



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA CAMPOS LIMA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DAS
CITOCINAS CIRCULANTES NA CAQUEXIA INDUZIDA POR
TUMOR WALKER-256**

CAROLINA CAMPOS LIMA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DAS
CITOCINAS CIRCULANTES NA CAQUEXIA INDUZIDA POR
TUMOR WALKER-256**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza

Londrina
2010

Catálogo elaborado pela divisão de processos técnicos da biblioteca central da universidade estadual de londrina.

Dados internacionais de catalogação-na-publicação (cip)

M838a Moreira, Carolina Campos Lima.

Avaliação da neoglicogênese hepática e das citocinas circulantes na caquexia induzida por tumor Walker-256 / Carolina Campos Lima Moreira. – Londrina, 2010.
81 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Caquexia – Teses. 2. Tumor Walker-256 – Teses. 3. Neoglico-gênese hepática – Teses. 4. Citocinas – Teses. 5. Cancer – Teses. I. Souza, Helenir Medri. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-091.8

CAROLINA CAMPOS LIMA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DAS CITOCINAS
CIRCULANTES NA CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR
WALKER-256**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Helenir Medri de Souza
UEL – Londrina - PR

Profª Drª Márcia Regina Batista
UEM – Maringá - PR

Profª Drª Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

Dedico com carinho este trabalho
aos meus pais, José Luiz e Inês,
que sempre apoiaram minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Prof^ª Dr^ª Helenir Medri de Souza, por sua imensa dedicação, paciência, amizade e pelos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos.

À Prof^ª Dr^ª Gláucia Regina Borba Murad, pelo seu companheirismo e por estar sempre disposta a ajudar e colaborar.

À Prof^ª Dr^ª Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia, por ter me acolhido em seu laboratório durante a graduação e me ensinado os primeiros passos da pesquisa.

Aos meus pais, José Luiz e Inês, que, com amor, carinho e dignidade, não mediram esforços para que eu pudesse estudar. Sou eternamente grata!

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo.

Ao Fábio, por sempre estar ao meu lado.

Ao Prof Dr João Batista Calixto, à Prof^ª Dr^ª Tânia Mazzuco e aos mestrandos, Diogo Santos Martins da Costa e Marianne Neves Manjavachi, que tornaram possível a realização das dosagens das citocinas.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Fisiologia Metabólica, pela ajuda e companhia.

À minha turma de mestrado, pelos bons momentos.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo apoio estrutural.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

MOREIRA, Carolina Campos Lima. **Avaliação da neoglicogênese hepática e das citocinas circulantes na caquexia induzida por tumor Walker-256**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A caquexia neoplásica é caracterizada por um conjunto de desvios metabólicos provocados por diversos fatores denominados mediadores da caquexia. Poucos estudos têm investigado as alterações metabólicas hepáticas na caquexia associada ao câncer, não havendo consenso se a neoglicogênese está aumentada ou diminuída nesta patologia. Além disso, não há estudos sobre as concentrações circulantes de citocinas durante o processo de desenvolvimento do tumor Walker-256. O objetivo deste estudo foi avaliar a neoglicogênese hepática e parâmetros metabólicos relacionados, bem como as concentrações séricas de citocinas, em ratos portadores de caquexia induzida por tumor Walker-256, em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral. Para a implantação do tumor, 8×10^7 células Walker-256 (grupo WK) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito traseiro de ratos machos Wistar (220-230 g). Animais controles foram inoculados com PBS (salina tamponada com fosfato) no mesmo local. A neoglicogênese hepática e os parâmetros metabólicos relacionados foram avaliados em estudos de perfusão de fígado *in situ*, a partir dos precursores alanina, piruvato, lactato ou glicerol, no 5º (WK 5º) e 8º (WK 8º) dia após a inoculação das células tumorais. As citocinas séricas, fator de necrose tumoral α (TNF α) e as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), foram avaliadas no 2º, 5º, 8º, 11º e 14º dia de desenvolvimento tumoral. Os resultados demonstraram redução ($p < 0,05$) da produção hepática de glicose e do consumo de oxigênio a partir da alanina 2,5 mM nos grupos WK 5º e WK 8º. Nestes estudos de perfusão com alanina, houve aumento ($p < 0,05$) da produção hepática de piruvato e lactato e tendência de aumento na produção hepática de uréia no grupo WK 5º, enquanto no grupo WK 8º houve tendência de redução na produção hepática de piruvato, lactato e uréia. A produção hepática de glicose e o consumo de oxigênio a partir do piruvato 5 mM ou lactato 2 mM foram também reduzidos ($p < 0,05$) nos animais portadores de tumor (WK 5º e WK 8º), exceto para o grupo WK 5º que apresentou apenas tendência de redução no consumo de oxigênio a partir do piruvato. Entretanto, a produção de glicose e o consumo de oxigênio a partir do lactato 5,5 mM (grupo WK 8º) ou a partir do glicerol 2 mM (grupos WK 5º e WK 8º) não foram reduzidos nos animais portadores de tumor. As concentrações séricas de TNF α , IL-1 β e IL-6 foram indetectáveis nos ratos portadores de tumor (grupos WK 2º, WK 5º, WK 8º, WK 11º e WK 14º). Os resultados permitiram concluir que houve inibição da neoglicogênese hepática a partir dos precursores alanina, piruvato e lactato, mas não a partir do glicerol, no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral. Estes achados, juntamente com os de produção hepática de lactato, piruvato e uréia a partir da alanina, permitem sugerir que houve inibição de enzimas regulatórias da neoglicogênese, como a piruvato carboxilase e/ou PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e tendência de inibição da alanina aminotransferase (WK 8º), mas não houve inibição de enzimas que catalisam reações posteriores à entrada do glicerol (frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase), nos ratos portadores de tumor. É possível que o TNF α , a IL-1 β e a IL-6, produzidos localmente no fígado e em

outros tecidos, estejam atuando como mediadores autócrinos/parácrinos e inibindo a expressão e/ou atividade destas enzimas regulatórias da neoglicogênese. Os dados também indicam, como demonstrado pela inibição da produção hepática de glicose a partir do lactato 2 mM, mas não a partir do lactato 5,5 mM, que houve alteração da concentração saturante de lactato, nos fígados dos animais portadores de tumor. Assim, é possível que a produção hepática de glicose a partir de maiores concentrações circulantes de lactato, como as observadas nos ratos portadores de tumor, contribua para o impedimento de hipoglicemia acentuada e, portanto para o prolongamento da vida no estado portador de tumor.

Palavras-chave: Caquexia. Tumor Walker-256. Neoglicogênese hepática. Citocinas

MOREIRA, Carolina Campos Lima. **Evaluation of hepatic gluconeogenesis and circulating cytokines in the Walker-256 tumor-induced cachexia.** Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Neoplastic cachexia is characterized by a set of metabolic disorders caused by several factors denominated mediators of cachexia. Few studies have investigated the hepatic metabolic alterations in cancer-associated cachexia, there is no consensus whether gluconeogenesis is increased or decreased in this pathology. Moreover, there are no studies on circulating concentrations of cytokines during the development process of the Walker-256 tumor. The objective of this study was to evaluate hepatic gluconeogenesis and related metabolic parameters, as well as serum concentrations of cytokines, in rats with Walker-256 tumor-induced cachexia, at different stages of tumor development. For tumor implantation, 8×10^7 Walker-256 cells (group WK) were inoculated subcutaneously into the back right flank of Wistar male rats (220-230 g). Control animals were inoculated with PBS (phosphate-buffered saline) in the same place. Hepatic gluconeogenesis and related metabolic parameters were evaluated in studies of *in situ* liver perfusion, from precursors alanine, pyruvate, lactate or glycerol, on 5th (WK 5th) and 8th (WK 8th) day after inoculation of tumor cells. Serum cytokines, tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 1 β (IL-1 β) and 6 (IL-6), were evaluated on 2nd, 5th, 8th, 11th and 14th day of tumor development. The results showed reduction ($p < 0.05$) of hepatic glucose production and oxygen consumption from alanine 2.5 mM in the groups WK 5th and WK 8th. In these perfusion studies with alanine, there was increase ($p < 0.05$) of hepatic production of pyruvate and lactate and tendency of increase in hepatic production of urea in the group WK 5th, while in the group WK 8th there was tendency of reduction in hepatic production of pyruvate, lactate and urea. Hepatic glucose production and oxygen consumption from pyruvate 5 mM or lactate 2 mM were also reduced ($p < 0.05$) in tumor-bearing animals (WK 5th and WK 8th), except for the group WK 5th, which showed only tendency of reduction in oxygen consumption from pyruvate. However, production of glucose and oxygen consumption from lactate 5.5 mM (group WK 8th) or from glycerol 2 mM (groups WK 5th and WK 8th) were not reduced in tumor-bearing animals. Serum concentrations of TNF α , IL-1 β and IL-6 were undetectable in tumor-bearing rats (groups WK 2nd, WK 5th, WK 8th, WK 11th and WK 14th). The results showed that there was inhibition of hepatic gluconeogenesis from precursors alanine, pyruvate and lactate, but not from glycerol, on 5th and 8th day of tumor development. These findings, together with the hepatic production of pyruvate, lactate and urea from alanine, permit to suggest that there was inhibition of regulatory enzymes of gluconeogenesis, such as pyruvate carboxylase and/or PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) and tendency of inhibition of alanine aminotransferase (WK 8th), but there was not inhibition of the enzymes that catalyze posterior reactions to the entry of glycerol (fructose 1,6-bisphosphatase and glucose 6-phosphatase), in tumor-bearing rats. It is possible that TNF α , IL-1 β and IL-6, locally produced in the liver and other tissues, are acting as autocrine/paracrine mediators and inhibiting the expression and/or activity of these regulatory enzymes of gluconeogenesis. The data also indicate, as demonstrated by

inhibition of hepatic glucose production from lactate 2 mM, but not from lactate 5.5 mM, that there was alteration of the saturating concentration of lactate, in livers of tumor-bearing animals. Thus, it is possible that the hepatic glucose production from higher circulating concentrations of lactate, as observed in tumor-bearing rats, contributes to the prevention of severe hypoglycemia and, therefore to the extension of life in the tumor-bearing state.

Keywords: Cachexia. Walker-256 tumor. Hepatic gluconeogenesis. Cytokines

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM..... 39
- Figura 2** - Produções hepáticas de uréia, piruvato e L-lactato em ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM..... 40
- Figura 3** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de piruvato 5 mM..... 42
- Figura 4** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-lactato 2 mM..... 44
- Figura 5** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de glicerol 2 mM⁴⁷ 46
- Figura 6** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM..... 49
- Figura 7** - Produções hepáticas de uréia, piruvato e L-lactato em ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM..... 50
- Figura 8** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de piruvato 5 mM..... 52
- Figura 9** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-lactato 2 mM..... 54
- Figura 10** - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-lactato 5,5 mM..... 56

Figura 11 - Produção de glicose e consumo de oxigênio em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de glicerol 2 mM.....	58
Figura 12 - Neoglicogênese hepática pelos precursores alanina, piruvato, lactato e glicerol, e as principais enzimas que regulam a via.....	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Taxas (Δ) de produção de glicose, uréia, piruvato e L-lactato e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-alanina 2,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).....41
- Tabela 2** - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com piruvato 5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).....43
- Tabela 3** - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).....45
- Tabela 4** - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com glicerol 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).....47
- Tabela 5** - Taxas (Δ) de produção de glicose, uréia, piruvato e L-lactato e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-alanina 2,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).....51
- Tabela 6** - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com piruvato 5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).....53
- Tabela 7** - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).....55

Tabela 8 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 5,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º)	57
Tabela 9 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com glicerol 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º)	59
Tabela 10 - Neoglicogênese hepática e parâmetros relacionados ao longo do desenvolvimento do tumor/caquexia	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μmol	10^{-6} molar
1,3-DPGA	1,3-difosfoglicerato
2-PGA	2-fosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
4-AF	4-aminofenazona
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de Variância Unidimensional
ATP	Adenosina trifosfato
CO₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
CRF	Fator liberador de corticotropina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase relacionada com sinal extracelular
Fru-1,6-P₂	Frutose-1,6-bifosfato
Fru-6-P	Frutose-6-fosfato
g	Grama
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato
Gli-6-P	Glicose-6-fosfato
G6Pase	Glicose 6-fosfatase
Glicerol-P	Glicerol-fosfato
GLUT-1	Transportador de glicose-1
GLUT-3	Transportador de glicose-3
gmc	Ganho de massa corpórea do grupo controle
GOD	Glicose-oxidase
H⁺	Íon hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio

HIF	Fator induzido por hipóxia
HSL	Lipase hormônio-sensível
IFN-γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
KCl	Cloreto de potássio
Kg	10 ³ grama
KH	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
LDH	Lactato desidrogenase
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipoproteína lípase
Mal	Malato
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mfe	Massa corpórea final do animal com tumor
mg	10 ⁻³ grama
mie	Massa corpórea inicial do animal com tumor
min	Minuto
mL	10 ⁻³ litro
mm	10 ⁻³ metros
mM	10 ⁻³ molar
mt	Massa do tumor
n	Número amostral
N₂	Nitrogênio molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio
NH₂Cl	Monocloroamino
NH₃	Amônia

nm	10 ⁻⁹ metro
NPY	Neuropeptídeo Y
O₂	Oxigênio molecular
OAA	Oxaloacetato
°C	Graus Celsius
PBS	Salina tamponada com fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
pg	10 ⁻¹² grama
pH	Potencial hidrogeniônico
PIF	Fator indutor de proteólise
POD	Peroxidase
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
SOCS-3	Proteína supressora da sinalização de citocinas-3
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá
WK	Tumor Walker-256

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	28
2.1	GERAL	28
2.2	ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	REAGENTES	29
3.2	ANIMAIS	29
3.3	IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256	30
3.4	EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DE FÍGADO IN SITU PARA AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS	33
3.5	EXPERIMENTOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO	33
3.6	CONFIRMAÇÃO DA CAQUEXIA DOS ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256	33
3.7	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	34
3.7.1	Determinação da Concentração de Glicose	34
3.7.2	Determinação do Consumo de Oxigênio Hepático	34
3.7.3	Determinação da Concentração de Uréia	35
3.7.4	Determinação da Concentração de Piruvato	35
3.7.5	Determinação da Concentração de Lactato	35
3.7.6	Quantificação de Citocinas Séricas	36
3.8	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	36
4	RESULTADOS	37
4.1	AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS, A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE, NO 5º DIA DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL	37
4.2	AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS, A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE, NO 8º DIA DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL	47
4.3	AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS SÉRICAS	59

5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

#

1 INTRODUÇÃO

A incidência mundial de neoplasias vem crescendo ao longo dos anos. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1,0 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2007).

No Brasil, em 2008, assim como para 2009, foram esperados 231.860 casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), de mama feminina (49 mil), de pulmão (27 mil), de cólon e reto (27 mil), de estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil) (INCA, 2007).

Dentre os efeitos provocados pelo câncer no organismo, a caquexia representa um dos mais sérios, uma vez que leva à debilitação do paciente, resultando em perda acentuada de peso e fraqueza generalizada.

A caquexia é uma síndrome complexa e multifatorial (INUI, 1999; TISDALE, 1997, 1999, 2000, 2002 & 2004; VICENTINO *et al.*, 2002a) caracterizada por perda maior que 10% da massa corporal total. É freqüentemente definida como uma profunda desordem constitucional em que a fraqueza (perda de força muscular) e a desnutrição (decorrente da anorexia e má absorção de nutrientes) estão relacionadas com a presença de uma doença crônica (HOLROYDE & REICHARD, 1981), como: câncer, AIDS, insuficiência crônica do coração, artrite reumatóide, falência crônica dos pulmões, cirrose hepática, deficiência renal ou sepse (MARTIGNONI *et al.*, 2003; PLATA-SALAMÁN, 2000). Este estado patológico ocorre em mais de 2/3 dos pacientes com neoplasia avançada (ARGILÉS *et al.*, 2001) e está associado com o decréscimo do tempo de vida desses portadores (TISDALE, 1997). Aproximadamente 30% das mortes por câncer são atribuídas à caquexia e as suas consequências (BARTON, 2001).

As anormalidades associadas à caquexia do câncer incluem anorexia, perda de peso, anemia e alterações no metabolismo de carboidratos,

lipídeos e proteínas (ARGILÉS *et al.*, 1997). O grau de caquexia é inversamente proporcional ao tempo de vida do paciente e a caquexia sempre implica em um pobre prognóstico (DeWYS, 1985; HARVEY *et al.*, 1979; NIXON *et al.*, 1980). Talvez uma das mais relevantes características da caquexia seja a astenia (perda da força muscular), a qual reflete a grande degradação muscular que leva à caquexia no paciente com câncer (ARGILÉS *et al.*, 1992). A astenia é também caracterizada por fraqueza bem como fadiga mental (ADAMS & VICTOR, 1981). Além disso, na caquexia há também depleção das proteínas cardíacas, resultando em importantes alterações no desempenho do coração (ARGILÉS *et al.*, 2007).

A perda maciça de massa muscular é responsável pela maior parte da perda de peso total e pode ocorrer independentemente da diminuição da ingestão alimentar ou má absorção de nutrientes. Embora a caquexia sempre inclua um componente de redução na ingestão de alimentos, a anorexia é insuficiente para justificar a perda excessiva de massa corporal. Na caquexia há maciça depleção do músculo esquelético, ausente na anorexia. Além disso, a suplementação alimentar não é capaz de reverter o quadro caquético e a caquexia pode ocorrer na ausência de anorexia (TISDALE, 2001).

O desenvolvimento da caquexia do câncer pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pelas consequências energéticas do crescimento do tumor. As células tumorais utilizam substratos como glicose, lipídios ou aminoácidos, cuja importância relativa varia de acordo com o tipo e estágio de desenvolvimento de um determinado tumor (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988).

A arquitetura dos tumores sólidos possui importância na determinação dos substratos metabólicos utilizados para a produção de energia. Grandes tumores sólidos, como o Walker-256, de crescimento rápido e pouca vascularização, apresentam pobre suprimento sanguíneo. Muitas regiões tumorais tornam-se hipóxicas e utilizam, preferencialmente, a via glicolítica anaeróbica para a produção de energia (VICENTINO *et al.*, 2002b). Assim, nestes tipos de tumor, a glicose é a fonte primária de energia (TISDALE, 2000), e a quantidade requerida pelas células tumorais é cerca de quatro a cinco vezes à das células normais (TIJERINA, 2004), estabelecendo-se um mecanismo de competição por este substrato entre o tumor e os demais tecidos do hospedeiro.

Uma vez que a glicólise é uma via menos eficiente de produção de energia quando comparada à fosforilação oxidativa, grandes quantidades de glicose

são consumidas pelo tumor. E essa demanda extra de glicose pelo tumor é acompanhada por uma menor utilização de glicose pelos tecidos do hospedeiro (TISDALE, 1997).

O aumento na captação de glicose e da glicólise anaeróbica é necessário para manter o nível de ATP para sobrevivência e proliferação contínua das células tumorais, e estes mecanismos são mediados pelo fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), um fator de transcrição capaz de estimular a expressão de mais de 70 genes (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007).

Sob condição de hipóxia, o HIF-1 induz a expressão de transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3) e de enzimas glicolíticas nas células tumorais (ORTEGA *et al.*, 2009), para aumentar a captação e utilização de glicose respectivamente.

No entanto, muitas células tumorais que crescem sob condições normais de oxigênio também apresentam expressão aumentada de transportadores de glicose e de enzimas glicolíticas (DANG & SEMENZA, 1999). Tem sido mostrado que oncogenes podem diretamente ativar o HIF-1, independente da hipóxia, levando a uma taxa de glicólise aumentada (SHAW, 2006). O oncogene Ras, por exemplo, pode aumentar os transportadores de glicose e a glicólise em células transformadas (MAZUREK *et al.*, 2001).

O desvio do fluxo metabólico da célula tumoral para a via glicolítica anaeróbica pelo HIF aumenta, portanto, o consumo de glicose por esta célula (TISDALE, 2002). A rápida taxa de utilização de glicose pelas células tumorais juntamente com a anorexia resultam em hipoglicemia no hospedeiro e elevação da concentração de lactato sanguíneo, o qual é convertido novamente à glicose no fígado pela via da neoglicogênese, estabelecendo entre o tumor e o fígado um ciclo fútil, como o ciclo de Cori (BONGAERTS *et al.*, 2006; PIFFAR *et al.*, 2003).

A reciclagem da glicose por este ciclo fútil aumenta de 20%, em indivíduos normais, para 50%, em indivíduos com caquexia neoplásica, sendo responsável pela eliminação de 60% do lactato produzido pelo tumor (TISDALE, 2000). A atividade aumentada deste ciclo contribui para o aumento do gasto energético na caquexia, visto que a neoglicogênese a partir do lactato utiliza seis moléculas de ATP para cada conversão de lactato a glicose, e a oxidação anaeróbica de glicose pelas células tumorais produz dois ATPs, sendo então parte

da energia dissipada em forma de calor (BONGAERTS *et al.*, 2006; MORLEY *et al.*, 2006; TISDALE, 2002).

O desenvolvimento da caquexia do câncer decorre não só da utilização de combustíveis pelas células tumorais para suas necessidades energéticas como também das complexas interações entre o hospedeiro e o tumor (SKIPWORTH *et al.*, 2007), ou seja, depende da dinâmica da resposta do hospedeiro (ativação da resposta inflamatória sistêmica e mudanças metabólicas, imunológicas e neuroendócrinas) e das características do tumor e/ou dos produtos derivados do tumor (ARIAS *et al.*, 2007; TISDALE, 2005).

Sugere-se que fatores produzidos pelo tumor e pelo tecido do hospedeiro na presença de certos tumores, desempenham papel importante na redução da massa tecidual e, por essa razão, são chamados de mediadores da caquexia (LOBERG *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2004; RUBIN, 2003; TISDALE, 1999 & 2003).

Os mediadores da caquexia atuam em múltiplos alvos, como adipócitos, miócitos, hepatócitos, medula óssea, células endoteliais e neurônios, induzindo uma complexa cascata de respostas biológicas que culminam em progressiva anorexia, perda de peso, depleção de estoque de lipídeos, severa perda protéica do músculo esquelético (LOBERG *et al.*, 2007) e várias outras alterações no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos.

Entre os mediadores da caquexia derivados do tumor estão incluídos pequenos peptídeos descritos como tóxicos – toxohormônios – produzidos por células tumorais, os quais têm sido relacionados à caquexia, muito embora seu papel não esteja precisamente determinado (RUBIN, 2003). Contudo, foi verificado que um toxohormônio obtido do tumor Walker-256, um carcinossarcoma encontrado em ratos, foi capaz de inibir a incorporação de aminoácidos em proteínas de miofibrila do músculo diafragma (GOODLAD & RAYMOND, 1973). Outros mediadores da caquexia derivados do tumor são o fator de mobilização de lipídios (LMF) que degrada diretamente o tecido adiposo (TISDALE, 1993 & 2000) e o fator indutor de proteólise (PIF) que induz a proteólise no músculo esquelético por ativar a via ubiquitina-proteassoma dependente de ATP e reduz a síntese protéica muscular, como demonstrado no músculo gastrocnêmio (TISDALE, 2000 & 2001). A administração de PIF em camundongos não-portadores de tumor produziu um

estado de caquexia, com rápida perda de peso, devido à depleção seletiva de massa magra (TISDALE, 1999 & 2000).

As citocinas são também consideradas mediadores da caquexia. Dados atuais apontam as citocinas como sendo os principais fatores envolvidos na síndrome de caquexia. Estas moléculas sinalizadoras, produzidas pelo próprio tumor ou liberadas por células do sistema imune em resposta à presença do tumor, desencadeiam intrincadas redes de sinalização nos tecidos as quais estão envolvidas com a degradação e síntese protéica, controle da ingestão alimentar, gasto energético e regulação hormonal. Altas concentrações de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), têm sido encontradas em alguns pacientes com câncer e os níveis circulantes destas citocinas parecem correlacionar com a progressão do tumor (FEARON *et al.*, 1991; MANTOVANI *et al.*, 2000; MATTHYS & BILLIAU, 1997; MOLDAWER *et al.*, 1992; NOGUCHI *et al.*, 1996; YANAGAWA *et al.*, 1995). É possível, no entanto, que as concentrações circulantes de TNF α e IL-6 não necessariamente devem estar elevadas para o desenvolvimento da caquexia. Postula-se que o TNF α e a IL-6 possam atuar como mediadores autócrino/parácrino ao invés de serem mensageiros circulantes na caquexia (TISDALE, 1997).

A administração isolada ou combinada de TNF α , IL-6 e IL-1 é capaz de reduzir a entrada de alimento e reproduzir a síndrome anorexia-caquexia observada no câncer (GELIN *et al.*, 1991; INUI, 1999; MATTHYS & BILLIAU, 1997; MOLDAWER *et al.*, 1992; NOGUCHI *et al.*, 1996; TISDALE, 1997). As citocinas podem atravessar a barreira hemato-encefálica (INUI, 1999) e se ligarem a receptores que estão presentes em alta densidade na região do hipotálamo (STERNBERG, 1997), atuando diretamente em neurônios envolvidos no controle da ingestão de alimentos na área hipotalâmica lateral e nos núcleos ventromedial e paraventricular do hipotálamo (PLATA-SALAMÁN, 2000). O consumo de alimentos é regulado por um complexo sistema de hormônios e neuropeptídeos (MARTIGNONI *et al.*, 2003). As citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , TNF α e interferon- γ (INF- γ) são apontadas como indutoras de anorexia relacionada ao câncer, por aumentarem a liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRF), um neurotransmissor do sistema nervoso central que suprime a ingestão de alimentos (ARGILÉS *et al.*, 2003; MARTIGNONI *et al.*, 2003; PLATA-SALAMÁN, 2000).

O TNF α , também denominado de caquectina, tem sido a citocina mais estudada. Foi o primeiro fator a ser associado com a caquexia quando se observou sua secreção por linhagens celulares de macrófagos em resposta a endotoxinas (BEUTLER *et al.*, 1985).

O TNF α estimula diretamente a lipólise em humanos pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) e da quinase relacionada com sinal extracelular (ERK), confluindo com a diminuição da expressão da fosfodiesterase 3B, a enzima degradante de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), resultando em aumento do AMPc intracelular, o qual ativa a proteína quinase A (TISDALE, 2003; WARNE, 2003), estimuladora da enzima lipase hormônio-sensível (HSL) - enzima que estimula a hidrólise dos triacilgliceróis nos adipócitos (ARNER, 1995).

Além de estimular a lipólise (MacDOUGALD & MANDRUP, 2002; TISDALE, 1999, 2002 & 2003; WARNE, 2003), o TNF α é capaz de promover aumento da apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (PRINS *et al.*, 1997; WARNE, 2003) e diminuição dos processos de adipogênese e lipogênese (MacDOUGALD & MANDRUP, 2002; WARNE, 2003). Verificou-se que esta citocina suprime a lipoproteína lipase (LPL), enzima localizada na superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos dos tecidos adiposo e muscular, que degrada os triacilgliceróis do plasma em ácidos graxos e glicerol (BERG *et al.*, 1994). A infusão intravenosa de TNF α em ratos promove elevação de triglicerídeos e ácidos graxos livres no plasma, (TREDGET *et al.*, 1988).

O TNF α é também responsável pelo aumento do metabolismo muscular (NIJSTEN *et al.*, 1987; PERLMUTTER *et al.*, 1986) e da atividade glicolítica em culturas de miócitos (ZENTELLA *et al.*, 1993). A infusão intravenosa de TNF α e IL-1 β em ratos provoca alterações nas concentrações plasmáticas de lactato e glicose, aumento da reciclagem de glicose, redução no consumo de oxigênio do animal e redução da atividade da piruvato desidrogenase hepática (TREDGET *et al.*, 1988). Diversos estudos apontam o TNF α como sendo o iniciador da via de degradação protéica.

Com relação à neoglicogênese hepática, foi demonstrado que baixas doses TNF α inibiram a neoglicogênese a partir do precursor alanina (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006), e isso pode ser devido à diminuição da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima-chave da neoglicogênese, pois o TNF α em baixas

doses diminuiu a expressão da PEPCK em camundongos (HILL & MCCALLUM *apud* KELMER-BRACHT *et al.*, 2006). Entretanto, altas doses de TNF α aumentaram a neoglicogênese a partir da alanina em hepatócitos isolados (BLUMBERG *et al.*, 1995b).

Metzger e colaboradores (1997), por sua vez, observaram que a atividade da glicose 6-fosfatase (G6Pase), enzima que catalisa a conversão da glicose 6-fosfato em glicose, reduziu (20%) seis horas após a administração de TNF α e a atividade da PEPCK diminuiu (60%) doze horas após a administração de TNF α . A regulação da atividade da G6Pase e da PEPCK foi associada à acentuada redução de seus RNAs mensageiros, devido à redução das taxas de transcrição.

Outra citocina importante envolvida na caquexia do câncer é a IL-6 (STRASSMANN & KAMBAYASHI, 1995), que modula uma variedade de respostas fisiológicas e ativa genes envolvidos na diferenciação, sobrevivência, apoptose e proliferação celular (HEINRICH *et al.*, 2003).

A infusão de IL-6, em doses próximas à fisiológica em humanos saudáveis, inibiu a lipogênese, estimulou a lipólise nos adipócitos e aumentou os ácidos graxos livres circulantes (BARTON, 2001; VAN HALL *et al.*, 2003), indicando a IL-6 como um fator importante no metabolismo lipídico. A IL-6 tem também a capacidade de encurtar a meia-vida de proteínas de vida longa e aumentar a atividade do proteossoma 26S (TISDALE, 1999).

Foi verificado que a IL-6 aumentou a neoglicogênese hepática em hepatócitos de ratos incubados por 24 horas (BLUMBERG *et al.*, 1995a) e induziu, *in vivo* e *in vitro*, a expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas-3 (SOCS-3) hepática, a qual é capaz de inibir a sinalização do receptor de insulina, promovendo resistência à insulina (SENN *et al.*, 2003).

Há evidências de correlação entre o aumento das concentrações circulatórias de IL-6 e de TNF α , indicando que as citocinas não agem isoladamente, podendo agir sinergicamente como mediadores finais da caquexia (LANGSTEIN & NORTON, 1991; NETO *et al.*, 2001).

A interleucina-1 β , outra citocina mediadora do processo de caquexia, é um peptídeo endógeno e tem sido apontada como desencadeadora de muitos efeitos similares ao do TNF α , incluindo a inibição da LPL e o aumento da lipólise (INUI & MEGUID, 2003; NETO *et al.*, 2001).

A interleucina-1 β pode agir diretamente no cérebro para produzir anorexia (PLATA-SALAMÁN, 2000), ou indiretamente por meio de outros mediadores anorexígenos como a leptina, o CRF e a serotonina (INUI, 1999). A indução da resposta anoréxica pela IL-1 está associada com processos patofisiológicos crônicos incluindo o câncer, AIDS, artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica entre outras (PLATA-SALAMÁN, 1996). Já é bem estabelecido que o consumo de alimentos é regulado por um complexo sistema de hormônios e neuropeptídeos (MARTIGNONI *et al.*, 2003). Inui (1999) demonstrou que o neuropeptídeo Y (NPY) (potente orexígeno) e o CRF (anorexígeno) são desregulados na rede hipotalâmica, na síndrome anorexia-caquexia induzida pelo câncer, levando a diminuição do consumo energético apesar da alta demanda metabólica por nutrientes. A IL-1 tem também sido associada à indução da anorexia, por ser antagonista do receptor de NPY (PLATA-SALAMÁN, 2000).

Além disso, de modo semelhante ao TNF α , baixas doses de IL-1 β inibiram a neoglicogênese hepática a partir do precursor alanina (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006). Foi demonstrado também que a adição de IL-1 β e IL-10, em cultura de hepatócitos, inibiu a produção de glicose hepatocelular, e esta inibição foi acompanhada pela menor atividade da PEPCK (YERKOVICH *et al.*, 2004).

Embora o fígado possa sofrer influências de citocinas circulantes, de citocinas produzidas localmente pelas células de Kupffer ativadas e de fatores produzidos pelo tumor (TRAN-THI *et al.*, 1993; SCHÜMANN *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2002), o metabolismo hepático na caquexia tem sido relativamente pouco investigado.

Estudos em perfusão de fígado de ratos portadores do tumor Walker-256, no 14^o dia após a inoculação das células tumorais, demonstraram algumas alterações no metabolismo de carboidratos tais como: diminuição da glicólise a partir da glicose exógena, provavelmente decorrente da menor atividade da glicoquinase; diminuição da glicólise a partir do glicogênio endógeno, provavelmente devido à menor quantidade de glicogênio hepático em ratos portadores do tumor Walker-256; maior tendência de liberação de glicose, o que é coerente com a grande capacidade de consumo de glicose apresentada pelos tumores em geral (VICENTINO *et al.*, 2002b).

Entretanto, em relação à neoglicogênese hepática, não há consenso se ela está aumentada ou diminuída em portadores de tumor. Há trabalhos

demonstrando que no estado portador de tumor há maior liberação de glicose pela neoglicogênese hepática. Pacientes com vários tipos de cânceres apresentaram maior neoglicogênese a partir do lactato (SHAPOT & BLINOV *apud* TISDALE, 1997), alanina (WATERHOUSE *et al.*, 1979) e glicerol (LUNDHOLM *et al.*, 1982). Waterhouse e colaboradores (1979) relataram aumento significativo na conversão do esqueleto de carbono da alanina para glicose em um grupo de pacientes com câncer que tinham manifestações sistêmicas de anorexia e perda de peso. Da mesma forma, Lundholm e colaboradores (1982) mostraram maior produção de glicose após a injeção de glicerol marcado radioativamente em pacientes com câncer. Similarmente, animais portadores de tumor apresentaram maior neoglicogênese hepática. A taxa de produção de glicose a partir do precursor lactato mostrou-se significativamente aumentada nos estudos de perfusão de fígado de ratos portadores de tumor mamário subcutâneo (SHEARER *et al.*, 1983). Hepatócitos isolados de ratos portadores de tumor apresentaram maior neoglicogênese quando incubados com lactato, alanina (BLUMBERG *et al.*, 1993; ROH *et al.*, 1984) ou glutamina (FISCHER *et al.*, 1997). Esse aumento na produção de glicose foi associado com maior atividade da PEPCK, enzima regulatória da neoglicogênese, em ratos com tumor (NOGUCHI *et al.*, 1989). Sabe-se que animais portadores de tumor apresentam concentrações plasmáticas de glucagon aumentadas e de insulina diminuídas (INCULET *et al.*, 1987), e que o glucagon pode aumentar a síntese de PEPCK e a insulina diminuir a síntese da mesma (YOUNES & NOGUCHI, 2000).

Por outro lado, há trabalhos demonstrando diminuição da neoglicogênese no estado portador de tumor. Estudos de perfusão de fígado evidenciaram diminuição da neoglicogênese em ratos portadores de tumor Walker-256 quando a alanina foi o precursor neoglicogênico utilizado (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004). Liu e colaboradores (1990) também observaram conversão reduzida da alanina em glicose em fígados de ratos portadores de adenocarcinoma mamário. Em concordância, estudos realizados recentemente (CASSOLLA, 2008) mostraram que fígados de ratos no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 apresentaram menor produção de glicose a partir dos precursores neoglicogênicos: alanina, lactato ou piruvato, mas não a partir do glicerol.

Em resumo, a caquexia neoplásica envolve uma complexa rede de desvios metabólicos provocados por diversos fatores, mediadores da caquexia, que

podem alterar a neoglicogênese hepática. Considerando que não há concordância se a neoglicogênese hepática está aumentada ou diminuída em portadores de câncer e que esta falta de consenso pode ser decorrente das análises nos diferentes estudos terem sido realizadas em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, o que implica em diferentes concentrações dos mediadores da caquexia, como as citocinas, seguem-se os objetivos do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a neoglicogênese hepática e parâmetros metabólicos relacionados, bem como as concentrações séricas de citocinas, em ratos portadores de caquexia induzida por tumor Walker-256 em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar em estudos de perfusão de fígado a neoglicogênese hepática e parâmetros metabólicos relacionados a partir dos precursores alanina, piruvato, lactato ou glicerol em ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.
- Avaliar em estudos de perfusão de fígado a neoglicogênese hepática e parâmetros metabólicos relacionados a partir dos precursores alanina, piruvato, lactato ou glicerol em ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.
- Determinar as concentrações séricas das citocinas TNF α , IL-1 β e IL-6 em ratos no 2º, 5º, 8º, 11º e 14º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os sais do líquido de perfusão, os precursores neoglicogênicos e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma, Merck, Reagen, J.T. Backer, Mallinckrodt, Nuclear ou CAQ – Casa Química. Os kits de ELISA para dosagem das citocinas foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, USA).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 220 e 230 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, a uma temperatura de 23 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados à vontade com ração Nuvilab® para roedores e com livre acesso à água. Nos experimentos para avaliação da neoglicogênese hepática os animais foram submetidos a 24 horas de privação alimentar. Os experimentos foram realizados sempre no mesmo horário para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano.

Os protocolos dos experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (cadastro nº 23/09; processo nº 7061/2009). Foram utilizados de 4 a 13 animais por grupo, nos seguintes grupos:

- Grupos Walker-256: ratos portadores de tumor Walker-256 no 2º (WK 2º), 5º (WK 5º), 8º (WK 8º), 11º (WK 11º) e 14º (WK 14º) dia após a inoculação das células tumorais.
- Grupo Controle: ratos não portadores de tumor (inoculação de PBS).

3.3 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de crescimento rápido, e a sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia, pois é uma neoplasia bem caracterizada, facilmente mantida em laboratório, que raramente apresenta regressões e com eficiência comprovada em testes terapêuticos (MORAES *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Células Walker-256, cedidas pelo Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá (UEM), foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0$ ou $2,0 \times 10^6$ células/animal. Após 7 dias de crescimento intraperitoneal, os animais anestesiados com éter etílico foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial a 4°C para obtenção das células tumorais. As células foram ressuspensas em PBS (tampão fosfato $16,5$ mM, conteúdo NaCl 137 mM e KCl $2,7$ mM), pH $7,4$, e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer. Os ratos do grupo tumor foram inoculados com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Para o grupo controle, foi inoculado PBS no mesmo local. Para estes procedimentos, os animais foram previamente anestesiados com éter etílico.

3.4 EXPERIMENTOS DE PERFUSÃO DE FÍGADO *IN SITU* PARA AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS

A neoglicogênese hepática e os parâmetros metabólicos relacionados foram avaliados no 5º e 8º dia após a inoculação das células tumorais (grupos WK 5º e WK 8º) ou PBS (grupo controle). Para tanto, fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ*, a qual foi introduzida no Brasil por Kelmer-Bracht e colaboradores (1984).

O sistema para a perfusão de fígado é basicamente composto por reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica e um oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica ($\text{O}_2/\text{CO}_2=95/5\%$).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O₂ e CO₂, nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) (KREBS & HENSELEIT, 1932 *apud* KELMER-BRACHT, 1993). No sistema de perfusão o líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana. Neste local se processam as trocas gasosas. O O₂ e o CO₂ contidos na atmosfera carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de borracha silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversa) favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 45 ml por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de aproximadamente 1 minuto, e a saturação, próxima a 99%. Desse modo, o líquido saturado de ar (21% de O₂, 78% de N₂ além de outros), por troca passiva, satura-se com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A entrada de CO₂ no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. O líquido de perfusão deixa o oxigenador, saturado de O₂ e CO₂, aquecido a 37°C e com pH 7,4, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

Para a perfusão do fígado os animais, controles e portadores do tumor Walker-256, foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta. Em seguida a veia porta foi canulada sob baixo fluxo, aproximadamente 10 ml/minuto e, imediatamente após a canulação os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para que houvesse completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido

extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo da pressão, o que causaria inchamento do fígado. Logo após, o fluxo foi elevado para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto para exposição completa do fígado, e a veia cava inferior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada e a extremidade livre da cânula foi conectada a uma câmara de acrílico onde estava posicionado o eletrodo de Clark para registro da concentração de oxigênio no líquido efluente (perfusado). Finalmente, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (aproximadamente $4 \text{ ml. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos (aproximadamente $0,15 \text{ ml. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) e visa a compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão.

A perfusão foi, portanto, realizada em sistema aberto (não-recirculante), sendo o direcionamento do fluxo no sentido do hepatócito periportal para o hepatócito perivenoso (perfusão monovascular anterógrada).

Após os 20 minutos iniciais de perfusão, para a estabilização do consumo de oxigênio, o líquido efluente do fígado, depois de passar pelo eletrodo de oxigênio, foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose, uréia, piruvato ou lactato. Durante este período a perfusão do fígado dos animais controles e portadores do tumor Walker-256 foi realizada por um dos seguintes modos:

0-10 min	10-40 min	40-60 min
KH*	KH + L-alanina 2,5 mM	----
KH	KH + piruvato 5 mM, L-lactato 2 mM, L-lactato 5,5 mM ou glicerol 2 mM	KH

*KH= Krebs-Henseleit

Ao término do experimento, o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose, uréia, piruvato ou lactato por grama de fígado ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) pudesse ser calculada. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparações de experimentos nos quais foram empregados fígados com diferentes pesos.

3.5 EXPERIMENTOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO

As citocinas séricas foram avaliadas no 2º, 5º, 8º, 11º e 14º dia após a inoculação das células tumorais ou PBS (grupo controle). Para tanto, os animais foram submetidos à decapitação para coleta de sangue. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção dos soros, os quais foram aliqüotados e armazenados em freezer a -80°C para posteriores dosagens de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 .

3.6 CONFIRMAÇÃO DA CAQUEXIA DOS ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256

Em todos os experimentos os animais portadores de tumor Walker-256 foram avaliados quanto aos seus estados caquéticos.

Para tanto, foram mensuradas as massas corpóreas inicial e final dos animais com tumor e a massa tumoral total (tumor do flanco e metástases). A % de perda de massa corpórea foi calculada de acordo com a equação abaixo. Os animais são considerados caquéticos quando apresentam perda de massa corpórea próxima ou maior que 10%.

$$\% \text{ Perda de massa corpórea} = \frac{(\text{mie} - \text{mfe} + \text{mt} + \text{gmc})}{(\text{mie} + \text{gmc})} \times 100$$

Onde:

mie = massa corpórea inicial do animal com tumor;

mfe = massa corpórea final do animal com tumor;

mt = massa do tumor;

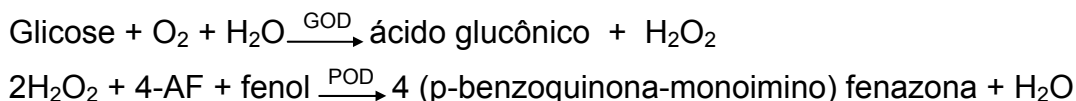
gmc = ganho de massa do grupo controle.

3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para a avaliação da neoglicogênese hepática foram determinadas as concentrações de glicose, uréia, piruvato e lactato e o consumo de oxigênio. Para a análise da influência das citocinas nas alterações metabólicas foram dosados o TNF α , a IL-1 β e a IL-6 no soro.

3.7.1 Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose no líquido de perfusão efluente do fígado foi medida pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER & BERNT, 1974). Neste método, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda. O esquema a seguir resume estas reações:



3.7.2 Determinação do Consumo de Oxigênio Hepático

O consumo de oxigênio pelo fígado foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Consumo de O}_2 = [\text{O}_2 \text{ porta}] - [\text{O}_2 \text{ cava}] \times \frac{\text{Fluxo}}{\text{Peso Fígado}} \quad (\mu\text{mol}/\text{min.g})$$

Onde:

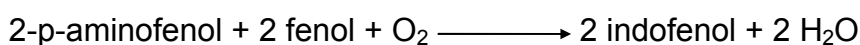
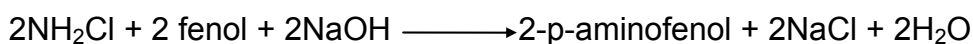
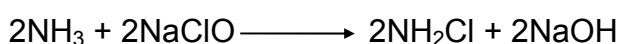
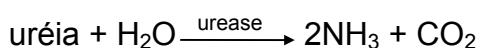
[O₂ porta] = concentração de oxigênio que entra no fígado, ou seja, aquela presente no líquido de perfusão (860 μ M), quando saturado com 95 % de oxigênio da mistura carbogênica.

[O₂ cava] = concentração de oxigênio que deixa o fígado, ou seja, aquela presente no líquido de perfusão efluente, após passar pelo fígado. A concentração de oxigênio no perfusado efluente foi medida polarograficamente através de um

eletrodo de oxigênio (eletrodo de Clark ou oxímetro), durante todo o período de perfusão.

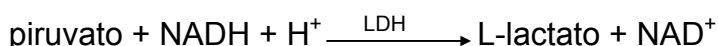
3.7.3 Determinação da Concentração de Ureia

A concentração de uréia no líquido de perfusão efluente do fígado foi determinada por método enzimático, de acordo com a técnica de Gutmann e Bergmeyer (1974), no qual a uréia é hidrolisada pela urease a amônia e gás carbônico. A amônia reage em pH alcalino com hipoclorito de sódio e fenol, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol, como segue adiante. A concentração de azul de indofenol é proporcional à concentração de uréia na amostra e é medida espectrofotometricamente a 600 nm.



3.7.4 Determinação da Concentração de Piruvato

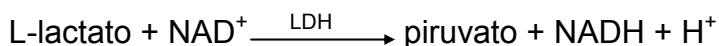
A concentração de piruvato no líquido de perfusão efluente do fígado foi quantificada por método enzimático, de acordo com a técnica de Czok e Lamprecht (1974). Nesse método, o piruvato é convertido enzimaticamente em L-lactato, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em uma reação catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH), que pode ser observada abaixo. A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato convertido e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



3.7.5 Determinação da Concentração de Lactato

A concentração de L-lactato no líquido de perfusão efluente do fígado foi quantificado por método enzimático, segundo a técnica de Gutman e

Wahlefeld (1974). Neste método, o L-lactato é oxidado a piruvato pelo NAD^+ em uma reação catalisada pela LDH, conforme esquematizado a seguir. A formação de NADH é proporcional à concentração de L-lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



3.7.6 Quantificação de Citocinas Séricas

A concentração de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 no soro foi determinada através do método de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), utilizando-se kits específicos de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems).

3.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os experimentos foram realizados de forma casualizada e os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors) e quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe), utilizando-se o programa Statistica 6.0, para que testes estatísticos apropriados pudessem ser aplicados para a análise dos resultados.

As taxas (delta; Δ) de produção de glicose, uréia, piruvato e lactato e as de consumo de oxigênio foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão do precursor neoglicogênico e os respectivos valores basais, obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão do precursor neoglicogênico. As diferenças entre as taxas foram avaliadas pelo teste t de Student para amostras independentes, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

Os resultados das concentrações séricas de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 foram analisados por ANOVA One Way seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS, A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE, NO 5º DIA DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL

A neoglicogênese e o consumo de oxigênio dos animais no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e dos animais controles (sem tumor) foram avaliados em fígados submetidos à perfusão com os seguintes substratos neoglicogênicos: alanina 2,5 mM, piruvato 5 mM, lactato 2 mM e glicerol 2 mM. Nos experimentos de perfusão com alanina foram também analisadas as produções hepáticas de uréia, piruvato e lactato.

A produção hepática de glicose antes da infusão do precursor neoglicogênico (produção basal) foi baixa e corresponde à glicose proveniente do glicogênio residual (figuras 1A, 3A, 4A e 5A). Vale ressaltar que fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram usados em todos os experimentos para depleção do glicogênio hepático. Os valores basais de produção de glicose (figuras 1A, 3A, 4A e 5A) e consumo de oxigênio (figuras 1B, 3B, 4B e 5B) não diferiram entre os grupos dos animais portadores de tumor e seus respectivos controles.

Após a infusão dos precursores neoglicogênicos houve aumento rápido na produção de glicose (figuras 1A, 3A, 4A e 5A) e no consumo de oxigênio (figuras 1B, 3B, 4B e 5B) nos animais portadores de tumor e controles, os quais retornaram aos valores basais após a retirada do precursor. Porém, os fígados dos animais no 5º dia de desenvolvimento tumoral que foram perfundidos com alanina, piruvato ou lactato apresentaram uma resposta menos acentuada na produção de glicose (figuras 1A, 3A e 4A) e redução ou tendência de redução no consumo de oxigênio (figuras 1B, 3B e 4B) quando comparados com os respectivos controles.

A infusão de alanina 2,5 mM promoveu, nos animais portadores de tumor, menor produção de glicose (38,81%) e consumo de oxigênio (53,17%) e maior produção de piruvato (57,93%) (figura 2B) e lactato (71,62%) (figura 2C) em relação aos controles, como pode ser observado por suas taxas (Δ) de produção ou consumo, ilustradas na tabela 1. As taxas do grupo com tumor e controle foram respectivamente: $0,134 \pm 0,022 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,219 \pm 0,025 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para a produção de glicose; $0,303 \pm 0,069 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,647 \pm 0,042 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para

o consumo de oxigênio; $0,259 \pm 0,023 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,164 \pm 0,031 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para a produção de piruvato; $0,508 \pm 0,021 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,296 \pm 0,032 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para a produção de lactato (tabela 1). Com relação à produção de uréia, não houve diferença entre o grupo WK 5° ($\Delta=0,310 \pm 0,027 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e controle ($\Delta=0,273 \pm 0,027 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (figura 2A, tabela 1).

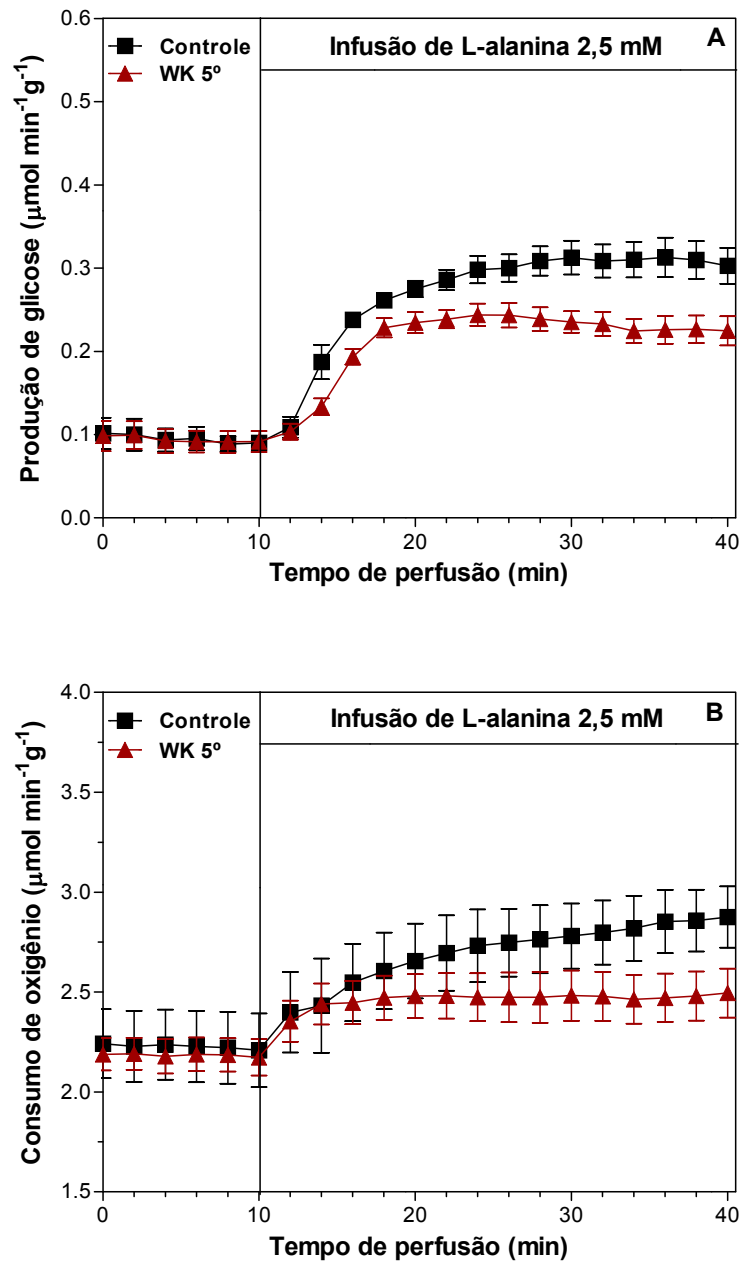
A redução na produção hepática de glicose a partir do precursor piruvato 5 mM foi de 29,02% (tabela 2). As taxas de produção de glicose dos grupos WK 5° e controle foram respectivamente de $0,313 \pm 0,026 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,441 \pm 0,033 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$. Com relação ao consumo de oxigênio, houve tendência de redução (Δ WK 5°= $0,322 \pm 0,073 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Δ controle= $0,456 \pm 0,045 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (tabela 2).

A produção de glicose hepática no grupo WK 5° foi 59,30% menor após a infusão do lactato 2 mM, quando comparada a do grupo controle, como demonstrado por suas taxas (Δ WK 5°= $0,208 \pm 0,014 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Δ controle= $0,511 \pm 0,045 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (tabela 3). O consumo de oxigênio hepático a partir do lactato no grupo WK 5° também foi menor (45,23%) ($\Delta=0,339 \pm 0,031 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao grupo controle ($\Delta=0,619 \pm 0,096 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), acompanhando a redução na produção de glicose (tabela 3).

No entanto, não foi observada diferença na produção de glicose nem no consumo de oxigênio em relação aos seus controles quando o substrato neoglicogênico utilizado foi o glicerol (figura 5, tabela 4). As taxas do grupo WK 5° e controle foram respectivamente: $0,359 \pm 0,058 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,353 \pm 0,040 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para a produção de glicose; $0,022 \pm 0,014 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,123 \pm 0,043 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ para o consumo de oxigênio.

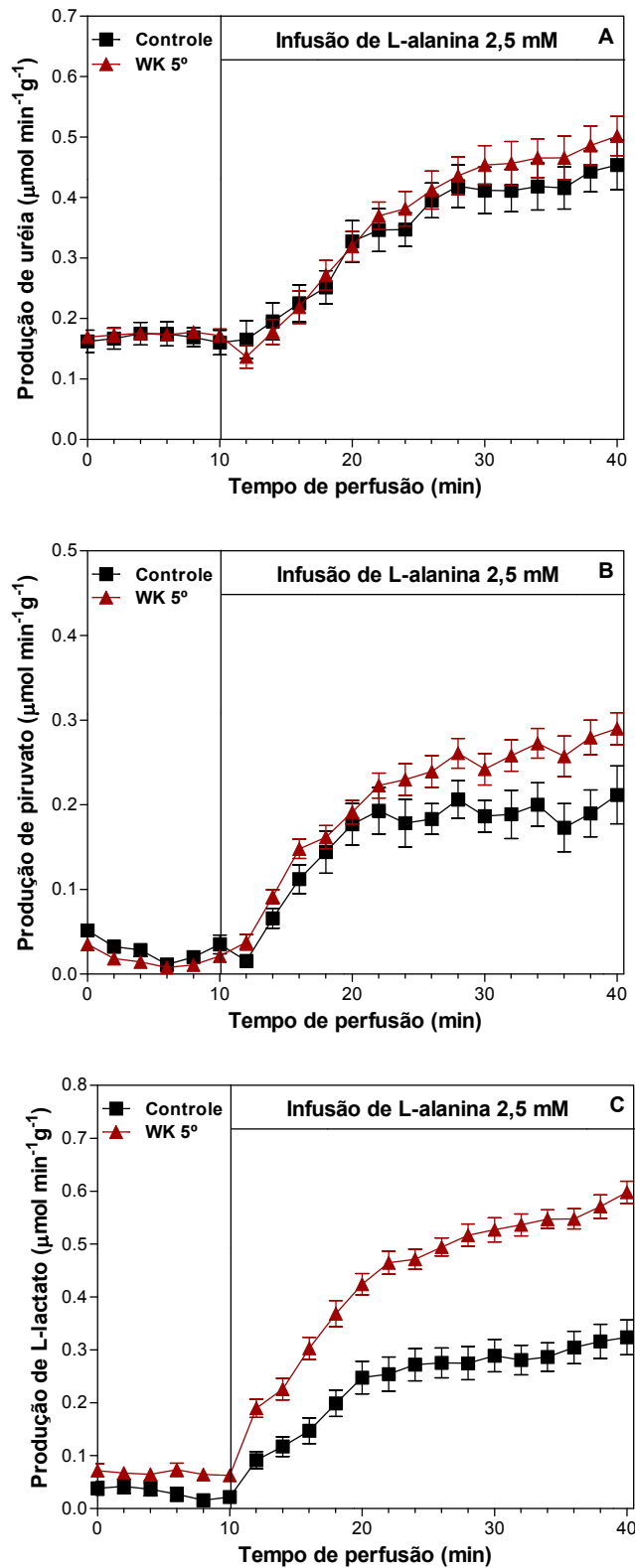
As tabelas 1, 2, 3 e 4 ilustram também os valores das massas tumorais assim como a perda de massa corpórea, dos animais portadores de tumor, a qual foi superior à 10%, confirmando o estado caquético dos animais utilizados nestes experimentos de perfusão de fígado.

Figura 1 – Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 a 12 experimentos.

Figura 2 –Produções hepáticas de uréia (A), piruvato (B) e L-lactato (C) em ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 a 12 experimentos.

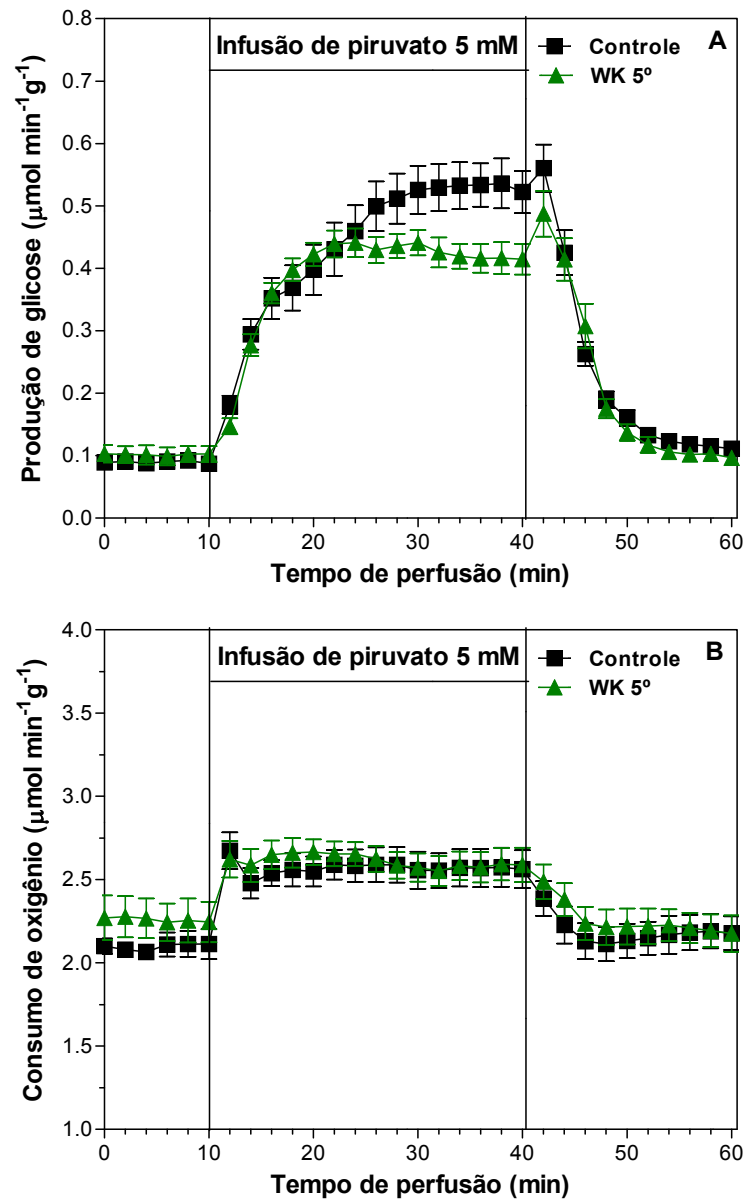
Tabela 1 -Taxas (Δ) de produção de glicose, uréia, piruvato e L-lactato e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-alanina 2,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).

Variável	Controle	WK 5º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,219 \pm 0,025 (n=7)	0,134 \pm 0,022 * (n=12)	-38,81
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,647 \pm 0,042 (n=6)	0,303 \pm 0,069 ** (n=10)	-53,17
Δ Produção de uréia ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,273 \pm 0,027 (n=7)	0,310 \pm 0,027 (n=12)	---
Δ Produção de piruvato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,164 \pm 0,031 (n=7)	0,259 \pm 0,023 * (n=12)	+57,93
Δ Produção de L-lactato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,296 \pm 0,032 (n=7)	0,508 \pm 0,021 *** (n=12)	+71,62
Massa tumoral flanko (g)	---	5,909 \pm 0,752 (n=12)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	1,021 \pm 0,136 (n=12)	---
Massa tumoral total (g)	---	6,930 \pm 0,834 (n=12)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	12,248 \pm 0,850 (n=12)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelos protocolos experimentais ilustrados nas figuras 1 e 2. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 5º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de L-alanina e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de L-alanina). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* controle.

Figura 3 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de piruvato 5 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Piruvato 5 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 13 experimentos.

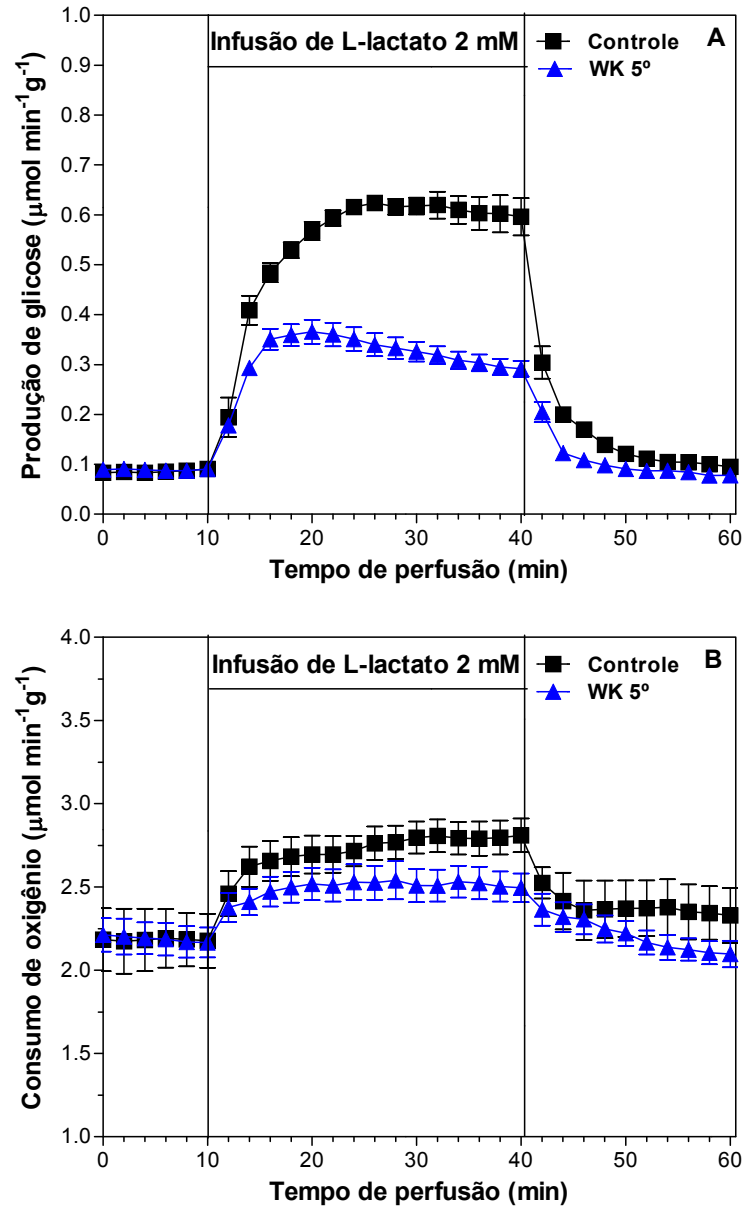
Tabela 2 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com piruvato 5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).

Variável	Controle	WK 5º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,441 \pm 0,033 (n=13)	0,313 \pm 0,026 * (n=7)	-29,02
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,456 \pm 0,045 (n=6)	0,322 \pm 0,073 (n=5)	---
Massa tumoral flanko (g)	---	6,874 \pm 0,433 (n=7)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	0,886 \pm 0,095 (n=7)	---
Massa tumoral total (g)	---	7,760 \pm 0,442 (n=7)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	14,845 \pm 1,000 (n=7)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 3. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 5º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de piruvato e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de piruvato). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ versus controle.

Figura 4 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de L-lactato 2 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-lactato 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos.

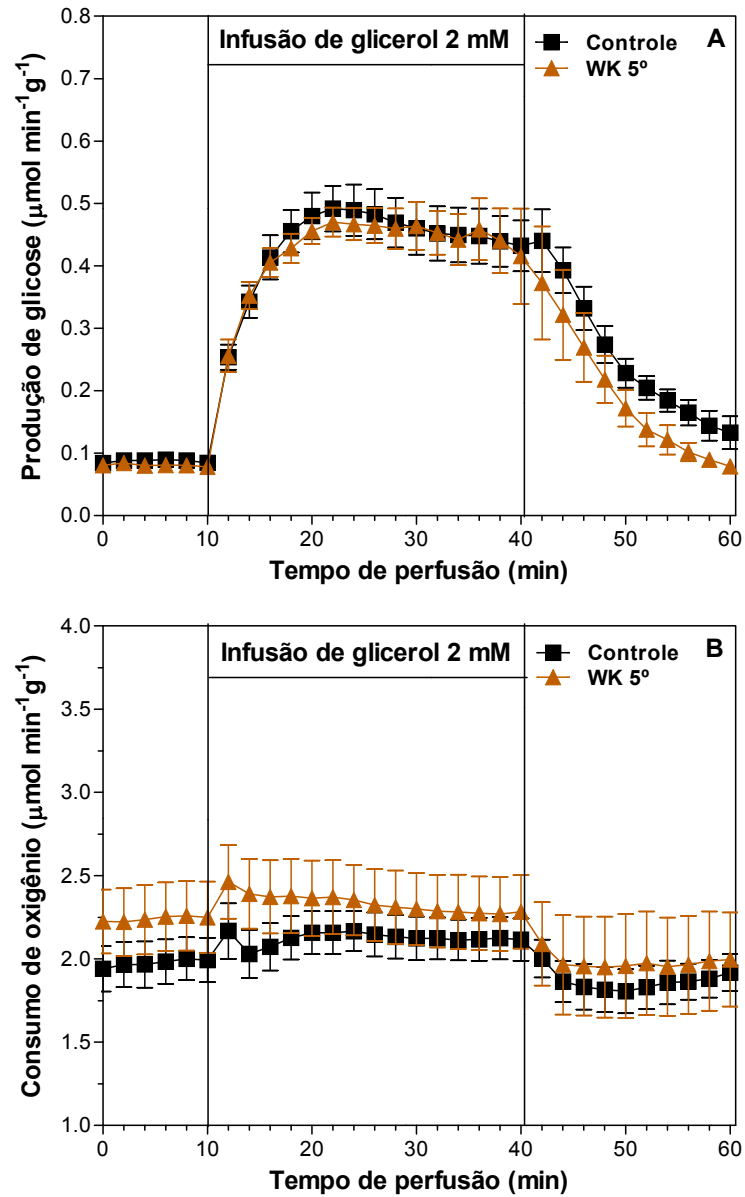
Tabela 3 -Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).

Variável	Controle	WK 5º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,511 \pm 0,045 (n=4)	0,208 \pm 0,014 *** (n=8)	-59,30
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,619 \pm 0,096 (n=4)	0,339 \pm 0,031 * (n=4)	-45,23
Massa tumoral flanko (g)	---	4,078 \pm 0,264 (n=8)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	0,711 \pm 0,130 (n=8)	---
Massa tumoral total (g)	---	4,789 \pm 0,268 (n=8)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	10,185 \pm 0,829 (n=8)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 4. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 5º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de L-lactato e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de L-lactato). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ versus controle e *** $p < 0,001$ versus controle.

Figura 5 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º) e controles durante a infusão de glicerol 2 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicerol 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 6 experimentos.

Tabela 4 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com glicerol 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º).

Variável	Controle	WK 5º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,353 \pm 0,040 (n=6)	0,359 \pm 0,058 (n=5)	---
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,123 \pm 0,043 (n=5)	0,022 \pm 0,014 (n=4)	---
Massa tumoral flanko (g)	---	6,807 \pm 0,802 (n=5)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	0,492 \pm 0,276 (n=5)	---
Massa tumoral total (g)	---	7,299 \pm 0,687 (n=5)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	16,210 \pm 2,694 (n=5)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 5. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 5º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de glicerol e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de glicerol). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

4.2 AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA E DE PARÂMETROS METABÓLICOS RELACIONADOS, A PARTIR DE VÁRIOS PRECURSORES DE GLICOSE, NO 8º DIA DE DESENVOLVIMENTO TUMORAL

A capacidade neoglicogênica hepática e o consumo de oxigênio foram também avaliados em ratos portadores de tumor Walker-256 no 8º dia após a inoculação das células tumorais (WK 8º) e em ratos controles a partir da alanina 2,5 mM, do piruvato 5 mM, do lactato 2 mM e 5,5 mM e do glicerol 2 mM.

Taxas basais baixas de produção de glicose e consumo de oxigênio (antes da infusão do precursor) foram observadas em ambos os grupos (WK 8º e controle). A produção de glicose (figuras 6A, 8A, 9A, 10A e 11A) e o consumo de oxigênio (figuras 6B, 8B, 9B, 10B e 11B) aumentaram rapidamente com a infusão dos substratos neoglicogênicos, retornando aos valores iniciais após a interrupção da infusão dos precursores.

A infusão de alanina 2,5 mM elevou a produção hepática de glicose, uréia, piruvato e lactato e o consumo de oxigênio tanto no grupo WK 8º como no grupo controle. Porém, a produção de glicose do animal portador de tumor foi

significativamente menor (54,05%) quando comparada ao controle (Δ WK 8^o= $0,102 \pm 0,019 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Δ controle= $0,222 \pm 0,008 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (figura 6A, tabela 5). Quanto ao consumo de oxigênio, houve redução de 50% no grupo WK 8^o (Δ = $0,319 \pm 0,056 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao controle (Δ = $0,638 \pm 0,038 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (figura 6B, tabela 5). As produções de uréia, piruvato e lactato dos animais portadores de tumor tiveram tendência à redução em relação aos seus controles, não sendo as diferenças estatisticamente significativas (figuras 7A, 7B e 7C, tabela 5).

Também foi observada, nos ratos portadores de tumor, redução na produção hepática de glicose (25,06%) e no consumo de oxigênio (67,70%) a partir do piruvato 5 mM. A taxa de produção de glicose do grupo com tumor foi de $0,293 \pm 0,014 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e do grupo controle foi de $0,391 \pm 0,024 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ (figura 8A, tabela 6). O consumo de oxigênio do grupo WK 8^o também foi menor (Δ = $0,136 \pm 0,082 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em relação ao controle (Δ = $0,421 \pm 0,045 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (figura 8B, tabela 6).

Similarmente à alanina e ao piruvato, houve também inibição da produção de glicose e do consumo de oxigênio hepáticos no grupo WK 8^o em relação ao controle quando o precursor foi o lactato 2 mM (figura 9). Houve inibição de 30,73% na produção de glicose (Δ WK 8^o= $0,435 \pm 0,056 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e Δ controle= $0,628 \pm 0,061 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e inibição de 42,44% no consumo de oxigênio (Δ WK 8^o= $0,453 \pm 0,059 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e Δ controle= $0,787 \pm 0,097 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (tabela 7).

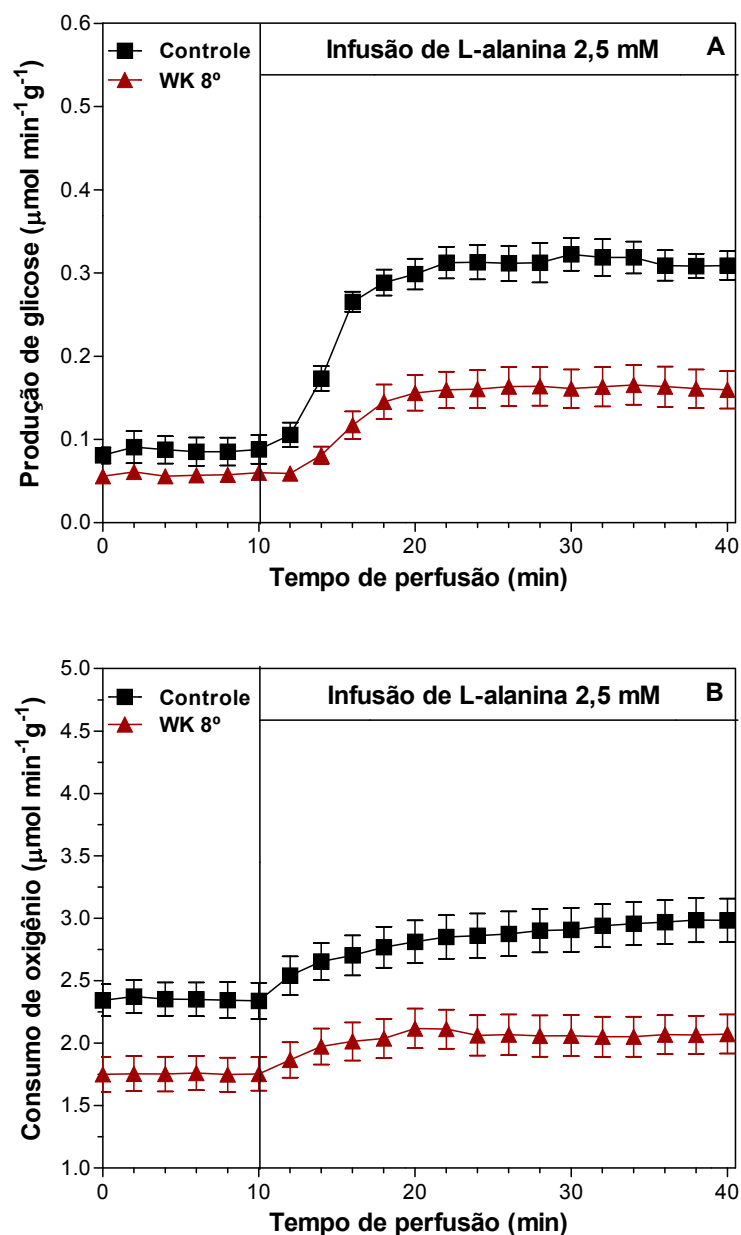
No entanto, não houve diferenças na produção de glicose (Δ WK 8^o= $0,610 \pm 0,078 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e Δ controle= $0,616 \pm 0,078 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e no consumo de oxigênio (Δ WK 8^o= $0,716 \pm 0,115 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e Δ controle= $0,758 \pm 0,114 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) entre os ratos portadores de tumor e os controles durante a infusão de lactato 5,5 mM (figura 10, tabela 8). Vale lembrar que a concentração de lactato 5,5 mM é próxima a do lactato plasmático encontrada em animais portadores de tumor Walker-256 no 8^o dia de desenvolvimento tumoral.

A neoglicogênese e o consumo de oxigênio hepáticos a partir do glicerol 2 mM foram semelhantes nos ratos WK 8^o e controles, como pode ser observado pelas taxas de produção de glicose (Δ WK 8^o= $0,379 \pm 0,047 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e Δ controle= $0,352 \pm 0,049 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e de consumo de oxigênio (Δ WK

$8^{\circ}=0,043 \pm 0,057 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $\Delta \text{ controle}=0,094 \pm 0,060 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) (figura 11, tabela 9).

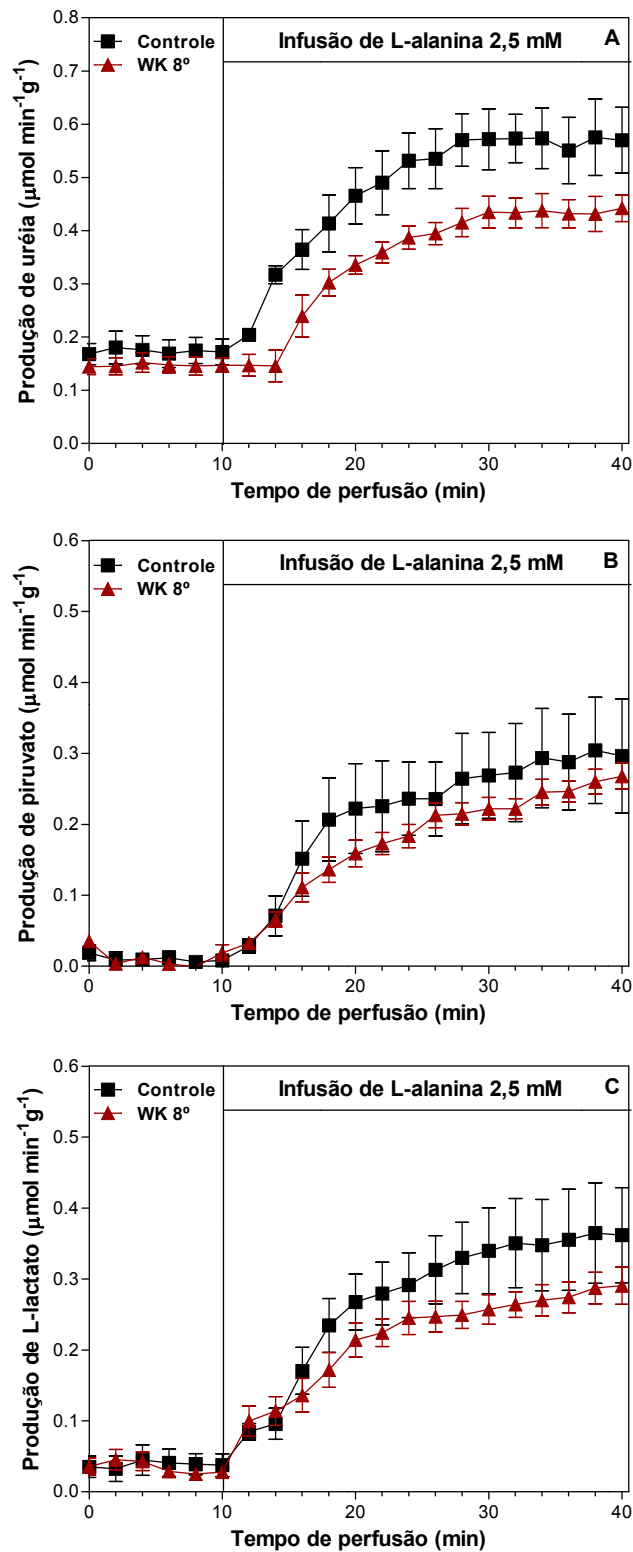
Todos os animais do grupo WK 8° utilizados nos experimentos de perfusão de fígado apresentaram perda de massa corpórea superior a 10%, ou seja, estavam caquéticos (tabelas 5, 6, 7, 8 e 9).

Figura 6 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 8° dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8°) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 8 experimentos.

Figura 7 –Produções hepáticas de uréia (A), piruvato (B) e L-lactato (C) em ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-alanina 2,5 mM



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-alanina 2,5 mM foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos.

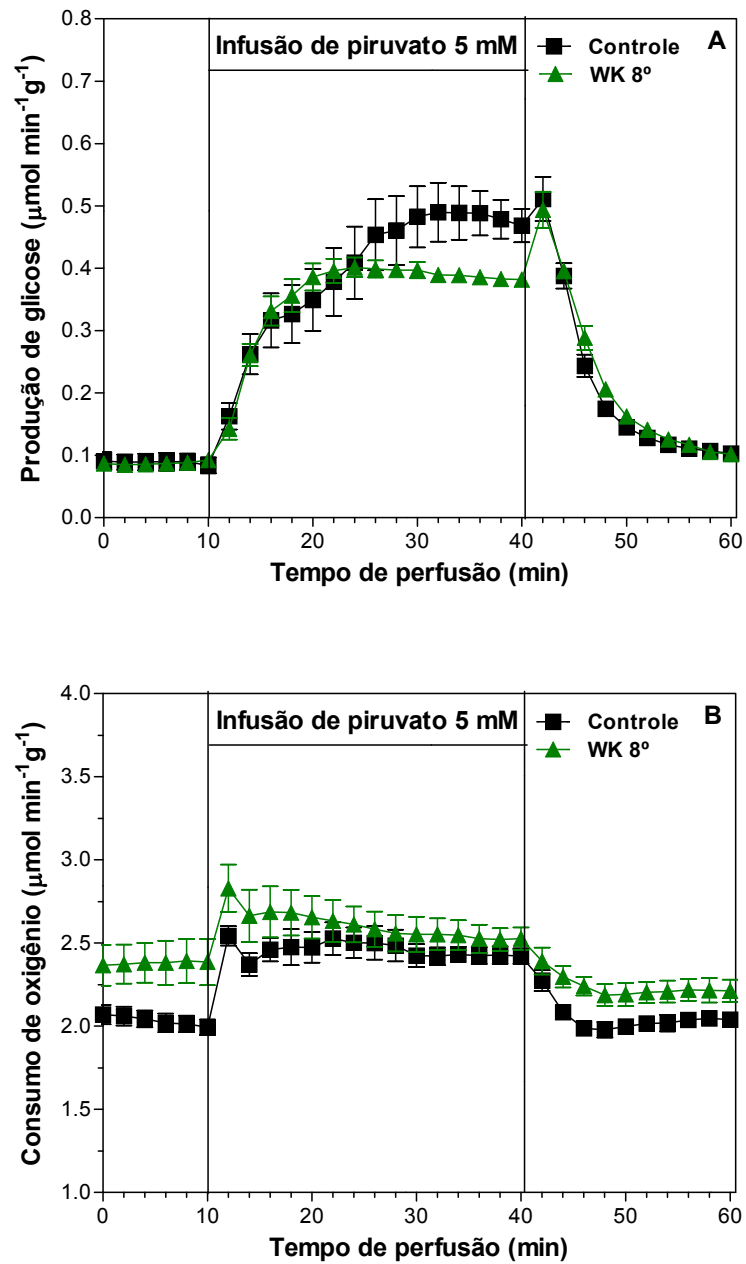
Tabela 5 -Taxas (Δ) de produção de glicose, uréia, piruvato e L-lactato e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-alanina 2,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).

Variável	Controle	WK 8º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,222 \pm 0,008 (n=5)	0,102 \pm 0,019 *** (n=8)	-54,05
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,638 \pm 0,038 (n=5)	0,319 \pm 0,056 ** (n=8)	-50,00
Δ Produção de uréia ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,392 \pm 0,059 (n=5)	0,289 \pm 0,019 (n=8)	---
Δ Produção de piruvato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,289 \pm 0,069 (n=4)	0,249 \pm 0,018 (n=8)	---
Δ Produção de L-lactato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,322 \pm 0,058 (n=4)	0,258 \pm 0,023 (n=7)	---
Massa tumoral flanko (g)	---	14,470 \pm 1,398 (n=8)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	3,540 \pm 0,432 (n=8)	---
Massa tumoral total (g)	---	18,010 \pm 1,513 (n=8)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	19,407 \pm 1,146 (n=8)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelos protocolos experimentais ilustrados nas figuras 6 e 7. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 8º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de L-alanina e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de L-alanina). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* controle.

Figura 8 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de piruvato 5 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Piruvato 5 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 7 experimentos.

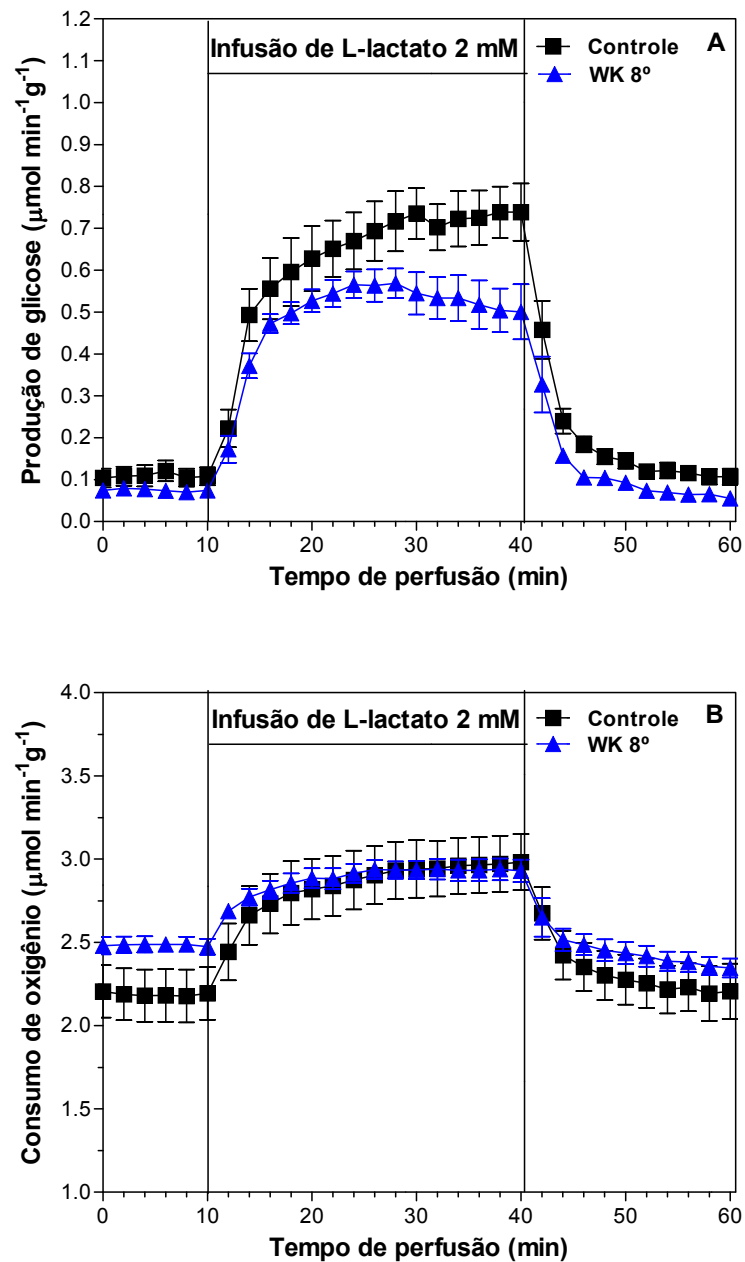
Tabela 6 -Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com piruvato 5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).

Variável	Controle	WK 8º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,391 \pm 0,024 (n=7)	0,293 \pm 0,014 * (n=5)	-25,06
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,421 \pm 0,045 (n=4)	0,136 \pm 0,082 * (n=5)	-67,70
Massa tumoral flanko (g)	---	9,446 \pm 1,870 (n=5)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	2,857 \pm 1,002 (n=5)	---
Massa tumoral total (g)	---	12,304 \pm 2,803 (n=5)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	16,799 \pm 2,701 (n=5)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 8. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 8º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de piruvato e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de piruvato). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ versus controle.

Figura 9 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-lactato 2 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-lactato 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 8 experimentos.

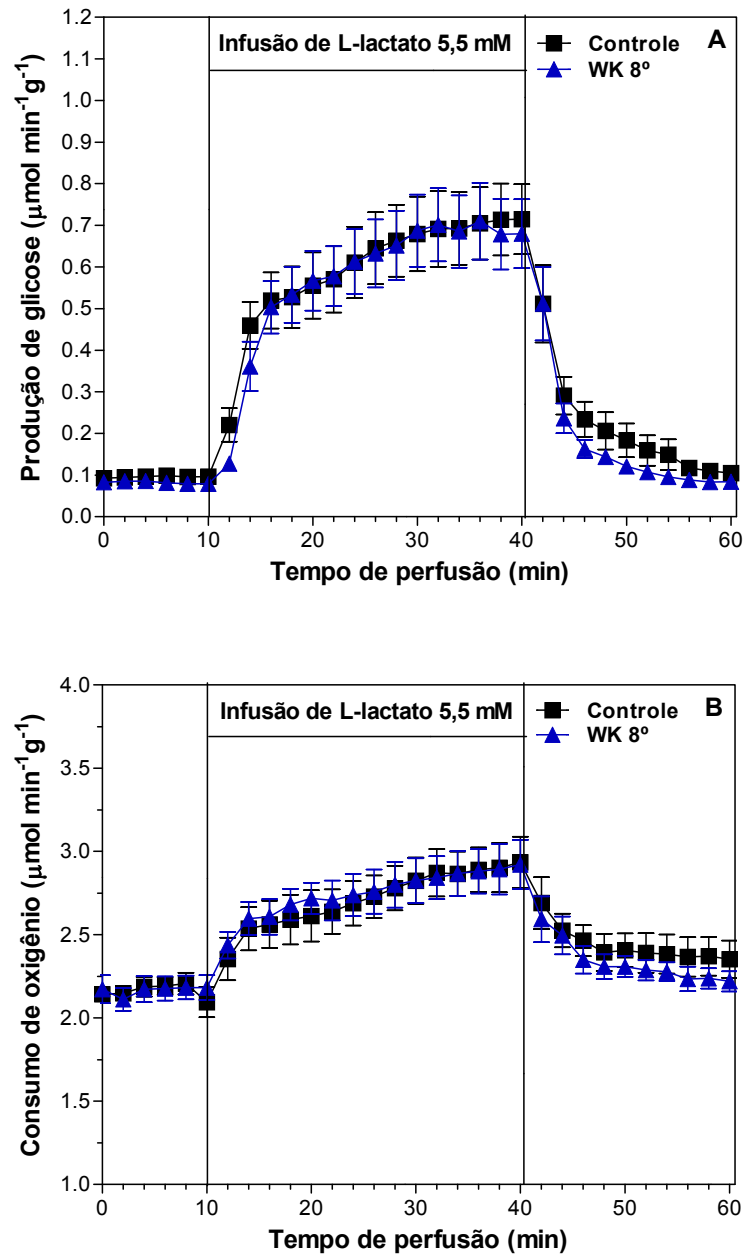
Tabela 7 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).

Variável	Controle	WK 8º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,628 \pm 0,061 (n=6)	0,435 \pm 0,056 * (n=5)	-30,73
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,787 \pm 0,097 (n=8)	0,453 \pm 0,059 * (n=7)	-42,44
Massa tumoral flanko (g)	---	12,795 \pm 1,306 (n=5)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	5,331 \pm 3,290 (n=5)	---
Massa tumoral total (g)	---	18,126 \pm 4,346 (n=5)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	18,594 \pm 0,469 (n=2)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 9. As massas tumorais do flanko, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 8º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de L-lactato e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de L-lactato). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. * $p < 0,05$ versus controle.

Figura 10 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de L-lactato 5,5 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. L-lactato 5,5 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 8 experimentos.

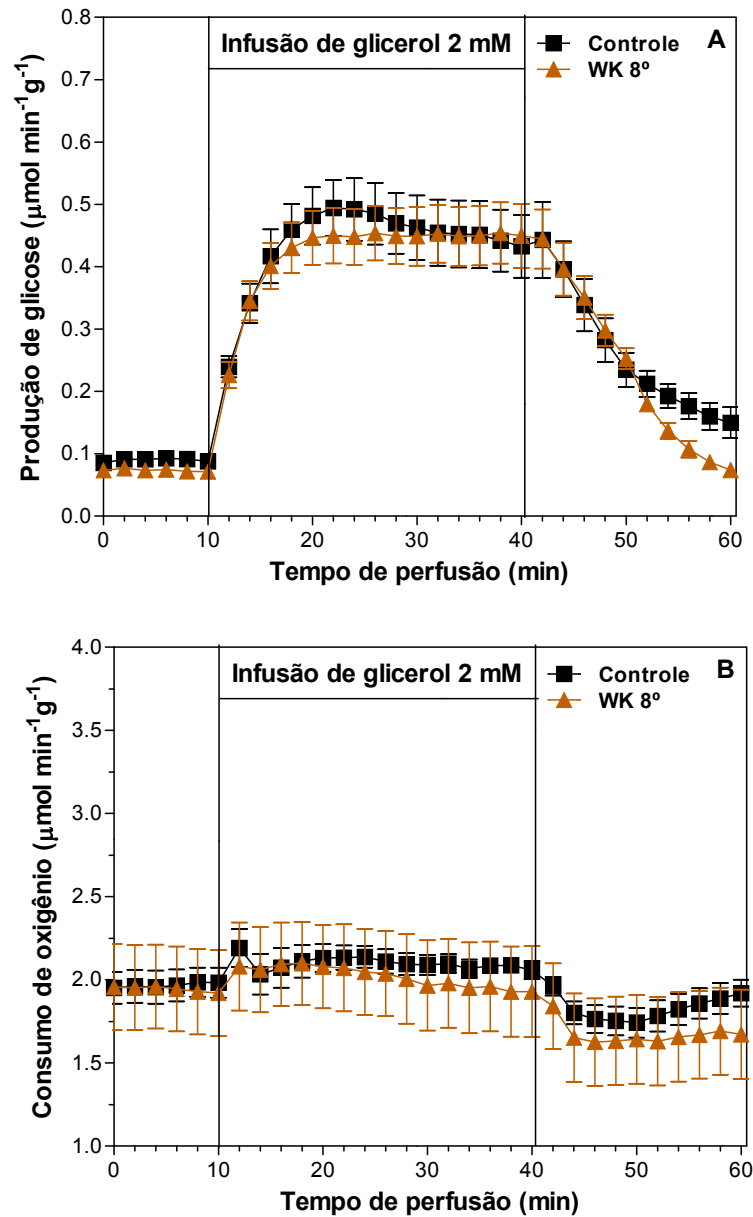
Tabela 8 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com L-lactato 5,5 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).

Variável	Controle	WK 8º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,616 \pm 0,078 (n=7)	0,610 \pm 0,078 (n=8)	---
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,758 \pm 0,114 (n=5)	0,716 \pm 0,115 (n=6)	---
Massa tumoral flanco (g)	---	11,553 \pm 0,409 (n=8)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	2,234 \pm 0,451 (n=8)	---
Massa tumoral total (g)	---	13,787 \pm 0,686 (n=8)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	19,862 \pm 2,572 (n=3)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 10. As massas tumorais do flanco, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 8º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de L-lactato e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de L-lactato). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

Figura 11 –Produção de glicose (A) e consumo de oxigênio (B) em fígados de ratos no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º) e controles durante a infusão de glicerol 2 mM.



Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicerol 2 mM foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

Tabela 9 - Taxas (Δ) de produção de glicose e de consumo de oxigênio em fígados submetidos à perfusão com glicerol 2 mM, de ratos controles e portadores de tumor Walker-256, no 8º dia de desenvolvimento tumoral (WK 8º).

Variável	Controle	WK 8º	% do controle
Δ Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,352 \pm 0,049 (n=5)	0,379 \pm 0,047 (n=5)	---
Δ Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0,094 \pm 0,060 (n=4)	0,043 \pm 0,057 (n=4)	---
Massa tumoral flanco (g)	---	10,872 \pm 1,325 (n=5)	---
Massa tumoral metástases (g)	---	1,193 \pm 0,200 (n=5)	---
Massa tumoral total (g)	---	12,066 \pm 1,450 (n=5)	---
Perda de massa corpórea (%)	---	17,769 \pm 1,567 (n=5)	---

Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* pelo protocolo experimental ilustrado na figura 11. As massas tumorais do flanco, das metástases e total e a perda de massa corpórea dos animais WK 8º também foram avaliadas.

As taxas (Δ) dos parâmetros metabólicos foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos nos últimos 6 minutos após a infusão de glicerol e os respectivos valores basais (obtidos nos últimos 4 minutos antes da infusão de glicerol). Valores representam a média \pm EPM. Diferenças entre as taxas dos grupos tumor Walker-256 e controle foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

4.3 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS SÉRICAS

O TNF α , a IL-1 β e a IL-6 foram indetectáveis no soro dos ratos portadores de tumor Walker-256 em todos os grupos analisados (WK 2º, WK 5º, WK 8º, WK 11º e WK 14º).

5 DISCUSSÃO

Apesar dos inúmeros estudos relacionados à caquexia no câncer o conhecimento das interações entre o tumor e o hospedeiro é ainda muito fragmentado (CRAVO *et al.*, 2000). Algumas informações disponíveis até o presente momento não são claras ou são controversas, evidenciando o alto grau de complexidade destas interações.

Há, por exemplo, informações de que a neoglicogênese estaria aumentada nos pacientes com câncer/caquexia o que proporcionaria maior liberação de glicose pelo fígado e conseqüente aumento no aporte de glicose pelas células tumorais (BONGAERTS *et al.*, 2006).

A neoglicogênese, dada pela taxa de conversão do glicerol marcado radioativamente (LUNDHOLM *et al.*, 1982), de alanina (WATERHOUSE *et al.*, 1979) ou de lactato (SHAPOT & BLINOV *apud* TISDALE, 1997) em glicose, foi aumentada em pacientes com câncer. Adicionalmente, a neoglicogênese a partir do lactato foi aumentada em estudos de perfusão de fígado de ratos portadores de tumor (SHEARER *et al.*, 1983) e há estudos demonstrando maior atividade da PEPCK em ratos com tumor (NOGUCHI *et al.*, 1989). Além disso, hepatócitos isolados de ratos portadores de tumor apresentaram maior neoglicogênese quando incubados com lactato, alanina (BLUMBERG *et al.*, 1993; ROH *et al.*, 1984) ou glutamina (FISCHER *et al.*, 1997).

Por outro lado, há estudos de perfusão de fígado evidenciando redução da neoglicogênese hepática a partir da alanina em ratos portadores de tumor Walker-256, no 14º dia de desenvolvimento tumoral (CORBELLO-PEREIRA, 2004). Similarmente, estudos de perfusão de fígado do nosso laboratório (CASSOLLA, 2008) mostraram diminuição da neoglicogênese, no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256, a partir de vários precursores de glicose (alanina, piruvato, lactato), mas não a partir do glicerol, e sugerem inibição na atividade de enzimas neoglicogênicas como a alanina aminotransferase, piruvato carboxilase e/ou a PEPCK (tabela 10). Liu e colaboradores (1990) também observaram diminuição da conversão da alanina em glicose em fígados de ratos portadores de adenocarcinoma mamário.

Tabela 10 – Neoglicogênese hepática e parâmetros relacionados ao longo do desenvolvimento do tumor/caquexia.

Precursor neoglicogênico	Variável	WK 5°	WK 8°	WK 12°
L-alanina 2,5 mM	Produção de glicose	< (38,81%)	< (54,05%)	< (55,81%)
	Consumo de oxigênio	< (53,17%)	< (50,00%)	< (69,44%)
	Produção de uréia	≥	≤	< (65,33%)
	Produção de piruvato	> (57,93%)	≤	< (43,66%)
	Produção de L-lactato	> (71,62%)	≤	≤
Piruvato 5 mM	Produção de glicose	< (29,02%)	< (25,06%)	< (41,67%)
	Consumo de oxigênio	≤	< (67,70%)	< (118,72%)
L-lactato 2 mM	Produção de glicose	< (59,30%)	< (30,73%)	< (28,94%)
	Consumo de oxigênio	< (45,23%)	< (42,44%)	< (49,31%)
L-lactato 5,5 mM	Produção de glicose	----	=	----
	Consumo de oxigênio	----	=	----
L-lactato 8 mM	Produção de glicose	----	----	=
	Consumo de oxigênio	----	----	=
Glicerol 2 mM	Produção de glicose	=	=	=
	Consumo de oxigênio	=	=	=

Comparação da produção de glicose, uréia, piruvato e L-lactato e consumo de oxigênio a partir de vários precursores neoglicogênicos (L-alanina, piruvato, L-lactato, glicerol) no 5°, 8° e 12° dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK) em relação aos respectivos controles.

Os símbolos < (menor), > (maior), = (igual), ≤ (tendência a ser menor) ou ≥ (tendência a ser maior) são em comparação aos respectivos controles.

Diante destes resultados aparentemente contraditórios e considerando que os mesmos possam ser decorrentes das análises nos diferentes estudos terem sido feitas em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral a proposta deste trabalho foi avaliar, em perfusão de fígado, a neoglicogênese a partir dos precursores alanina, piruvato, lactato e glicerol, em ratos portadores de caquexia induzida por tumor Walker-256, na fase inicial (5° dia) e intermediária (8° dia) do desenvolvimento tumoral.

Vale ressaltar que em todos os experimentos de perfusão de fígado os ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram perda de massa corpórea maior do que 10% (tabelas 1 a 9), confirmando a presença de caquexia nesses

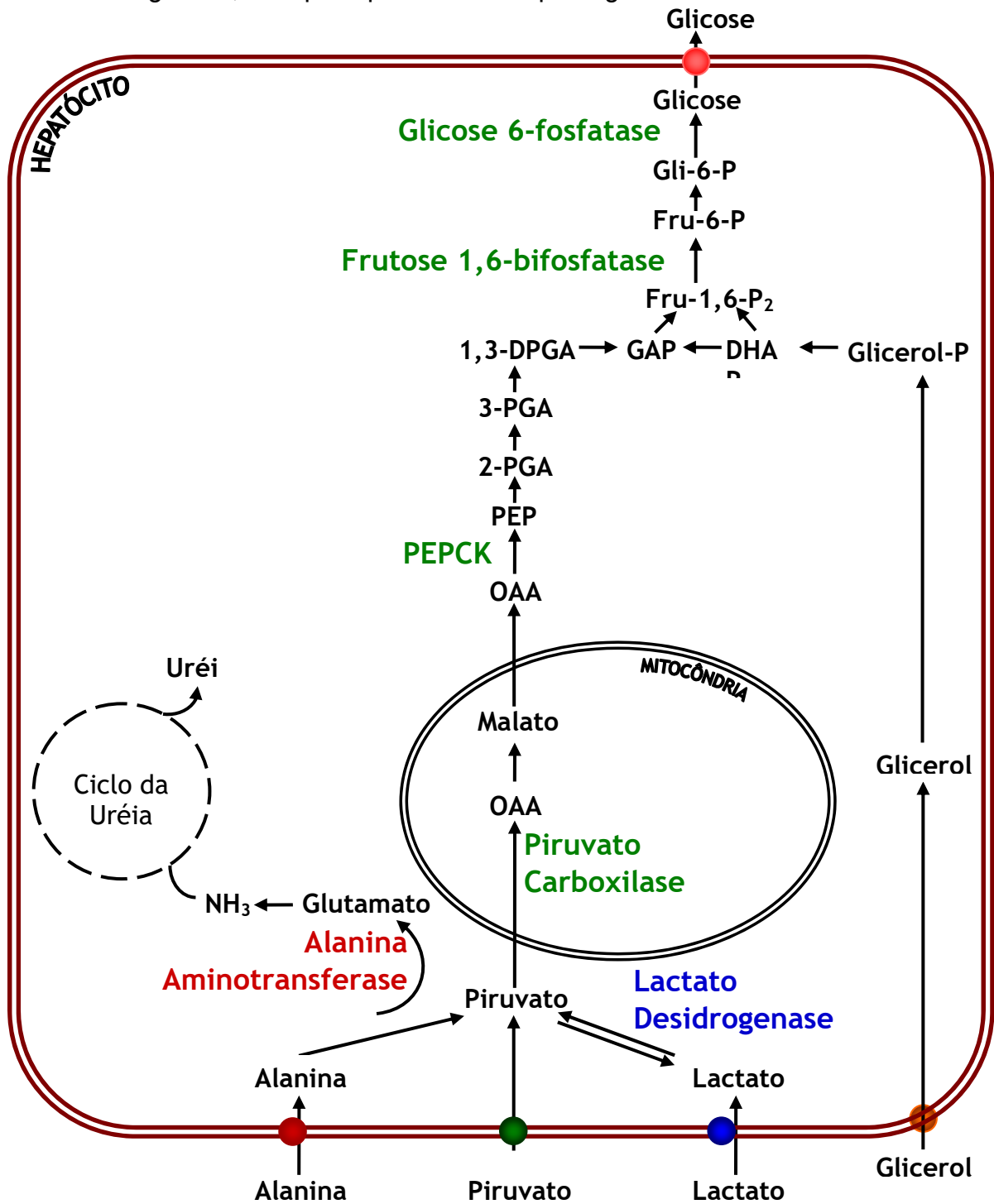
animais. A perda de massa corpórea média no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral foi de aproximadamente 13% e 18% respectivamente.

Inicialmente foi avaliada a neoglicogênese hepática a partir da alanina. Como ilustra a figura 12, a alanina captada pelo hepatócito é convertida a piruvato pela enzima desaminadora alanina aminotransferase, que transfere o NH_3 da porção amino da alanina ao α -cetoglutarato formando o glutamato. O glutamato, dentro da mitocôndria, libera o íon amônio utilizado na síntese da uréia. O piruvato formado é convertido em glicose, por uma série de reações catalisadas por enzimas, algumas das quais são reguladoras-chave da via como a piruvato carboxilase, PEPCK, frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase, ou pode ser convertido a lactato pela lactato desidrogenase (COOMES, 1997; SALWAY, 1994).

Assim, a infusão de alanina no fígado resulta em produção de glicose, piruvato, lactato e uréia (figuras 1, 2, 6 e 7). Parte da glicose formada é utilizada como fonte de energia para o fígado, visto que a própria via neoglicogênica necessita de ATP, através de metabolismo aeróbico, com aumento do consumo de oxigênio, o aceptor final de elétrons. Desse modo, a infusão hepática de qualquer precursor neoglicogênico aumenta, além da produção de glicose, o consumo de oxigênio (figuras 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 11).

Como esperado, em todos os experimentos de perfusão de fígado tanto no 5º como no 8º dia de desenvolvimento tumoral, o consumo de oxigênio acompanhou a produção hepática de glicose, exceto para a perfusão com piruvato no 5º dia de tumor onde a redução da neoglicogênese foi acompanhada apenas por tendência de redução do consumo de oxigênio (tabela 10).

Figura 12 – Neoglicogênese hepática pelos precursores alanina, piruvato, lactato e glicerol, e as principais enzimas que regulam a via



OAA, oxalacetato; Mal, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Glicerol-P, glicerol fosfato; Fru-1,6-P₂, frutose 1,6-bifosfato; Fru-6-P, frutose 6-fosfato; Gli-6-P, glicose 6-fosfato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (CASSOLLA, 2008).

Os resultados do presente trabalho evidenciaram, como nos estudos de Cassola (2008) realizados no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256,

inibição da neoglicogênese hepática no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral a partir da alanina 2,5 mM (figuras 1A e 6A). Com a infusão de alanina, ocorreu inibição de 38,81% e 54,05% na produção hepática de glicose respectivamente no 5º e 8º dia após a inoculação das células tumorais (tabela 10). A inibição observada por Cassolla (2008) no 12º dia de desenvolvimento tumoral foi de 55,81% (tabela 10).

No 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256, fígados submetidos à perfusão com alanina apresentaram aumento na produção de piruvato (57,93%) e lactato (71,62%) e tendência a aumento na produção de uréia (tabela 10). No entanto, no 8º dia de desenvolvimento tumoral, foi encontrada tendência à diminuição tanto na produção de piruvato, como de lactato e uréia a partir da alanina (tabela 10). No 12º dia de desenvolvimento tumoral, Cassolla (2008) observou diminuição na produção de piruvato (43,66%) e uréia (65,33%) e tendência à diminuição na produção de lactato (tabela 10).

Analisando-se em conjunto os resultados da produção hepática de glicose, piruvato, lactato e uréia a partir da alanina no 5º e 8º dia e também no 12º dia de tumor (tabela 10) pode-se inferir que a alanina aminotransferase não está inibida no 5º dia de tumor, uma vez que houve aumento na produção de piruvato e lactato e tendência a aumento na produção de uréia. Pode-se também levantar a hipótese de que a alanina aminotransferase começa a ser inibida próximo ao 8º dia de tumor, encontrando-se inibida no 12º dia de desenvolvimento tumoral.

Esses resultados corroboram aqueles encontrados por Corbello-Pereira e colaboradores (2004), ou seja, menor produção de glicose, uréia e lactato a partir da alanina, sugerindo inibição da alanina aminotransferase, no 14º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.

Baixas concentrações de alanina são encontradas no sangue de ratos com câncer (INCULET *et al.*, 1987), enquanto altas concentrações de alanina foram detectadas em fígados de animais portadores de tumor (RIVERA *et al.*, 1988), sugerindo captação elevada de alanina pelo fígado nesta condição. Este aumento da captação de alanina pode ser devido à ação do $TNF\alpha$ que em combinação com o glucagon estimulam o transporte de aminoácidos no fígado, como demonstrado por estudos em hepatócitos isolados (INOUE *et al.*, 1995). Uma vez que a captação de alanina não está diminuída em ratos portadores de tumor, a explicação para a inibição da neoglicogênese hepática a partir da alanina no 5º, 8º e 12º dia de tumor

pode estar, de fato, na redução da atividade das enzimas regulatórias da via neoglicogênica, ou ainda na diminuição da concentração hepática dessas enzimas.

Adicionalmente, quando o precursor neoglicogênico infundido no fígado foi o piruvato 5 mM, também ocorreu inibição da produção de glicose no 5º e 8º dia após a inoculação das células tumorais (figuras 3A e 8A). No 5º dia houve inibição de 29,02% e no 8º dia houve inibição de 25,06%. Dados anteriores obtidos no laboratório (CASSOLLA, 2008) mostraram inibição mais intensa (41,67%) no 12º dia de tumor (tabela 10). Estes resultados sugerem que outras enzimas que poderiam estar inibidas no fígado destes animais são a piruvato carboxilase, PEPCK, frutose 1,6-bifosfatase e/ou a glicose 6-Pase, como pode ser deduzido da análise da figura 12.

O menor grau de redução da neoglicogênese a partir do piruvato em relação ao encontrado pela alanina (tabela 10), no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral, reforça os achados anteriores de inibição da alanina aminotransferase nos animais portadores de tumor, como pode ser também deduzido da análise da figura 12. O mesmo acontece no 12º dia de tumor como observado por Cassolla (2008) (tabela 10).

Similarmente à infusão de piruvato, quando o precursor neoglicogênico foi o lactato 2 mM houve redução na produção de glicose no 5º (59,30%) e 8º (30,73%) dia de desenvolvimento tumoral (figuras 4A e 9A). Cassolla (2008) encontrou redução de 28,94% na produção de glicose no 12º dia de tumor (tabela 10).

Como as porcentagens de inibição da produção hepática de glicose a partir do lactato 2 mM foi maior do que a partir do piruvato 5 mM no 5º dia de tumor, pode-se sugerir (figura 12) diminuição na captação hepática de lactato e/ou inibição da lactato desidrogenase hepática neste estágio de desenvolvimento tumoral. Estas alterações foram amenizadas no 8º e 12º dia de tumor.

O lactato é um importante substrato neoglicogênico e suas concentrações plasmáticas foram crescentes ao longo do desenvolvimento do tumor Walker-256, estando correlacionadas com o tamanho da massa tumoral e grau de caquexia. Dados do laboratório (CASSOLLA, 2008) demonstraram que enquanto a concentração de lactato plasmático de animais saudáveis é de aproximadamente 2 mM a dos animais portadores de tumor foram próximas a 5,5 mM (8º dia), 8 mM

(12º dia) e 9,5 mM (14º dia) correspondendo respectivamente a aumentos de 128%, 218% e 282%.

Como a capacidade do fígado para responder a um substrato neoglicogênico *in vivo* depende, entre outros fatores, da concentração plasmática do precursor (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004), perfusões de fígado no grupo WK 8º e controle foram realizadas a partir do lactato 5,5 mM, com a finalidade de se mimetizar as condições fisiológicas dos animais portadores de tumor.

Os fígados dos animais do grupo controle responderam sempre de forma semelhante quando submetidos à perfusão com lactato 2 mM, 5,5 mM (figuras 9 e 10) ou 8 mM (CASSOLLA, 2008), confirmando que a concentração de 2 mM já é saturante para a produção hepática de glicose nos animais saudáveis. Entretanto, enquanto no 8º dia de tumor houve redução da produção hepática de glicose a partir do lactato 2 mM, a produção de glicose foi semelhante a do controle quando os fígados foram perfundidos com lactato 5,5 mM, como se a via fosse restaurada pela maior concentração de substrato.

Estudos anteriores (CASSOLLA, 2008) também mostraram que fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 no 12º dia apresentaram redução da neoglicogênese a partir do lactato 2 mM, mas não do lactato 8 mM (tabela 10). De forma similar, em outros estudos (VEIGA *et al.*, 2008) a neoglicogênese a partir do lactato mais piruvato (2/0,2 mM) foi menor nos animais portadores de tumor, no 14º dia, e a elevação das concentrações de lactato/piruvato para 6/0,3 mM produziu redução na diferença entre o grupo portador de tumor e controle.

Em conjunto, estes resultados indicam alteração da concentração saturante de lactato para produção de glicose em fígados de animais portadores de tumor Walker-256. É possível que isto seja decorrente do aumento da captação hepática de lactato ao longo do processo de desenvolvimento tumoral, ou seja, fatores produzidos no estado portador de tumor, como as citocinas, poderiam estar promovendo um aumento crescente da captação de lactato pelo fígado e isto poderia atenuar a redução da neoglicogênese decorrente da inibição das enzimas regulatórias.

Finalmente, quando o precursor neoglicogênico utilizado foi o glicerol, não houve diferenças na produção de glicose e no consumo de oxigênio nos animais no 5º e 8º dia de desenvolvimento do tumor, em relação aos seus respectivos controles (figuras 5A e 11A, tabela 10). Estes resultados, juntamente

com os citados anteriormente, sugerem que enzimas regulatórias da neoglicogênese hepática como a alanina aminotransferase, a piruvato carboxilase e/ou a PEPCK possam estar inibidas no estado portador de tumor, mas não as enzimas que catalisam reações posteriores à entrada do glicerol (frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase) (figura 14). A atividade da piruvato carboxilase foi consideravelmente reduzida em hepatomas humanos e em hepatomas de ratos em um estudo conduzido por Hammond e colaboradores (1978).

Apesar de o glicerol não contribuir muito para a produção de glicose, contribuição de somente 3% para a produção da glicose total (LUNDHOLM, 1982), diante da inibição da neoglicogênese a partir de outros precursores, este substrato pode ter um papel relevante no impedimento de hipoglicemia acentuada e contribuir para manutenção da vida do portador de tumor.

A procura dos agentes que causam mudanças na neoglicogênese hepática tem sido concentrada nas citocinas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$ e as interleucinas, em pacientes e animais com câncer (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006). Altas concentrações de $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6 têm sido encontradas em alguns pacientes com câncer e os níveis circulantes destas citocinas parecem correlacionar com a progressão do tumor (FEARON *et al.*, 1991; MANTOVANI *et al.*, 2000; MATTHYS & BILLIAU, 1997; MOLDAWER *et al.*, 1992; NOGUCHI *et al.*, 1996; YANAGAWA *et al.*, 1995).

Entretanto, no presente estudo, a concentração sérica de $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 foram indetectáveis ao longo do processo de desenvolvimento do tumor Walker-256. Como o $TNF\alpha$ e as interleucinas IL-1 β e IL-6 são considerados importantes mediadores da caquexia, é possível que estas citocinas possam ser produzidas localmente nos tecidos, atuando como mediadores autócrinos/parácrinos (TISDALE, 1997) e, desse modo, promovendo muitas das alterações metabólicas observadas na caquexia associada ao câncer, como inibição da neoglicogênese hepática.

Um trabalho realizado por Caton e colaboradores (2009) mostrou que a administração de lipolissacarídeo em ratos, condição que leva ao aumento de $TNF\alpha$, reduziu o RNAm e a atividade da PEPCK mitocondrial hepática e aumentou os níveis de RNAm da PEPCK citosólica hepática, no entanto a atividade da mesma permaneceu inalterada. Nesse mesmo trabalho (CATON *et al.*, 2009), foi

demonstrado em cultura de hepatócitos aumento da produção de glicose a partir do lactato, porém quando os hepatócitos foram incubados simultaneamente com lactato e TNF α , houve redução na produção de glicose, diminuição da concentração de RNAm da PEPCK mitocondrial e de sua atividade, e não alteração da concentração de RNAm da PEPCK citosólica e de sua atividade. Além disso, foi observado que a administração de TNF α diminui a atividade da PEPCK, a qual foi associada à redução da sua taxa de transcrição (METZGER *et al.*, 1997).

Outros estudos demonstraram que o TNF α , em baixas doses (18 μ g/Kg), diminuiu a expressão da PEPCK em camundongos (HILL & MCCALLUM *apud* KELMER-BRACHT *et al.*, 2006), um efeito que pode estar relacionado com a redução da neoglicogênese hepática. Em concordância, Kelmer-Bracht e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de baixas doses de TNF α e IL-1 β , isoladamente (10 μ g/Kg) ou simultaneamente (5 μ g/Kg de cada citocina), inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina em ratos, reproduzindo as alterações observadas nos ratos portadores de tumor de Walker-256. Porém, Blumberg e colaboradores (1995b) observaram que a injeção de altas doses de TNF α (250 μ g/Kg) aumentou a neoglicogênese da alanina em hepatócitos isolados. Estes dados aparentemente contraditórios permitem inferir que o tipo de efeito das citocinas na neoglicogênese, estimulatório ou inibitório, pode ser dependente da sua concentração circulante.

Em relação aos efeitos da IL-1 β na neoglicogênese hepática, foi verificado que camundongos portadores de tumor secretor de IL-1 β tiveram as atividades das enzimas-chave da neoglicogênese, PEPCK e glicose 6-Pase, diminuídas, assim como seus níveis de RNAm (METZGER *et al.*, 2004). A administração de baixas doses de IL-1 β inibiu a neoglicogênese hepática a partir do precursor alanina em estudos de perfusão de fígado (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006) e a adição de IL-1 β e IL-10 em cultura de hepatócitos reduziu a atividade da PEPCK e inibiu a produção de glicose (YERKOVICH *et al.*, 2004).

Em contraste com estas evidências, Blumberg e colaboradores (1995a) observaram que a IL-6 aumentou a neoglicogênese em hepatócitos de ratos incubados por 24 horas.

Embora os nossos resultados demonstram que a capacidade neoglicogênica hepática, a partir de vários precursores de glicose (alanina, piruvato

ou lactato 2 mM), encontra-se reduzida em ratos portadores de tumor Walker-256, deve-se levar em consideração que os estudos foram realizados em perfusão de fígado *in situ*, uma técnica onde o fígado é isolado da circulação. É preciso considerar que *in vivo* o fígado pode sofrer influência de fatores circulatórios, alterados no estado portador do tumor, que poderiam afetar a neoglicogênese.

Sabe-se que a neoglicogênese depende: a) da disponibilidade de precursores neoglicogênicos para o fígado (VEIGA *et al.*, 2008); b) da taxa de captação de substratos neoglicogênicos (RIVERA *et al.*, 1988); c) da atividade e/ou concentração das enzimas-chave da neoglicogênese (NOGUCHI *et al.*, 1989); e d) do fornecimento de NADH e ATP.

Na caquexia do câncer ocorre depleção de massa muscular e tecido adiposo e os aminoácidos neoglicogênicos e glicerol liberados, respectivamente destes tecidos no sangue, são utilizados como precursores da síntese de glicose no fígado (BARACOS, 2000; MacDONALD, 2000). De modo semelhante, o lactato proveniente do metabolismo anaeróbico da célula tumoral, onde é produzido em grande quantidade, é liberado no sangue e convertido em glicose no fígado (BONGAERTS *et al.*, 2006). Assim, por aumento da disponibilidade de precursores de glicose, a neoglicogênese hepática poderia estar aumentada em portadores de câncer/caquexia.

A maior concentração de ácido graxo livre (MLINAR *et al.*, 2007; CASSOLLA, 2008) e o aumento da razão glucagon/insulina (LEIJ-HALFWERK *et al.*, 2000) em portadores de câncer, também são fatores que poderiam contribuir para o aumento da neoglicogênese neste estado patológico.

Um aumento nos ácidos graxos plasmáticos nos portadores de tumor (MLINAR *et al.*, 2007; CASSOLLA, 2008), resultante da ação do LMF e de citocinas estimuladoras da lipólise (TISDALE, 1997, 2003 & 2004), e conseqüentemente da sua oxidação hepática, poderia estimular a neoglicogênese (MLINAR *et al.*, 2007) pela maior geração de: a) acetil-CoA, a qual ativa a piruvato carboxilase e PEPCK; b) NADH, que favorece a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; c) ATP, que é usado como fonte de energia na neoglicogênese; e d) citrato, que favorece a transformação de frutose 1,6-bifosfato em frutose 6-fosfato (LAM *et al.*, 2003; VEIGA *et al.*, 2008). De fato, a inibição da neoglicogênese a partir do lactato+piruvato em ratos portadores de tumor Walker-256 foi praticamente

normalizada quando os fígados dos animais foram submetidos à perfusão com lactato+piruvato+ácido graxo (VEIGA *et al.*, 2008).

É sabido que o aumento da razão glucagon/insulina pode estimular as enzimas regulatórias da neoglicogênese (YOUNES & NOGUCHI, 2000). O glucagon, por exemplo, aumenta a síntese de PEPCK e a insulina diminui (YOUNES & NOGUCHI, 2000). Animais portadores de tumor mostraram concentrações plasmáticas de glucagon aumentadas e de insulina diminuídas (INCULET *et al.*, 1987). Em concordância, ilhotas de Langerhans isoladas de ratos caquéticos portadores de tumor Walker-256 secretaram menos insulina em resposta à glicose (FERNANDES, 1990). Adicionalmente, a razão glucagon/insulina foi observada alta em pacientes com câncer de pulmão com perda de peso quando comparada com a de pacientes com câncer de pulmão sem perda de peso (LEIJ-HALFWERK *et al.*, 2000). A hiperglucagonemia e a hipoinsulinemia podem ser a alteração hormonal mais importante relacionada às mudanças do metabolismo de carboidratos em portadores de tumor (BARTLETT *et al.*, 1995).

Portanto, *in vivo*, o efeito estimulatório do aumento dos ácidos graxos circulantes e da maior razão glucagon/insulina sobre a neoglicogênese hepática poderia sobrepor ao efeito inibitório, por exemplo, das citocinas nesta via metabólica e isto poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento da neoglicogênese relatada em indivíduos com câncer.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- O tumor Walker-256 induziu eficazmente o estado de caquexia nos ratos no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral.
- Houve inibição da produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir dos precursores alanina 2,5 mM, piruvato 5 mM ou lactato 2 mM, mas não a partir do glicerol 2 mM, no 5º e 8º dia de desenvolvimento tumoral. Estes resultados, juntamente com os de produção hepática de lactato, piruvato e uréia a partir da alanina, permitem sugerir que houve inibição de enzimas regulatórias da neoglicogênese, como a piruvato carboxilase e/ou PEPCK (no 5º e 8º dia de tumor) e tendência de inibição da alanina aminotransferase (no 8º dia de tumor), mas não houve inibição das enzimas que catalisam reações posteriores à entrada do glicerol (frutose 1,6-bifosfatase e G-6-Pase), nos ratos portadores de tumor.
- Diferentemente da redução da neoglicogênese a partir do lactato 2 mM, não houve inibição da neoglicogênese hepática a partir do lactato 5,5 mM no 8º dia de desenvolvimento tumoral, indicando alteração da concentração saturante de lactato para a produção de glicose em fígados de animais portadores de tumor. Portanto, é possível que a concentração mais elevada de lactato nos animais com tumor contribua para o impedimento de hipoglicemia acentuada e, portanto para a manutenção da vida do hospedeiro portador de tumor.
- O TNF α , a IL-1 β e a IL-6 não foram detectáveis no soro dos animais no 2º, 5º, 8º, 11º e 14º dia de tumor. Provavelmente, estas citocinas, produzidas no fígado e em outros tecidos, atuam como mediadores autócrinos/parácrinos e, desse modo, promovem muitas das alterações metabólicas observadas na caquexia associada ao tumor Walker-256, entre as quais a inibição da neoglicogênese hepática, por redução da expressão e/ou atividade de enzimas regulatórias da neoglicogênese.

Em síntese, este trabalho mostrou inibição da neoglicogênese em perfusão de fígado *in situ* na caquexia associada ao câncer, acrescentando conhecimento científico, principalmente porque não há estudos em que a neoglicogênese hepática e os parâmetros metabólicos relacionados foram avaliados ao longo do desenvolvimento da caquexia, particularmente a induzida por tumor Walker-256.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.; VICTOR, M. **Asthenia**. Principles of Neurology. New York: McGraw-Hill, 1981. p.341–345.
- ARGILÉS, J.M.; AZCÓN-BIETO, J. The metabolic environment of cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 81: 3-17, 1988.
- ARGILÉS, J.M.; GARCIA-MARTÍNEZ, C.; LLOVERA, M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. The role of cytokines in muscle wasting: Its relation with cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, 12(6): 637-652, 1992.
- ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, 17(5): 477-498, 1997.
- ARGILÉS, J.M.; MEIJSING, S.H.; PALLARES-TRUJILLO, J.; GUIRAO, X.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia: a therapeutic approach. **Medicinal Research Reviews**, 21(1): 83-101, 2001.
- ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 6: 401–406, 2003.
- ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; MOORE-CARRASCO, R.; FIGUERAS, M.; ALMENDRO, V.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Targets in clinical oncology: the metabolic environment of the patient. **Frontiers in Bioscience**, 12: 3024-3051, 2007.
- ARIAS, J-I.; ALLER, M-A.; ARIAS, J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. **Molecular Cancer**, 6: 29-40, 2007.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of Medicine**, 27(7): 435-438, 1995.
- BARACOS, V.E. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition**, 16: 1015-1018, 2000.
- BARTLETT, D.L.; CHARLAND, S.L.; TOROSIAN, M.H. Reversal of tumor-associated hyperglucagonemia as treatment for cancer cachexia. **Surgery**, 118(1): 87-97, 1995.
- BARTON, B.E. IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation. **Immunologic Research**, 23(1): 41-58, 2001.
- BERG, M.; FRAKER, D.L.; ALEXANDER, H.R. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**, 6(4): 425–432, 1994.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. **Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase**. In: BERGMEYER, H.U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, New York: Academic Press, 1974. p. 1205-1215.

BEUTLER, B.; MAHONEY, J.; LE TRANG, N.; PEKALA, P.; CERAMI, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, 161(5): 984-995, 1985.

BLUMBERG D.; BURT M.E.; KHER U.; BRENNAN M.F. Tolbutamide inhibits gluconeogenesis in the tumor-influenced hepatocyte. **The Journal of Surgical Research**, 55(5):565-569, 1993.

BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BRENNAN, M.F.; BURT, M. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. **Metabolism: clinical and experimental**, 44(2): 145-146, 1995a.

BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BURT, M.; DONNER, D.; BRENNAN, M.F. Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine *in vivo*. **Journal of Surgical Oncology**, 59(4): 220-224, 1995b.

BONGAERTS, G.P.; VAN HALTEREN, H.K.; VERHAGEN, C.A.; WAGENER, D.J. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Medical Hypotheses**, 67(5): 1213-1222, 2006.

BRAHIMI-HORN, M.C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Current Opinion in Cell Biology**, 19(2): 223-229, 2007.

CASSOLLA, P. **Alterações metabólicas na caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos: anormalidades de parâmetros plasmáticos e hepáticos**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

CATON, P.W.; NAYUNI, N.K.; MURCH, O.; CORDER, R. Endotoxin induced hyperlactatemia and hypoglycemia is linked to decreased mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Life Sciences**, 84: 738–744, 2009.

COOMES, M.W. **Amino acid metabolism**. In: DEVLIN, T.M. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. p.445-488.

CORBELO-PEREIRA, S.R.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; SILVA, M.H.R.A.; YAMAMOTO, N.S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1688(3): 187-196, 2004.

CRAVO, M.L.; GLÓRIA, L.M.; CLARO, I. Metabolic responses to tumour disease and progression: tumour-host interaction. **Clinical Nutrition**, 19(6): 459-465, 2000.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. **Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate**. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, 1974. p.1446-1448.

DANG, C.V.; SEMENZA, G.L. Oncogenic alterations of metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, 24(2): 68–72, 1999.

DeWYS, W. Management of cancer cachexia. **Seminars in Oncology**, 12(4): 452-460, 1985.

- FEARON, K.C.; McMILLAN, D.C.; PRESTON, T.; WINSTANLEY, F.P.; CRUICKSHANK, A.M.; SHENKIN, A. Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute-phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer. **Annals of Surgery**, 213(1): 26-31, 1991.
- FERNANDES, L.C.; MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **The American Journal of Physiology**, 258(6 Pt 1): E1033-10366, 1990.
- FISCHER C.P.; BODE B.P.; HURLEY B.P.; SOUBA W.W. Alterations in oxidative metabolism and glutamine transport support glucose production in the tumor-influenced hepatocyte. **The Journal of Surgical Research**, 69(2): 379-384, 1997.
- GELIN, J.; MOLDAWER, L.L.; LÖNNROTH, C.; SHERRY, B.; CHIZZONITE, R.; LUNDHOLM, K. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. **Cancer Research**, 51(1): 415-421, 1991.
- GOODLAD, G.A.; RAYMOND, M.J. The action of the Walker-256 carcinoma and toxohormone on amino acid incorporation into diaphragm protein. **European Journal of Cancer**, 9(2): 139-145, 1973.
- GUTMANN, I.; BERGMAYER, H.U. **Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite**. In: BERGMAYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 1974. p.1790-1798.
- GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. **Determination with lactate dehydrogenase and NAD**. In: BERGMAYER H.U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, New York: Academic Press, 1974. p.1464-1472.
- HAMMOND, K.D.; BALINSKY, D. Activities of key gluconeogenic enzymes and glycogen synthase in rat and human livers, hepatomas, and hepatoma cell cultures. **Cancer Research**, 38(5): 1317-1322, 1978.
- HARVEY, K.B.; BOTHE, A.Jr.; BLACKBURN, G.L. Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. **Cancer**, 43: 2065-2069, 1979.
- HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H.M.; MULLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **The Biochemical Journal**, 374: 1-20, 2003.
- HOLROYDE, C.P.; REICHARD, G.A. Carbohydrate metabolism in cancer cachexia. **Cancer Treatment Reports**, 65(5): 55-59, 1981.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**, 94 p. Rio de Janeiro: 2007.
- INCULET, R.I.; PEACOCK, J.L.; GORSCHBOTH, C.M.; NORTON, J.A. Gluconeogenesis in the tumor-influenced rat hepatocyte: importance of tumor burden, lactate, insulin, and glucagon. **Journal of the National Cancer Institute**, 79(5):1039-1046, 1987.

INOUE, Y.; BODE, B.P.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Enhanced hepatic amino acid transport in tumor-bearing rats is partially blocked by antibody to tumor necrosis factor. **Cancer research**, 55(16): 3525-3530, 1995.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: Are neuropeptides the key? **Cancer Research**, 59(18): 4493-4501, 1999.

INUI, A.; MEGUID, M.M. Cachexia and obesity: two sides of one coin? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 6(4): 395-399, 2003.

KELMER-BRACHT, A.M.; ISHII, E.L.; ANDRADE, P.V.M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 27(4): 419-438, 1984.

KELMER-BRACHT, A.M. **Efeitos metabólicos e transporte do ácido niflúmico no fígado de rato**. Tese-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

KELMER-BRACHT, A.M.; BROETTO-BIAZON, A.C.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; BRACHT, A. Low doses of tumour necrosis factor α and interleukin 1β diminish hepatic gluconeogenesis from alanine *in vivo*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 99(5): 335-339, 2006.

LAM, T.K.; CARPENTIER, A.; LEWIS, G.F.; VAN DE WERVE, G.; FANTUS, I.G.; GIACCA, A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, 284(5): E863-E873, 2003.

LANGSTEIN H.N.; NORTON, J.A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 5(1): 103-123, 1991.

LEIJ-HALFWERK, S.; VAN DEN BERG, J.W.O.; SIJENS, P.E.; WILSON, J.H.P.; OUDKERK, M.; DAGNELIE, P.C. Altered hepatic gluconeogenesis during L-alanine infusion in weight-losing lung cancer patients as observed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy and turnover measurements. **Cancer Research**, 60(3): 618-623, 2000.

LIU, K.J.; HENDERSON, T.O.; KLEPS, R.A.; REYES, M.C.; NYHUS, L.M. Gluconeogenesis in the liver of tumor rats. **The Journal of Surgical Research**, 49(2):179-185, 1990.

LOBERG, R.D.; BRADLEY, D.A.; TOMLINS, S.A.; CHINNAIYAN, A.M.; PIENTA, K.J. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 57(4): 225-241, 2007.

LUNDHOLM, K.; EDSTROM, S.; KARLBERG, I.; EKMAN, L.; SCHERSTEN, T. Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer**, 50(6): 1142-1150, 1982.

MacDONALD, N. Workshop summary and conclusions. **Nutrition**. 16: 1019-1020. 2000.

MacDOUGALD, O.A.; MANDRUP, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 13(1): 5-11, 2002.

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MURA, L.; MASSA, E.; MUDU, M.C.; MULAS, C.; LUSSO, M.R.; MADEDDU C.; DESSÌ, A. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. **Journal of Molecular Medicine**, 78(10): 554-561, 2000.

MARTIGNONI, M.E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer**, 2(1): 36, 2003.

MATSUMOTO, Y.; ITO, Y.; HAYASHI, I.; MAJIMA, M.; ISHII, K.I.; KATAGIRI, H.; KAKITA, A. Effect of FR167653, a novel inhibitor of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synthesis on lipopolysaccharide-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. **Shock**, 17(5): 411-415, 2002.

MATTHYS, P.; BILLIAU, A. Cytokines and cachexia. **Nutrition**, 13: 763-770, 1997.

MAZUREK, S.; ZWERSCHKE, W.; JANSEN-DURR, P.; EIGENBRODT, E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. **Oncogene**, 20(47): 6891-6898, 2001.

METZGER, S.; BEGLEIBTER, N.; BARASH, V.; DRIZE, O.; PERETZ, T.; SHILONI, E.; CHAJEK-SHAUL, T. Tumor necrosis factor inhibits the transcriptional rate of glucose-6-phosphatase *in vivo* and *in vitro*. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 46(5): 579-583, 1997.

METZGER, S.; NUSAIR, S.; PLANER, D.; BARASH, V.; PAPPO, O.; SHILYANSKY, J.; CHAJEK-SHAUL, T. Inhibition of hepatic gluconeogenesis and enhanced glucose uptake contribute to the development of hypoglycemia in mice bearing interleukin-1 β -secreting tumor. **Endocrinology**, 145(11): 5150-5156, 2004.

MLINAR, B.; MARC, J.; JANEŽ, A.; PFEIFER, M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica Chimica Acta**, 375: 20-35, 2007.

MOLDAWER, L.L.; ROGY, M.A.; LOWRY, S.E. The role of cytokines in cancer cachexia. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 16: 43-49, 1992.

MORAES, M.O.; FONTELES, M.C.; MORAES, M.E.A.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Screening for anticancer activity of plants from the northeast of Brazil. **Fitoterapia**, 68(3): 235-240, 1997.

MORLEY, J.E.; THOMAS, D.R.; WILSON, M.M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 83(4): 735-743, 2006.

NETO, J.C.B.; FRANZI, S.A.; CARVALHO, M.B.; GUEDES, A.L. Fisiopatologia e tratamento da caquexia neoplásica. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, 15: 26, 2001.

NIJSTEN, M.W.; DE GROOT, E.R.; TEN DUIS, H.J.; KLASSEN, H.J.; HACK, C.E.; AARDEN, L.A. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. **Lancet**, 2: 921, 1987.

NIXON, D.W.; HEYMSFIELD, S.B.; COHEN, A.E.; KUTNER, M.H.; ANSLEY, J.; LAWSON, D.H.; RUDMAN, D. Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. **The American Journal of Medicine**, 68(5): 683-690, 1980.

NOGUCHI, Y.; VYDELINGUM, N.A.; BRENNAN, M.F. The reversal of increased gluconeogenesis in the tumor-bearing rat by tumor removal and food intake. **Surgery**, 106(2): 423-430, 1989.

NOGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; MATSUMOTO, A.; SVANINGER, G.; GELIN, J. Are cytokines possible mediators of cancer cachexia? **Surgery Today**, 26(7): 467-475, 1996.

OLIVEIRA, P.F.M.; HENRIQUES, I.A.; RODRIGUES-FILHO, F.; ALMEIDA, P.R.C.; MORAES, M.O. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 13(4): 243-248, 1998.

ORTEGA, A.D.; SÁNCHEZ-ARAGÓ, M.; GINER-SÁNCHEZ, D.; SÁNCHEZ-CENIZO, L.; WILLERS, I.; CUEZVA, J.M. Glucose avidity of carcinomas. **Cancer Letters**, 276(2): 125-135, 2009.

PERLMUTTER, D.H.; DINARELLO, C.A.; PUNSAL, P.I.; COLTEN, H.R. Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. **The Journal of Clinical Investigation**, 78(5): 1349-1354, 1986.

PIFFAR, P.M.; FERNANDEZ, R.; TCHAIKOVSKI, O.; HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; PINTO, G.J.; JAKOBI, S.; GOBBO-BORDON, D.; ROHN, T.V.; FABRÍCIO, V.E.; MORETTO, K.D.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Letters**, 201(2): 139-148, 2003.

PLATA-SALAMÁN, C.R. Anorexia during acute and chronic disease. **Nutrition**, 12(2): 69-78, 1996.

PLATA-SALAMÁN, C.R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. **Nutrition**, 16(10): 1009-1012, 2000.

PRINS J.B.; NIESLER, C.U.; WINTERFORD, C.M.; BRIGHT, N.A.; SIDDLE, K.; O'RAHILLY, S.; WALKER, N.I.; CAMERON, D.P. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. **Diabetes**, 46(12): 1939-1944, 1997.

RAMOS, E.J.; SUZUKI, S.; MARKS, D.; INUI, A.; ASAKAWA, A.; MEGUID, M.M. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 7(4): 427-434, 2004.

RIVERA, S.; AZCÓN-BIETO, J.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; MIRALPEIX, M.; ARGILÉS, J.M. Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. **Biochemical Journal**, 249(2): 443-449, 1988.

- ROH, M.S.; EKMAN, L.; JEEVANANDAM, M.; BRENNAN, M.F. Gluconeogenesis in tumor-influenced hepatocytes. **Surgery**, 96(2):427-434, 1984.
- RUBIN, H. Cancer Cachexia: its correlations and causes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(9): 5384-5389, 2003.
- SALWAY, J.G. **Metabolism at a Glance**. London: Blackwell Science Ltd, 1994. p.52-71.
- SCHÜMANN, J.; WOLF, D.; PAHL, A.; BRUNE, K.; PAPADOPOULOS, T.; ROOIJEN, N.V.; TIEGS, G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. **American Journal of Pathology**, 157: 1671-1683, 2000.
- SENN, J.J.; KLOVER, P.J.; NOWAK, I.A.; ZIMMERS, T.A.; KONIARIS, L.G.; FURLANETTO, R.W.; MOONEY, R.A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 278(16): 13740-13746, 2003.
- SHAW, R.J. Glucose metabolism and cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, 18(6): 598-608, 2006.
- SHEARER, J.; CALDWELL, M.; CROSBY, L.O.; MILLER, E.; BUZBY, G.P.; MULLEN, J.L. Tumor effects on gluconeogenesis in the isolated perfused rat liver. **Journal of parenteral and enteral nutrition**, 7(2): 105-109, 1983.
- SKIPWORTH, R.J.E.; STEWART, G.D.; DEJONG, C.H.C.; PRESTON, T.; FEARON, K.C.H. Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction? **Clinical Nutrition**, 26(6): 667-676, 2007.
- STERNBERG, E.M. Neural-immune interactions in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 100(11): 2641-2647, 1997.
- STRASSMANN G.; KAMBAYASHI T. Inhibition of experimental cancer cachexia by anti-cytokine and anti-cytokine-receptor therapy. **Cytokines and Molecular Therapy**, 1(2): 107-113, 1995.
- TIJERINA, A.J. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. **Dimensions of Critical Care Nursing**, 23(6): 237-243, 2004.
- TISDALE, M.J. Cancer Cachexia. **Anticancer Drugs**, 4: 115-125, 1993.
- TISDALE, M.J. Biology of cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, 89(23): 1762-1773, 1997.
- TISDALE, M.J. Wasting in cancer. **The Journal of Nutrition**, 129: 243S-246S, 1999.
- TISDALE, M.J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, 16(10): 1013-1014, 2000.
- TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, 17: 438-442, 2001.

TISDALE, M.J. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews Cancer**, 2: 862-871, 2002.

TISDALE, M.J. Pathogenesis of cancer cachexia. **The Journal of supportive oncology**, 1: 159-168, 2003.

TISDALE, M.J. Tumor-host interactions. **Journal of Cellular Biochemistry**, 93(5): 871-877, 2004.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, 20: 340-348, 2005.

TRAN-THI, T.A.; WEINHOLD, L.; WEINSTOCK, C.; HOFFMANN, R.; SCHULZE-SPECKING, A.; NORTHOFF, H.; DECKER, K. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in the perfused rat liver. **European Cytokine Network**, 4(5): 363-370, 1993.

TREDGET, E.E.; YU, Y.M.; ZHONG, S.; BURINI, R.; OKUSAWA, S.; GELFAND, J.A.; DINARELLO, C.A.; YOUNG, V.R.; BURKE, J.F. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. **The American Journal of Physiology**, 255: E760-E768, 1988.

VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C.; SCHJERLING, P.; HISCOCK, N.; MØLLER, K.; SALTIN, B.; FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 88(7): 3005-3010, 2003.

VEIGA, R.P.; SILVA, M.H.R.A.; TEODORO, G.R.; YAMAMOTO, N.S.; CONSTANTIN, J. BRACHT, A. Metabolic fluxes in the liver of rats bearing the Walker-256 tumour: influence of the circulating levels of substrates and fatty acids. **Cell Biochemistry and Function**, 26(1): 51-63, 2008.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, 22: 342-350, 2002a.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; STECANELLA, L. A.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology**, 8: 175-182, 2002b.

WARNE, J.P. Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass. **The Journal of Endocrinology**, 177: 351-355, 2003.

WATERHOUSE, C.; JEANPRETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from Alanine in Patients with Progressive Malignant Disease. **Cancer Research**, 39: 1968-1972, 1979.

YANAGAWA, H.; SONE, S.; TAKAHASHI, I.; HAKU, T. YANO, S.; SHINOHARA, T.; OGURA, T. Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. **British Journal of Cancer**, 71: 1095-1098, 1995.

YERKOVICH, S.T.; RIGBY, P.J.; FOURNIER, P.A.; OLYNYK, J.K.; YEOH, G.C. Kupffer cell cytokines interleukin-1 β and interleukin-10 combine to inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cultured hepatocytes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36(8):1462-1472, 2004.

YOUNES, R.N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Revista do Hospital das Clínicas**, 55(5):181-193, 2000.

ZENTELLA, A.; MANOGUE, K.; CERAMI, A. Cachetin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. **Cytokine**, 5(5): 436-447, 1993.