a 43,5°C por 30 minutos permanecendo este aumento por até 24 horas. Os autores constataram também um acréscimo nos níveis de β -hidroxibutirato. Entretanto, como o aumento da concentração de lactato era muito maior que a de β -hidroxibutirato, concluiu-se que o lactato foi o responsável pela possível acidificação do tumor. Estudos posteriores demonstraram que o aumento no lactato é mais dependente das características do tumor e difere entre linhagens sob as mesmas condições. Todavia, observou-se em todos os tumores um aumento na relação lactato/piruvato. Estes dados demonstram que a glicólise aparentemente não é inibida durante a hipertermia e a glicemia é suficientemente mantida.

6.4.1- Status metabólico e reação ao aquecimento

A sensibilidade térmica tem se mostrado altamente dependente do pH tumoral, bem como do status nutricional e energético dos tumores tratados (SCHAEFER et al., 1993). Embora não existam evidências conclusivas relacionadas à interferência destes fatores, não há dúvidas que a taxa e a homogeneidade da perfusão sanguínea desempenha um papel primordial na determinação do status metabólico.

Como consequência patofisiológica da microcirculação tumoral inadequada funcionante (REINHOLD & ENDRICH, 1986), o suprimento e a drenagem sanguínea em muitos tumores sólidos são restritas à determinadas áreas, desencadeando então hipoxia tecidual, acidose e depleção energética (SONG et al., 1980). Paralelamente às taxas de *turn-over*, o status metabólico tumoral depende predominantemente (SHAPOT, 1972, VAUPEL et al., 1980 e VAUPEL et al., 1989) da função microcirculatória (**figura 6**).

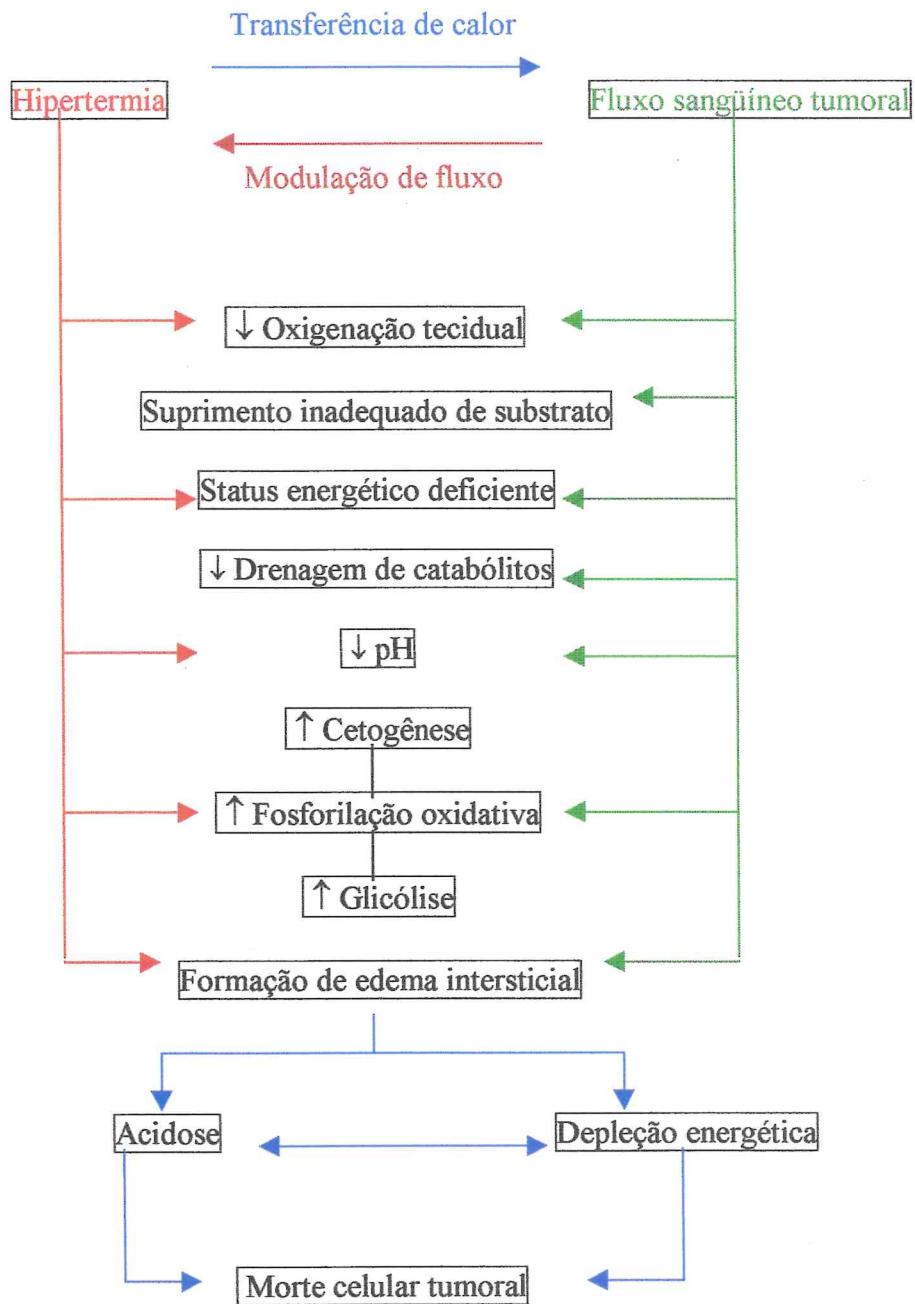


Figura 6: Representação esquemática da destruição celular tumoral induzida pela hipertermia *in vivo* através da modulação da termosensibilidade por fatores fisiológicos tais como função microcirculatória (alteração de fluxo sanguíneo), pH intracelular (acidose) e pelo status bioenergético (depleção energética e restrição de substratos).

A alteração de fluxo sanguíneo após aquecimento em tecidos normais é devido a mecanismos termorregulatórios acompanhados de dissipação de calor. Dados relacionados à perfusão sanguínea em tumores humanos (VAUPEL et al., 1992) mostram uma grande variabilidade da mesma considerando-se histologia e sítios primários similares. Após aquecimento destes tumores, as investigações acerca das alterações de fluxo de sangue ainda são inconclusivas (VAUPEL et al., 1993). Experimentos com tumores de roedores, de variados volumes e semelhantes taxas de fluxo sanguíneo antes do aquecimento, demonstraram que alterações de fluxo e de disponibilidade de O₂ não dependem exclusivamente da dose térmica administrada e nem da linhagem tumoral investigada, mas também do fluxo sanguíneo dos tumores antes do tratamento térmico, bem como do volume tumoral e do sítio de implantação.

O fluxo aumentado registrado em modelos experimentais com tumores pode ajudar a explicar a não responsividade ao aquecimento de muitos tumores humanos quando uma situação clínica é criticamente avaliada (WATERMAN et al., 1991). O aumento do fluxo em tumores experimentais e humanos pode resultar numa melhor dissipação do calor de modo que temperaturas terapeuticamente relevantes (41°– 49°C) podem não ser atingidas (DICKSON & CAEDERWOOD, 1980).

O status bioenergético tumoral “piora” durante a hipertermia (SCHAEFER et al., 1993), com a redução do ATP e da fosfocreatina e, do acréscimo dos níveis de fosfato inorgânico (LILLY et al., 1984). A hidrólise do ATP resulta em acúmulo de catabólitos de purina e na formação de prótons, os quais podem contribuir para a acidose induzida pelo calor. Adicionalmente, a formação de espécies reativas de oxigênio podem contribuir para a citotoxicidade induzida pela hipertermia.

6.4.2) Níveis de glicose e de lactato após hipertermia

A glicose tem sido o “termosensor” mais estudado em tumores experimentais (SHAH et al., 1982 e SHAPOT & BLIBOV, 1974). A depleção de energia celular resultante de um fornecimento reduzido de nutrientes pode sensibilizar células tumorais à hipertermia. Uma vez que alguns tumores experimentais exibem decréscimo dos níveis de glicose e de glicose-6-fosfato após tratamento hipertérmico, tem-se hipotetizado que as células tumorais podem tornar-se sensíveis termicamente após hipertermia, induzindo um possível *feedback* positivo.

As concentrações intratumorais de glicose (SCHAFFER et al., 1993 e STREFFER et al., 1988) pós hipertermia podem ser o resultado de diferentes mecanismos patogênicos relacionados ao aumento do fluxo sanguíneo arterial e à expansão do compartimento intersticial.

Após aquecimento terapêutico as concentrações de ácido láctico aumentam significantemente. Em presença de O₂, o ácido láctico pode ser o catabólito da glicólise aeróbica e da glutaminólise. O acúmulo de lactato em tumores é resultante do colapso glicolítico com cerca de 18 vezes menos ATP/campo do que ocorre com a oxidação normal. A degradação de piruvato a acetil-CoA e o mecanismo oxidativo seguinte estão prejudicados na hipertermia (STREFFER, 1984). Estas alterações metabólicas induzidas pelo calor conduzem a uma produção aumentada das formas ionizadas do lactato, β-hidroxibutirato e do acetoacetato (STREFFER, 1982). O estado redox também é um bom indicador do oxidação celular após hipertermia, uma vez que a razão [NAD⁺]/[NADH] no sítio das oxidoreduções refletem o comportamento metabólico dos substratos oxidáveis e reduzíveis (WILLIAMSON et al., 1967) em presença de atividade enzimática aumentada induzida pelo tratamento térmico.

II) JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se encontrar alternativas, para o tratamento das neoplasias gástricas, que sejam mais eficientes e que menos depletem reservas energéticas, é que se deu início a este trabalho utilizando a hipertermia como modelo experimental. É conhecido que a morte celular tumoral ocasionada pela hipertermia é devida principalmente à redução do pH intracelular. Sabendo-se então que a acidificação do tecido tumoral pode ser modulada na termoterapia pela localização tumoral, pela disponibilidade de nutrientes e energia para o tumor e seu hospedeiro, é que propôs-se os seguintes objetivos:

a) Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de possíveis alterações metabólicas em ratos com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker (W256) e submetidos à hipertermoterapia.

b) Objetivos Específicos

Reproduzir o modelo experimental da hipertermia com o implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker (W256);

Implantar no Laboratório de Farmacologia Clínica e Celular a metodologia das determinações enzimáticas de piruvato, lactato, acetoacetato, hidroxibutirato e D-glicose;

Avaliar o status metabólico dos grupos de animais em diferentes tempos após tratamento térmico, propondo correções se necessárias.

II) MATERIAL E MÉTODOS

1) Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (n=96) pesando entre 180 e 250g. Todos os animais receberam ração PURINA com livre acesso à água e permanecendo em ciclo de 12 horas de luz e 12 horas sem luminosidade. Previamente ao implante gástrico de W256 e ao tratamento térmico os ratos permaneceram em jejum durante 24 horas com água *ad libitum*.

2) Grupos de estudo

Grupo SHAM (n=18): Animais controle sãos (não portadores de tumor), submetidos à normotermia (NT) com temperaturas entre 37ºe 38º C.

Grupo TUM (n=18): Animais portadores de tumor (W256), submetidos à normotermia (NT) com temperaturas entre 37ºe 38º C.

Grupo HT (n=18): Animais controle sãos (não portadores de tumor), submetidos à hipertermia (HT) com temperaturas entre 41ºe 42º C.

Grupo TUM + HT (n=18): Animais portadores de tumor (W256), submetidos à hipertermia (HT) com temperaturas entre 41ºe 42º C.

De acordo com STONER e colaboradores (1979), as concentrações sanguíneas de glicose, lactato, corpos cetônicos e de ácidos graxos encontram-se aumentadas imediatamente após a injúria, sendo normalizadas entre 1 a 7 dias após o estresse. Coincidemente o pico de crescimento tumoral ocorre no 7º dia pós implante. A partir então dos pressupostos supracitados é que determinou-se que o tratamento térmico e a coleta de amostras seriam efetuadas no 7º dia pós implante (de células tumorais ou do veículo).

Cada grupo de estudo foi subdividido em 3 subgrupos, sendo submetidos à hipertermia ou à normotermia no 7º dia após procedimento cirúrgico (*sham* ou com implante tumoral) e avaliados imediatamente (T0), aos trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após tratamento térmico.

3) Material

3.1) Enzimas e outras substâncias

L-Lactato desidrogenase de músculo de coelho - SIGMA - USA

β -Hidroxibutirato desidrogenase de *Rhodopseudomonas sphaeroides* – SIGMA – USA

Hexoquinase de leveduras – SIGMA – USA

Glucose-6-P desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* - SIGMA - USA

NAD⁺, do inglês β -Nicotinamide adenine dinucleotide - SIGMA - USA

NADH, do inglês β -Nicotinamide adenine dinucleotide (forma reduzida)- SIGMA-USA

ATP, do inglês Adenosine 5'- triphosphate - SIGMA - USA

Fosfato de potássio monobásico – REAGEN - RJ/BRASIL

Fosfato de potássio dibásico – REAGEN - RJ/BRASIL

Tris (hidroximetil aminometano) – REAGEN - RJ/BRASIL

Hidrato de Hidrazina 100% – REAGEN - RJ/BRASIL

Ácido perclórico (Haloquímica Ind. e Com.Ltda. - SP/BRASIL)

EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) – REAGEN – RJ/BRASIL

Cloreto de magnésio (Grupo Química Industrial Ltda. – RJ/BRASIL

Solução de Ringer com lactato (Gaspar Viana – BRASIL): Frasco com 500 ml
(3,0 g de cloreto de sódio; 0,15 g de cloreto de potássio; 0,10 g de Cloreto de cálcio dihidratado e 1,55 g de lactato de sódio)

Ketalar: Cloridrato de ketamina (Aché – BRASIL)
Rompun: Cloridrato de xilazina 20% (Bayer – BRASIL)
Cloranfenicol: Succinato de cloranfenicol (Prodotti – BRASIL)
Povidine: Polivinilpirrolidona a 10% (Tecnofarma – BRASIL)
Éter dietílico (Hoechst – BRASIL)
Nitrogênio líquido (White Martins, São Paulo-SP-Brasil)
Indicador de pH Universal (Poole - Inglaterra)

3.2) Equipamentos e instrumentos de laboratório

Balança analítica (modelo H5 – Mettler - Suíça)
Centrífuga refrigerada (Modelo FR 15 – Fanem – SP – Brasil)
Espectrofotômetro (modelo DU 640 – Beckman – Fullerton – CA - USA)
Potenciômetro (Micronal; pH-metro B374)
Banho-Maria (modelo 100 – FANEM – SP/BRASIL)
Bomba com equipo de infusão para nutrição enteral (B.Braun – BRASIL)
Termômetro clínico (BD – BRASIL)
Agitador magnético (Dbarnstead/Thermolyne, modelo M37610-26)
Agitador para tubos de ensaio (Marconi, modelo TE089)
Balança analítica (Marte, modelo AL 200) / Espátulas
Balança para pesagem de animais (Filizola, modelo ID 1500)
Cubetas em quartzo para leitura espectrofotométrica (American Hospital Supply Corporation)
Tubos de ensaio de vidro com capacidade para 20 ml (pyrex)
Freeze-clamp em metal
Gral e pistilo em porcelana / Béqueres e provetas (pyrex - BRASIL)
Freezer e geladeira (Prosdócimo – BRASIL)
Pipeta automática com capacidade para 200-1000 µl (SciTech – Sellek, Inc. – USA)
Placas de Petri (Pyrex)

3.3) Material cirúrgico

Tesouras, porta-agulhas, pinças simples e hemostáticas em inox (Medlight – BRASIL)

Lâminas de bisturi n^{os} 11 e 15

Fios mononylon para sutura nº 4 (Ethicon – BRASIL)

Seringas com capacidade para 2 e 5 ml, e agulhas descartáveis 25x7 (BD – BRASIL)

Luvas cirúrgicas

Escalpe Nº 19

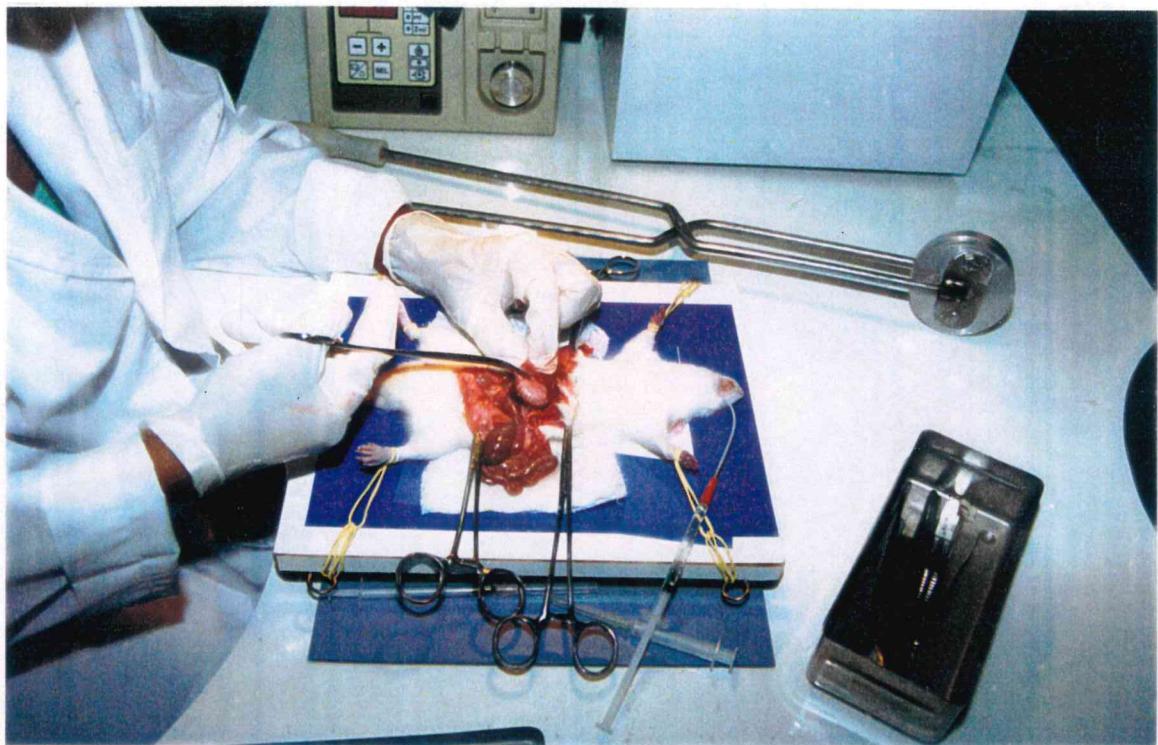
Cânula em metal fenestrada 40 x 12 (3 janelas)

4) Procedimentos

4.1)Transplante tumoral e procedimento cirúrgico

A preparação do inóculo e a repicagem do tumor foi efetuada entre o 8º e o 10º dia pós implante (intramuscular na pata traseira) no animal de manutenção do tumor. O tumor foi retirado e colocado em uma placa de Petri, contendo 9 ml de solução de Ringer com lactato com 1 ml de cloranfenicol (100 mg/ml). Transferiu-se o tecido sem focos necróticos para outra placa de Petri contendo a mesma quantidade de Ringer com lactato e cloranfenicol, onde o tumor foi triturado em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm cada. As placas foram mantidas sobre uma superfície gelada durante os procedimentos supracitados. A solução com fragmentos foi agitada em agitador (com “bala” magnética) por 15 minutos e filtrada em gase após, obtendo-se uma solução contendo as células tumorais em suspensão.

No tocante à técnica cirúrgica para inoculação do tumor no estômago dos ratos, os mesmos foram mantidos anestesiados sob ação inalatória de éter. Seguiu-se a técnica descrita por Brøn (1974) e adaptada por Oliveira, (1997), determinando após a exposição do estômago a clampeadura em três regiões gástricas: Foram clampeadas as curvaturas menor e maior do estômago e a junção gastroesofágica. Este trauma, na mucosa ricamente vascularizada, otimiza a implantação das células tumorais mesmo na presença de resíduos alimentares pós jejum destes animais. Após a clampeadura foi administrado 1 ml de solução contendo suspensão de células tumorais (10^7 células) de W256 através de uma sonda orogástrica (**figura 7**). Os ratos inoculados foram submetidos no 7º dia pós cirúrgico ao tratamento térmico (NT ou HT). Os animais *sham* operados foram submetidos aos mesmos estresse de cirurgia e de anestesia, ao se substituir o veículo (Ringer-lactato sem células tumorais). O sucesso do implante tumoral pode ser visualizado nas representações macroscópica e histológica, respectivamente nas **figuras 8 e 9**.

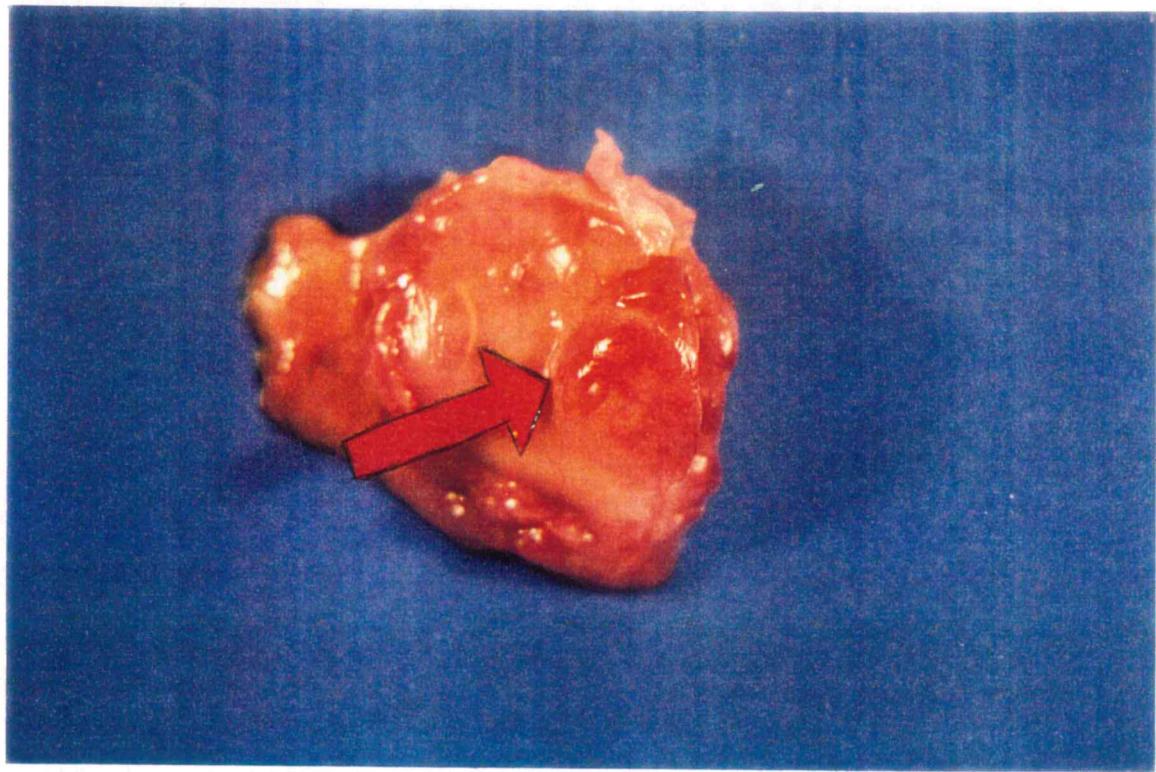


7A

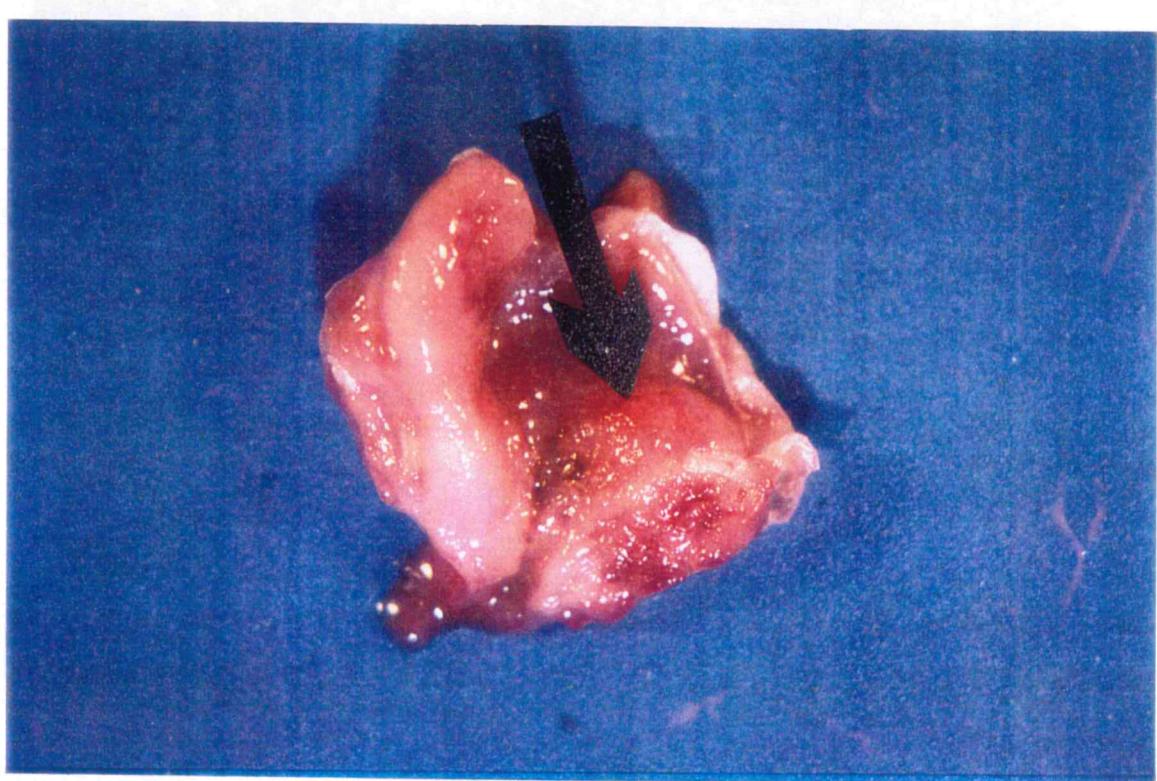


7B

Figura 7: Fotografias do procedimento cirúrgico com clampeadura e implante tumoral de suspensão de células de W256 através de sonda orogástrica (A); e Freeze-clampping e tubos com ácido perclórico para acondicionamento das amostras (B).

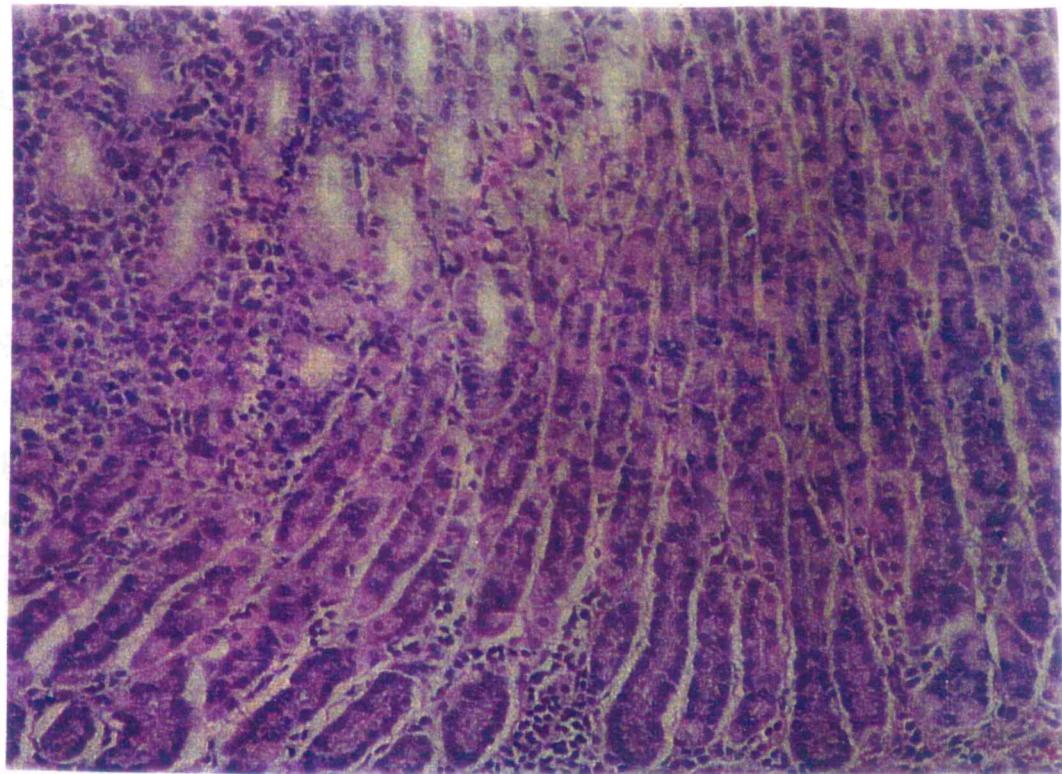


A



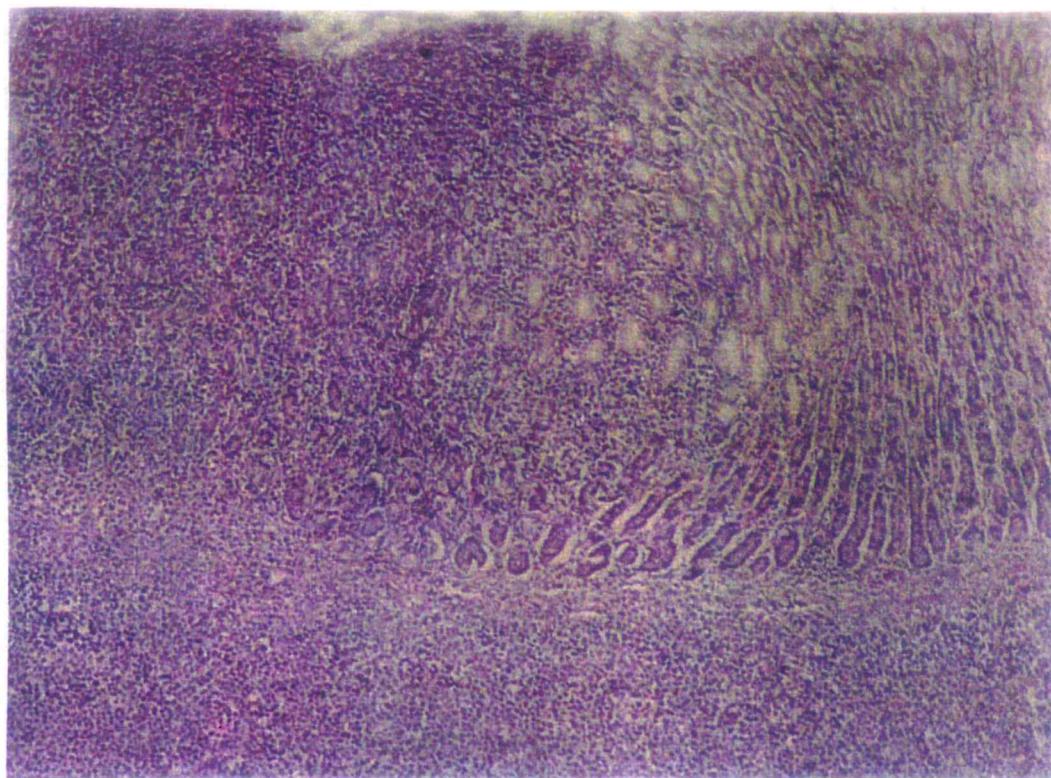
B

Figura 8: Fotografias do sucesso do implante tumoral demonstrado macroscopicamente através do desenvolvimento neoplásico na mucosa gástrica (A) e; na parte externa da grande curvatura do estômago (B).



A

Figura 9: Sucesso do implante tumoral demonstrado histologicamente através da infiltração de células tumorais de W256 no interstício entre as glândulas da mucosa gástrica (A) e na camada submucosa (B). Fotografias gentilmente cedidas por Paulo F. M. Oliveira (fonte: Dissertação de Mestrado, 1997).



B

Figura 9: Fotografias do sucesso do implante tumoral demonstrado histologicamente através da infiltração de células tumorais de W256 no interstício entre as glândulas da mucosa gástrica (A) e na camada submucosa (B). Fotografias gentilmente cedidas por Paulo F. M. Oliveira (fonte: Dissertação de Mestrado, 1997).

4.2) Protocolo experimental

O modelo de termoterapia (**figuras 10 e 11**) foi utilizado da seguinte forma: Uma bomba infusora bombeou uma solução de Ringer com lactato conduzida para aquecimento, através de uma “serpentina”, em banho maria sendo infundida por meio do acesso de uma escalpe Nº 19 (inserida no flanco esquerdo) para a cavidade abdominal do rato. A solução aquecida infundida foi drenada com o auxílio de outra cânula fenestrada inserida contralateralmente. A infusão com drenagem contínua foi mantida por 60 minutos estando os animais sob anestesia com uma solução mista de xilazina (10 mg/kg i.p.) + ketamina (90 mg/kg i.p.). O aquecimento para NT (37°- 38° C) ou HT (41°- 42° C) foi mantido através do controle da temperatura retal. Verificava-se a temperatura previamente à colocação do animal no sistema, aos 30 minutos de NT ou HT e imediatamente após a retirada do mesmo do sistema de termoterapia. Estando o animal ainda sob efeito anestésico foi efetuada abertura cirúrgica do abdome do rato, procedendo-se seqüencialmente, a coleta de sangue arterial (2 ml da aorta abdominal), bem como a retirada do fígado e do estômago, imediatamente (T0) e aos trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após o tratamento térmico.

O material coletado foi conservado em 5 ml de ácido perclórico 0,75 M (“parada” das reações enzimáticas), sendo que as amostras de tecidos hepático e gástrico, foram anteriormente conservadas em nitrogênio líquido à temperatura de -190°C (WOLLENBERGER, 1960; em: VASCONCELOS, 1987) e posteriormente em 5 ml de ácido perclórico 0,75 M. Após este procedimento as amostras foram maceradas (com o auxílio de gral e pistilo de porcelana) e acondicionadas também em ácido perclórico 0,75 M a 190° C. As amostras foram utilizadas em ensaios enzimáticos para determinação de piruvato, lactato, 3-hidroxibutirato, acetoacetato e D-glicose. Os tubos de ensaio utilizados para acondicionar as amostras foram devidamente identificados e pesados antes (P0), após a adição de ácido perclórico (P1), e após a adição das amostras (P2).

A imersão em ácido perclórico para precipitação das proteínas e posterior foi seguida de centrifugação refrigerada a 2000 RPM durante 20 minutos. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante (extrato ácido), colocado em tubos de ensaio previamente pesados. Os tubos foram novamente pesados, obtendo-se desta forma o volume ácido. O volume ácido foi titulado com hidróxido de potássio 20% até a neutralidade (pH entre 7,0 e 8,0). Novamente procedeu-se a pesagem dos tubos e centrifugação a 2000 RPM durante 10 minutos, e o extrato neutro, foi utilizado para a análise dos metabólitos, nas cubetas, através de leitura espectrofotométrica (340 nm).

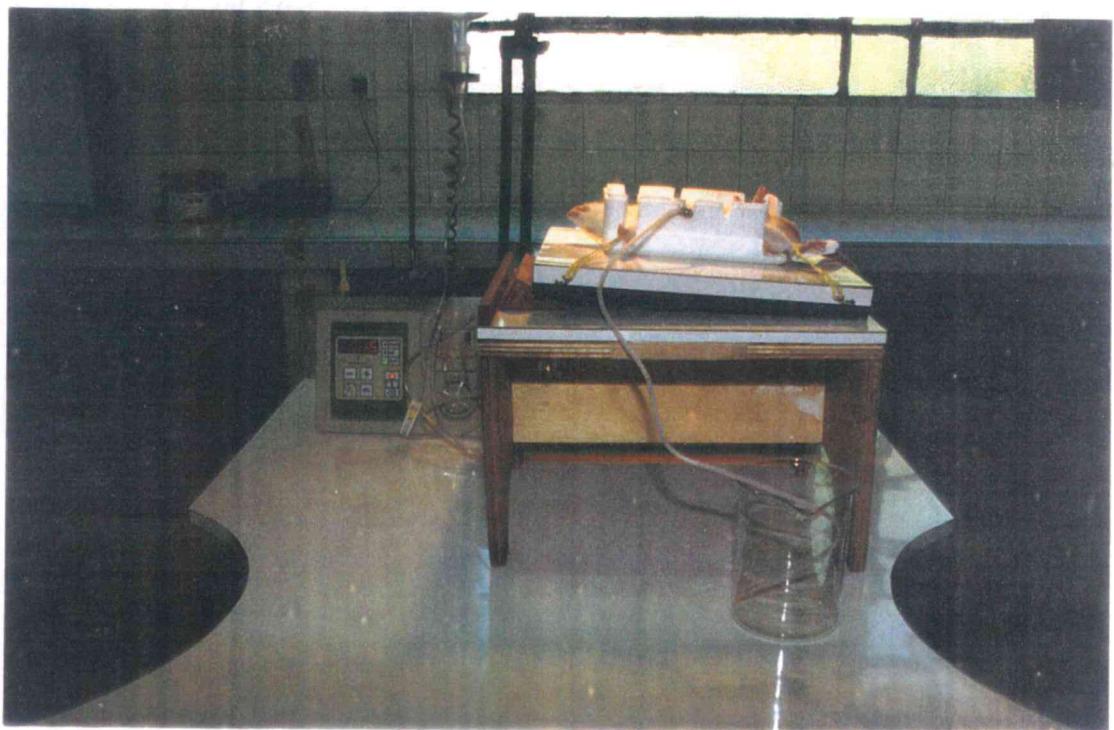


Figura 10: Fotografias do sistema de termoterapia com infusão peritoneal contínua com drenagem abdominal.

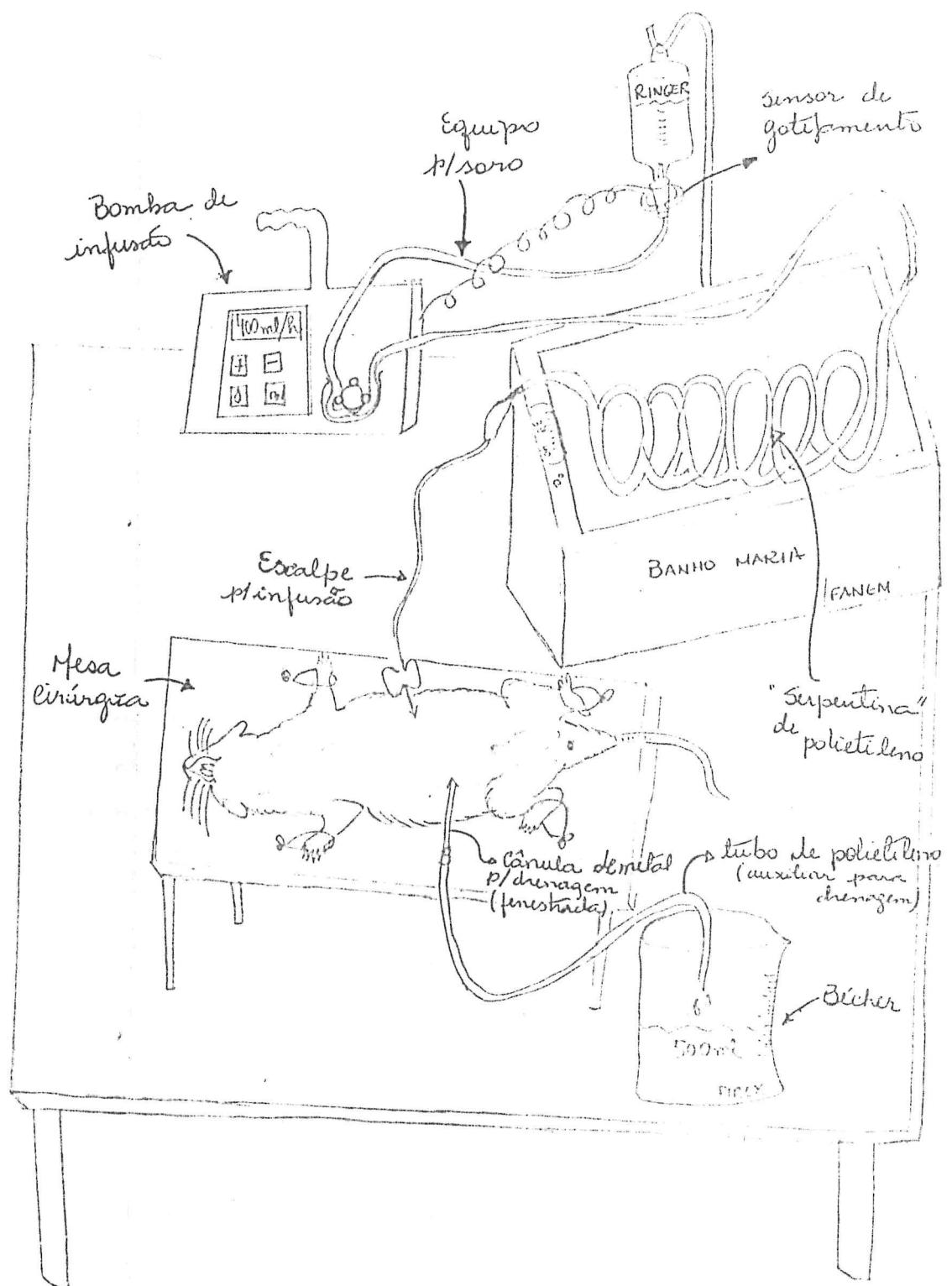


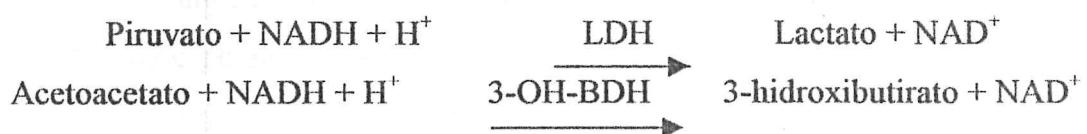
Figura 11: Representação esquemática do sistema de termoterapia com infusão peritoneal contínua e drenagem abdominal.

5) Determinação dos metabólitos

5.1) Piruvato e acetacetato

Piruvato e acetoacetato possuem condições de ensaio similares, e podem ser determinados seqüencialmente na mesma amostra e na mesma cubeta, de acordo com a combinação de métodos descritos por HOHOROST (1959) e WILLIANSON (1962):

Seqüência da reação:



Solução tampão para o ensaio:

10,0 ml de fosfato de potássio monobásico 0,1 M + 10,0 ml de fosfato de potássio dibásico 0,1 M (pH final = 6,9)

1,0 ml de NADH⁺ 0,05 M

Água destilada (q.s.p. 100 ml)

O equilíbrio da primeira reação em pH 7,0 é suficientemente desviado para a direita, garantindo uma medida quantitativa dos níveis de piruvato desde que a concentração de NADH não seja inferior a 0,01 mM. Com o mesmo pH e com o excesso de NADH compatível, pelo menos 98% do acetoacetato é reduzido para 3-hidroxibutirato. No entanto, devido a baixa atividade da preparação de 3-hidroxibutirato desidrogenase, a segunda reação ocorre com uma velocidade menor que a primeira.

Uma solução fresca foi preparada para cada ensaio. O volume total a ser colocado em cada cubeta foi de 2,0 ml, consistindo de 1,0 ml da amostra contendo ácido perclórico neutralizado e 1,0 ml da solução tampão. A cubeta controle continha 1 ml de água destilada e 1,0 ml da solução tampão do ensaio.

As leituras (a 340 nm) das amostras foram efetuadas aos 10 e 15 minutos anteriormente e após a adição de 0,01 ml (550 U/mg de proteína a 25° C) de lactato desidrogenase. Em seguida, adicionou-se 0,01 ml (3 U/mg de proteína a 25° C) de 3-hidroxibutirato desidrogenase em cada cubeta; as quais foram lidas novamente após 35 e 45 minutos.

5.2) L-Lactato

As concentrações de lactato foram determinadas nos tecidos hepático e gástrico e no sangue de acordo com o método descrito por HOHOROST (1963).

Seqüência da reação:



O equilíbrio desta reação é deslocado para o lado do lactato e NAD⁺. No entanto, para garantir a conversão do lactato, os produtos da reação devem ser removidos. Os prótons são aprisionados por uma reação alcalina; o piruvato reage com uma solução de hidrato de hidrazina na solução tampão para formar piruvato hidrazona e além disso, um excesso de NAD⁺ e enzima foram utilizados para se obter rapidamente o ponto final da reação. A lactato desidrogenase reage somente com L-(+)-lactato e isto confere especificidade para o ensaio.

Solução tampão para o ensaio:

40,0 ml de Tris 0,2 moles/L

5,0 ml de hidrato de hidrazina 100%

25,0 mg de EDTA

Água destilada (q.s.p. 100 ml)

O pH da solução foi ajustado para 9,5 com ácido hidroclórico 5 M (este

procedimento garantiu a estocagem por até duas semanas, mantendo-a a 4º C.). No ensaio, 1,0 ml de NAD⁺ 0,1 M foi adicionado a cada 10 ml de solução tampão. O volume total em cada cubeta foi de 2,0 ml; 0,2 ml da amostra neutralizada; 0,8 ml de água destilada e 1,0 ml de solução tampão contendo NAD⁺ 1%. A leitura das cubetas foi efetuada a 340 nm, 35 e 45 minutos após a adição de 0,02 ml (550 U/mg de proteína a 25º C) de lactato desidrogenase.

5.3) D-(-)-Hidroxibutirato

As concentrações sanguíneas, hepáticas e gástricas de 3-hidroxibutirato foram determinadas de acordo com o método proposto por WILLIANSO (1962):

Seqüência da reação:



O equilíbrio da reação com pH 8,0 foi alcançado quando aproximadamente 40% do 3-hidroxibutirato foi oxidado a acetoacetato. No entanto, a presença de hidrazina aprisiona o acetoacetato formado como uma hidrazona e a reação seguiu quantitativamente da esquerda para a direita.

Solução tampão para o ensaio:

70,0 ml da solução tampão Tris 0,1 moles/L; pH 8,5

0,25 ml de hidrato de hidrazina 100%

25,0 mg de EDTA

Água destilada (q.s.p. 100 ml)

O pH da solução tampão do ensaio foi ajustado para 8,5 com ácido hidroclórico 5M e a solução pôde ser armazenada por até duas semanas a 4º C. No início do ensaio, 1 ml de NAD⁺ 0,1 M foi adicionado a 10 ml de solução

tampão. O volume total em cada cubeta foi de 2 ,0ml, consistindo de 0,5 ml da amostra neutralizada, 0,5 ml de água destilada e 1,0 ml de solução tampão com NAD⁺ 0,1 M. As cubetas foram lidas a 340 nm aos 50 e 60 minutos após a adição de 0,01 ml (3 U/mg de proteína a 25° C) da enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase.

5.4) D-Glicose

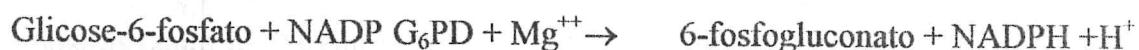
Os níveis de glicose no sangue, fígado e estômago foi determinada de acordo com o método descrito por SLEIN (1963).

Seqüência da reação:

a) Reação auxiliar



b) Reação indicadora



O equilíbrio para a reação indicadora, com pH 7,5 é desviada para a direita, o que garante o término completo de ambas as reações, desde que a glicose-6-fosfato formada na reação seja rapidamente utilizada na reação seguinte. Ainda que a hexoquinase catalise a fosforilação de vários outros monossacarídios, a especificidade do ensaio provém da glicose-6-fosfato desidrogenase (G₆PD), a qual não reage com outras hexoses ou pentoses que não seja a glicose-6-fosfato.

Solução tampão para o ensaio:

20,0 ml de tampão Tris 0,1 M (pH=8)

2,0 ml de cloreto de magnésio 0,1 M

2,0 ml de ATP 0,01 M

2,0 ml de NAD⁺ 0,1 M

0,13 ml de G₆PD (1 mg/ml)

0,01 ml de hexoquinase (atividade: 130-250 U/mg proteína)

Uma solução fresca foi preparada para cada ensaio. O volume total em cada cubeta foi de 2,0 ml, consistindo de 0,1 ml da amostra neutralizada; 0,9 ml de água destilada e 1 ml de solução tampão do ensaio. A cubeta controle possuia 1,0 ml de água destilada e 1,0 ml de solução tampão. Todas as amostras foram lidas a 340 nm anteriormente e aos 10 e 15 minutos posteriores à adição de 0,01 ml de hexoquinase.

5.5) Cálculo dos metabólitos no sangue e nos tecidos

Todos os cálculos dos metabólitos foram baseados nas alterações de densidade óptica a 340 nm nas amostras contidas das cubetas, observadas após adição da enzima e subtraídas das mudanças inespecíficas que ocorreram nas amostras controle. Portanto:

Absorbância (ABS) = (alteração da absorbância da amostra teste) – (alteração da absorbância da amostra controle)

Desde que o coeficiente molar de extinção de NADH seja de 6,22 cm²/μmol, a quantidade do substrato é igual a (ABS/6,22) x volume total da reação. Este resultado foi então multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato.

Nas amostras

(Peso do tecido + ácido perclórico/peso tecido) x (peso do extrato neutro/ peso do extrato ácido) x (volume total da reação/volume do extrato neutro) x (ABS/6,22) = μmol do metabólito/mililitro ou grama da amostra.

6) DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX

As concentrações dos substratos oxidados e reduzidos dos sistemas lactato e 3-hidroxibutirato desidrogenases foram mensuradas no fígado dos animais. Os substratos destas desidrogenases encontram-se provavelmente em equilíbrio com NAD⁺ e NADH, e a razão dos dinucleotídios livres foi calculada pela medida das concentrações dos substratos e da constante de equilíbrio (HOLDE, 1956; em: VASCONCELOS, 1987).

7.1) Redox citoplasmático

O sistema lactato desidrogenase (LDH) através da razão [NAD⁺]/[NADH] reflete o comportamento metabólico citoplasmático do hepatócito, uma vez que a enzima LDH encontra-se localizada apenas no citoplasma, catalisando a reação:



Desde que esta desidrogenase seja altamente ativa no fígado, aceita-se que esta reação tende para o equilíbrio. Portanto, a seguinte equação deve ser correta: $K_{LDH} = [\text{piruvato}] \times [\text{NADH}] / [\text{lactato} \times \text{NAD}]$, onde K_{LDH} é a constante de equilíbrio. Deduz-se portanto a seguinte fórmula para o cálculo do estado redox citoplasmático:

$$[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = [\text{piruvato}]/[\text{lactato}] + 1/K$$

Considerando que as concentrações de piruvato e lactato tenham sido mensuradas no fígado e o valor de K_{LDH} determinado *in vitro* tenha sido de $1,11 \times 10^{-4}$ (WILLIANSOON et al., 1966), a razão $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ no compartimento citoplasmático pode ser calculada utilizando-se a fórmula supracitada.

7.2) Redox mitocondrial

O sistema β -hidroxibutirato desidrogenase através da razão $[NAD^+]/[NADH]$ reflete o comportamento metabólico mitocondrial do hepatócito, uma vez que a enzima 3- β -BDH encontra-se localizada na crista mitocondrial catalisando a reação:



Uma vez que esta enzima é metabolicamente ativa no hepatócito, admite-se que esta reação esteja em equilíbrio. Portanto, a seguinte reação deve ser correta:

$$K_{HBD} = [acetoacetato] \times [NADH] / [3\text{-hidroxibutirato}] \times [NAD^+]$$

Deduz-se portanto a seguinte fórmula para o cálculo do estado redox mitocondrial:

$$[NAD^+] / [NADH] = [acetoacetato] / [3\text{-hidroxibutirato}] \times 1 / K_{HBD}$$

Uma vez que as concentrações de acetoacetato e de 3-hidroxibutirato foram mensuradas no fígado e o valor de K_{HBD} determinado *in vitro* de $4,93 \times 10^{-2}$ (WILLIAMSON et al., 1966), pode-se então calcular a razão $[NAD^+] / [NADH]$ no comportamento mitocondrial do hepatócito através da fórmula supracitada.

8) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm EPM acompanhado do número de observações (n). A significância estatística foi calculada de acordo com a análise de variância (ANOVA) para determinação das diferenças entre os grupos, e com o teste de Fisher; obedecendo os níveis de significância de $p < 0,05$.

4) RESULTADOS

1) Efeitos do procedimento cirúrgico, da anestesia e do tratamento térmico na sobrevida dos ratos

Neste estudo, obteve-se apenas 10% de óbito de todos os animais utilizados sendo 5% devido à ocorrência de abcesso de parede abdominal ou sepse, 2% em razão de inadequação da dose de anestésico administrada, e cerca de 2% de óbito devido ao aumento da temperatura corpórea acima de 42° C (dados não mostrados). Com relação aos outros animais não incluídos no estudo, estão os que desenvolveram termotolerância (1%) como descrito em literatura. A variação de temperatura no tratamento térmico dos grupos controles e experimental foi de cerca de 1° C. Os valores das concentrações dos metabólitos avaliados nos grupos controles (animais *sham* operados) foram semelhantes àqueles encontrados em ratos não tratados (BRODY, 1994).

2) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) sanguínea de lactato, piruvato e glicose em ratos ($n=6$) controle e em portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós termoterapia.

As determinações bioquímicas das amostras de sangue, permitiram observar que a hipertermia induziu significativas alterações metabólicas. Estas alterações foram constatadas através do aumento das concentrações de lactato (figura 12) nos grupos experimentais Sham-HT e Tumor-HT nos tempos T0, T30 e T60, sendo menor neste último tempo T60. Observou-se também elevação das concentrações de lactato nos animais do grupo tumor (normotermia).

Com relação ao piruvato sanguíneo (**figura 13**) o mesmo apresentou os mais baixos níveis no grupo Tumor nos tempos T0 e T30 minutos comparados aos grupos Sham e Sham-HT, respectivamente. Constatou-se, no entanto, um aumento da concentração deste metabólito no grupo Tumor-HT aos 30 e 60 minutos pós hipertermia, em comparação ao restante dos grupos.

Os níveis sangüíneos de glicose (**figura 14**) pós hipertermia, mostraram-se elevados nos grupos Tumor, Sham-HT e Tumor-HT no tempo zero; nos animais dos grupos Sham-HT e Tumor-HT aos trinta e sessenta minutos pós hipertermia. Constatou-se uma menor elevação da concentração de glicose sanguínea nos grupos Tumor e Tumor-HT aos sessenta minutos pós hipertermia. O pico do aumento dos níveis de glicose sanguínea foi curiosamente observado em todos os grupos.

O valores absolutos das concentrações sanguíneas de lactato, piruvato e glicose dos animais dos grupos Sham e Tumor podem ser visualizados na **tabela 1** e dos ratos submetidos à hipertermia, na **tabela 2**.

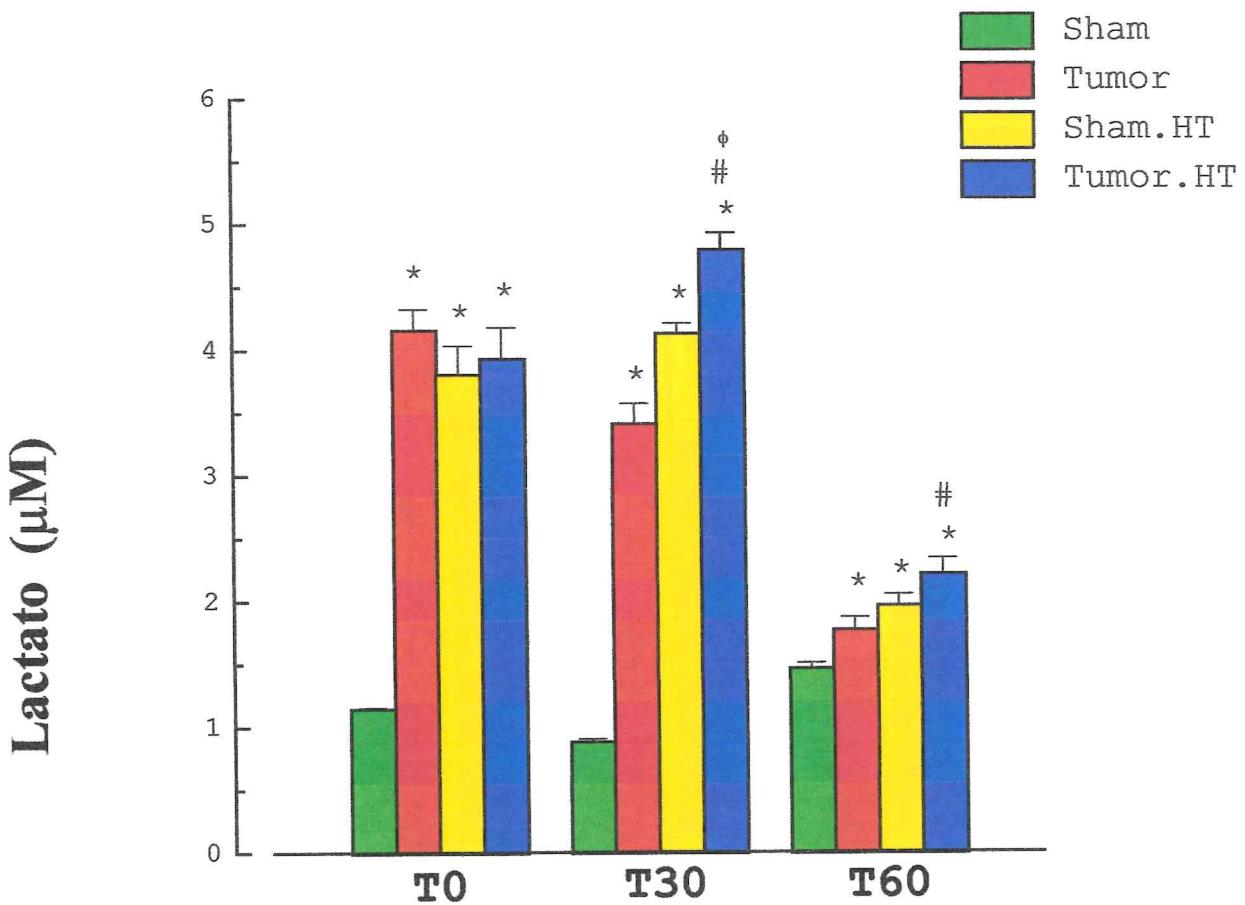


Figura 12: Concentração de lactato no sangue de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis sanguíneos de lactato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de lactato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

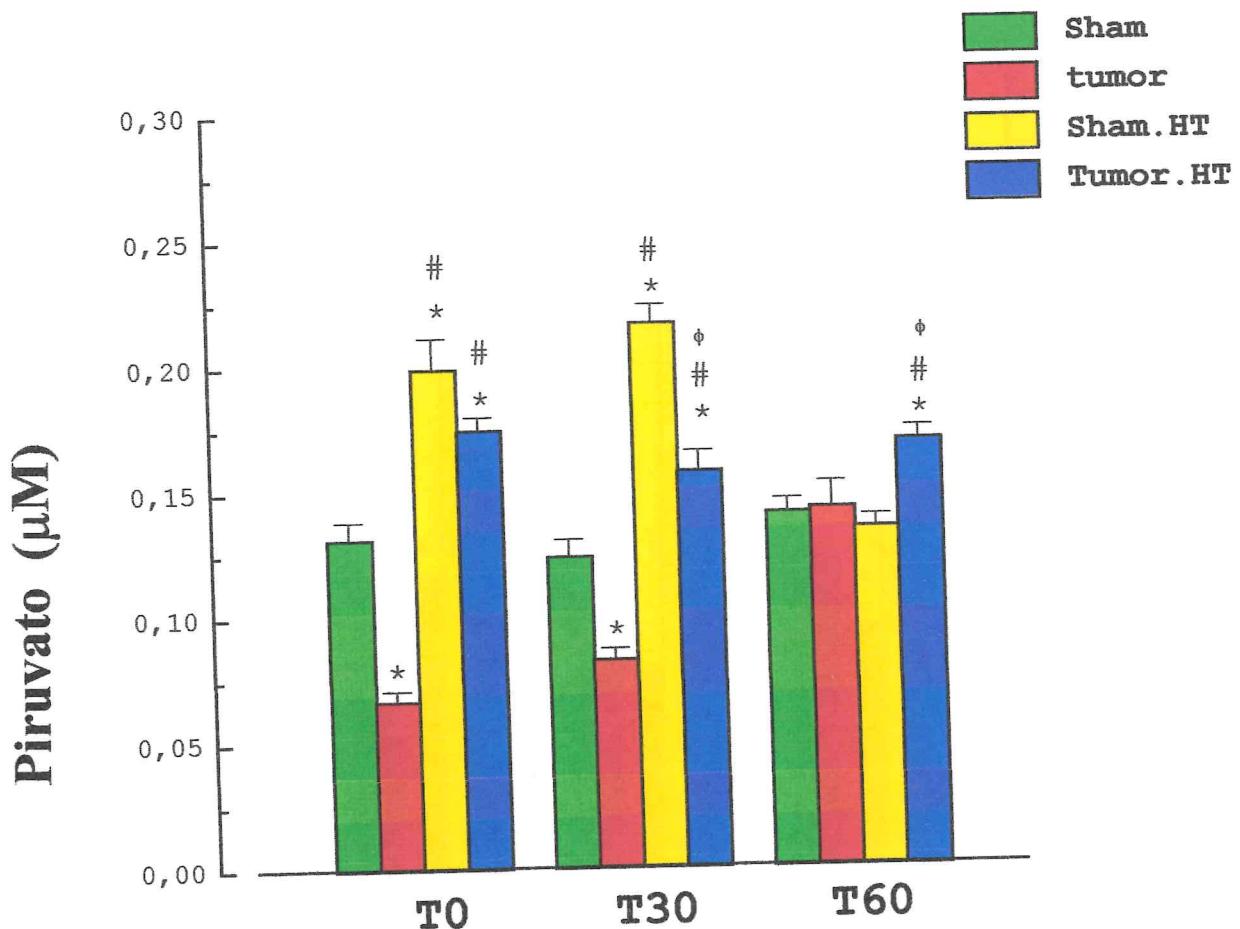


Figura 13: Concentração de piruvato no sangue de ratos ($n=6$) controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis sanguíneos de piruvato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média±EPM das concentrações de piruvato em μ M. * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

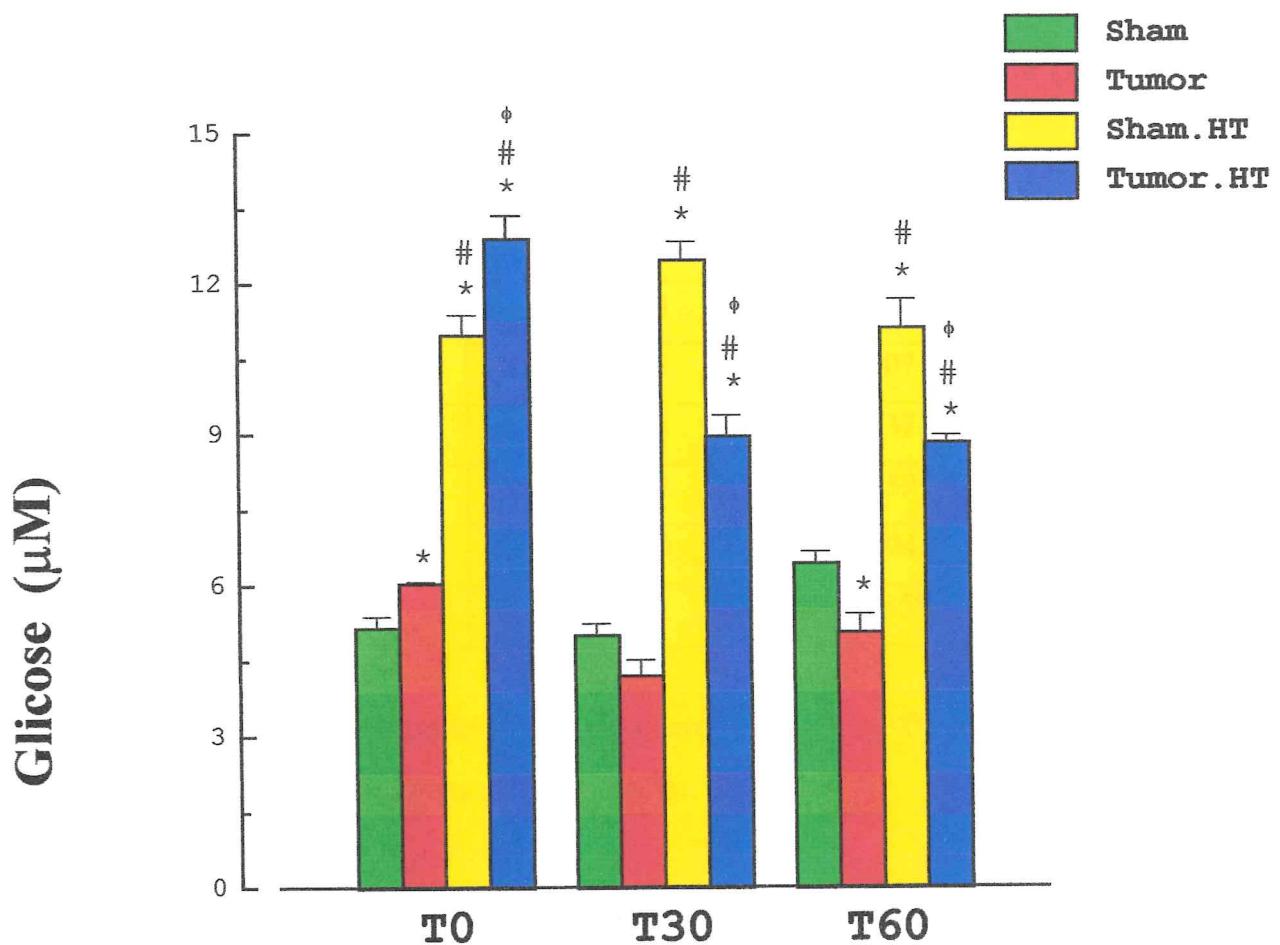


Figura 14: Concentração de glicose no sangue de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis sanguíneos de glicose foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de glicose em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Tabela 1- Alteração nas concentrações (μ M) sanguíneas de lactato, piruvato e glicose em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós normotermia (37° –38° C).

Grupos	μ M	T0	T30	T60
SHAM	Lactato	1,149±0,004	0,884±0,021	1,471±0,043*
	Piruvato	0,131±0,007	0,124±0,007	0,141±0,006
	Glicose	5,152±0,223	4,998±0,237	6,440±0,228*
TUMOR	Lactato	4,162±0,162	3,416±0,159	1,778±0,098*
	Piruvato	0,067±0,004	0,083±0,004	0,142±0,010*
	Glicose	6,039±0,031	4,195±0,315*	5,072±0,353*

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) com o grupo Sham (controle) com o tempo correspondente.

Tabela 2- Alteração nas concentrações (μ M) sanguíneas de lactato, piruvato e glicose em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) pós hipertermia (41° –42° C).

Grupos	μ M	T0	T30	T60
SHAM-HT	Lactato	3,811±0,227	4,138±0,074	1,969±0,043*
	Piruvato	0,199±0,012	0,216±0,007*	0,134±0,004*
	Glicose	10,984±0,387	12,476±0,350*	11,123±0,554
TUMOR-HT	Lactato	3,937±0,248	4,799±0,133#	2,222±0,123*
	Piruvato	0,175±0,005	0,157±0,008*#	0,169±0,005#
	Glicose	12,903±0,468#	8,957±0,410*#	8,839±0,133*#

* ($p<0,05$) comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) em relação ao grupo Sham-HT (controle) com o tempo correspondente.

3) Efeitos da hipertermia sobre a concentração sanguínea (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, e sobre a produção total de corpos cetônicos (KB) em ratos controle e em portadores de W256, avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos após termoterapia.

Com relação às dosagens de corpos cetônicos, os níveis sanguíneos de acetoacetato (**figura 15**) no T0 mantiveram-se aumentados nos animais dos grupos Sham-HT e Tumor-HT. Já aos 30 e 60 minutos, além dos grupos submetidos à hipertermia, também foram observadas concentrações elevadas deste metabólito nos grupos Tumor. Esta elevação apresentou-se de forma mais marcante, aos sessenta minutos pós hipertermia nos ratos do grupo Tumor-HT.

As concentrações de β -hidroxibutirato (**figura 16**) mensuradas imediatamente (T0) e aos sessenta (T60) minutos após normotermia e a hipertermia, apresentaram-se elevadas nos grupos Tumor, Sham-HT e Tumor-HT. O pico de aumento destes níveis foi mais evidente no tempo zero após a termoterapia, declinando posteriormente nos tempos T30 e T60. No entanto as concentrações de β -hidroxibutirato no T30, mostraram-se aumentadas com relação aos seus controles apenas nos animais submetidos ao tratamento hipertérmico. Os valores absolutos dos níveis de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, assim como a concentração total de corpos cetônicos no sangue de ratos *sham* operados (grupo controle) e portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker podem ser visualizados nas **tabelas 3** (normotermia) e **tabela 4** (hipertermia).

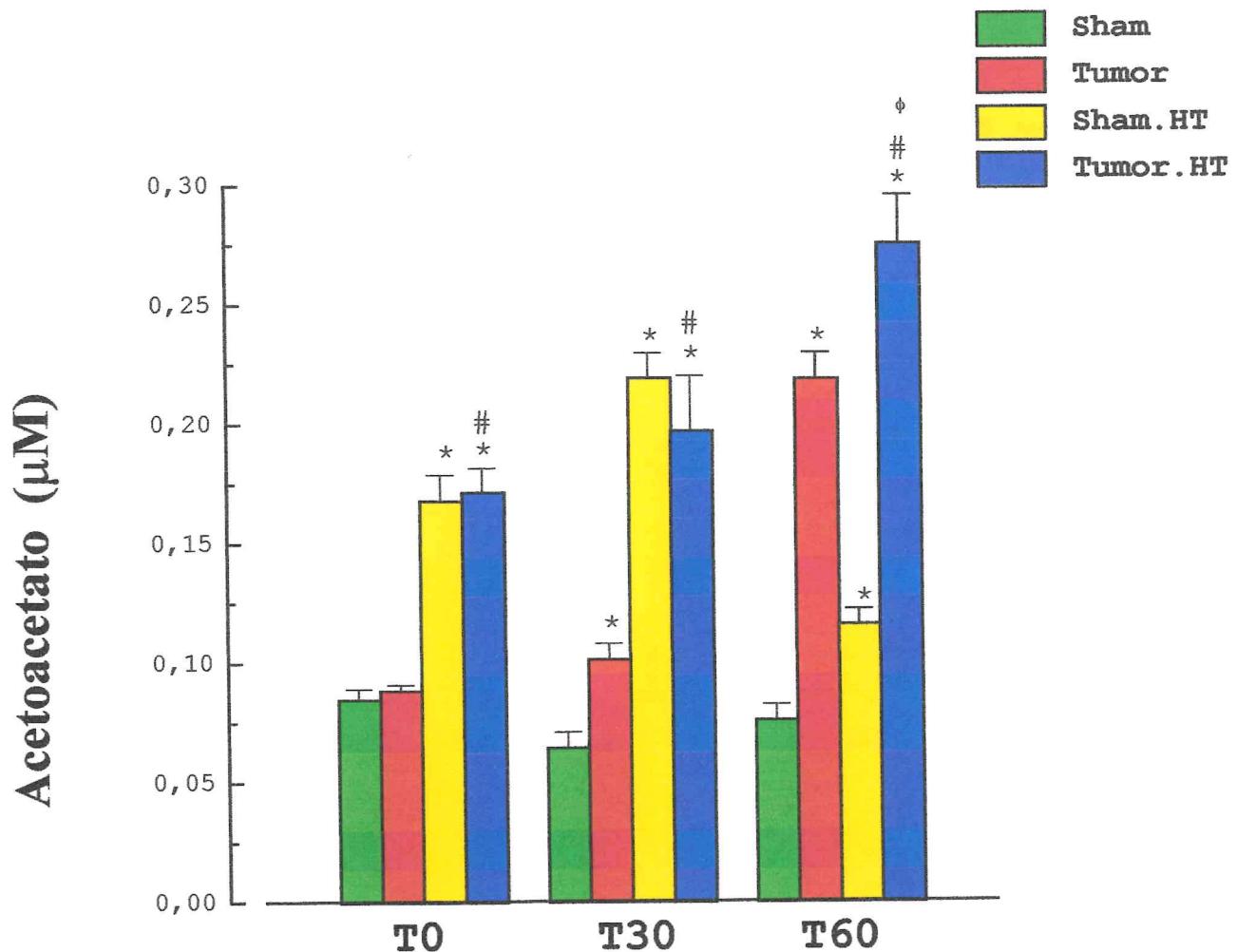


Figura 15: Concentração de acetoacetato no sangue de ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis sanguíneos de acetoacetato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média±EPM das concentrações de acetoacetato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

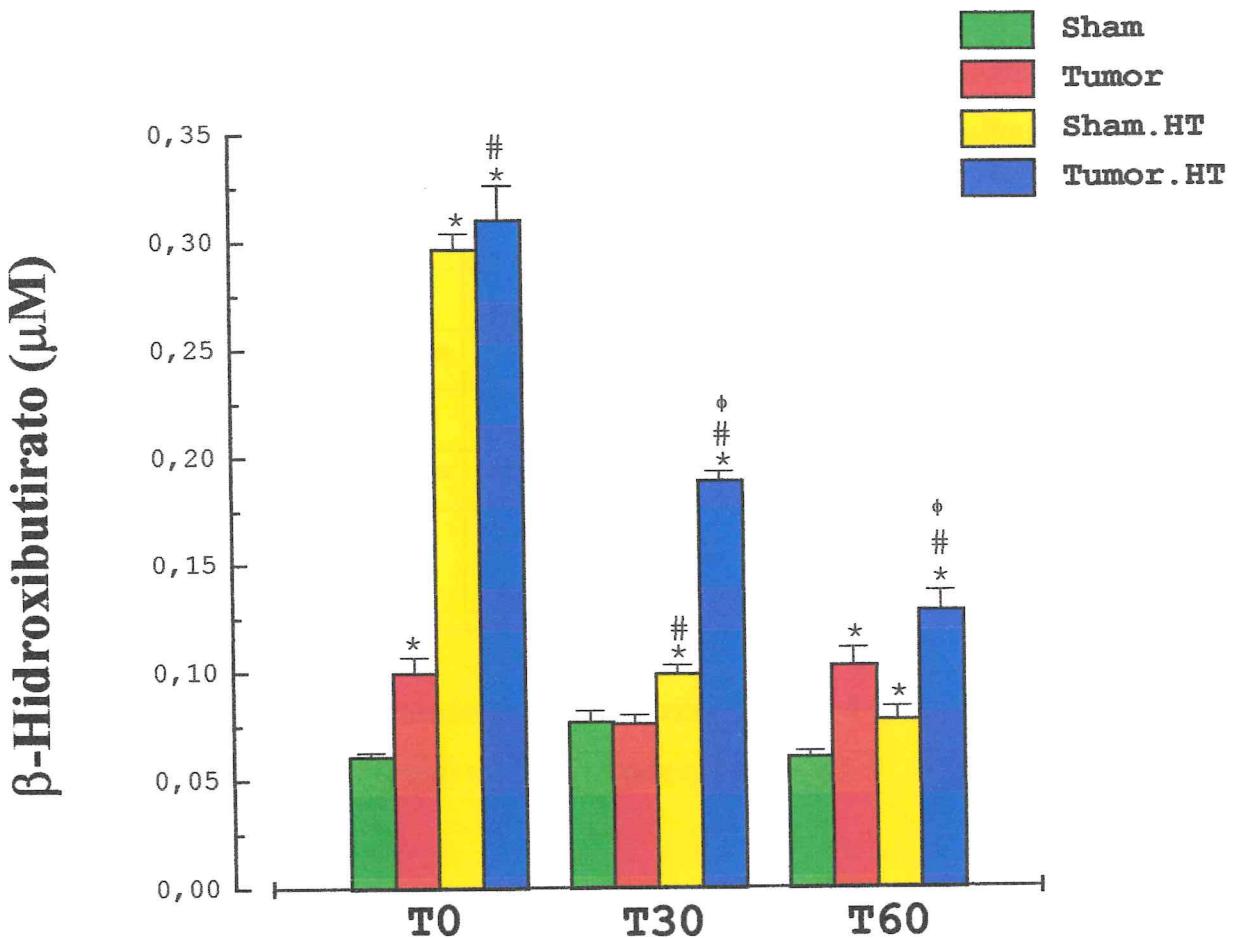


Figura 16: Concentração de β -hidroxibutirato no sangue de ratos ($n=6$) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis sanguíneos de β -hidroxibutirato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de β -hidroxibutirato em μ M. * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Tabela 3- Alterações nas concentrações sanguíneas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos 0, 30 e 60 minutos pós normotermia em ratos controle e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM	Acetoacetato	0,085 \pm 0,004	0,065 \pm 0,007*	0,0760 \pm 0,007
	Hidroxibutirato	0,061 \pm 0,002	0,077 \pm 0,005*	0,061 \pm 0,003
TUMOR	Acetoacetato	0,089 \pm 0,002	0,102 \pm 0,006	0,219 \pm 0,011
	Hidroxibutirato	0,100 \pm 0,007	0,076 \pm 0,004*	0,103 \pm 0,006
Total (KB)	SHAM	0,146 \pm 0,006	0,141 \pm 0,012	0,137 \pm 0,009
	TUMOR	0,188 \pm 0,009	0,177 \pm 0,010#	0,322 \pm 0,017*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) comparado com o grupo Sham (controle) no tempo correspondente.

Tabela 4- Alterações nas concentrações sanguíneas (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e na produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos 0, 30 e 60 minutos pós hipertermia em ratos controle e em portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM-HT	Acetoacetato	0,168 \pm 0,011	0,219 \pm 0,010*	0,116 \pm 0,006*
	Hidroxibutirato	0,297 \pm 0,007	0,099 \pm 0,004*	0,077 \pm 0,006*
TUMOR-HT	Acetoacetato	0,172 \pm 0,010	0,197 \pm 0,023	0,276 \pm 0,021*
	Hidroxibutirato	0,310 \pm 0,016	0,189 \pm 0,004*	0,129 \pm 0,010
Total (KB)	SHAM-HT	0,464 \pm 0,018	0,386 \pm 0,014	0,194 \pm 0,012
	TUMOR-HT	0,482 \pm 0,034	0,178 \pm 0,010*#	0,404 \pm 0,030*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) comparado com o grupo Sham-HT (controle) nos tempos correspondentes.

4) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) de lactato, piruvato e glicose no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256 avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta T60 pós termoterapia.

O aumento na concentração de lactato observada com o tratamento normotérmico comparando-se com os animais do grupos Sham e Tumor não foram alterados no tempo de 30 minutos (figura 17). Uma maior elevação das concentrações de lactato foram observadas imediatamente (T0), após a hipertermia nos grupos Sham-HT e Tumor-HT. A hipertermia induziu aumento dos níveis de lactato no grupo Sham-HT, aos trinta e sessenta minutos pós hipertermia, embora de menor amplitude que no tempo zero. Já com relação aos grupos Tumor e Tumor-HT, observou-se concentrações menores do metabólito nos tempos T30 e T60.

Os níveis de piruvato no tecido gástrico (figura 18) dos grupos Sham e Tumor, praticamente não foram alterados com a normotermia nos diferentes tempos avaliados (T0, T30 e T60), no entanto foram constatadas concentrações 2 vezes maiores para os animais portadores de W256. A hipertermia afetou os animais do grupo Tumor-HT nos três tempos; por outro lado elevou de maneira significante os níveis de lactato principalmente no tempo de trinta minutos.

Não foram observadas alterações nas concentrações de glicose no tecido gástrico (figura 19) imediatamente após a hipertermia, exceto no grupo Tumor-HT, no qual foi observado um aumento, no tempo T0, com posterior declínio após 30 e 60 minutos. As concentrações de glicose nos três tempos foi similar, com uma ligeira porém significativa alteração aos sessenta minutos nos ratos portadores de W256 (Tumor) submetidos ao tratamento normotérmico. As concentrações de glicose no animais dos grupos Sham-HT e Tumor-HT, por outro lado, mostraram-se significativamente elevadas nos tempos T30 e T60 após hipertermia.

Os valores absolutos das concentrações de lactato, piruvato e de glicose no tecido gástrico de ratos sham operados e naqueles portadores de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normoterapia (Sham e Tumor) e hipertermia (Sham-HT e Tumor-HT) podem ser visualizados, respectivamente na **tabela 5** e na **tabela 6**.

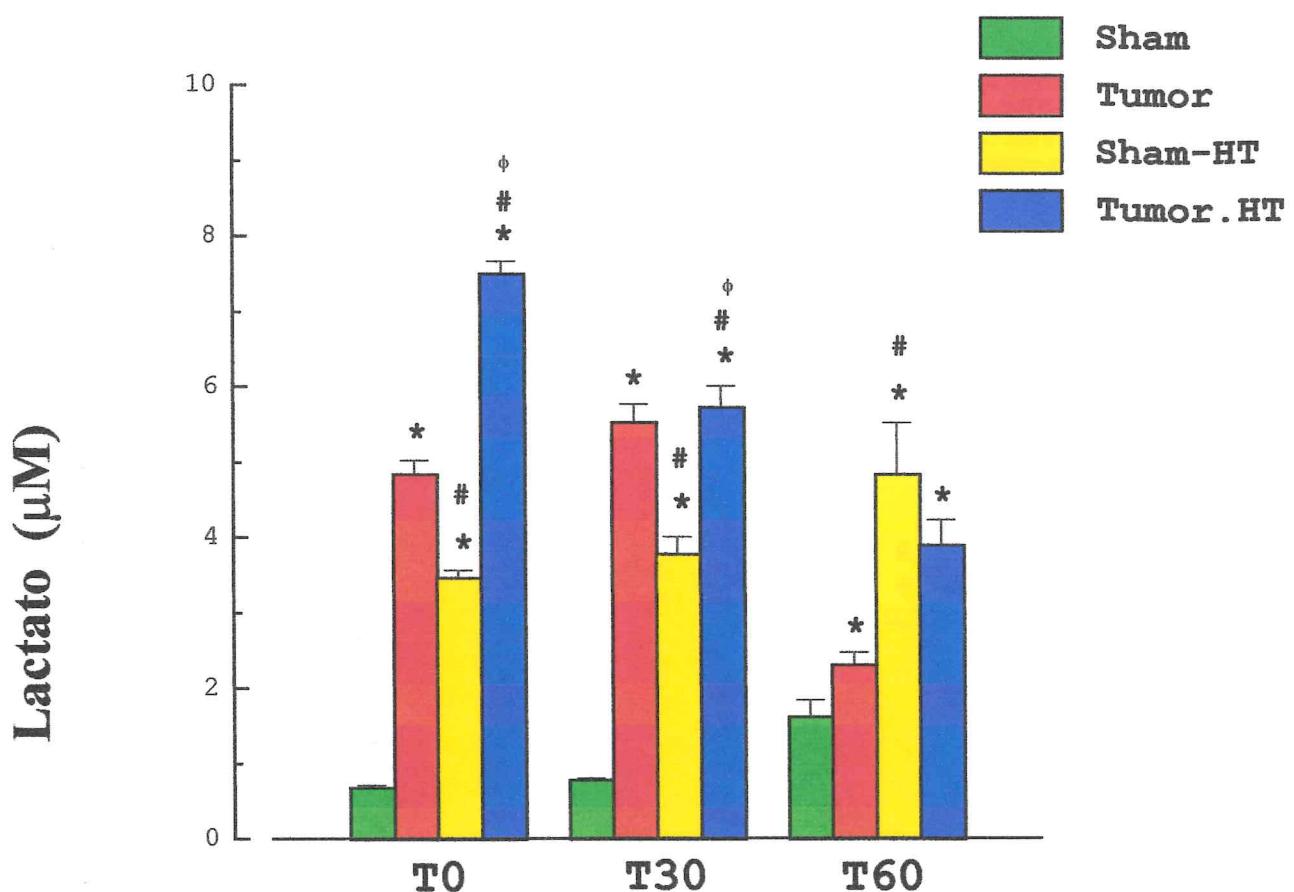


Figura 17: Concentração de lactato no tecido gástrico de ratos ($n=6$) controle e de ratos portadores de implante em estômago de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis de lactato no tecido gástrico foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de lactato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

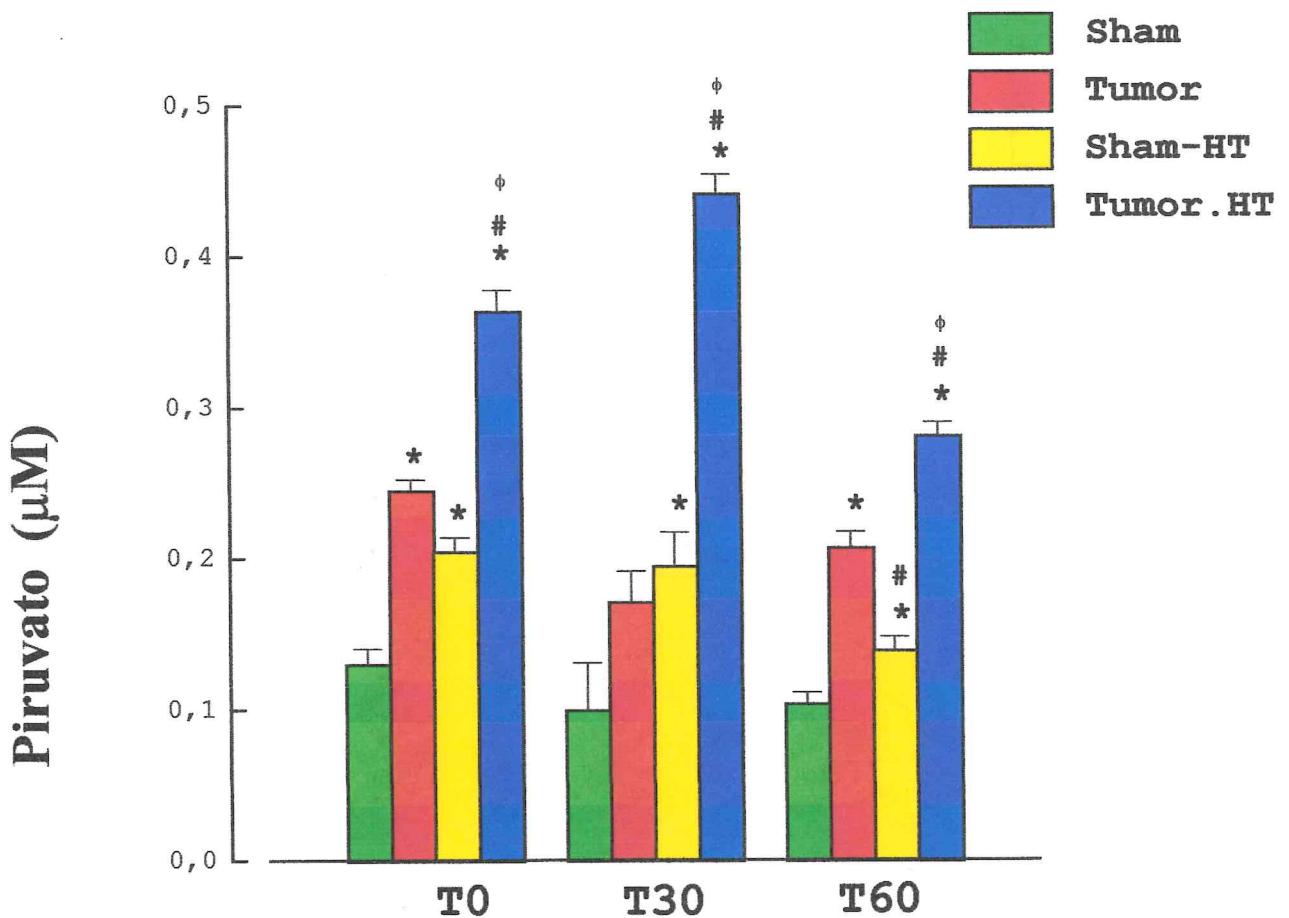


Figura 18: Concentração de piruvato no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante em estômago de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis de piruvato no tecido gástrico foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de piruvato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

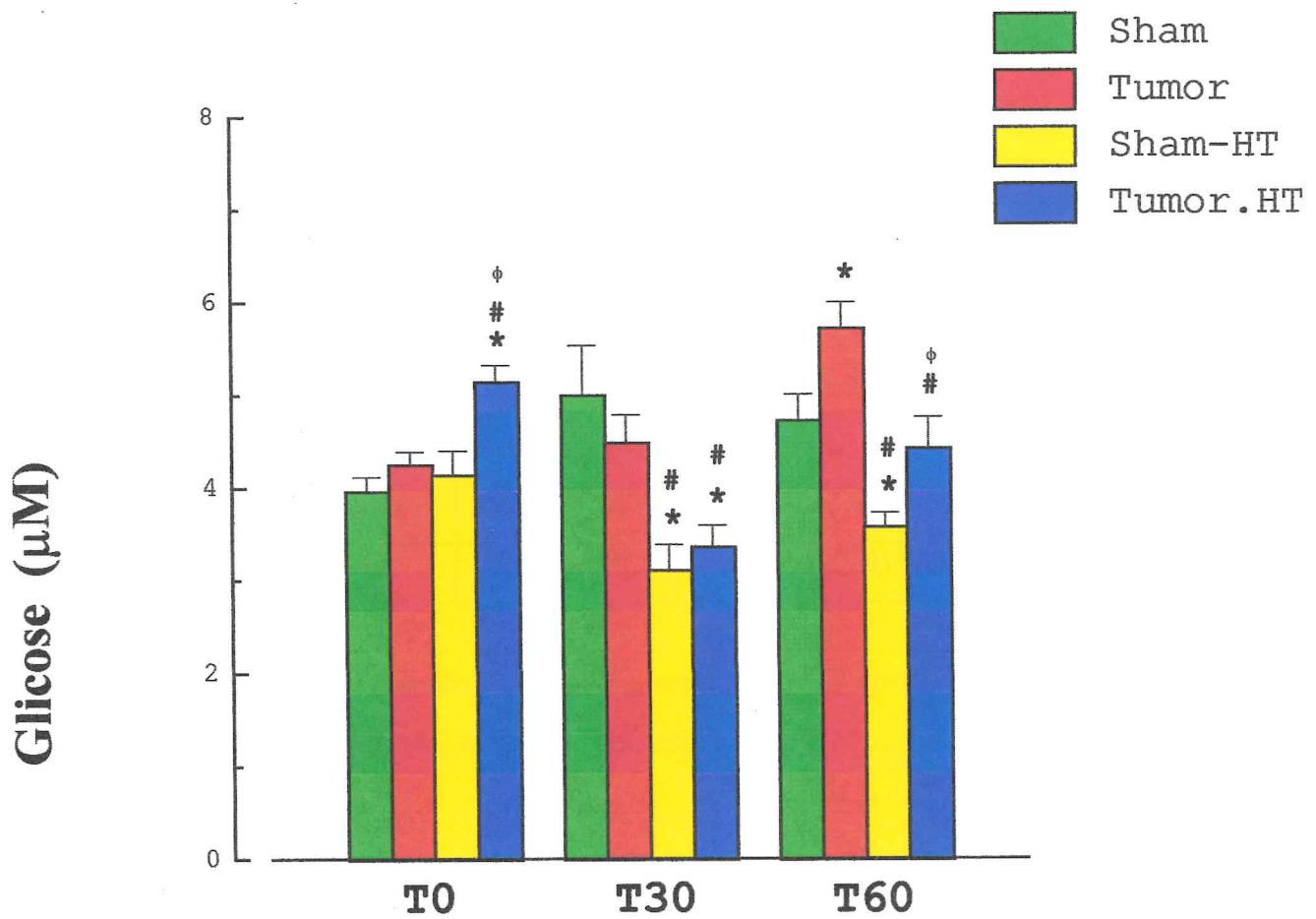


Figura 19: Concentração de glicose no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante em estômago de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis de glicose no tecido gástrico foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de glicose em μ M. * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Tabela 5-- Alteração nas concentrações de lactato, piruvato e glicose (μ M) no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e de ratos com implante de W256 em estômago, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós normotermia (37° – 38° C).

Grupos	μ M	T0	T30	T60
SHAM	Lactato	0,683±0,027	0,784±0,015	1,615±0,027*
	Piruvato	0,130±0,010	0,099±0,031	0,104±0,007
	Glicose	3,965±0,151	5,0042±0,5278	4,735±0,275*
TUMOR	Lactato	4,840±0,183#	5,533±0,235#	2,309±0,157*#
	Piruvato	0,245±0,007	0,171±0,020	0,104±0,010*
	Glicose	4,247±0,137	4,488±0,301*	5,726±0,278*

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) comparado com o grupo Sham (controle) no tempo correspondente.

Tabela 6- Alteração no tecido gástrico das concentrações (μ M de lactato, piruvato e glicose em ratos (n=6) controle e com implante de W256 em estômago, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 pós hipertermia (41° – 42° C).

Grupos	μ M	T0	T30	T60
SHAM-HT	Lactato	3,464±0,098	3,777±0,222	4,844±0,680*
	Piruvato	0,205±0,009	0,195±0,022	0,139±0,009*
	Glicose	4,143±0,254	3,113±0,274*	3,580±0,150*
TUMOR-HT	Lactato	7,505±0,162	5,736±0,268#	3,900±0,326*
	Piruvato	0,364±0,014	0,442±0,013*#	0,282±0,009*#
	Glicose	5,149±0,176#	3,366±0,226*	4,435±0,332*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) comparado com o grupo Sham-HT (controle) no tempo correspondente.

5) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, e sobre a produção total de corpos cetônicos (KB) no tecido gástrico de ratos controle e de ratos com W256 implantado em estômago avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após termoterapia.

Ao analisar os níveis de acetoacetato (**figura 20**) nas amostras de tecido gástrico, observou-se que a normoterapia, no T0 não induziu modificações nos grupos Sham e Tumor. Entretanto, no mesmo tempo (T0) foi detectado uma significativa elevação das concentrações deste corpo cetônico nos grupos Sham-HT e Tumor-HT ocasionada pela hipertermia. O pico do aumento dos níveis de acetoacetato em todos os grupos experimentais ocorreu aos trinta minutos pós tratamentos normotérmico e hipertérmico, sendo mais evidente no grupo Sham-HT. Foi observado, aos 60 minutos, uma tendência ao retorno dos níveis de acetoacetato aos valores obtidos no tempo zero após a termoterapia (NT ou HT); não sendo evidenciadas diferenças estatísticas entre as concentrações deste metabólito nos quatro grupos de estudo.

Com relação às alterações dos níveis de β -hidroxibutirato (**figura 21**), foi constatado no tempo zero um aumento significativo no grupo Tumor e em ratos *sham* operados (Sham-HT) e portadores de implante gástrico de W256 (Tumor-HT) submetidos à hipertermia. Uma maior produção de corpos cetônicos nestes animais foi observada imediatamente após ao tratamento hipertérmico, em comparação com os outros tempos avaliados. A normotermia e hipertermia, após trinta minutos, não induziu alterações nas concentrações de β -hidroxibutirato nos quatro grupos experimentais e, curiosamente os menores valores deste metabólito após tratamento térmico foram encontrados neste período. Entretanto, a análise das amostras de tecido gástrico, aos sessenta minutos pós termoterapia, demonstrou que elevação nas concentrações de β -

hidroxibutirato voltaram em todos os grupos com relação ao tempo T30. Ainda com relação aos trinta minutos após tratamento térmico, apenas o grupo Tumor-HT apresentou aumento nos níveis de β -hidroxibutirato. Aos sessenta minutos de termoterapia, todos os grupos mantiveram elevadas suas concentrações de β -hidroxibutirato com relação ao grupo Sham, embora com valores semelhantes entre si.

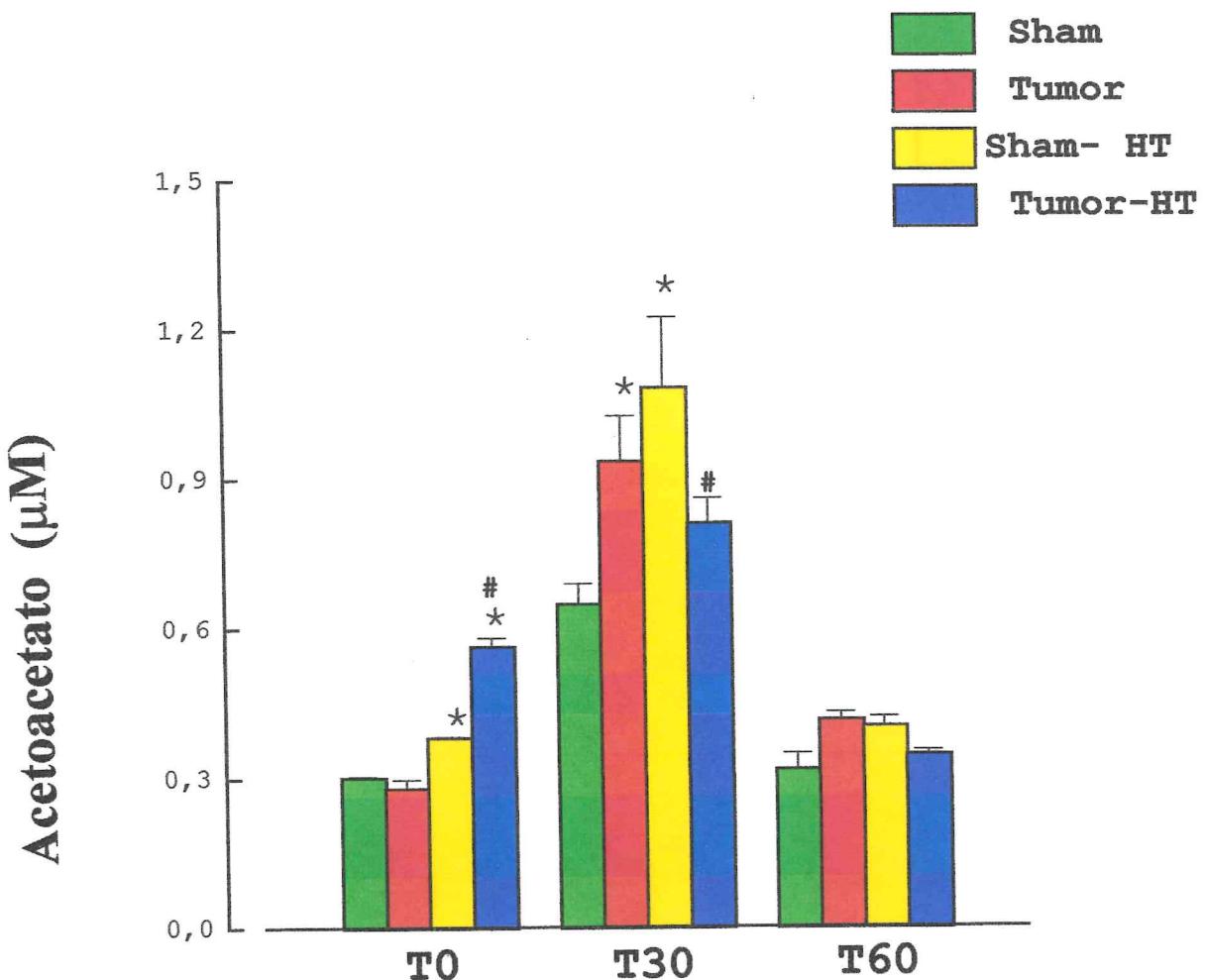


Figura 20: Concentração de acetoacetato no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante em estômago de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis de acetoacetato no tecido gástrico foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média±EPM das concentrações de acetoacetato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

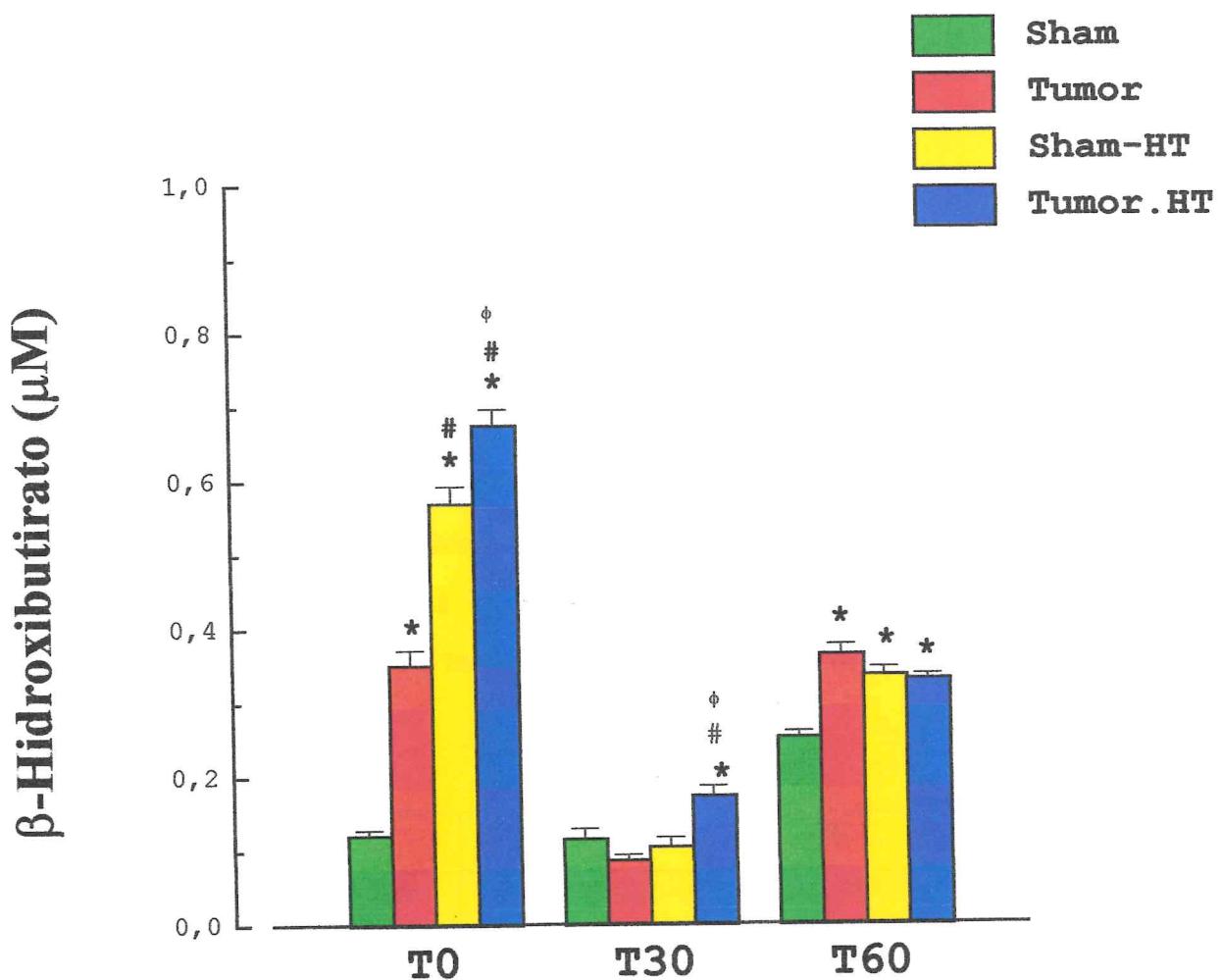


Figura 21: Concentração de β -hidroxibutirato no tecido gástrico de ratos (n=6) controle e de ratos portadores de implante, em estômago, de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis de β -hidroxibutirato no tecido gástrico foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média±EPM das concentrações de β -hidroxibutirato em μ M. * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Os valores absolutos das concentrações de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, bem como sua produção total após termoterapia podem ser visualizadas na **tabela 7** e na **tabela 8**.

Tabela 7- Alterações no tecido gástrico das concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e da produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos T0, T30 e T60 minutos pós normotermia em ratos controle e em portadores de carcinossarcoma 256 de Walker implantado em estômago.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM	Acetoacetato	0,302 \pm 0,002	0,650 \pm 0,039*	0,318 \pm 0,030
	Hidroxibutirato	0,121 \pm 0,006	0,116 \pm 0,014	0,253 \pm 0,008*
TUMOR	Acetoacetato	0,281 \pm 0,016	0,936 \pm 0,039*	0,417 \pm 0,014*
	Hidroxibutirato	0,351 \pm 0,020	0,087 \pm 0,007*	0,365 \pm 0,013
Total (KB)	SHAM	0,423 \pm 0,008	0,766 \pm 0,053*	0,571 \pm 0,039*
	TUMOR	0,633 \pm 0,035	1,023 \pm 0,060*#	0,782 \pm 0,027*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) quando comparado com o grupo Sham (controle) no tempo correspondente.

Tabela 8- Alterações no tecido gástrico das concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e da produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos 0, 30 e 60 minutos pós hipertermia em ratos controle e em portadores de carcinossarcoma 256 de Walker implantado em estômago.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM-HT	Acetoacetato	0,382 \pm 0,002	1,084 \pm 0,140*	0,405 \pm 0,017
	Hidroxibutirato	0,570 \pm 0,023	0,105 \pm 0,012*	0,337 \pm 0,011*
TUMOR-HT	Acetoacetato	0,564 \pm 0,017#	0,812 \pm 0,049*#	0,347 \pm 0,008*
	Hidroxibutirato	0,332 \pm 0,020#	0,087 \pm 0,007*#	0,128 \pm 0,010*#
Total (KB)	SHAM-HT	0,952 \pm 0,024	1,189 \pm 0,152*	0,742 \pm 0,027*
	TUMOR-HT	0,896 \pm 0,023	0,899 \pm 0,158#	0,476 \pm 0,018*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) quando comparado com o grupo Sham-HT (controle) no tempo correspondente.

6) Efeitos da hipertermia sobre a concentração (μM) de lactato, piruvato e glicose no fígado de ratos ($n=6$) controle e em ratos portadores de implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) após termoterapia.

O tratamento normotérmico, nos três tempos avaliados não alterou as concentrações de lactato (**figura 22**) nos animais *sham* operados (grupo Sham), observando-se, no entanto, elevação dos níveis deste metabólito no grupo Tumor. A hipertermia induziu aumento significativo das concentrações de lactato em cerca de 4 vezes nos grupos Sham-HT e Tumor-HT, com relação aos seus controles (Sham e Tumor), nos tempos T0 e T30, apresentando aos sessenta minutos pós termoterapia um declínio das concentrações deste metabólito no grupo Sham-HT e manutenção da elevação no grupo Tumor-HT, respectivamente. Em todos os tempos avaliados, o grupo Tumor-HT apresentou níveis de lactato hepático maiores que os outros grupos, sendo que o pico deste aumento constatado aos trinta minutos após hipertermia.

As concentrações hepáticas de piruvato (**figura 23**) não se apresentaram alteradas no grupo Sham, quando avaliado nos três tempos. A mesma observação pode ser feita para o grupo Sham-HT, nos tempos T30 e T60. Os níveis mais altos de piruvato foram constatadas imediatamente (T0) após tratamento térmico no grupo Tumor-HT e nos animais sham operados (Sham-HT),, sendo maiores neste último nos tempos avaliados.

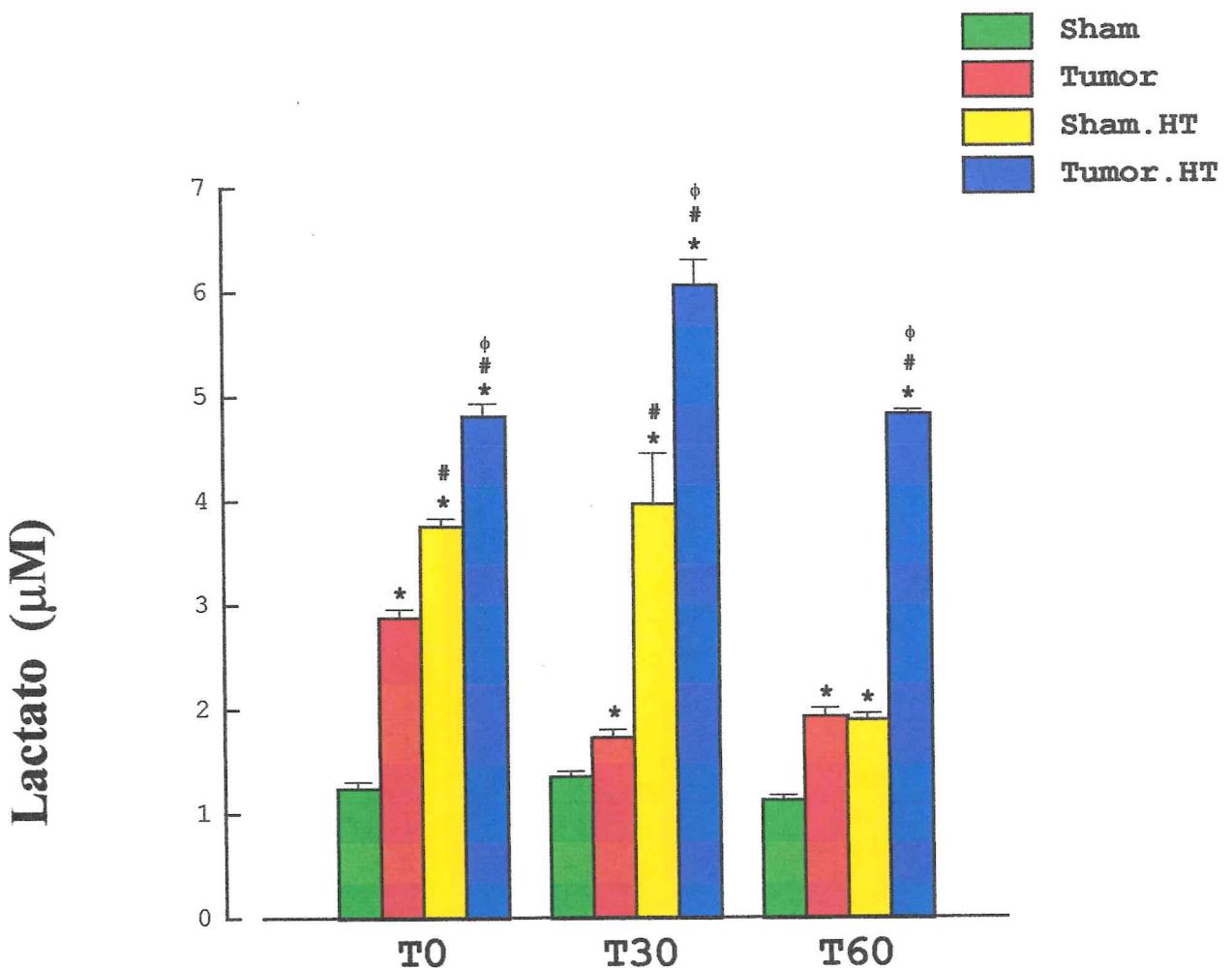


Figura 22: Concentrações hepáticas de lactato em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis hepáticos de lactato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de lactato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

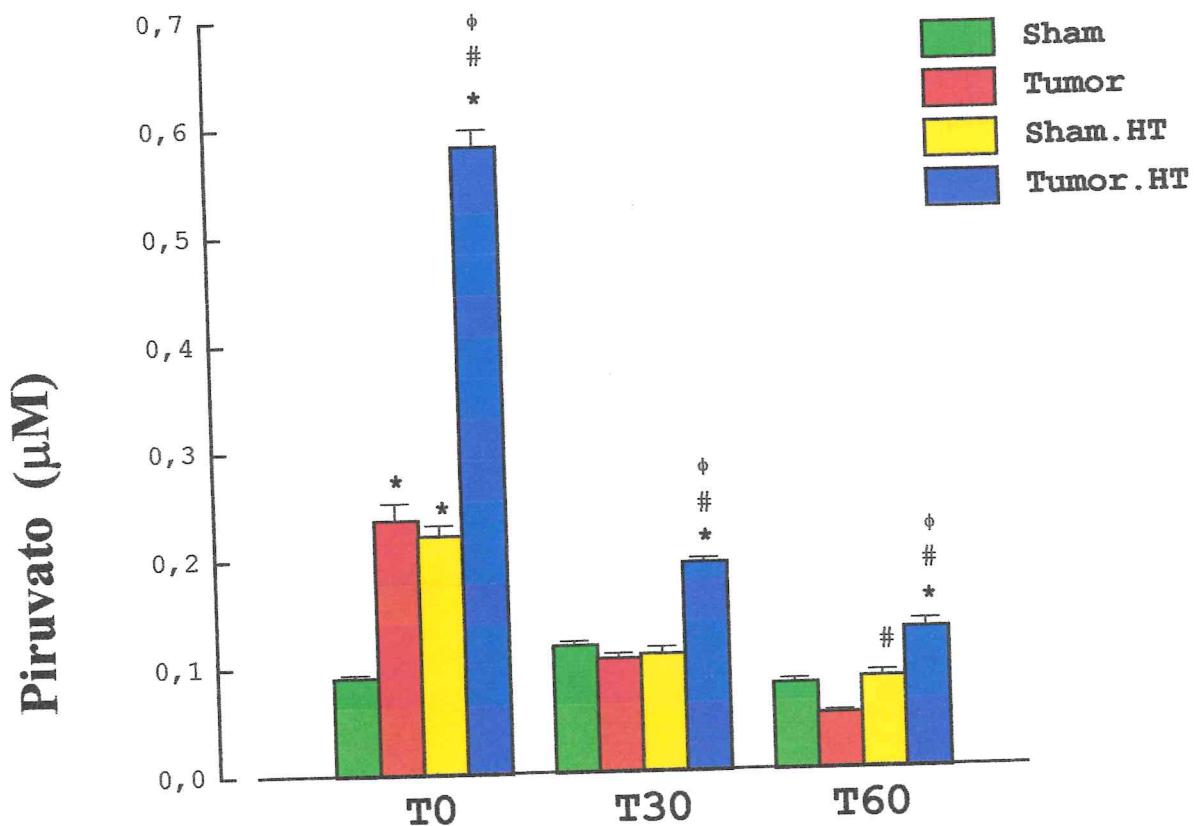


Figura 23: Concentrações hepáticas de piruvato em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis hepáticos de piruvato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de piruvato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

No tocante às concentrações hepáticas de glicose hepática (**figura 24**) não foram observadas alterações das mesmas no grupo Sham em nenhum dos tempos analisados. Níveis maiores de glicose foram detectadas aos trinta minutos pós hipertermia nos animais dos grupos Sham-HT e Tumor-HT. A hipertermia *per si* (Sham-HT) induziu elevação das concentrações de glicose hepática nos animais *sham* operados nos três tempos avaliados sendo, coincidentemente mais evidente aos trinta minutos após tratamento térmico. Não foram observadas variações nas concentrações deste metabólito em função da normotermia (animais *sham* operados) nos três tempos de avaliação.

Os valores absolutos das concentrações de lactato, piruvato e D-glicose em ratos submetidos à normotermia e à hipertermia podem ser visualizadas, respectivamente, na **tabelas 9 e na tabela 10**.

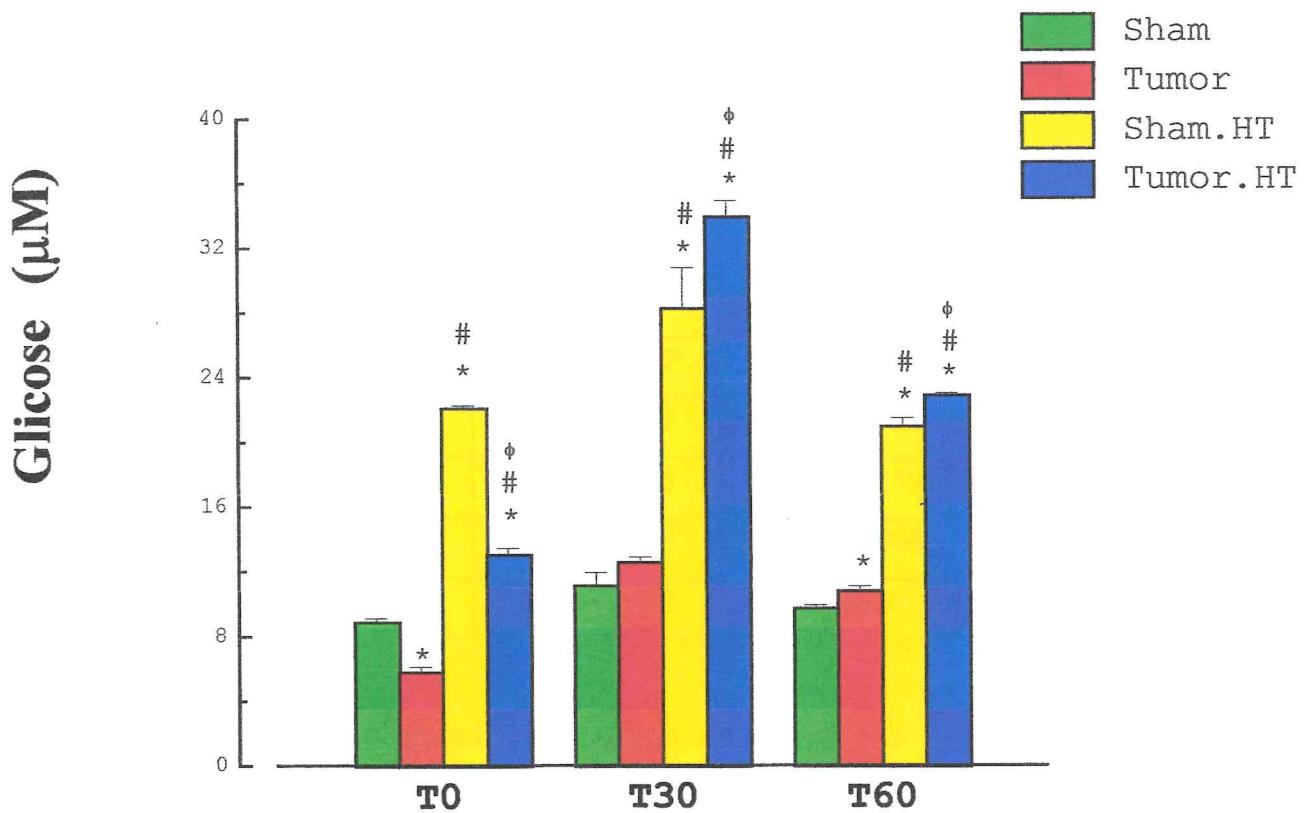


Figura 24: Concentrações hepáticas de D-glicose em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis hepáticos de D-glicose foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de D-glicose em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Tabela 9-- Alteração nas concentrações hepáticas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos (n=6) controle e em ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós normotermia (37°–38° C).

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM	Lactato	0,784±0,015	1,615±0,227	0,683±0,027*
	Piruvato	0,104±0,007	0,199±0,013	0,130±0,010
	Glicose	5,199±0,275	5,004±0,528	3,965±0,151*
TUMOR	Lactato	5,533±0,235	3,416±0,159	1,777±0,098*
	Piruvato	0,207±0,010	0,171±0,004	0,244±0,007*
	Glicose	5,726±0,277	4,488±0,301*	4,246±0,137*

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) quando comparado com o grupo Sham (controle) no tempo correspondente.

Tabela 10- Alteração nas concentrações hepáticas (μM) de lactato, piruvato e glicose em ratos (n=6) sham operados e com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos T0, T30 e T60 pós hipertermia (41°–42° C).

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM-HT	Lactato	3,811±0,227	4,138±0,074	1,969±0,043*
	Piruvato	0,199±0,012	0,216±0,007*	0,134±0,004*
	Glicose	10,984±0,386	12,476±0,350*	11,123±0,554
TUMOR-HT	Lactato	3,937±0,247	4,799±0,133#	2,222±0,122*
	Piruvato	0,175±0,005	0,157±0,008*#	0,169±0,005#
	Glicose	12,903±0,468#	8,96±0,410*#	8,839±0,133*#

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) quando comparado com o grupo Sham-HT (controle) no tempo correspondente.

7) Efeitos da hipertermia sobre a concentração hepática (μM) de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, e sobre a produção total de corpos cetônicos (KB) em ratos controle e em ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após termoterapia.

A hipertermia induziu redução significativa das concentrações hepáticas de acetoacetato (figura 25) nos tempos T30 e T60. Os animais controle (Sham) e portadores de tumor (Tumor) apresentaram elevação gradual dos níveis de acetoacetato ao longo dos tempos avaliados, como esperado em situações de jejum. Este aumento foi mais evidente no grupo Tumor aos sessenta minutos após normotermia.

Os níveis de β -hidroxibutirato nos grupos Sham-HT e Tumor-HT mantiveram-se elevados em comparação com seus respectivos controles (Sham e Tumor) imediatamente após hipertermia (T0). O maior pico das concentrações deste corpo cetônico foi detectado nos animais *sham* operados (Sham-HT) e portadores de implante gástrico de W256 (Tumor-HT) submetidos à hipertermia.

Os valores absolutos das concentrações hepáticas de acetoacetato e de β -hidroxibutirato, bem como a produção total de corpos cetônicos no fígado de ratos *sham* operados e naqueles portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, submetidos à termoterapia podem ser visualizados na tabela 11 (normotermia) e na tabela 12 (hipertermia).

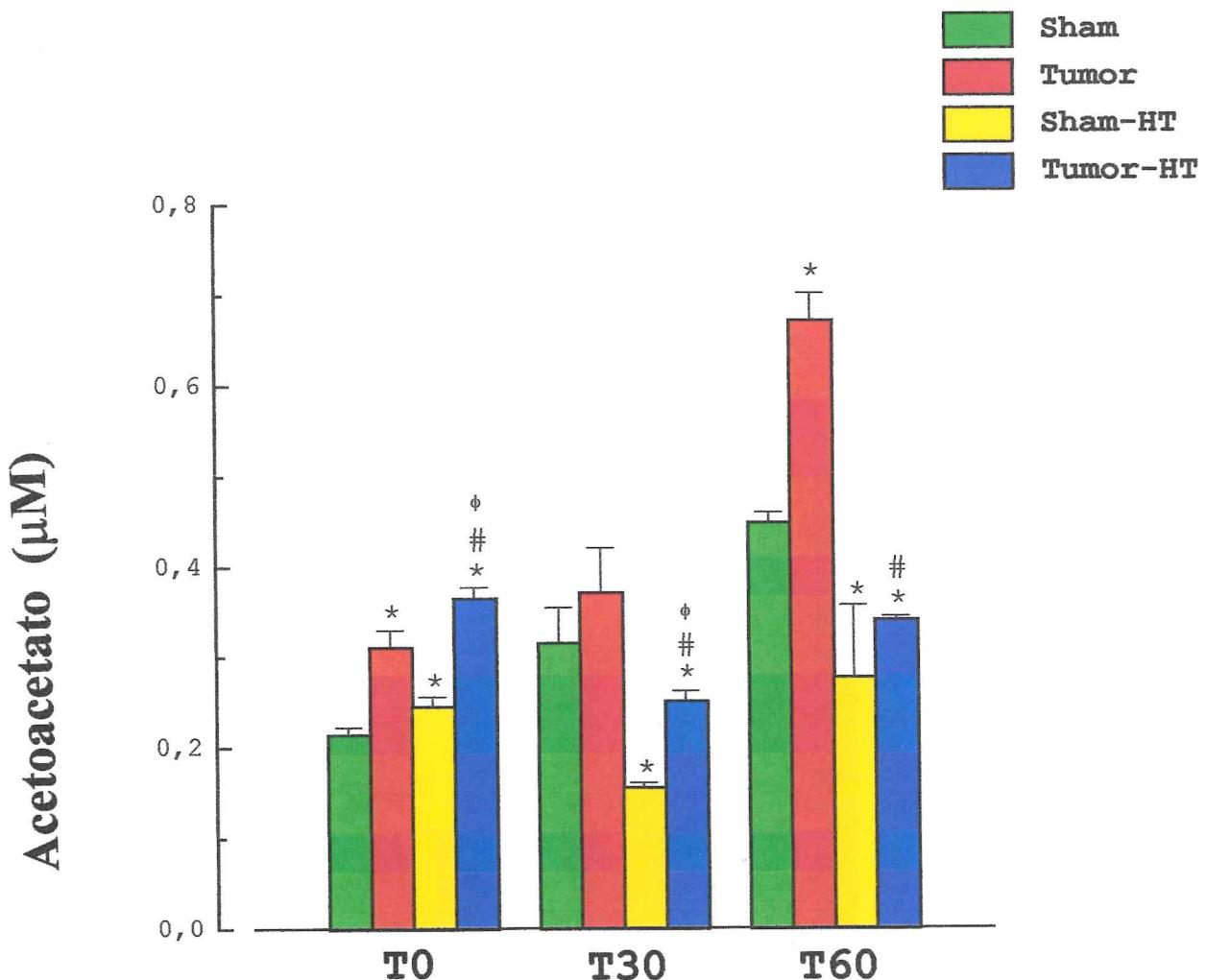


Figura 25: Concentrações hepáticas de acetoacetato em ratos ($n=6$) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis hepáticos de acetoacetato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37°C) e HT (42°C). Os valores foram expressos como média±EPM das concentrações de acetoacetato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e φ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

β -Hidroxibutirato (μM)

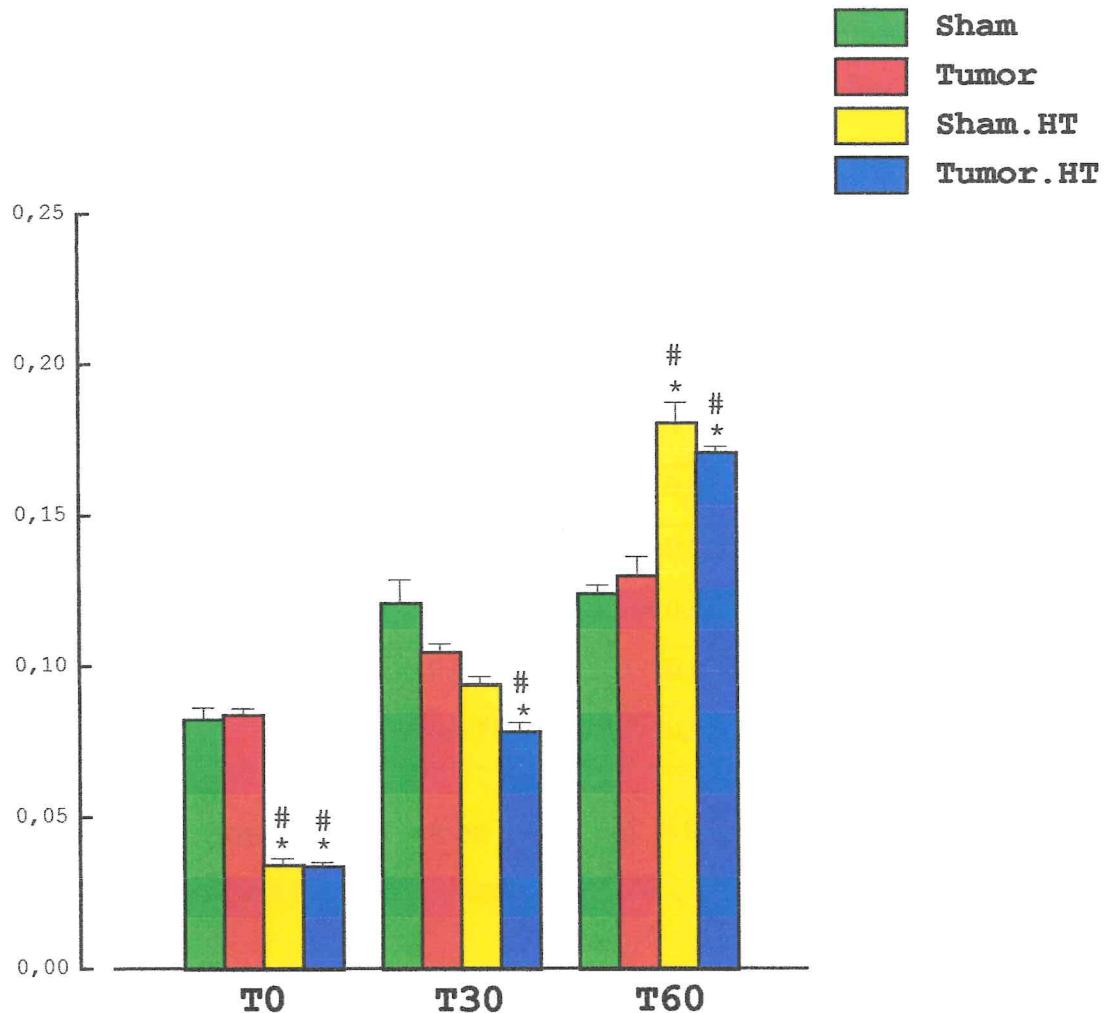


Figura 26: Concentrações hepáticas de β -hidroxibutirato em ratos (n=6) controle e em ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia (NT) ou à hipertermia (HT). Os níveis hepáticos de β -hidroxibutirato foram avaliados aos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após NT (37° C) e HT (42° C). Os valores foram expressos como média \pm EPM das concentrações de β -hidroxibutirato em μM . * ($p<0,05$) representa significância estatística com relação ao grupo Sham; # ($p<0,05$) com relação ao grupo Tumor e ϕ ($p<0,05$) em comparação com o grupo Sham-HT (ANOVA, Teste de Fisher).

Tabela 11- Alterações hepáticas das concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e da produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos T0, T30 e T60 minutos pós normotermia ($37^{\circ}\text{-}38^{\circ}\text{ C}$) em ratos controle e em ratos com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM	Acetoacetato	$0,085 \pm 0,004$	$0,065 \pm 0,006^*$	$0,076 \pm 0,006$
	Hidroxibutirato	$0,061 \pm 0,002$	$0,077 \pm 0,052^*$	$0,061 \pm 0,003$
TUMOR	Acetoacetato	$0,088 \pm 0,002$	$0,102 \pm 0,006$	$0,219 \pm 0,011$
	Hidroxibutirato	$0,010 \pm 0,007$	$0,076 \pm 0,004^*$	$0,103 \pm 0,006$
Total (KB)	SHAM	$0,146 \pm 0,006$	$0,141 \pm 0,012$	$0,136 \pm 0,009$
	TUMOR	$0,188 \pm 0,009$	$0,177 \pm 0,010$	$0,322 \pm 0,017^* \#$

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) comparado com o grupo Sham (controle) no tempo correspondente.

Tabela 12- Alterações hepáticas das concentrações (μM) de acetoacetato e hidroxibutirato e da produção total de corpos cetônicos (KB) avaliadas nos tempos T0, T30 e T60 minutos pós hipertermia em ratos controle e em ratos com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker.

Grupos	μM	T0	T30	T60
SHAM-HT	Acetoacetato	$0,246 \pm 0,001$	$0,156 \pm 0,005^*$	$0,278 \pm 0,080^*$
	Hidroxibutirato	$0,171 \pm 0,020$	$0,092 \pm 0,001^*$	$0,181 \pm 0,001^*$
TUMOR-HT	Acetoacetato	$0,365 \pm 0,012$	$0,251 \pm 0,011$	$0,342 \pm 0,004^*$
	Hidroxibutirato	$0,170 \pm 0,002$	$0,079 \pm 0,003^*$	$0,171 \pm 0,001$
Total (KB)	SHAM-HT	$0,417 \pm 0,021$	$0,248 \pm 0,005$	$0,459 \pm 0,080$
	TUMOR-HT	$0,535 \pm 0,014$	$0,329 \pm 0,014^*$	$0,513 \pm 0,004^* \#$

* ($p<0,05$) quando comparado com tempo zero (T0); e # ($p<0,05$) quando comparado com o grupo Sham-HT (controle) no tempo correspondente.

8) Efeitos da hipertermia sobre os estados redox citoplasmático e mitocondrial em ratos controle e em ratos com implante gástrico de W256, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia e hipertermia.

Ao avaliar o estado redox citoplasmático ($[\text{piruvato}]/[\text{lactato}]$), não foram observadas alterações na relação $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ no grupo Sham nos tempos zero e sessenta minutos pós normotermia. A hipertermia *per si* diminuiu a taxa de reações de oxiduredução no grupo Sham-HT. O mesmo fenômeno foi observado nos animais portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à normotermia e à hipertermia. Curiosamente, os menores valores foram observados no tempo T30 pós tratamento hipertérmico, nos grupos Sham-HT e Tumor-HT, e aos sessenta minutos pós hipertermia no grupo Tumor.

No tocante à avaliação do estado redox mitocondrial, ($[\text{acetoacetato}]/[\text{hidroxibutirato}]$) observou-se um aumento significativo na razão $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ nos grupos Sham-HT e Tumor-HT, comparados aos seus controles (Sham e Tumor), em todos os tempos avaliados. Entretanto, foi constatado, aos trinta minutos pós tratamento térmico (NT e HT), um declínio mais acentuado nos valores desta razão em todos os grupos experimentais, exceto nos animais do grupo Sham.

Os valores absolutos das razões $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ do estado redox dos grupos estudados podem ser visualizados na **tabela 13** e na **tabela 14**.

Tabela 13- Alterações no estado redox citoplasmático [NAD⁺]/[NADH] de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos após normotermia → NT (37°– 38° C) e hipertermia→ HT (41°–42°C).

Grupo / tempo	SHAM	TUMOR	SHAM-HT	TUMOR-HT
T0	652,25±44,25	739,08±0,30,34*	531,10±20,09*#	729,08±30,34#
T30	777,08±38,70	554,43±19,84*	245,43±11,16*#	191,92±27,22*#
T60	633,94±13,39	239,64±27,80*	399,70±13,63*#	359,00±14,26*#

Os resultados foram expressos com média±EPM, com um número de 6 experimentos. * $p<0,05$ comparado com o grupo Sham, e # $p<0,05$ em relação ao grupo tumor.

Tabela 14- Alterações no estado redox mitocondrial [NAD⁺]/[NADH] de ratos controle e de ratos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, avaliados nos tempos zero (T0), trinta (T30) e sessenta (T60) minutos pós normotermia → NT (37°– 38° C) e hipertermia→ HT (41°– 42° C).

Grupo / tempo	SHAM	TUMOR	SHAM-HT	TUMOR-HT
T0	3,823±0,496	6,697±0,282*	69,034±1,007*#	30,740±2,277*#
T30	9,496±0,986	6,980±0,293*	14,996±1,339*#	7,764±0,188*#
T60	6,861±0,270	4,794±0,435*	16,856±2,057*#	12,414±2,068*#

Os resultados foram expressos com média±EPM, com um número de 6 experimentos. * $p<0,05$ comparado com o grupo Sham, e # $p<0,05$ em relação ao grupo tumor.

V- DISCUSSÃO

O papel bioquímico do fluxo sanguíneo no tratamento hipertérmico de tumores consiste na sua influência sobre o pH, a pressão tecidual de O₂ e sobre a condição nutricional do portador de tumor. Estes fatores alteram a termosensibilidade dos tecidos, de forma que em presença de um meio orgânico ácido, a citotoxicidade induzida pela hipertermia é potenciada (LILLY et al., 1984; WIKE-HOOLE et al., 1984; RHEE et al., 1985 e VAUPEL et al., 1988).

A sensibilidade térmica relativa às células endoteliais é pouco conhecida. Sabe-se, no entanto, que a termoterapia ocasiona danos também às células tumorais ao longo da parede capilar. A lise das células endoteliais e tumorais lesadas conduz, inevitavelmente, à estase e oclusão vascular. A redução ou cessação de fluxo sanguíneo durante a hipertermia pode contribuir para o aumento da temperatura e para o declínio do pH celular, mais marcadamente no tecido tumoral que no normal. Pode-se, então esperar um efeito citotóxico muito maior no tumor que na celular normal (KANG et al., 1980).

A morte celular (apoptose) induzida pela hipertermia correlaciona-se positivamente com a resposta antitumoral (TOYOTA, N. et al., 1997). Investigando mecanismos pelos quais o calor afeta as células tumorais, KIM e colaboradores (1978) propuseram que em condições de hipoxia, a via glicolítica (principalmente a anaeróbica) é o sítio primário do dano hipertérmico que conduz à apoptose. A hipertermia em nosso trabalho induziu aumento na concentração de glicose no fígado e no sangue dos ratos *sham* operados e nos portadores de implante gástrico de W256. DI-PIPETTE e colaboradores (1986) postularam que a redução do fluxo sanguíneo devido à hiperglicemia no carcinossarcoma 256 de Walker é primariamente devido a

uma redução no débito cardíaco. Em 1986, SAUER e colaboradores, sugeriram que a inibição seletiva tumoral da glicólise e um efeito tumoricida podem ser induzido com o uso de análogos apropriados de glicose. SHAH e colaboradores (1982) propuseram que a hiperglicemias aliada a um imunoestimulante não específico potenciariam a apoptose tumoral, induzida pela hipertermia.

O tratamento hipertérmico em humanos modula as subpopulações de células mononucleares sanguíneas e as natural killer, bem como as respostas proliferativas linfocitárias (DOWNING et al., 1987 e ZANKER & LANGE, 1982). Além disso, a hipertermia encontra-se associada com o aumento na produção de TNF interferon gama (IFN γ) e interleucina 2 (KAPPEL et al., 1995). O processo de crescimento tumoral envolve uma variedade de interações célula-célula e célula-matriz extracelular mediada por moléculas de adesão celular. As moléculas ICAM-1 (do inglês intercellular adhesion molecule-1) e VCAM-1 (do inglês vascular cell adhesion molecule) são glicoproteínas up-reguladas por IL-1, TNF- α e IFN γ . Na hipertermia são encontradas concentrações de TNF e de IL-2 aumentadas. ICAN-1 e VCAM-1 encontram-se elevadas em pacientes portadores de neoplasia gástrica (VELIKOVA, 1997). Poder-se-ia então, especular que em nossos experimentos a hipertermia no rato portador de implante gástrico de W256 induziria, através de citocinas, a expressão de moléculas de adesão.

Em situações hipercatabólicas como sepse e câncer, a glicemia encontra-se freqüentemente aumentada. LOSSER e colaboradores (1994) postularam que a glicose modula respostas metabólicas, hemodinâmicas e inflamatórias em coelhos sépticos. Propuseram ainda que esta modulação encontrava-se associada à liberação aumentada de TNF, em até 4 vezes. A ativação de macrófagos e linfócitos pela implantação de células tumorais de W256 aumentam a conversão da glicose a lactato (FERNANDES et al., 1996a). Estas células do sistema imune potenciam suas atividades secretórias e proliferativas mediante implante tumoral, liberando TNF e ocasionando caquexia, a qual

encontra-se associada a níveis plasmáticos aumentados de hormônios catabólicos e à redução da insulinemia em ratos portadores de W256. Em 1996, NETO e colaboradores observaram que em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos portadores de carcinossarcoma 256 de Walker existia um prejuízo na secreção de insulina. Os principais transportadoras de glicose nestes ratos são as GLUT-1 e GLUT-4 (FERNANDES et al., 1996b).

O aumento na formação de ácido láctico após tratamento térmico induz declínio do pH tumoral resultando em lesão vascular e hipoxia. Um aumento considerável das concentrações de lactato, pós hipertermia, nas amostras gástricas, hepáticas e de sangue foram constatadas no presente trabalho, bem como um aumento nos níveis de hidroxibutirato e de acetoacetato. Este fato sugere a possibilidade de ocorrência de acidez tumoral pós hipertermia nos animais estudados. Os achados de LOSSER (1994), com relação à elevação dos níveis de lactato e de glicose em animais hipercatabólicos, corroboram os resultados de nosso estudo.

Tecidos neoplásicos, os quais possuem metabolismo aumentado, encontram-se em rápida divisão celular, necessitando portanto de um fluxo sanguíneo adequado para o fornecimento de substratos essenciais ao seu crescimento. A depleção energética celular resultante de um fornecimento nutricional deficiente pode sensibilizar células tumorais à hipertermia, uma vez que tumores experimentais (como o tumor de Walker) exibem reduzidos níveis de glicose e de glicose-6-fosfato após tratamento térmico (STREFFER & VAN BEUNIGEN, 1987). Entretanto, estas alterações metabólicas possuem grandes variações entre linhagens celulares e, encontram-se relacionadas às modificações de fluxo sanguíneo e ao desenvolvimento de edema intersticial durante o aquecimento. As altas taxas de glicose em tecidos tumorais após hipertermia em nosso estudo podem ser o resultado de diferentes estudos patogenéticos: 1) Devido ao aumento, pelo menos temporário, do fluxo sanguíneo e de uma glicemia 20% maior no sangue arterial (MAYER et al.,

1992) e; 2) Devido a uma expansão do compartimento intersticial (edema), no qual o nível de glicose é maior que no meio intracelular.

Outro metabólito que merece atenção especial na hipertermia é o lactato. O acúmulo de lactato observado nos animais submetidos à hipertermia podem ser o resultado de uma intensa atividade glicolítica induzindo produção reduzida de ATP. Em comparação com a oxidação da glicose em condições normotérmicas existe uma redução na produção de ATP em cerca de 18 vezes (STREFFER, 1990).

A degradação do piruvato a acetil-CoA e a consequente via oxidativa encontram-se prejudicadas na hipertermia (STREFFER, 1984). Este fenômeno foi observado, em nosso trabalho, através da redução das concentrações de piruvato e de lactato sanguíneas e hepáticas nos ratos *sham* operados e nos portadores de tumor submetidos à hipertermia. Esta alterações metabólicas podem ter induzido uma elevação na produção das formas ionizadas de lactato, 3-hidroxibutirato e acetoacetato. Estes metabólitos, de baixo pH e ocorrentes no jejum, contribuem como determinantes na acidificação do tecido tumoral após hipertermoterapia.

BURGER (1970) submetendo ratos albinos wistar machos à hipertermia (42,5° C) e avaliando a atividade enzimática sérica dos mesmos, constatou aumento na concentração de ácido láctico e na atividade da fosfatase alcalina. Esta última é indicadora de lesão no fígado, como confirmado histologicamente por OLIVEIRA (1997) através da observação de picnose hepática pós hipertermia. Ainda no mesmo estudo BURGER (1970) observou um aumento na atividade das transaminases glutâmico oxalacética e glutâmico pirúvica e na atividade enzimática da lactato desidrogenase. Estas observações corroboram os achados de nosso trabalho, no qual constatou-se elevação na atividade da LDH (estudo piloto) e nas concentrações de hidroxibutirato e de lactato no

animais *sham* operados e nos ratos com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker submetidos à hipertermia.

DICKSON e colaboradores (1979) constataram que a glicólise anaeróbica é relativamente resistente quando comparada com o processo aeróbico. É aceitável portanto, que a glicólise aumenta nos tumores aquecidos para compensar a via aeróbica diminuída resultando na formação de ácido láctico. No entanto, não apenas a taxa de formação mas também a drenagem de metabólitos encontra-se prejudicada, resultando em acúmulo de ácido láctico, propiciando morte tumoral. Com relação ao aumento dos níveis de hidroxibutirato pós hipertermia, constatadas no presente trabalho, obtivemos o mesmo fenômeno observado por STEFFER e colaboradores (1981) ao comprovarem acúmulo de ácido hidroxibutírico em tumores da linhagem SKC, submetidos ao tratamento hipertérmico. Sabe-se que na β -oxidação, para conversão de acetil-CoA a corpos cetônicos (LEHNINGER, 1995) o hidroxibutirato é liberado para os tecidos periféricos (incluindo tumores) para sua utilização como fonte energética no ciclo do ácido tricarboxílico. Portanto, uma vez que o hidroxibutirato formado no fígado e a concentração de lactato nos tecidos periféricos (LEE et al., 1986) tenham seus níveis aumentados em tumores aquecidos, pode então ocorrer o acúmulo de lactato nas amostras estudadas. Outra explicação plausível para a elevação da concentração de hidroxibutirato é que em tumores aquecidos, a pO_2 reduzindo-se após lesão vascular induz acúmulo de ácido hidroxibutírico não sendo este metabólito utilizado eficientemente (STREFFER et al., 1981). A síntese hepática de hidroxibutirato pode estar elevada ainda como consequência do estresse sistêmico associado à hipertermia. SAUER e colaboradores (1986) postularam que um aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres e/ou de corpos cetônicos atuariam como um estímulo para o crescimento tumoral durante o jejum agudo em ratos portadores de W256. Foi encontrado em nossos resultados um aumento temporal na concentração de corpos cetônicos nos ratos

sham operados e nos portadores de implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker, similarmente ao metabolismo de jejum.

A sensibilidade térmica tem mostrado ser muito dependente do pH tumoral e do *status* nutricional de tumores tratados termicamente, bem como da microcirculação tumoral inadequadamente funcionante nos mesmos (REINHOLD, 1988 e VAUPEL, 1990). Em tumores de baixo fluxo, como o carcinossarcoma 256 de Walker, o *status* bioenergético e a dissipação de calor são limitadas pelo tecido conectivo. Além disto, a estrutura intrínseca do tumor de Walker é composta de uma mistura de células endoteliais e tumorais, estando assim mais susceptíveis à lesão e à perda de integridade funcional ocasionada pela hipertermia.

O tratamento hipertérmico ocasiona ainda desestabilização e lise de membranas celulares, liberando ácidos graxos livres, aminoácidos e espécies oxigênio e nitrogênio reativas. Além disso, interfere na atividade enzimática de enzimas mitocondriais e provoca fragmentação de DNA (MIRKES, 1997) da célula aquecida principalmente naquelas na fase G1 de divisão celular, culminando com apoptose (SAKAKURA et al., 1998).

O *milieu* tumoral e o comportamento metabólico dos substratos oxidáveis e redutíveis ($[NAD^+]/[NADH]$) são importantes em nosso estudo, na determinação da atividade das enzimas LDH e β -BDH. O cálculo das concentrações dos substratos reduzidos e oxidados, dos sistemas lactato e hidroxibutirato dos animais estudados, possibilitou a avaliação do estado redox citoplasmático e mitocondrial, respectivamente. O uso do sistema β -hidroxibutirato/acetoacetato para avaliação da razão $[NAD^+]/[NADH]$ mitocondrial foi primeiramente discutido em 1963 por KLINGENBERG & HÄFEN e por BORST (em: WILLIAMSON et al., 1967). Em 1960, LEHNINGER e SUDDUTH & WISE (em: WILLIAMSON et al., 1967) postularam que este sistema é rapidamente reversível e que sua atividade

encontra-se em equilíbrio no fígado de ratos. BÜCHER & RÜSSMANN (1963) propuseram que dos três sistemas desidrogenases, o sistema lactato/piruvato é o que mais rapidamente fornece valores confiáveis, para a razão $[NAD^+]/[NADH]$ citoplasmática, considerando-se uma variedade de situações.

Freqüentemente é observado um acréscimo no estado redox após a hipertermia; parecendo ser consequência da redução do suprimento sanguíneo aos tumores (STREFFER 1990; VAUPEL 1990); conduzindo à alterações metabólicas refletidas através dos níveis de ATP. Os estados redox mitocondrial e citoplasmático dos ratos submetidos à hipertermia encontraram-se alterados, demonstrados através do desequilíbrio da relação $[NAD^+]/[NADH]$. A elevação a redução nos estados redox mitocondrial e citoplasmático, respectivamente, evidenciou valores semelhantes aos encontrados em presença de hiperglicemia, sendo este último fenômeno constatado nos ratos submetidos à hipertermia em nosso trabalho. Isto levou-nos a hipotetizar que houve prejuízo na respiração celular destes animais, a partir de um fluxo sanguíneo reduzido e consequente redução da oxigenação tecidual. No tocante ao estado redox na cetogênese, sabe-se que a β -oxidação elevada, observada em nosso estudo, pode ser devida a um decréscimo na concentração hepática de oxaloacetato devido à rápida conversão deste metabólito a fosfoenolpiruvato e subseqüentemente a glicose (WILLIAMSON et al., 1967).

Então pode-se conjecturar que se o potencial redox limita, possivelmente o grau de redução do NAD^+ , outros fatores podem determinar o estado redox encontrado em no presente trabalho. Entre estes fatores pode-se citar: a) concentrações dos substratos oxidados e reduzidos pelas desidrogenases e; b) taxa de remoção do NADH pela cadeia respiratória, sendo esta drenagem controlada pelas concentrações de ADP (adenosina difosfato) e de Pi (fosfato inorgânico) e pelos ésteres acil-CoA.

encontra-se em equilíbrio no fígado de ratos. BÜCHER & RÜSSMANN (1963) propuseram que dos três sistemas desidrogenases, o sistema lactato/piruvato é o que mais rapidamente fornece valores confiáveis, para a razão $[NAD^+]/[NADH]$ citoplasmática, considerando-se uma variedade de situações.

Freqüentemente é observado um acréscimo no estado redox após a hipertermia; parecendo ser conseqüência da redução do suprimento sanguíneo aos tumores (STREFFER 1990; VAUPEL 1990); conduzindo à alterações metabólicas refletidas através dos níveis de ATP. Os estados redox mitocondrial e citoplasmático dos ratos submetidos à hipertermia encontraram-se alterados, demonstrados através do desequilíbrio da relação $[NAD^+]/[NADH]$. A elevação a redução nos estados redox mitocondrial e citoplasmático, respectivamente, evidenciou valores semelhantes aos encontrados em presença de hiperglicemia, sendo este último fenômeno constatado nos ratos submetidos à hipertermia em nosso trabalho. Isto levou-nos a hipotetizar que houve prejuízo na respiração celular destes animais, a partir de um fluxo sanguíneo reduzido e conseqüente redução da oxigenação tecidual. No tocante ao estado redox na cetogênese, sabe-se que a β -oxidação elevada, observada em nosso estudo, pode ser devida a um decréscimo na concentração hepática de oxaloacetato devido à rápida conversão deste metabólito a fosfoenolpiruvato e subseqüentemente a glicose (WILLIAMSON et al., 1967).

Então pode-se conjecturar que se o potencial redox limita, possivelmente o grau de redução do NAD^+ , outros fatores podem determinar o estado redox encontrado em no presente trabalho. Entre estes fatores pode-se citar: a) concentrações dos substratos oxidados e reduzidos pelas desidrogenases e; b) taxa de remoção do NADH pela cadeia respiratória, sendo esta drenagem controlada pelas concentrações de ADP (adenosina difosfato) e de Pi (fosfato inorgânico) e pelos ésteres acil-CoA.

VI -CONCLUSÕES

- 1) O sistema utilizado para tratamento térmico em ratos *sham* operados e em outros com implante gástrico de carcinossarcoma 256 de Walker é viável para estudo de alterações metabólicas em hipertermia;
- 2) A hipertermia altera o perfil bioquímico de ratos sadios e de portadores de tumor. As alterações metabólicas constatadas neste estudo foram mais evidentes imediatamente após o tratamento térmico;
- 3) O aumento das concentrações de lactato, 3-hidroxibutirato e acetoacetato pós hipertermia, sugerem elevação da atividade enzimática das desidrogenases láctica e da β -hidroxibutírica conduzindo ao aumento da atividade glicolítica nos animais estudados;
- 4) Após constatação de um aumento mais evidente na produção de corpos cetônicos e de lactato em decorrência da hipertermia, sugere-se que uma possível apoptose tumoral foi favorecida através de redução do pH tumoral devido à presença de formas ionizadas dos metabólitos supracitados, e à deficiente oxigenação tecidual.

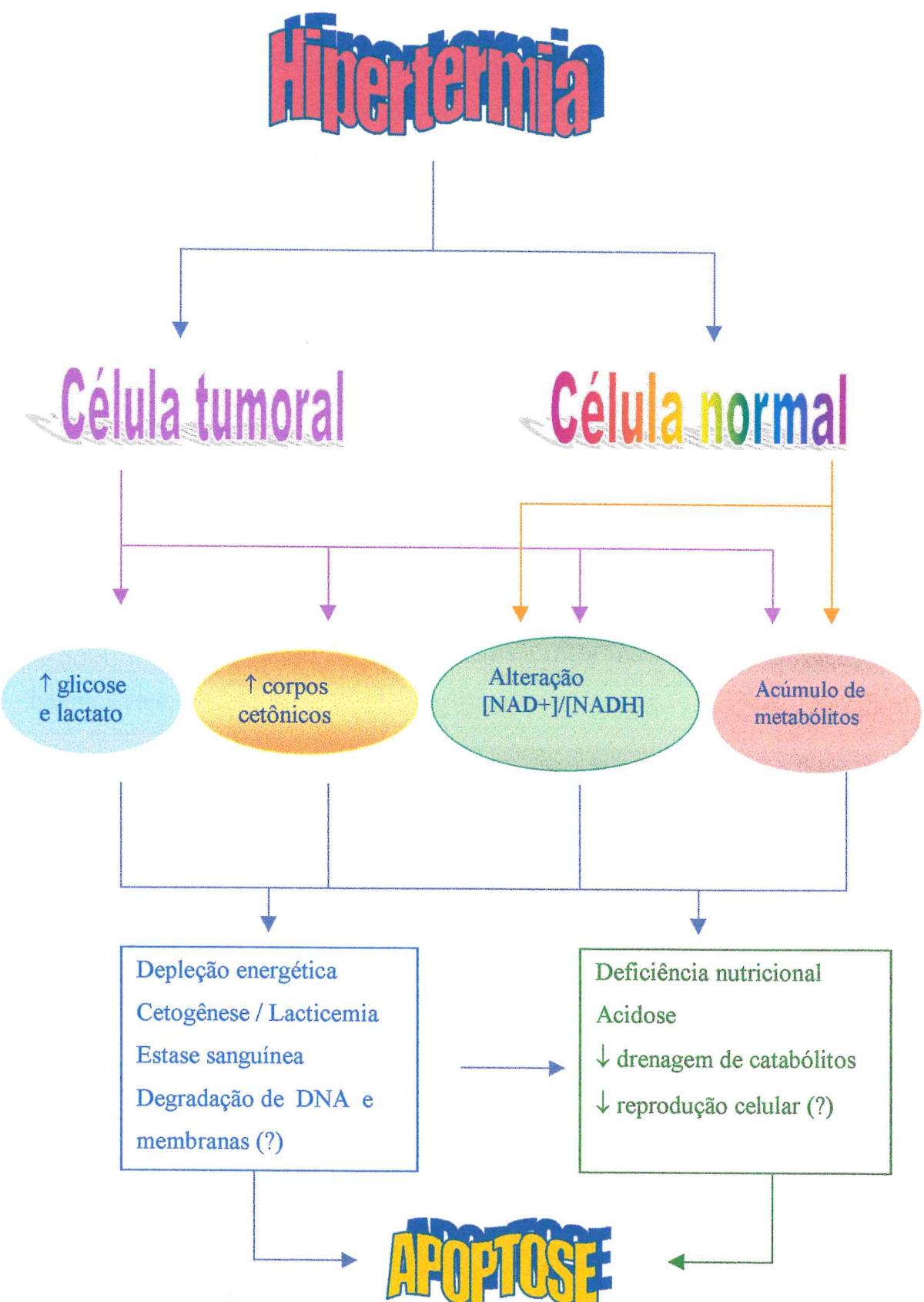
VII) MECANISMO PROPOSTO

Os dados do presente estudo demonstraram que a hipertermia exerce influência tanto sobre o metabolismo da célula normal quanto o da célula tumoral.

Tal pressuposto foi constatado através do aumento das concentrações de lactato, β -hidroxibutirato e acetoacetato, bem com de D-glicose. Sabendo-se então, que o portador de carcinossarcoma 256 de Walker (W256) possui baixa insulinemia, e que a hipertermia *per si* afeta o fluxo sanguíneo e a atividade enzimática, principalmente da lactato desidrogenase, é que hipotetizamos o seguinte: No modelo de implante gástrico de W256, os animais submetidos ao tratamento hipertérmico apresentaram aumento das concentrações teciduais de glicose devido tanto à hipoinsulinemia, quanto à redução do fluxo sanguíneo com conseqüente edema intersticial. Já a elevação dos níveis de lactato foi, provavelmente devida à intensa glicólise, estando prejudicada a conversão de piruvato a acetil-CoA. Estas alterações metabólicas conduziram à depleção energética, bem como a um aumento na cetogênese e na geração de ácido láctico, ácido hidroxibutírico e ácido acetoacético. A drenagem diminuída e o acúmulo destes catabólitos reduzem, após hipertermia, o pH no tumor induzindo, provavelmente apoptose (a ser posteriormente investigada).

Ao se determinar então, as possíveis vias metabólicas afetadas pela hipertermia, poderia-se viabilizar o controle do estresse catabólico encontrado no tratamento do câncer. Isto poderia ser efetuado através da manipulação farmacológica de substratos, citocinas e hormônios regulatórios das vias glicolítica e da β -oxidação favorecendo um status nutricional adequado ao portador de tumor gástrico.

ESQUEMA DO MECANISMO PROPOSTO



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTAZZI, E.; CAJONE, F.; LAKSHMI, M. S.; SHEBERT, G. V. Heat shock modulates the expression of the metastasis associated gene MTS1 and proliferation of murine and human cancer cells. **DNA-Cell-Biol.**, 17 : 1-7, 1998
- ANDO, M.; KATAGIRI, K. & YAKAMOTO, S. Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. **Environ. Health Perspect.**, 105 (7): 726-733, 1997.
- ARDAWI, M. S. M. & NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxilic acid cicle and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rats. **Biochem. J.**; 208: 743-748, 1982.
- ARDAWI, M. S. M. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. **Metabolism**, 37: 99-103, 1988.
- BEASLEY, T. C.; TYTRLL, M. & SWEATT, A. J. Heat shock protein 70 in the retina of *Xenopus laevis*, *in vivo* and *in vitro*: Effect of metabolic stress. **Cell-Tissue-Res.**, 290 (3): 525-538, 1997.
- BEN, Y.; LYONS, J. L.; SONG, C. W. & ROSS, B. D. Mechanism of action of lonidamine in the 9L brain tumor model involves inhibition of lactate efflux and intracellular acidification. **J. Neurooncol.**, 36 (2): 149-157, 1998.
- BERGMEYER, H. U., BERNT, E.; SCHMIDT, E. & STORK, H. D-glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. London, Academic Press, 1974; pp. 1196-1201.

BLAKE, D.; BESSEY, P.; HOTCHKISS, R. et al. Hyperthermia induces IL-1 alpha or TNF-alpha After Endotoxin. **Lymphokine-Cytokine-Res.**, 13(5): 271-275, 1994.

BLASBERG, R. G. et al. Apparent glucose utilization in Walker 256 metastatic brain tumors. **J-Neurooncol.**, 4(1): 5-16, 1986.

BLIGH, John. Aspects of Thermoregulatory Physiology Pertinent to Hyperthermic Treatment of cancer. **Cancer Research**, 39: 2307-2312, 1979.

BOARD, M.; COLQUHOUN, A.; NEWSHOLME, E. A. High K_m Glucose-phosphorylating (Glucokinase) Activities in a Range of Tumor Cell Line and Inhibition of Rates of Tumor Growth by the Specific Enzyme Inhibitor Mannoseptulose. **Cancer Research**, 55: 3278-3285, 1995.

BODEY, B.; BODEY, B. Jr. & KAISER, H. E. Apoptosis in mammalian thymus during normal histogenesis and under various *in vitro* and *in vivo* experimental condition. **In-Vivo**, 12 (1): 123-133, 1998.

BRODY, T. Regulation of Energy Metabolism. In: **Nutritional Biochemistry**. Academic Press, p.166-199, 1994.

BRØYN, T. A Simple Method to Establish Simulated Gastric and Intestinal Cancer in Rats by Mucosal Implantation of Walker tumour. **Acta Chir. Scand.**, 140: 481-485, 1974.

BURGER, F. J. The Effect of Hyperthermia on Serum Enzymes' Activity. **Supplement-South African Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, pp.899-903, 1970.

CAIRNS, J. The treatment of diseases and the war against cancer. **Scientific American**, 253 (5); p.51, 1985.

CALDAROLA, L.; DEI POLI, M. & BIGLIANI, S. Sullo sviluppo del tumore di Walker nella cuta e nel tessuto sottocutaneo del ratto-nota. **I. Minerva Chir.**, 23: 51-55, 1968.

CHATTERJEE, M. Nutrients and Cancer. **The Cancer Journal**, 9(6): 287-290, 1996.

COLQUHOUN, A. & CURI, R. Human and rat tumour cells posses mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I and II: effects of insulin. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 37 (4): 599-605, 1995.

COLTART, S.; IRVINE, C. Hyperthermia, Cell Proliferation and Cancer [letter]. **Int. J. Hyperthermia**, 2(4): 253-266, 1986.

CRILE, G. Jr. Heat as an adjuvant to the treatment of cancer. Experimental Studies. **Cleveland Clin. Q.**, 28: 577-582, 1940.

CURI, R. & NEWSHOLME, E. A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochem. J.**, 250: 383-388, 1988.

DEVEREAUX, D. F.; REDGRAVE, T. G.; TILTON, M. Intolerance administered lipids in tumor bearing animals. **Surgery**, 96: 414-419, 1984.

DEWEY, W. C.; HOPWOOD, L. E.; SAPARETO, S. A.; GERWECK, L. F. Cellular responses to combination of hyperthermia and radiation. **Radiology**, 123: 463-474, 1977.

DEWEY, W. C. The search for critical cellular targets damages by heat. **Radiat. Res.**, 120: 191-204, 1989.

DICKSON, J. A. The effects of hyperthermia in animal systems. **Recent Results Cancer Res.**, 59: 43-111, 1977.

DICKSON, J. A.; MACKENZIE, A.; MCLEOD, K. Temperatures Gradients in Pigs Whole-body Hyperthermia at 42° C. **J. Appl. Physiol.**, 47(4): 712-717, 1979.

DICKSON, J. A. & CAEDERWOOD, S. K. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: A critical review. **Ann. NY Acad. Sci.**, 335: 180-205, 1980.

DI-PIPETTE, D. J., WARD-HARTLEY, K. A. & JAIN, R. K. Effect of glucose on systemic hemodynamics and blood flow rate in normal and tumor tissues in rats. **Cancer Res.**, 46 (12.1): 6299-6304, 1986.

DOERRLER, W.; FEINGOLD, K R.; GRUNFELD, C. Cytokines Induce Catabolic Effects in Cultured Adipocytes by Multiple Mechanisms. **Cytokine**, 6(5): 478-484, 1994.

DOWNING, J. F.; MARTINEZ-VALDEZ, H. & ELIZONDO, R. S. Hyperthermia in humans enhances interferon-gamma synthesis and alters the peripheral lymphocyte population. **J. Interferon Res.**, v. 8, pp 143-150, 1988.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Cancer**, 24: 566-612; 1935.

ENGLE, P. C. & JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: Improved conditions for the assays of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal. Biochem.**, 88: 475-484, 1978.

EVANS, D. P.; TOMASOVIC, S. P. The Effect of Calmodulin antagonists on Hyperthermic Cell Killing and the Development of Thermotolerance. **Int.J.Hyperthermia**, 5(5): 563-578, 1989.

FAJARDO, L. F. Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. **Cancer Res. (suppl)** 44: 4826s-4835s, 1984.

FERNANDES, L. C.; CURI, R.; et al. Insulin Treatment Inhibits Glucose and Glutamine Metabolism in Tumor Cells from Walker 256 Tumor-bearing Rats. **Cancer Res.**, 5: 35-40, 1996a.

FERNANDES, L. C.; CURI, R.; et al. Insulin Treatment can Abolish Changes in Glucose and Glutamine Metabolism of Lymphocytes and Macrophages Caused by the Implantation of the Walker 256 Tumour. **Cell Bioch. and Function**, 14: 187-192, 1996b.

FISHER, E. R. & FISHER, B. Experimental study of factors affecting tumor growth-I: Effect of tissue homogenates. **Cancer Res.**, 23: 1651-1657, 1964.

FLECKENSTEIN, A. E.; WILKINS, D. G.; GIBB, J. W. & HANSON, G. R. Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 283 (1): 281-285, 1997.

FONTELES, M. C.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. & MORAES FILHO, M. O. Verificação da atividade antitumoral de plantas do Nordeste brasileiro. **Ciência e Cultura**, 29 (7): 619, 1977.

FONTELES, M. C.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. & MORAES FILHO. Avaliação da atividade antitumoral de óleos essenciais do Nordeste brasileiro. **Ciência e Cultura**, 31 (7): 723-729, 1979.

FRANCO, E-L. Cancer epidemiology: Substance and Methods. **Ciência e Cultura**, 46 (1/2); pp. 49-52; 1994.

FREEMAN, M. L.; DEWEY, W. C. & HOPWOOD, L. E. Effect of pH on hyperthermic cell survival. **J. Natl. Cancer Inst.**, 58: 1837-1839, 1988.

FUJIMORI, S.; OTAKA, M. & OTANI, S. Induction of 72-kDa heat shock protein and cytoprotection against thioacetamide-induced liver injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, 42 (9): 1987-1984, 1997.

FUJIMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; OHKUBO, H.; et al. Hyperthermia-induced Antitumor Activity in Human Gastric Cancer Cells Serially Transplanted into Nude Mice. **Anticancer Res.**, 14(1A): 67-71, 1994.

GARCIA, J. H. P. Alterações metabólicas induzidas por isquemia hepática normotérmica experimental. **Dissertação de Mestrado-UFC**, 1994.

GIOVANELLA, B. C.; WILLIAMS, L. J.; et al. Hyperthermic Treatment of Human Tumours Heterotransplanted in Nude Mice. **Cancer Res.**, 39: 2236-2241, 1979

GRAUBERT, T. A.; LEY, T. J. How do Lymphocytes Kill Tumor Cells? **Clinical Cancer Res.**, 2: 785-789, 1996.

GULLINO, P. H.; GRANTHAM, F. H. & COURTNEY, A. H. Glucose consumption by transplantable tumors *in vivo*. **Cancer Res.**, 27: 1031-1040, 1967.

GULLINO, P. H. Influence of blood supply on thermal properties and metabolism of mammary carcinomas. **Ann. NY Acad. Sci.**, 335: 1-21, 1980.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8^a edição; cap.48; pp. 466-467. Ed.Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 1992.

HANH, G. M. Hyperthermia and cancer. **Plenum**, New York, 1982.

HALICKA, H. D.; ARDELT, B.; DARZYNKIEWICZ, Z. 2-Deoxy-D-Glucose Enhances Sensitivity of Human Histiocytic Lymphoma U937 Cells to Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. **Cancer Res.**, 55: 444-449, 1995.

HECKLER, B. K.; CAREY, G. B. Lactate Production by Swine Adipocytes: Effects of Age, Nutritional Status, Glucose Concentration, and Insulin. **Am. J. Physiol.**, 272 (35): E957-E966, 1997.

HEYNS, S. D.; GOUGH, D. B.; KAHN, L.; EREMIN, O. Nutritional Pharmacology and Malignant Disease: A Therapeutic modality in Patients with Cancer. **British J. of Surgery**, 83: 608-619, 1996.

HILL, R. P.; HUNT, J. W. Hyperthermia. In: **The Basic Science of Oncology**. McGraw-Hill, Inc., 2nd edition, Chapter 21; pp. 337-355; Toronto, 1992.

HOHORST, H. J. Lactate dehydrogenase. In: **Methods in analysis**, edited by H. U. Bergmeyer. New York: Academic Press, p.266, 1963.

HOLROYDE, C. P.; GADUZDA, T. G. & PUTNAM, R. C. Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. **Cancer Res.**, 35: 3710-3714, 1975.

IWAMA DE MATTOS, M. C. F. & FRANCO, M. F. Megacariócitos e plaquetas no tumor de Walker experimental do rato. **Anais da I Jornada Científica da Faculdade de Ciências Médicas de Botucatu**, p.219, 1971.

IWAMA DE MATTOS, M. C. F., MONTENEGRO, M. R. & SILVA, C. R. V. Walker 256 carcinoma: Pathologic microscopic and Ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, 32 (7): 849-857, 1980.

KANDASAMY, S. B. Possible involvement of tumor necrosis factor alpha in radiation-induced hyperthermia in rats. **Radiat-Res.**, 149 (1): 27-31; 1998.

KANG, M. S.; SONG, C. W.; LEVITT, S. H.: Role of vascular function in response of tumors *in vivo* to hyperthermia. **Cancer Res.**, 40: 1130-1135, 1980.

KAPPEL, M.; TVEDE, N.; PEDERSEN, B. K.; et al. Cytokine Production *ex vivo*: Effect of Raised Body Temperature. **Int. J. Hyperthermia**; 11 (3): 329-335, 1995.

KELEMEN, J. J.; CIOFFI, W. G.; PRUITT, B. A.; et al. Effect of Ambient Temperature on Metabolic Rate After Thermal Injury. **Annals of Surgery**, 233 (4): 406-412, 1996.

KELLEHER, D. K.; ENGEL, T.; VAUPEL, P. Changes in microregional perfusion, oxygenation, ATP and lactate distribution in subcutaneous rat tumors upon water-filtered IR-A hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, 11: 241-255, 1995.

KIM, Y. D.; LAKE, R.; WEISE, V.; KOPIN, I. J. Hemodynamic and Plasma Catecholamine Responses to Hyperthermic Cancer Therapy in Humans. *Am. J. Physiol.*, 237 (5): H570-H574, 1979.

KIM, J. H.; KIM S. H.; HAHN, E. W. 5-Thio-D-Glucose Selectively Potentiates Hyperthermic Killing of Hypoxic Tumor Cells. *Science*, 200: 206-207, 1978.

KITADA, S.; HAYS, E. F. & MEAD, J. F. A lipid mobilizing factor in a serum of tumor-bearing mice. *Lipids*, 15: 168-174, 1980.

KOLOMINA, S. M.; PAGOMINA, L. S.; VASIL'eva, T. N. et al. [Metabolic study of sarcoma 45 and Walker carcinosarcoma cells during the process of growth and exposure to anticoagulants (an enzyme citochemical analysis)]. *Tsitol-Genet.*, 16 (6): 18-24, 1982.

KUPERMAN, D. I.; FREYALDENHOVEN, T. E.; SCHMUED, L. C.; ALI, S. F. Methamphetamine-induced in mice: examination of dopamine depletion and heat-shock protein induction. *Brain-Res.*, 771 (2): 221-227, 1997.

LEE, S. Y.; RYU, K. H.; KANG, M. S.; SONG, C. W. Effect of Hyperthermia on the Lactic Acid and β -hydroxybutyric Acid content in Tumour. *Int J. Hyperthermia*, 2 (2): 213-222, 1986.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. A glicólise e o catabolismo das hexoses, e a Oxidação dos ácidos graxos. Em: *Princípios de Bioquímica*. Sarvier; p.297-365, 1995

LEPOCK, Jr. Involvement of membranes in cellular responses to hyperthermia. *Radiat. Res.*, v.40, pp. 3155-3159, 1991.

LILLY, M. B.; Ng, T. C.; EVANOCHKO. Loss of high-energy phosphate following hyperthermia demonstrated *in vivo* 31P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cancer Res.**, 44: 633-638, 1984.

LOSSER, M.-R.; BERNARD, C. & BEAUDEUX, J-L. Glucose modulates hemodynamic, metabolic and inflammatory responses to lipopolysaccharide in rabbits. **J. Appl. Physiol.**, 83 (5): 1566-1574, 1994.

MALMENDIER, C. L.; DELCROIX, C.; BERMAN, M. Interrelations in the Oxidative Metabolism of Free Fatty Acids, Glucose, and Glycerol in Normal and Hyperlipidemic Patients. A Comparative Model. **The Journal of Clin. Investigation**, 54: 461-476, 1974.

MIRKES, P. E.; CORNEL, L. M.; PARK, H. W. & CUNNIHNGHAM, M. L. Induction of thermotolerance in early postimplantation rat embryos is associated with increased resistance to hyperthermia-induced apoptosis. **Teratology**, 56 (3): 210-219, 1997.

NAKAJIMA, T.; OSBORN, J.; RHEE, J. G.; SONG, C. W. Effect of regional heating of upper body on the liver blood flow in rats. **Int. J. Hyperthermia**, 6: 1-14, 1990.

NESCHIS, D. G.; SAFFORD, S. D.; HANNA, A. K.; GOLDEN, M. A. Thermal preconditioning before rat arterial balloon injury: Limitation of injury and sustained reduction of intimal thickening. **Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol.**; 18 (1): 120-126, 1998.

NETO, S. EL R.; ZORN, T. M. T.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Impairment of Insulin Secretion in Pancreatic Islets Isolated from Walker 256 Tumor-bearing Rats. **Am J. Physiol.**, 271 (40): C804-C809, 1996.

NEWSHOLME, E. A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. The role of the citric acid cycle in cells of immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. **Biochem. Soc. Symp.**, 54: 145-161, 1987.

NISHIMURA, Y.; SHIBAMOTO, Y.; Jo, S.; Relationship between heat-induced vascular damage and thermosensitivity in four mouse tumors. **Cancer Res.**, 48: 7224-7230, 1988.

NONOGAKI, K.; IGUCHI, A.; SAKAMOTO, N. Effects of Adrenoceptor Antagonists on the Hyperthermia and Hyperglycemia induced by Prostaglandin F2 α in Rats. **Eur. J. Pharmacol.**; 262 (1-2): 177-180, 1994.

OLESON, J. R. Hyperthermia. Em: **Cancer, Principles and Practice in Oncology**. J.B. Lippincott Company, 4th edition; Section 11; pp.2725-2731; Philadelphia, 1993.

OLIVEIRA, P. F. M. **Avaliação dos efeitos da hipertermia associada à quimioterapia em tumores experimentais implantados no estômago de ratos**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará, 1997.

OTAKA, M.; OKUYAMA, A. & OTANI, S. Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats. **Dig. Dis. Sci.**, 42 (7): 1473-1479, 1997.

OVERGAARD, J. Effect of hyperthermia alone , and in combination with radiation on solid tumors. In: **Cancer therapy by hyperthermia and radiation**. Ed. Strelffer (Urban & Schwarzenberg, Munich) pp. 46-61, 1977.

PEDERSEN, P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. **Prog. Exp. Tumor Res.**; 22: 190-274. 1978.

PHELIPPE, J. Struture and Expression pancreatic of the Insulin and Glucagon Genes. Em: **Nutritional Biochemical**; BRODY, T.(ed.); Academic Press, London, 1994.

QUINN, T. D.; POLK, H. C.; EDWARDS, M. J. Hyperthermic isolated Limb Perfusion Increases Circulating Levels of Inflammatory Citokines. **Cancer Immunol. Immunother.**; 40 (4): 272-275, 1995.

REMPEL, A.; MATHUPALA, S. P.; PEDERSEN, P. L. Glucose Catabolism in Cancer Cells: Amplification of the Gene Encoding Type II Hexokinase. **Cancer Res.**; 56: 2468-2471, 1996.

REICHARDT, G. A. Jr.; MOURY, N. F. Jr.; HOUCHELLA, N. J. Quantitative estimation of the Cori cycle in human. **J. Biol. Chem.**; 238: 495-501, 1963.

REINHOLD, H. S. & ENDRICH, B. Tumor microcirculation as a target for hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia.**, 2: 111- 137, 1986.

REINHOLD, H. S. Physiological effects of hyperthermia. **Recent Results Cancer Res.**, 107: 32-43, 1988.

RHEE, J. G., KIM, T. H.; LEVITT, S.H.; SONG, C. W. Changes in acidity of mouse tumor by hyperthermia. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 10: 393-399, 1985.

ROBINS, S. L.; COTRAN & KUMAR. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5^a edição; Ed. Guanabara-Koogan; pp.2-4, 213-216; 1994.

SABA, T. M. & ANTIKATZIDES, T.C. Decreased resistance to intravenous tumour-cells during reticuloendothelial depression following surgery. **Br. J. Cancer**, 34 (4): 381-389, 1976.

SAKAKURA, C.; KOIDE, K; ICHIKAWA, D. Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate and p53 status after combined treatment with radiation, hyperthermia and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancers. **Br. J. Cancer**, 77 (1): 159-166, 1998.

SAPARETO, S. A. & DEWEY, W. C. Thermal dose determination in cancer therapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biophys.**, 10: 787-800, 1984.

SARDBERG, J. A guerra ao câncer. Seção: Saúde; VEJA; p.80; 17 de abril de 1996.

SAUER, L. A.; AUSTIN, J. E.; et al. Stimulation of tumor growth in adults rats *in vivo* during an acute fast. **Cancer Res.**; 46 (7): 3469-75, 1986.

SAUER, L. A. & DAUCHY, R. T. *In vivo* lactate production and utilization by Jensen sarcoma and Morris hepatoma 7288CTC. **Cancer Res.**; 46 (2): 689-93, 1986.

SCHAEFER, C.; MAYER, W. K.; KRÜGER. Microregional distributions of glucose, lactate, ATP and tissue pH in experimental tumors upon local hyperthermia and/or hyperglycaemia. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 119: 599-608, 1993.

SCHREK, R. A quantitative study of the growth of the Walker rat tumor and the flexner jobling rat carcinoma. **Am. J. Cancer**, 24: 807-822, 1935.

SCHREK, R. & AVERY, R. C. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the Walker rat tumor 256. **Am. J. Pathol.**, 13: 45-51, 1937.

SCHULZE, B. et al. [Biochemical investigations of cancer cachexia. II. Depletion of glycogenolysis and stimulation of gluconeogenesis in Walker carcinoma 256 bearing rats. **Z-Krebsforsch-Klin-Onkol-Cancer-Res-Clin-Oncol.**; 85 (1): 29-38, 1976.

SEEGENNSSCHMIEDT, M. H.; FESSEDEN, P.; VERNON, C.C. **Thermoradiology and Thermochemotherapy**. vol. 1; Biology, Physiology and Physics. Springer, Berlin; pp. 157-176, 1995.

SEELAENDER, M. C. L. **Metabolismo de lipídeos em ratos portadores do tumor de Walker 256. Avaliação da atividade do sistema carnitina palmitoil transferase mitocondrial hepático**. São Paulo, 1994. 122 p. (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

SHAH, S. A.; JAIN, R. K. & FINEY, P. L. Effects of hyperthermia and hyperglycaemia on survival of rat bearing W256 carcinoma. **Adv-Exp-Med-Biol.**, 157: 23-42, 1982.

SHAPOT, V. S. Some biochemical aspects of the relationship between the tumor and the host. **Adv. Cancer Res.**; 15: 253-286, 1972.

SHAPOT, V. S. & BLINOV, V. A. Blood glucose levels and gluconeogenesis in animal bearing trans plantable tumors. **Cancer Res.**; 34: 1827- 1832, 1974.

SHINGELTON, W.; PARKER, R.; MAHALEY, S. Abdominal perfusion for cancer chemotherapy with hipothermia and hyperthermia. **Surgery**; v. 50, p. 260-265; 1961.

SHIME, N.; LEE, M.; HATANAKA, T. Cardiovascular Changes During Continuous Hyperthermic Peritoneal Perfusion. **Anesth. Analg.**; 78 (5): 938-942, 1994.

SIDIQUI, R A. & WILLIAMS, J.F. Interations of vasopressin and prostaglandin E2 in the development of the cancer cachexia. **Med. Sci. Res.**; 15: 45-46, 1987.

SONG, C. W.; KANG, M. S.; RHEE, J. G.; LEVITT, S. H. The Effect of Hyperthermia on Vascular Function, pH, and Cell Survival. **Radiology**; 137: 795-803, 1980.

SONG, G. W. Physiological factors in hyperthermia. **Natl-Cancer-Inst-Monogr.**, 61: 169-170, 1982.

SONG, C. W.; CHOI, B. S. & OSBORN, J. L. Microvasculature and Perfusion in Normal Tissues and Tumours. In: **Thermoradiotherapy and thermochemotherapy**; vol.1, Academic Press; 1995.

SONG, Y.; YANG, G. & DONG, Y. Immunohistochemical study of lactate isoenzymes in gastric cancer: light and electronmicroscopic observations. **Chung-Hua-Chung-Liu-tsa-chin.**, 18 (4): 266-269, 1996.

STHELIN, J. Regional hyperthermia and chemoterapy by perfusion. In: **International Symposium of cancer therapy by hyperthermia and radiations**, 1975. Proceedings. Washington, 1975.

STONER. Metabolism after injury. In: **Biochemistry for Medical Sciences**. 1979.

STURESSON, C.; LIU, D. L.; STENRAM, U. & ANDERSSON-ENGELS, S.
Hepatic inflow occlusion increases the efficacy of interstitial laser-induced
thermotherapy in rat. **J. Surg. Res.**, 71 (1): 67-72, 1997.

STREFFER, C. Aspects of biochemical effects by hyperthermia. **Natl. Inst. Monogr.**; 61: 11-16, 1982.

STREFFER, C. Mechanism of heat injury. In: Overgaard, J. (ed), **Hyperthermia oncology**, vol. 2. Taylor & Francis, London, pp. 213-222, 1984.

STREFFER, C. The biological basis for tumour therapy by hyperthermia and
radiation. **Recent Results Cancer Res.**, 104: 24-70, 1987.

STREFFER, C. Aspects of Metabolic Changes After Hyperthermia. **Recent Results Cancer Res.**; 107: 07-16, 1988.

STREFFER, C. W. Biological basis of thermotherapy. In: Gautherie, M. (ed)
Biological basis of oncology thermotherapy. Springer, Berlin Heidelberg
New York, pp.1-71, 1990.

STEWART, H. L.; SUELL, K. C. & DUNHAN, L. J. Transplantable and
transmissible tumors in animals. **1st Ed. Armed Forces Institute of Pathology**; Washington, 1959.

TAKE, H.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, I. Activation of circulating platelets
by hyperthermal stress. **Eur-J-Med-Res.**; 1 (12): 562-564, 1996.

TALALAY, P.; TAKANO, E. M. V. & HUGHINS. Studies on the Walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res.**; 12: 834-837, 1952.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. & JENIS, L. J. Identification of a human tumor-derived lipolysis-promoting factor. **Cancer Res.**; 52: 829-834, 1992.

TOMASOVIC, S. P.; WELCH, D. R. Heat Stress Proteins and Experimental Cancer Metastasis. **Int. J. Hyperthermia**; 2(2): 253-266, 1986.

TOYOTA, N.; STREBEL, F. R. & STEPHENS, L. C. Long-duration, mild whole body hyperthermia with cisplatin: tumor response and kinetics of apoptosis and necrosis in a metastatic rat mammary adenocarcinoma. **Int-J-Hyperthermia**, 13 (5): 497-506, 1997.

TREDGET, E. E.; MING YU, Y. & ZHONG, S. Role of interleukin 1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. **Am. J. Physiol.**, 255 (18): E760-E768, 1988.

UDA, M.; OSBORN, J. L.; LEE, C. K. K. Pathophysiological changes after local heating of rat liver. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 18: 903-907, 1990.

VAN-DER-ZEE; VAN-DEN-AARDWEG, G. J.; VAN-RHOON, G. C.; DE WIT, R.

British J. Cancer; 71 (6): 1158-1162, 1995.

VASCONCELOS, P. R. L. **Hepatic metabolism during sepsis**. Oxford: University Oxford, 1987. p.267 Tese (Doctor of Phylosophy).

VAUPEL, P.; OSTHEIMER, K. & MUELLER-KLIESER. Circulatory and metabolic response of malignant tumors during localizing hyperthermia. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 98: 15-29, 1980.

VAUPEL, P. & KALLINOWSKI, F. Physiological effects of hyperthermia.
Recent Results Cancer Res., 104: 71-109, 1987.

VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F & KLUGE, M. Pathophysiology of tumors in hyperthermia. **Recent Results Cancer Res.**, 107: 65-75, 1988.

VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F & OKUNIEFF, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenviroment of human tumors: A review. **Cancer Res.**, 49: 6449-6465, 1989.

VAUPEL, P.; OKUNIEFF, P. & NEURINGER, L. J. In vivo ^{31}P -NMR spectroscopy of murine tumors before and after localized hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, 6: 15-31, 1990.

VAUPEL, P; KELLEHER, D. K. & KRÜGER, W. Water-filtered infrared-A radiation: A novel technique to heat superficial tumors. **Strahlenther Onkol.**, 168: 633-639, 1992.

VAUPEL, P. Oxygenation of solid tumors. In: Tiecher BA (ed) **Drug resistance in oncology**. Marcel Dekker, New York, pp. 53-85, 1993.

VELIKOVA, G.; GEARING, A.; PRESTON, S. R.; WYATT, J.; SELBY, P. J. Circulating soluble adheshion molecules E-cadherin, E-selectin, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with gastric cancer. **British J. Cancer**; 76 (11): 1398-1404, 1997.

VIRKAMAKI, A.; YKI-JARVINEN, H. Role of Prostaglandins in Mediating Alterations in Glucose Metabolism During Acute Endotoxemia in the Rat. **Endocrinology**; 136 (4): 1701-1706, 1995.

WAN, J. M-F; ISRFAN, N. W.; BRISTIAN, B. R. Insulin-like Growth Factor-I is not Mitogenic for the Walker Carcinosarcoma. **Life Sciences**; 56 (10): 747-756, 1995.

WANG, B. H.; YE, C.; LIN, M. Improved free musculocutaneous flap survival with induction of heat shock protein. **Plast-Reconstr-Surg.**, 101 (3): 776-784, 1998.

WARBURG, O. on the origin of cancer cells. **Science**, 123: 309-314, 1956

WATANABE, N.; NIITSU, Y.; UMENO, H. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. **Cancer Res.**, 48: 650-653, 1988.

WATANABE, N.; TSUJI, N.; AKIYAMA, S.; NIITSU, Y. Endogenous tumor necrosis factor as a resistant factor against hyperthermic cytotoxicity in pancreatic carcinoma cells via enhancement of the heat shock element-binding activity of heat shock factor 1. **Chemotherapy**; 43 (6): 406-414, 1997.

WATERHOUSE, C. Lactate metabolism in patients with cancer. **Cancer**, 33: 66-71, 1974.

WATERMAN, F. M.; TUPCHONG, L.; NERLINGER, R. E. & MATTHEWS, J. Blood flow in human tumors during local hyperthermia. **Int. J. Radiat. Biol. Phys.**, 20: 1255-1262, 1991.

WILLIAMSON, D. H.; LUND, P.; KREBS, H. A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. **Biochem. J.**; 103: 514-527, 1967.

WIKE-HOOLE, J. L.; HAVEMAN J. & REINHOLD, H. S. The relevance of tumor pH to the treatment of malignant disease. **Radiother. Oncol.**, 2: 343-366, 1984.

YAACOBI, Y.; GOLDEBERG, E. P. Effect of Ringer's lactate irrigations on the formation of postoperative adhesions. **J. Invest. Surg.**; v. 4, pp. 31-36, 1991.

ZANKER, K. S. & LANGE, J. Whole body hyperthermia and natural killer cell activity [letter]. **Lancet**, 1, 1079-1080, 1982.

ZEPP, E. A. Degradation of insulin and glucagon by a factor associated with Walker 256 carcinoma cells. **Cancer-lett.**; 31 (1): 77-85, 1986.