



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIULIANA REGINA BIAZI

**RESPOSTA HEPÁTICA AO GLUCAGON, A AGONISTAS
ADRENÉRGICOS E AO AMP_c NA GLICOGENÓLISE,
NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE EM RATOS COM
CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR WALKER-256**

Londrina
2018



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

GIULIANA REGINA BIAZI

RESPOSTA HEPÁTICA AO GLUCAGON, A AGONISTAS ADRENÉRGICOS E AO
AMP_c NA GLICOGENÓLISE, NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE EM RATOS
COM CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR WALKER-256

Londrina - Pr
2018

GIULIANA REGINA BIAZI

**RESPOSTA HEPÁTICA AO GLUCAGON, A AGONISTAS
ADRENÉRGICOS E AO AMP_c NA GLICOGENÓLISE,
NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE EM RATOS COM
CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

Londrina
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B579r Biazi, Giuliana Regina.

Resposta hepática ao glucagon, a agonistas adrenérgicos e ao AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise em ratos com caquexia induzida por tumor Walker-256 / Giuliana Regina Biazi. - Londrina, 2018.
47 f.: il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Metabolismo - Teses. 2. Caquexia - Câncer - Teses. 3. Glicose - Teses. 4. Fígado - Teses.
I. Souza, Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612.015.3

GIULIANA REGINA BIAZI

**RESPOSTA HEPÁTICA AO GLUCAGON, A AGONISTAS
ADRENÉRGICOS E AO AMP_c NA GLICOGENÓLISE,
NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE EM RATOS COM CAQUEXIA
INDUZIDA POR TUMOR WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

BIAZI, Giuliana Regina. **Resposta hepática ao glucagon, a agonistas adrenérgicos e ao AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise em ratos com caquexia induzida por tumor Walker-256**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Portadores de câncer apresentam alterações no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos que resultam em perda acentuada de massa muscular e adiposa e de peso corpóreo (caquexia). Estas anormalidades metabólicas que resultam na caquexia do câncer são causadas por fatores catabólicos produzidos pelo tumor, como o fator indutor de proteólise (PIF) e o fator mobilizador de lipídeos (LMF), e pelas citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 e IL6) produzidas pelo sistema imune e tumor. É possível que a resistência insulínica também contribua para as anormalidades metabólicas presentes na caquexia do câncer, visto que a insulina possui importantes efeitos anabólicos e anti-catabólicos. Embora a resistência à insulina esteja bem estabelecida em portadores de câncer, a resposta ao glucagon e a adrenalina nesta doença, particularmente no metabolismo hepático da glicose, é pouco conhecida. Diante disto, o objetivo deste estudo foi investigar a resposta hepática ao glucagon, aos agonistas adrenérgicos fenilefrina (α) e isoproterenol (β) e ao AMPc (mensageiro intracelular do glucagon e da adrenalina) na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise em ratos portadores de tumor Walker-256. Para este propósito, foram utilizados ratos portadores de tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, e ratos saudáveis (controles). A resposta para o glucagon, agonistas adrenérgicos e AMPc foi avaliada em perfusão de fígado *in situ*. O conteúdo de ATP no fígado também foi quantificado. O glucagon (1 nM) estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese e inibiu a glicólise no fígado dos ratos saudáveis e portadores de tumor, porém seus efeitos foram menores nos ratos portadores de tumor. O isoproterenol (20 μ M) estimulou a glicogenólise, a neoglicogênese e a glicólise nos ratos saudáveis, mas praticamente não teve efeitos nos ratos portadores de tumor. O AMPc (9 μ M) também estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese e inibiu a glicólise nos ratos saudáveis, mas praticamente não teve efeito nos ratos portadores de tumor. A fenilefrina (2 μ M) estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese e inibiu a glicólise, sendo estes efeitos também menores nos ratos portadores de tumor. O conteúdo de ATP no fígado dos ratos portadores de tumor foi menor em comparação ao dos ratos saudáveis. Em conclusão, ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram menor resposta hepática ao glucagon, aos agonistas adrenérgicos (α e β) e ao AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise, a qual pode ser devida a reduzida taxa de fosforilação de enzimas regulatórias destas vias, causada pelo baixo conteúdo de ATP no fígado. Nossos estudos mostram pela primeira vez que um déficit de ATP pode estar associado à redução das respostas ao glucagon, isoproterenol, AMPc e a fenilefrina no metabolismo hepático da glicose dos ratos portadores de tumor.

Palavras-chave: Câncer. Caquexia. Perfusão de fígado. Metabolismo da glicose.

BIAZI, Giuliana Regina. **Hepatic response to glucagon, cAMP and adrenergic agonists on glycogenolysis, gluconeogenesis and glycolysis in rats with Walker-256 tumor-induced cachexia.** 2018. 48 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cancer carriers show changes in the metabolism of proteins, lipids and carbohydrates that result in marked loss of muscle and fat mass and body weight (cachexia). These metabolic abnormalities that result in cancer cachexia are caused by catabolic factors produced by the tumor, such as the proteolysis inducing factor (PIF) and the lipid mobilizing factor (LMF), and the proinflammatory cytokines (TNF α , IL1 and IL6) produced by the immune system and tumor. It is possible that insulin resistance also contributes to the metabolic abnormalities present in cancer cachexia, since insulin has important anabolic and anti-catabolic effects. Although insulin resistance is well established in cancer patients, the response to glucagon and adrenaline in this disease, particularly in hepatic glucose metabolism, is poorly understood. The objective of this study was to investigate the hepatic response to glucagon, to adrenergic agonists phenylephrine (α) and isoproterenol (β) and to cAMP (intracellular messenger of glucagon and adrenaline) on glycogenolysis, gluconeogenesis and glycolysis in Walker-256 tumor-bearing rats. For this purpose, Walker-256 tumor-bearing rats, with 12 days of tumor development, and healthy rats (controls) were used. The response to glucagon, adrenergic agonists and cAMP was evaluated by *in situ* liver perfusion. The ATP content in the liver was also quantified. Glucagon (1 nM) stimulated glycogenolysis and gluconeogenesis and inhibited glycolysis in the liver of healthy and tumor-bearing rats, but its effects were lower in tumor-bearing rats. Isoproterenol (20 μ M) stimulated glycogenolysis, gluconeogenesis and glycolysis in healthy rats, but had virtually no effect on tumor-bearing rats. cAMP (9 μ M) also stimulated glycogenolysis and gluconeogenesis and inhibited glycolysis in healthy rats, but practically had no effect in tumor-bearing rats. Phenylephrine (2 μ M) stimulated glycogenolysis and gluconeogenesis and inhibited glycolysis and these effects were also lower in tumor-bearing rats. The ATP content in the liver of tumor-bearing rats was lower in comparison to that of healthy rats. In conclusion, Walker-256 tumor-bearing rats showed a lower hepatic response to glucagon, adrenergic agonists (α and β) and cAMP in glycogenolysis, gluconeogenesis and glycolysis, which may be due to the reduced rate of phosphorylation of regulatory enzymes of these pathways, caused by the low ATP content in the liver. Our studies show for the first time that an ATP deficit may be associated with reduced response to glucagon, isoproterenol, phenylephrine and cAMP in hepatic glucose metabolism of tumor-bearing rats.

Key words: Cancer. Cachexia. Liver perfusion. Glucose metabolism.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Vias de sinalização do glucagon e da adrenalina no metabolismo hepático da glicose	13
Figura 2 – Efeito do glucagon sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256	28
Figura 3 – Efeito do AMPc sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256	29
Figura 4 – Efeito do isoproterenol sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256	30
Figura 5 – Efeito da fenilefrina sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256	31
Figura 6 – Conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256	32
Figura 7 – Síntese de ATP no fígado.....	38
Tabela 1 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na GLICOGENÓLISE (ratos alimentados).....	21
Tabela 2 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na GLICÓLISE (ratos com privação alimentar de 24h)	22
Tabela 3 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na NEOGLICOGÊNESE (ratos com privação alimentar de 24h).....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato-ciclase
AGL	Ácido graxo livre
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
CAM	Calmodulina
EPM	Erro padrão da média
GLUT2	Transportador de glicose 2
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
KH	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
LDH	Lactato desidrogenase
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PIF	Fator indutor de proteólise
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-difosfato
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PLC	Fosfolipase C
TNF α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Reagentes	19
3.2	Animais	19
3.3	Implantação do tumor Walker-256	19
3.4	Perfusão de fígado in situ	20
3.5	Procedimentos analíticos	22
3.6	Procedimento estatístico	24
4	RESULTADOS	26
4.1	Taxas basais	26
4.2	Efeito do glucagon na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise	26
4.3	Efeito do ampc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise	26
4.4	Efeito do isoproterenol na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise	26
4.5	Efeito da fenilefrina na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise	27
4.6	Conteúdo de ATP no fígado	32
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Portadores de câncer frequentemente apresentam caquexia, uma síndrome caracterizada por catabolismo severo de proteínas e lipídeos, que resulta em perda acentuada de massa muscular e adiposa e de peso corpóreo (AOYAGI et al., 2015; ARGILÉS et al., 2014; EVANS et al., 2008; MENDES et al., 2015; MUELLER et al., 2015; TISDALE, 1997, 2009, 2010). A caquexia é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer avançado (ARGILÉS et al., 2014; PORPORATO, 2016).

Embora as causas da caquexia do câncer sejam complexas e não muito bem entendidas, diversos fatores têm sido apontados como mediadores do processo caquético, entre os quais se destacam o fator indutor de proteólise (PIF) e o fator mobilizador de lipídeos (LMF), produzidos pelo tumor, e as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas 1 (IL1) e 6 (IL6), produzidas pelo sistema imune e tumor (LOBERG et al., 2007; RAMOS et al., 2004; RUBIN, 2003; TISDALE, 2010). Estes fatores estimulam as vias de degradação de proteínas (proteólise) e/ou lipídeos (lipólise) e inibem as vias biossintéticas correspondentes (ARGILÉS et al., 2014; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; MUELLER et al., 2015; PORPORATO, 2016; TISDALE, 2009).

Além destes mediadores clássicos da caquexia, outro fator que parece contribuir para a caquexia do câncer é a resistência insulínica. A resistência à insulina é frequentemente observada em pacientes (COPELAND et al., 1987; HONORS, KINZIG, 2012; LUNDHOLM et al., 1978; ROFE et al., 1994; TAYEK, 1992) e animais com câncer (ASP et al., 2010; DE SOUZA et al., 2015b; MIKSZA et al., 2013) e pode exacerbar a caquexia, visto que a insulina exerce potentes efeitos anabólicos e anti-catabólicos no metabolismo de lipídeos e proteínas (WILCOX, 2005).

A resistência à insulina no câncer tem sido relacionada ao aumento de citocinas (TNF α e IL6) e de ácidos graxos livres (AGLs) no sangue. Estes fatores ativam serinas quinases que fosforilam proteínas da cascata de sinalização da insulina em resíduos de serina, diminuindo a fosforilação em tirosina, e desse modo prejudicando a transmissão do sinal insulínico (CAPURSO; CAPURSO, 2012; KANETY et al., 1995; KIM et al., 2004; WARNE, 2003).

Além de alterações no metabolismo de lipídeos e proteínas, portadores de câncer apresentam anormalidades no metabolismo de carboidratos, incluindo

alterações no metabolismo hepático da glicose (glicogenólise, neoglicogênese e glicólise).

A glicogenólise hepática está aumentada e o conteúdo de glicogênio está diminuído no fígado de portadores de câncer (CASSOLLA et al., 2011; HIRAI; ISHIKO; TISDALE, 1997; VICENTINO et al., 2002). A depleção do glicogênio hepático em portadores de câncer parece ser mediada pela ação catabólica do LMF. O LMF estimula a glicogenólise por aumentar a adenosina monofosfato cíclica (AMPC), via receptores β_3 adrenérgicos (HIRAI; ISHIKO; TISDALE, 1997).

A neoglicogênese hepática também está aumentada em pacientes com caquexia do câncer (LUNDHOLM et al., 1982; WATERHOUSE; JEANPRETRE; KEILSON, 1979). Entre os fatores envolvidos no aumento da neoglicogênese nesta doença está a maior concentração de AGLs no sangue (CASSOLLA et al., 2011). Os AGLs estimulam enzimas-chave da neoglicogênese (piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase - PEPCK) e aumentam a razão NADH/NAD⁺ (potencial redox) e a produção de ATP (DELARUE; MAGNAN, 2007), fatores estimuladores da neoglicogênese. O aumento da neoglicogênese condiz com a liberação hepática de glicose aumentada em pacientes com câncer (40%) (TAYEK, 1992).

Contudo, há vários estudos (CORBELLO-PEREIRA et al., 2004; VEIGA et al., 2008), incluindo o do nosso laboratório (MOREIRA et al., 2013), mostrando redução da neoglicogênese em ratos portadores de tumor Walker-256. Porém, estes estudos foram realizados em perfusão de fígado, uma técnica onde o fígado é isolado da circulação e não recebe os fatores estimuladores da neoglicogênese, alterados no sangue dos ratos portadores de tumor, como o aumento de AGLs e lactato (CASSOLLA et al., 2011) e a redução da insulinemia (DE FATIMA-SILVA et al., 2017; DE MORAIS et al., 2017; FERNANDES et al., 1990).

Redução da glicólise a partir da glicose exógena, mas não a partir da glicose endógena, foi também observada em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 e parece ser devida a inibição da glicoquinase (VICENTINO et al., 2002), a enzima que fosforila a glicose que entra no hepatócito, favorecendo a sua captação.

É possível que resistência à insulina (DE SOUZA et al., 2015b; MIKSZA et al., 2013) e a hipoinsulinemia (DE FATIMA-SILVA et al., 2017; DE MORAIS et al., 2017; FERNANDES et al., 1990) presentes nos ratos portadores de tumor Walker-256 contribuam para a redução da glicólise, a partir da glicose exógena, visto que a

insulina estimula a glicoquinase (IYNEDJIAN, 2009). Similarmente, é possível que resistência à insulina e a hipoinsulinemia contribuam para a depleção do glicogênio em ratos portadores de tumor Walker-256 e para o aumento da neoglicogênese hepática em pacientes com câncer, uma vez que a insulina inibe as vias hepáticas produtoras de glicose (glicogenólise e neoglicogênese).

Embora a resistência à insulina esteja bem estabelecida em portadores de câncer, poucos estudos têm avaliado a resposta para outros hormônios, como por exemplo, o glucagon e a adrenalina, neste estado patológico. Uma resposta alterada para estes hormônios, os quais desempenham efeitos metabólicos importantes, também pode estar relacionada às anormalidades no metabolismo hepático da glicose.

O glucagon e a adrenalina são hormônios contrarreguladores que aumentam a glicemia por estimularem a glicogenólise e a neoglicogênese hepática. Além disso, o glucagon inibe a glicólise, um efeito que contribui para o aumento da liberação de glicose pelo fígado (PILKIS; GRANNER, 1992).

Como esquematizado na Figura 1, os efeitos do glucagon e da adrenalina (via receptores β -adrenérgicos) no fígado são mediados pelo aumento intracelular de AMPc (segundo mensageiro).

Estes hormônios, após ligarem-se aos seus receptores específicos, e por intermédio da proteína Gs, ativam a adenilato-ciclase (AC), a enzima que converte o ATP em AMPc. O AMPc gerado ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual fosforila muitas enzimas envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio, da neoglicogênese e da glicólise.

A PKA ativada por AMPc fosforila e ativa a fosforilase b quinase, que por sua vez fosforila e ativa a glicogênio fosforilase, a enzima-chave da glicogenólise, aumentando o catabolismo do glicogênio (EXTON, 1987; PILKIS; GRANNER, 1992; RAMNANAN et al., 2011) (Figura 1).

A PKA ativada por AMPc também fosforila a enzima bifuncional, aumentando sua atividade fosfatase. Isto aumenta a conversão da frutose-2,6-bisfosfato para frutose-6-fosfato, diminuindo a concentração de frutose-2,6-bisfosfato, um inibidor competitivo da frutose-1,6-bisfosfatase. Isto resulta em aumento de atividade da frutose-1,6-bisfosfatase, enzima-chave da neoglicogênese e estimulação desta via (MILLER; BIRNBAUM, 2016; PILKIS; GRANNER, 1992) (Figura 1).

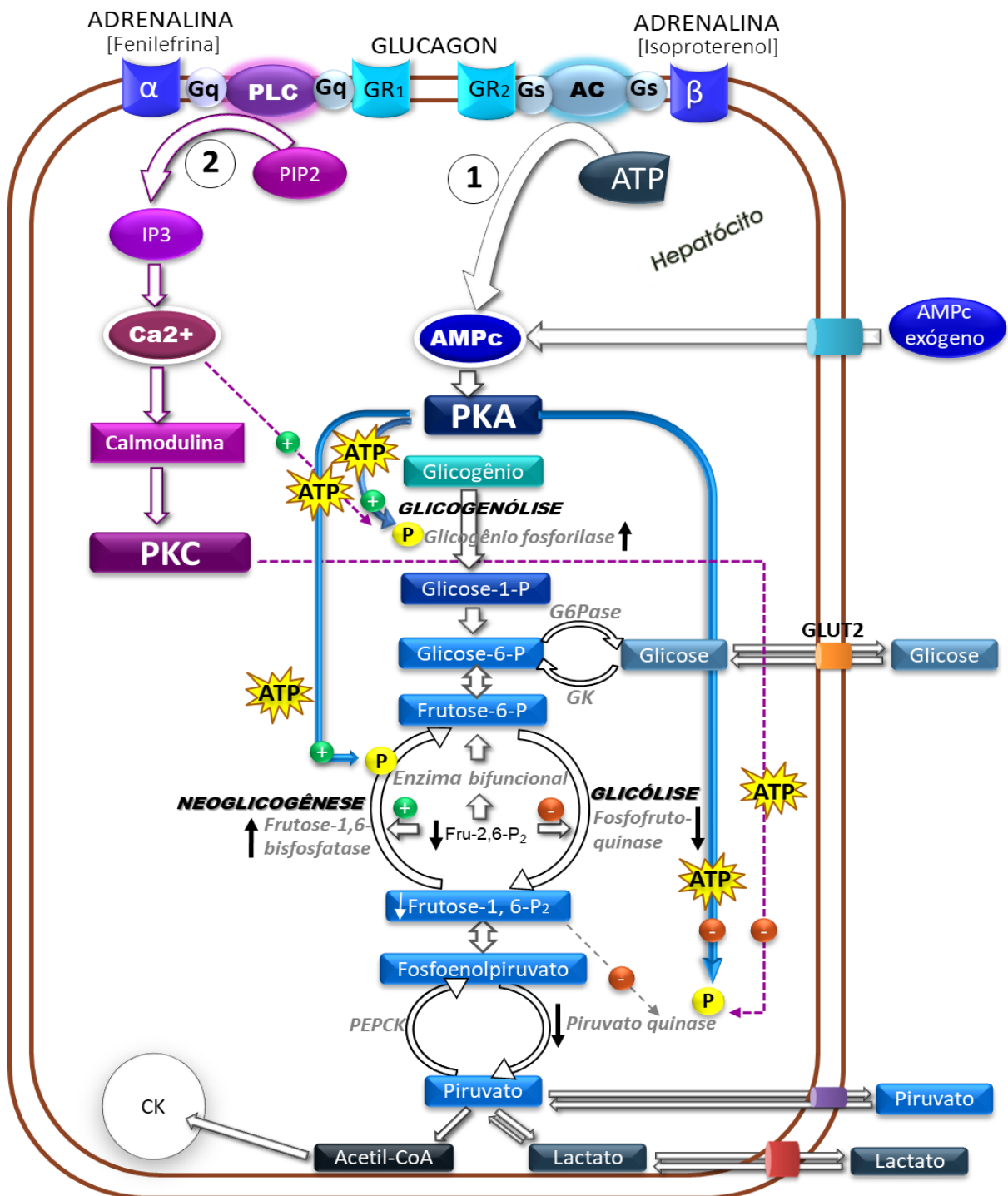


Figura 1 – Vias de sinalização do glucagon e da adrenalina no metabolismo hepático da glicose: 1) via AC/AMPc/PKA e 2) via PLC/Ca²⁺/PKC. Adenilato ciclase (AC); adenosina monofosfato cíclica (AMPc); adenosina trifosfato (ATP); cálcio (Ca²⁺); ciclo de Krebs (CK); fosfolipase C (PLC); fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2); fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (PEPCK); frutose-2,6 bisfosfato (Fru-2,6-P₂); glicoquinase (GK); glicose-6 fosfatase (G6Pase); inositol 1,4,5 trifosfato (IP3); proteínas G mediando efeitos dependentes de AMPc (Gs) e de Ca²⁺ (Gq); proteína quinase A dependente de AMPc (PKA); proteína quinase dependente de calmodulina (PKC); receptores para adrenalina (α e β); receptores para glucagon (GR1 e GR2); transportador de glicose (GLUT2); estimulação (+); inibição (-).

Além disso, a estimulação da frutose-1,6-bisfosfatase aumenta a conversão da frutose-1,6-bisfosfato para frutose-6-fosfato, diminuindo a concentração intracelular de frutose-1,6-bisfosfato e conseqüentemente o seu efeito alostérico positivo sobre a piruvato quinase, diminuindo a atividade desta enzima. A inibição da piruvato quinase diminui a conversão do fosfoenolpiruvato para piruvato, estimulando a neoglicogênese (MILLER; BIRNBAUM, 2016; PILKIS; GRANNER, 1992; SHARABI et al., 2015) (Figura 1).

O glucagon, via aumento de AMPc e estimulação da PKA também fosforila e inibe a piruvato quinase (enzima-chave da glicólise), inibindo a glicólise (PILKIS; GRANNER, 1992). Além disso, o glucagon por meio da via AC/AMPc/PKA/ fosforilação da enzima bifuncional/redução da frutose-2,6-bisfosfato, o qual é um ativador alostérico da fosfofrutoquinase, diminui a atividade desta enzima-chave da glicólise, amplificando seu efeito inibitório sobre a glicólise (PILKIS; GRANNER, 1992) (Figura 1).

Apesar da maioria dos efeitos do glucagon e da adrenalina ser mediado pelo AMPc, os íons Ca^{2+} (segundo mensageiro) também participam da atividade destes hormônios (JIANG; ZHANG, 2003; PILKIS; GRANNER, 1992; WAKELAM et al., 1986).

Foi sugerido que os hepatócitos possuem dois tipos de receptores para o glucagon: um receptor GR1, associado a via de sinalização dependente de Ca^{2+} , de alta afinidade e ativado por concentrações fisiológicas de glucagon, e um receptor GR2 associado a via de sinalização dependente de AMPc, de baixa afinidade e ativado por concentrações suprafisiológicas de glucagon (RODGERS, 2012) (Figura 1).

Os efeitos do glucagon mediados por Ca^{2+} (via receptores GR1) e da adrenalina (via receptores α -adrenérgicos) envolvem ativação da proteína Gq/fosfolipase C (PLC). A PLC hidroliza fosfoinositídeos da membrana (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato - PIP₂), gerando inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃), o qual mobiliza Ca^{2+} dos estoques intracelulares (retículo endoplasmático) (JIANG; ZHANG, 2003). O Ca^{2+} liberado do retículo endoplasmático se liga à calmodulina (CAM) e o complexo Ca^{2+} CAM estimula a proteína quinase dependente de Ca^{2+} CAM (PKC), que por sua vez fosforila e inibe a piruvato quinase, diminuindo a glicólise e aumentando a neoglicogênese (RODGERS, 2012) (Figura 1).

O Ca^{2+} também ativa alostericamente a fosforilase-b-quinase, a qual fosforila e ativa a glicogênio fosforilase, estimulando a glicogenólise (EXTON., 1987; PILKIS; GRANNER, 1992; RAMNANAN et al., 2011) (Figura 1).

Vale ressaltar que o efeito da adrenalina mediado pelo Ca^{2+} (via receptores α) na neoglicogênese/glicólise hepática é menos intenso que seu efeito mediado pelo AMPc (via receptores β) (PILKIS; GRANNER, 1992), provavelmente porque a PKC não afeta a enzima bifuncional e causa apenas uma pequena inativação da piruvato quinase (EXTON, 1987).

Em suma, os efeitos a curto prazo do glucagon e da adrenalina no metabolismo hepático da glicose ocorrem por duas vias de sinalização (AC/AMPc/PKA e PLC/ Ca^{2+} /PKC) e são mediados por fosforilação-dependente de ATP de enzimas regulatórias da glicogenólise, neoglicogênese e glicólise.

Considerando que:

1. A resposta ao glucagon e a adrenalina em portadores de câncer, particularmente no metabolismo hepático da glicose (glicogenólise, neoglicogênese e glicólise), é pouco conhecida;
2. Respostas alteradas ao glucagon e a adrenalina podem estar relacionadas às alterações metabólicas em portadores de câncer, incluindo as hepáticas;
3. Os agonistas α (via PLC/ Ca^{2+} /PKC) e β (via AC/AMPc/PKA) adrenérgicos, por atuarem através de vias de sinalização distintas, e o AMPc, por ser o mensageiro intracelular do glucagon e dos agonistas β adrenérgicos, podem ser usados na tentativa de identificar possíveis mecanismos envolvidos nas respostas.

Seguem os objetivos do presente trabalho.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar em ratos portadores de tumor Walker-256 a resposta hepática ao glucagon, AMPc e aos agonistas adrenérgicos fenilefrina (agonista α_1) e isoproterenol (agonista β_1 e β_2) no metabolismo da glicose.

2.2 Objetivos Específicos:

- ▶▶ Avaliar em estudos de perfusão de fígado *in situ* de ratos portadores de tumor Walker-256, a resposta ao glucagon, isoproterenol, AMPc e a fenilefrina sobre a glicogenólise, neoglicogênese e glicólise.

- ▶▶ Avaliar o conteúdo de ATP no fígado de ratos portadores de tumor Walker-256.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O glucagon (glucagen®) foi adquirido da Novo Nordisk (Brazil) e o isoproterenol, a fenilefrina e o AMPc da Sigma (St Louis, EUA). Os sais do líquido de perfusão e demais reagentes foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, Brazil).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (126), pesando entre 220-230g. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola), em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12 horas) controlados. Os ratos receberam alimentação (ração Nuvilab®) e água à vontade. Para avaliação da neoglicogênese e glicólise os ratos foram submetidos a 24 horas de privação alimentar para retirar a influência do glicogênio hepático.

Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário (13 horas) para minimizar variações circadianas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (cadastro nº 10412).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- ▶ Grupo Walker-256: Ratos portadores de tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.

- ▶ Grupo saudável: Ratos sem tumor (controle).

3.3 Implantação do tumor Walker-256

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de origem espontânea de glândula mamária de rata prenhe (EARLE, 1935), que apresenta crescimento rápido e é capaz de se desenvolver na forma sólida ou ascítica (AGOSTINO e CLIFFTON, 1968; CALDAROLA et al., 1968). Sua implantação em ratos é um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia/anorexia (GUAITANI et al., 1982), já que em

curto espaço de tempo após sua implantação verifica-se redução no peso do animal e da ingestão alimentar e catabolismo acentuado de proteínas, lipídeos e carboidratos. Aos 14 dias após o implante, a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO et al., 2002).

As células Walker-256 foram mantidas vivas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0 \times 10^6$ células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial por 15 minutos, a 2500 rpm e 4°C, para obtenção das células tumorais. As células tumorais foram ressuspensas em tampão salina fosfato (PBS: fosfato 16,5 mM, 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 portadores de tumor (grupo Walker-256) receberam subcutaneamente com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, no flanco direito traseiro. O grupo saudável foi inoculado com PBS no mesmo local. Para este procedimento os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg).

3.4 Perfusão de fígado *in situ*

A técnica de perfusão de fígado *in situ* (KELMER-BRACHT et al., 1984) foi utilizada para avaliar a resposta ao glucagon, AMPc, isoproterenol e a fenilefrina.

O sistema de perfusão de fígado é composto por reservatórios para o líquido de perfusão (tampão Krebs/Henseleit-KH), bomba peristáltica e oxigenador de membrana. O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, enrolado com tubos de silicone (15 metros) de pequeno diâmetro (2 mm), parede fina (0,25 mm) e permeáveis ao O₂ e CO₂, e é acoplado a um cilindro de carbogênio (O₂/CO₂=95/5%). O cilindro de alumínio é isolado do meio ambiente por uma cobertura de acrílico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O₂ e CO₂, nas proporções de 95:5. A câmara interna do cilindro de alumínio é aquecida por meio de uma bomba de circulação externa de água quente de um banho-maria.

No sistema de perfusão, o tampão KH contido nos reservatórios é impulsionado pela bomba peristáltica até o oxigenador de membrana. No oxigenador, o O₂ e CO₂ contidos na atmosfera carbogênica, por troca passiva,

passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de silicone. Com os fluxos normalmente utilizados (até 45 mL/min), o tempo de permanência do líquido no oxigenador é de aproximadamente 1 minuto, e a saturação próxima a 99%. 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 ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg), fixados em mesa cirúrgica e laparotomizados até a altura do diafragma para exposição do fígado e dos vasos sanguíneos. Em seguida, a veia porta foi canulada, sob baixo fluxo, para entrada do líquido de perfusão no fígado. Após a canulação da veia porta, o tórax foi aberto para oclusão da veia cava inferior supra-hepática. Este procedimento desvia o líquido de perfusão para a veia cava inferior infra-hepática, que foi canulada para a coleta do líquido efluente do fígado. Finalmente, o fluxo foi ajustado para aproximadamente 4 mL.min⁻¹.g⁻¹ de fígado, para permitir oxigenação hepática adequada.

Os fígados foram perfundidos durante 20 minutos iniciais com o tampão KH, para estabilização do consumo de oxigênio. Depois disso, os fígados dos ratos saudáveis e portadores de tumor foram submetidos a um dos protocolos de perfusão esquematizados nas tabelas 1, 2 e 3, para avaliação da resposta ao glucagon, AMPc, isoproterenol e fenilefrina na glicogenólise, glicólise e neoglicogênese.

Tabela 1 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na **GLICOGENÓLISE** (ratos alimentados):

0-10 min	10-24 min
KH	KH + glucagon (1 nM)
KH	KH + AMPc (9 μM)
KH	KH + isoproterenol (20 μM)
KH	KH + fenilefrina (2 μM)

Tabela 2 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na **GLICÓLISE** (ratos com privação alimentar de 24h):

0-10 min	10-40 min	40-60 min
KH	KH + glicose 20 mM	KH + glicose 20 mM + glucagon (1 nM)
KH	KH + glicose 20 mM	KH + glicose 20 mM + AMPc (9 μ M)
KH	KH + glicose 20 mM	KH + glicose 20 mM + isoproterenol (20 μ M)
KH	KH + glicose 20 mM	KH + glicose 20 mM + fenilefrina (2 μ M)

Tabela 3 – Protocolos de perfusão para avaliação da resposta hepática na **NEOGLICOGÊNESE** (ratos com privação alimentar de 24h):

0-10 min	10-30 min	30-50 min
KH	KH + lactato 8 mM	KH + lactato 8 mM + glucagon (1 nM)
KH	KH + lactato 8 mM	KH + lactato 8 mM + AMPc (9 μ M)
KH	KH + lactato 8 mM	KH + lactato 8 mM + isoproterenol (20 μ M)
KH	KH + lactato 8 mM	KH + lactato 8 mM + fenilefrina (2 μ M)

* KH = tampão Krebs/Henseleit

Durante a perfusão, amostras do líquido efluente do fígado foram coletadas, em intervalos de 2 minutos, para determinação das concentrações de glicose, lactato e piruvato.

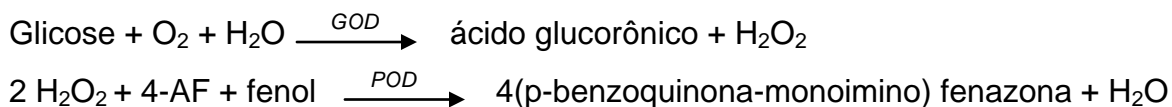
Ao final do experimento, o fígado foi retirado e pesado para quantificação das produções de glicose, lactato e piruvato por grama de fígado e cálculos das taxas de glicogenólise e glicólise. A glicogenólise foi calculada pela soma da produção de glicose + $\frac{1}{2}$ da soma da produção de piruvato + lactato, enquanto a glicólise foi calculada pela soma da produção hepática de piruvato + lactato (DE MORAIS, et al., 2012). A neoglicogênese corresponde a glicose produzida e liberada pelo fígado durante a infusão do precursor de glicose (lactato) nos ratos submetidos a privação alimentar (DE SOUZA et al, 2015a).

3.5 Procedimentos analíticos

Determinação da concentração de glicose

A glicose no perfusado foi quantificada pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974). Nesse método, a glicose é oxidada pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucorônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , 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. O esquema a seguir resume estas reações:



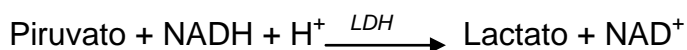
Determinação da concentração de lactato

O lactato no perfusado foi quantificado por método enzimático, segundo a técnica de GUTMANN e WAHLEFELD (1974). Nesse método, o lactato é oxidado a piruvato pelo NAD^+ em uma reação (adiante) catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH). A formação de NADH é proporcional à concentração de lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



Determinação da concentração de piruvato

O piruvato no perfusado foi quantificado por método enzimático, de acordo com a técnica de CZOK e LAMPRECHT (1974). Nesse método, o piruvato é convertido em lactato pela LDH, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH (reação adiante). A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato convertido e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



Determinação da concentração de ATP

Para evitar o estabelecimento de condições anaeróbicas que promovem a hidrólise do ATP, amostras de fígado de animais anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) foram retiradas pela técnica de “freeze-clamp” e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para rápido congelamento. As amostras congeladas foram trituradas em nitrogênio líquido, desproteinizadas em ácido perclórico gelado e submetidas à centrifugação diferencial. O sobrenadante obtido, após ser precipitado com carbonato de potássio (pH 7.4), foi utilizado na determinação enzimática da concentração de ATP (LAMPRECHT; TRAUTSCHOLD I., 1974).

3.6 Procedimentos estatísticos

A distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown Forsythe) foram testadas e o teste t de Student foi empregado para análise dos resultados. As áreas sob as curvas (AUCs) foram calculadas nos intervalos entre 10 a 24 minutos (glicogenólise), 30 a 50 minutos (neoglicogênese) ou 40 a 60 minutos (glicólise), adotando-se como linha de base (*baseline*) a média dos dois primeiros valores antes do início das curvas. As diferenças entre as AUCs dos grupos saudáveis e portadores de tumor foram realizadas pelo programa GRAPHPAD PRISM-5.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EPM) da média e para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Taxas basais

Ratos portadores de tumor mostraram menores ($p < 0,05$) taxas basais (0 a 10 minutos de perfusão) de glicogenólise (Figuras 2A a 5A), mas não de produção de glicose antes da infusão de lactato (Figuras 2B a 5B) ou glicose (Figuras 2C a 5C), em comparação aos ratos saudáveis. A neoglicogênese a partir do lactato 8 mM (10 a 30 minutos de perfusão) não foi alterada nos ratos portadores de tumor (Figuras 2B a 5B), mas esses animais apresentaram menor ($p < 0,05$) taxa glicólítica (10 a 40 minutos de perfusão) a partir da glicose infundida no fígado (Figuras 2C a 5C).

4.2 Efeito do glucagon na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise

A infusão de glucagon 1 nM no fígado estimulou a glicogenólise (Figura 2A) e a neoglicogênese (Figura 2B) e inibiu a glicólise (Figura 2C) nos ratos saudáveis e portadores de tumor. Entretanto, os ratos portadores de tumor apresentaram menor reposta glicogenolítica ($p < 0,05$), neoglicogênica ($p < 0,001$) e glicolítica ($p < 0,05$) ao glucagon do que os ratos saudáveis, como evidenciado pelas AUCs (Figuras 2D, 2E e 2F).

4.3 Efeito do isoproterenol na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise

A infusão de isoproterenol 20 μ M no fígado estimulou a glicogenólise (Figura 3A), a neoglicogênese (Figura 3B) e a glicólise (Figura 3C) nos ratos saudáveis. Os efeitos do isoproterenol na glicogenólise ($p < 0,05$), neoglicogênese ($p < 0,01$) e glicólise ($p < 0,05$) foram menores nos ratos portadores de tumor em comparação aos ratos saudáveis, como observado pelas respectivas AUCs (Figuras 3D, 3E e 3F).

4.4 Efeito do AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise

A infusão de AMPc 9 μ M no fígado estimulou a glicogenólise (Figura 4A) e a neoglicogênese (Figura 4B) e inibiu a glicólise (Figura 4C) nos ratos saudáveis, mas praticamente não teve efeito sobre estes parâmetros nos ratos portadores de tumor (Figuras 4A, 4B e 4C). Os ratos portadores de tumor apresentaram menor reposta ao AMPc na glicogenólise ($p < 0,001$), neoglicogênese ($p < 0,05$) e glicólise ($p < 0,05$) do que os ratos saudáveis, como mostrado pelas AUCs (Figuras 4D, 4E e 4F).

4.5 Efeito da fenilefrina na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise

A infusão de fenilefrina 2 μ M no fígado estimulou a glicogenólise (Figura 5A) e a neoglicogênese (Figura 5B) nos ratos saudáveis e portadores de tumor, sendo estas respostas menores ($p < 0,05$) nos ratos portadores de tumor, como pode ser visto pelas AUCs (Figuras 5D e 5E). Com relação à glicólise, a infusão hepática de fenilefrina inibiu este parâmetro nos ratos saudáveis, mas não nos ratos portadores de tumor (Figura 5C), como ilustrado pelas AUCs ($p < 0,05$) (Figura 5F). Os ratos portadores de tumor apresentaram menor ($p < 0,05$) resposta a fenilefrina na glicólise em comparação aos saudáveis, como observado pelas AUCs (Figura 5F).

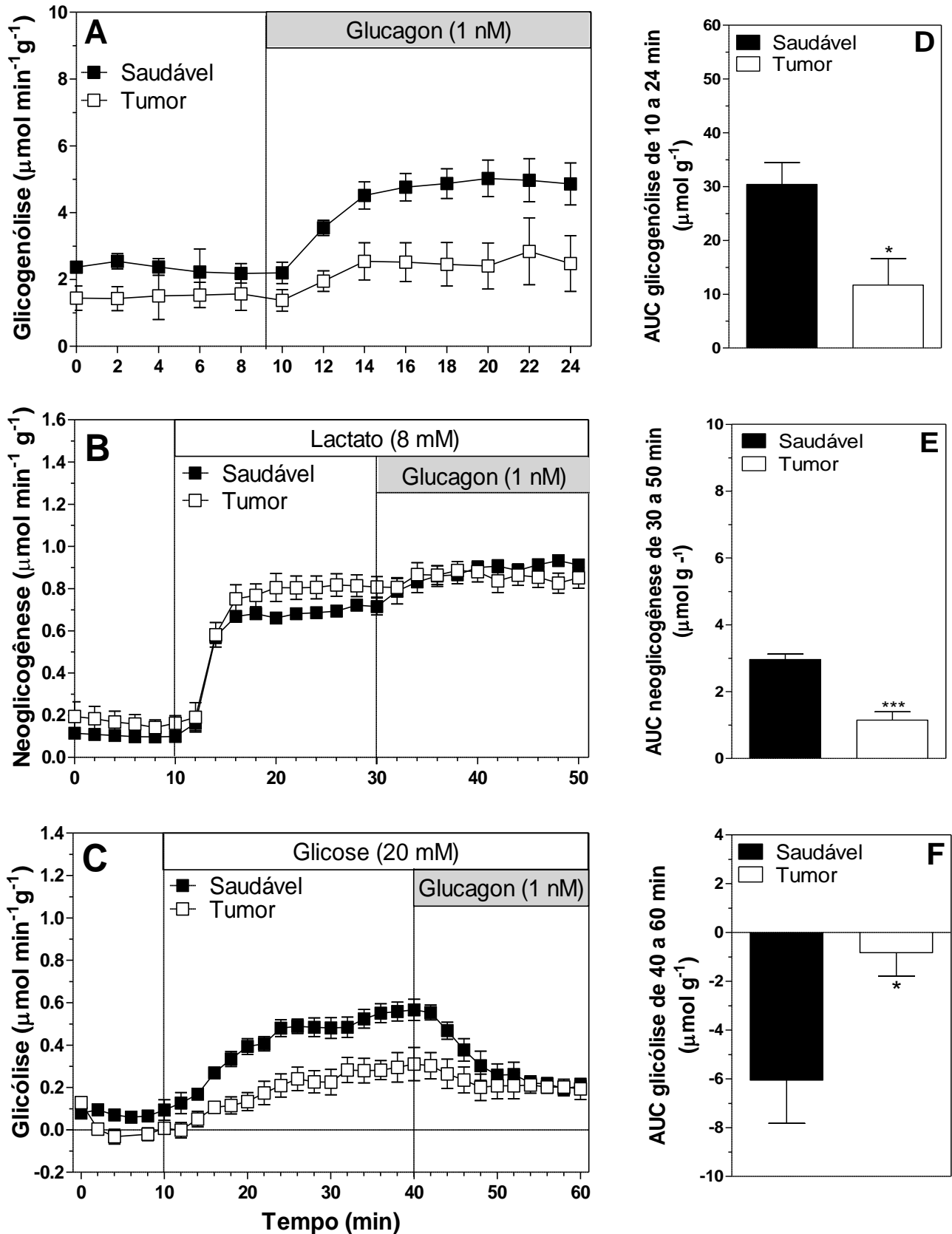


Figura 2 – Efeito do glucagon sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256. Fígados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glucagon (1 nM) foi infundido no período indicado. Dados representam a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

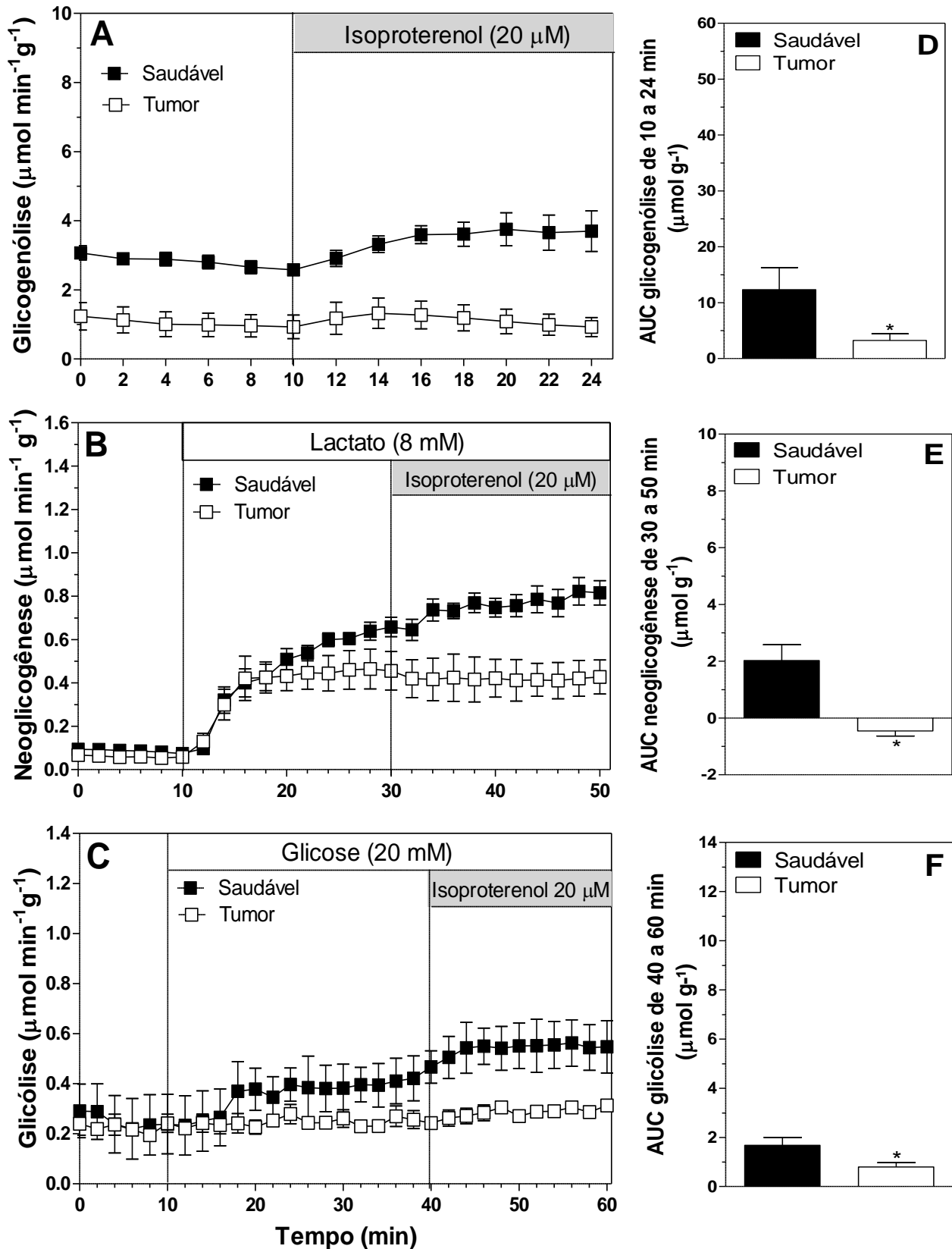


Figura 3 – Efeito do isoproterenol sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256. Fígados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Isoproterenol (20 μM) foi infundido no período indicado. Dados representam a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ versus saudável.

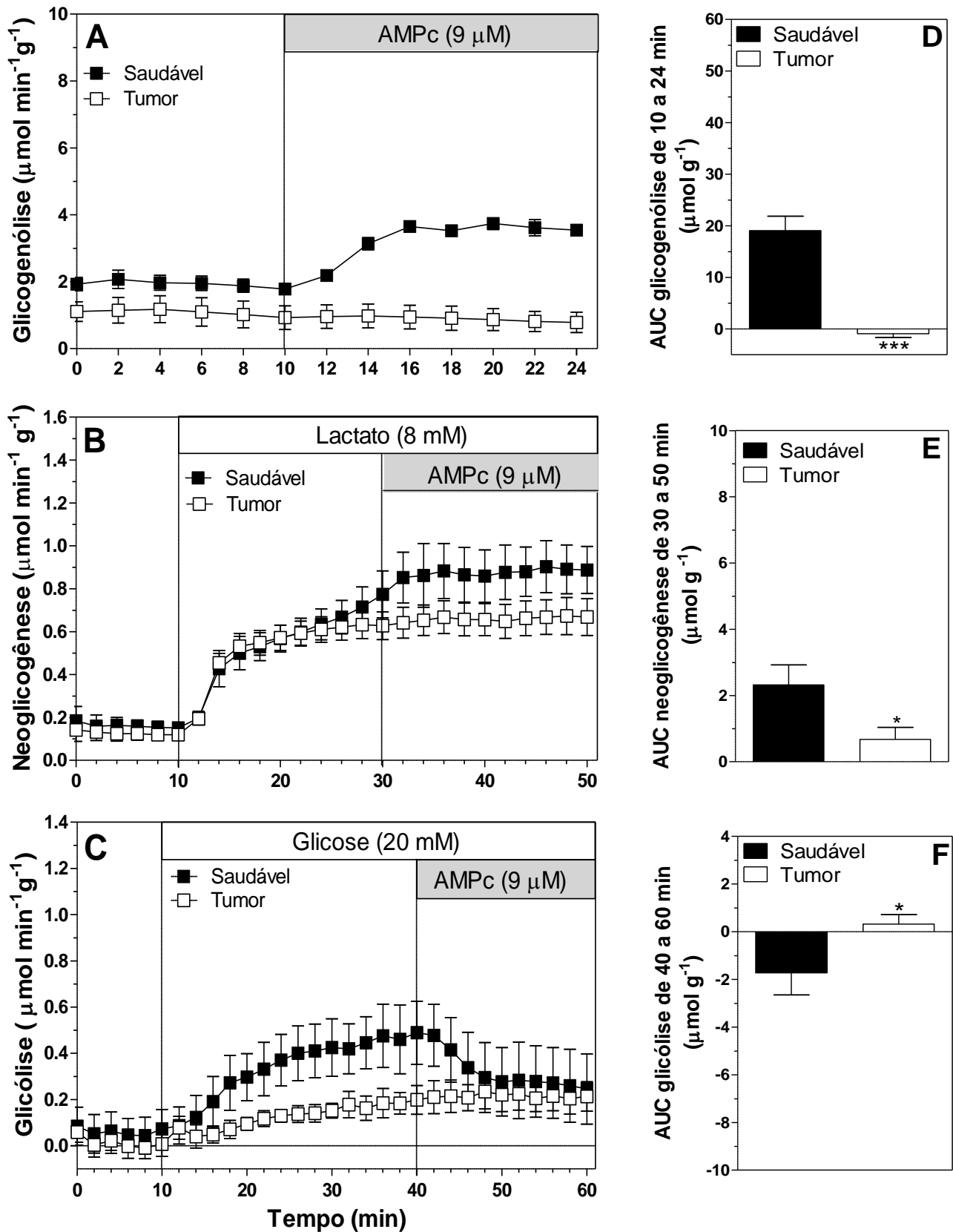


Figura 4 – Efeito do AMPc sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256. Fígados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc (9 μM) foi infundido no período indicado. Dados representam a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

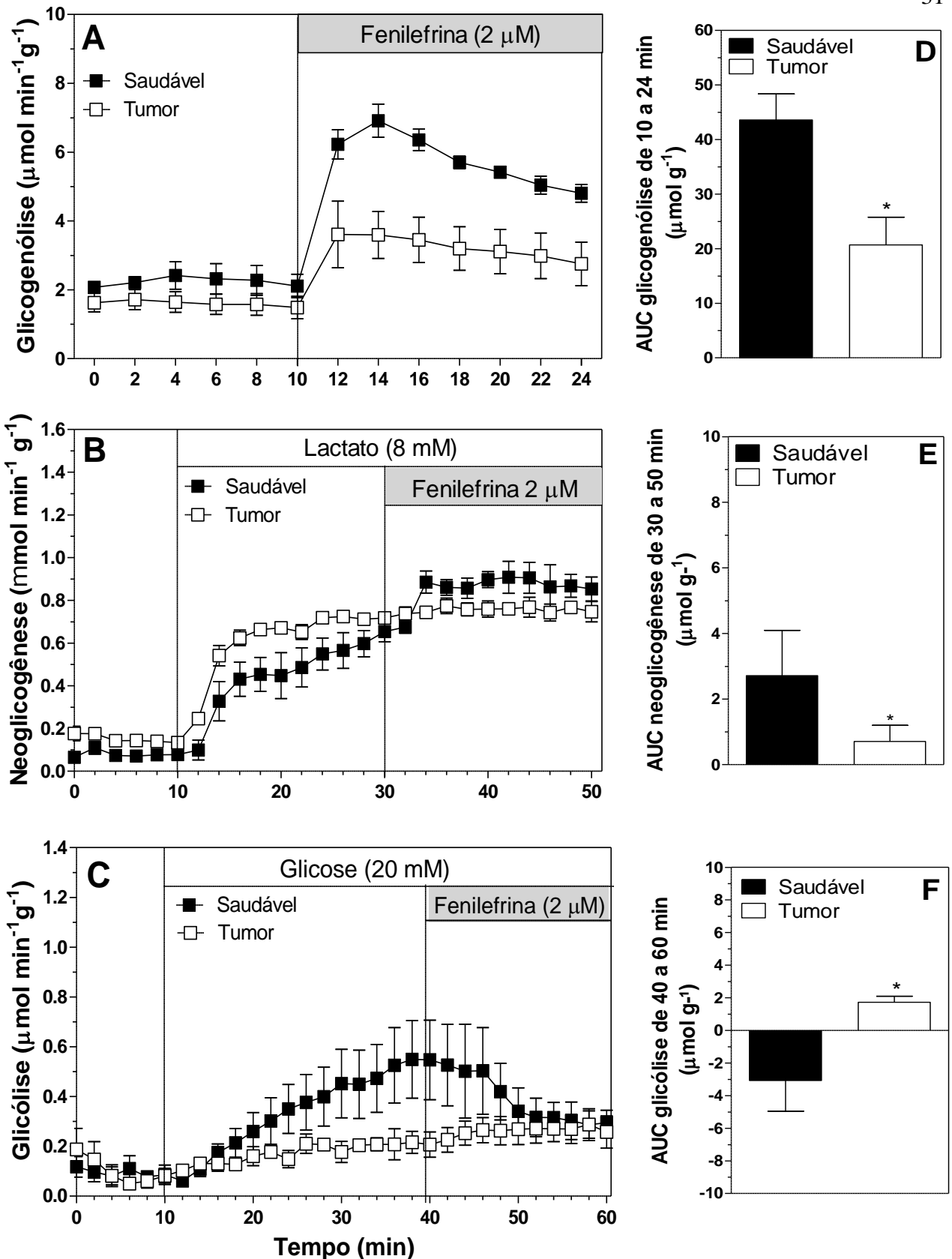


Figura 5 – Efeito da fenilefrina sobre a glicogenólise (A), neoglicogênese (B) e glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E, F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256. Fígados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Fenilefrina (2 μM) foi infundido no período indicado. Dados representam a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ versus saudável.

4.5 Conteúdo de ATP no fígado

O conteúdo de ATP no fígado dos ratos portadores de tumor foi menor ($p < 0,01$) em comparação ao dos ratos saudáveis (Figura 6).

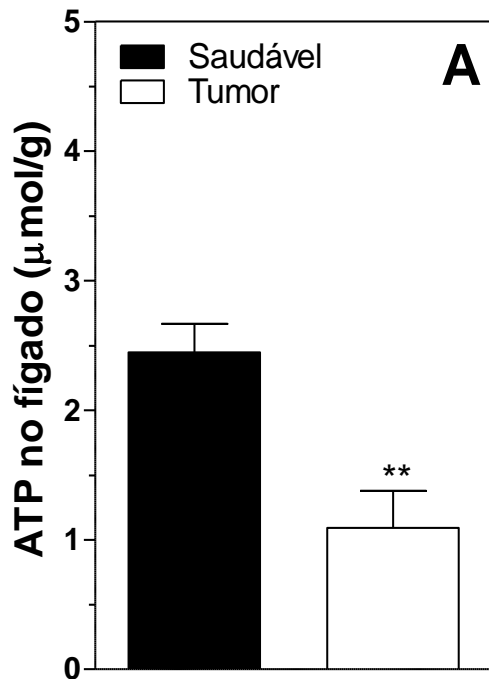


Figura 6 – Conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256. Dados representam a média \pm EPM de 6 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student. ** $p < 0,01$ versus saudável.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Estudos prévios do laboratório mostram que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam caquexia, caracterizada por acentuada redução de massa muscular e adiposa e de peso corpóreo, resistência periférica a insulina e várias alterações no metabolismo hepático da glicose, incluindo baixo conteúdo de glicogênio, baixas taxas basais de glicogenólise, mas não de neoglicogênese e glicólise, redução da neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose e redução da glicólise a partir da glicose exógena (CASSOLLA et al., 2011; DE FATIMA-SILVA et al., 2017; DE MORAIS, 2012; DE MORAIS et al., 2017; DE SOUZA et al., 2015b; MIKSZA et al., 2013; MOREIRA et al., 2013).

Confirmando estes resultados prévios, ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram baixas taxas basais (0 a 10 minutos de perfusão) de glicogenólise (Figuras 2A a 5A), as quais provavelmente se devem ao baixo conteúdo de glicogênio no fígado (CASSOLLA et al., 2011; VICENTINO et al., 2002). A depleção de glicogênio hepático em portadores de câncer tem sido atribuída a ação glicogenolítica do LMF (HIRAI; ISHIKO; TISDALE, 1997), embora outros fatores como hipoinsulinemia e a resistência hepática à insulina possam também estar envolvidos.

As taxas basais de neoglicogênese (0 a 10 minutos de perfusão), antes da infusão do precursor neoglicogênico (lactato), as quais correspondem a liberação de glicose proveniente da glicogenólise, foram similares entre os ratos portadores de tumor e saudáveis (Figuras 2B a 5B). Estes resultados são compatíveis com o período de privação alimentar de 24 horas a que estes animais foram submetidos. O jejum de 24 horas depleta e iguala o conteúdo de glicogênio no fígado dos ratos portadores de tumor e saudáveis.

Embora a literatura relate redução da neoglicogênese hepática a partir do lactato 2 mM em ratos portadores de tumor Walker-256 (VEIGA et al., 2008), a infusão de lactato 8 mM no fígado (10 a 30 minutos de perfusão) aumentou a neoglicogênese dos ratos portadores de tumor e saudáveis de modo similar (Figuras 2B a 5B). Vale ressaltar que 8 mM é a concentração de lactato presente no sangue dos ratos portadores de tumor Walker-256 e 2 mM é a lactatemia de ratos saudáveis (CASSOLLA et al., 2011).

As taxas basais de glicólise (0 a 10 minutos de perfusão), antes da infusão de glicose no fígado, as quais refletem o catabolismo da glicose proveniente do glicogênio residual, após 24 horas de privação alimentar, foram similares entre os ratos portadores de tumor e saudáveis (Figuras 2C a 5C). Estes resultados mostram que a glicólise, a partir da glicose proveniente do glicogênio residual (glicose endógena), não está alterada nos ratos portadores de tumor.

Entretanto, as taxas glicolíticas a partir da glicose infundida no fígado (10 a 40 minutos de perfusão) foram menores nos ratos portadores de tumor (Figuras 2C a 5C). A redução da glicólise a partir da glicose exógena (10 a 40 minutos de perfusão), mas não a partir da glicose endógena (0 a 10 minutos de perfusão), indica que a captação de glicose está diminuída no fígado dos ratos portadores de tumor. De fato, ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam redução de atividade da glicoquinase (VICENTINO et al., 2002), a enzima que favorece a captação hepática de glicose e conseqüentemente o seu catabolismo (glicólise). A reduzida atividade da glicoquinase pode ser devida a baixa concentração de insulina no sangue dos ratos portadores de tumor Walker-256 (FERNANDES et al., 1990) e/ou a resistência à insulina no fígado, visto que a insulina aumenta a atividade desta enzima.

A redução da captação de glicose pelo fígado dos ratos portadores de tumor aumenta a disponibilidade deste substrato energético no sangue, o qual é usado pelo tumor. Além disso, a resistência à insulina nos ratos portadores de tumor Walker-256 (DE MORAIS et al., 2012) diminui a captação de glicose pelos tecidos periféricos, favorecendo sua utilização pelo tumor.

Estendendo os conhecimentos prévios, no presente estudo nós mostramos, pela primeira vez, que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram menor resposta ao glucagon, aos agonistas α (fenilefrina) e β (isoproterenol) adrenérgicos e ao AMPc tanto na glicogenólise, como na neoglicogênese e glicólise.

O glucagon estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese e inibiu a glicólise nos ratos saudáveis e portadores de tumor, porém as respostas para o glucagon foram significativamente menores nos ratos portadores de tumor (Figura 2). Em concordância, um estudo mostrou redução da resposta hepática ao glucagon na glicólise, mas não na glicogenólise, em ratos portadores de tumor Walker-256 (VICENTINO et al., 2002). Porém, neste estudo (VICENTINO et al., 2002), a resposta glicogenolítica ao glucagon foi estimada matematicamente, levando-se em

consideração a quantidade de glicose liberada pelo fígado em perfusão (glicose acumulada) e a concentração de glicogênio no fígado.

Como já estabelecido (Figura 1), os efeitos do glucagon no metabolismo hepático glicose ocorrem por duas vias de sinalização (via AC/AMPc/PKA e via PLC/Ca²⁺/PKC) e são mediados por fosforilação-dependente de ATP de enzimas regulatórias da glicogenólise, neoglicogênese e glicólise.

O glucagon através da via AC/AMPc/PKA induz a fosforilação/ativação dependente de ATP da glicogênio-fosforilase (enzima da glicogenólise) e da enzima bifuncional. A enzima bifuncional fosforilada induz a ativação da frutose-1,6 bisfosfatase (enzima neoglicogênica) e inibição da piruvato quinase (enzima glicolítica) (EXTON, 1987; MILLER; BIRNBAUM, 2016; PILKIS; GRANNER, 1992; RAMNANAN et al., 2011; SHARABI et al., 2015).

O glucagon através da via PLC/Ca²⁺/PKC induz a fosforilação-dependente de ATP da piruvato quinase, resultando em inibição da glicólise e estimulação da neoglicogênese (RODGERS, 2012) (Figura 1). Além disso, o Ca²⁺ ativa alostericamente a fosforilase b quinase, resultando em fosforilação/ativação da glicogênio fosforilase (EXTON, 1987). Foi mostrado que o glucagon, via Ca²⁺, estimulou a glicogenólise (EXTON, 1987) e a neoglicogênese (KELMER-BRACHT et al., 2002) e inibiu a glicólise (CONSTANTIN et al., 1995).

O isoproterenol, um agonista β -adrenérgico (β_1 e β_2) que atua através da via AC/AMPc/PKA (Figura 1) estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese nos ratos saudáveis, como fez o glucagon. Porém, diferentemente do glucagon, o isoproterenol não inibiu a glicólise, um efeito já estabelecido (Figura 3). Essa diferença de resposta na glicólise entre o isoproterenol e glucagon, ambos geradores de AMPc é desconhecida. Porém, um estudo sugere que possa ser devida a diferentes quantidades de AMPc gerados. O glucagon geraria maior quantidade de AMPc que o isoproterenol, a qual é necessária para inibição da glicólise, uma via menos sensível ao AMPc (VARDANEGA-PEICHER et al., 2003). A resposta hepática para o isoproterenol na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise também foi menor nos ratos portadores de tumor (Figura 3), como evidenciado para o glucagon.

Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na redução da resposta ao glucagon e ao isoproterenol nós avaliamos a resposta hepática ao AMPc (segundo mensageiro do glucagon e isoproterenol). Os ratos portadores de

tumor mostraram menor resposta ao AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise (Figura 4), similarmente ao glucagon e isoproterenol. Estes resultados indicam que a redução das respostas ao glucagon e agonista β -adrenérgico (isoproterenol) nos ratos com tumor não envolveu alterações a nível de receptor e da via de transdução de sinal até a geração de AMPc, desde que as respostas glicogenolítica, neoglicogênica e glicolítica para o AMPc também foram reduzidas.

Corroborando estes resultados, nós previamente observamos diminuição da resposta hepática para o AMPc na glicogenólise em ratos portadores de tumor Walker-256, a qual não foi devida ao menor conteúdo de glicogênio hepático e nem a maior atuação da fosfodiesterase-3B (PDE3B), a enzima que degrada o AMPc (MORAIS et al., 2012). Neste estudo (MORAIS et al., 2012), o mecanismo envolvido na redução da resposta hepática ao AMPc nos ratos portadores de tumor não foi esclarecido.

Na tentativa de identificar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na diminuição das respostas ao glucagon, isoproterenol e AMPc nós avaliamos a resposta hepática a fenilefrina, um agonista α -adrenérgico (α_1) que atua através da via PLC/ Ca^{2+} /PKC (Figura 1). A fenilefrina estimulou a glicogenólise e a neoglicogênese e inibiu a glicólise nos ratos saudáveis, como fez o glucagon. Os efeitos da fenilefrina também foram menores nos ratos portadores de tumor do que nos saudáveis (Figura 5), corroborando com as respostas hepáticas diminuídas para o glucagon, isoproterenol e AMPc nestes animais. Esses resultados sugerem que a menor resposta hepática para o glucagon, isoproterenol e AMPc provavelmente não envolveu alterações da PKA, uma vez que as respostas glicogenolítica, neoglicogênica e glicolítica para a fenilefrina, a qual sinaliza pela via PLC/ Ca^{2+} /PKC também foram menores.

A menor resposta glicogenolítica, neoglicogênica e glicolítica observada através das duas vias de sinalização (via AC/AMPc/PKA e via PLC/ Ca^{2+} /PKC) sugere que há um fator comum envolvido na redução das respostas, o qual poderia ser um déficit de energia no fígado (ATP). Um déficit de ATP reduziria o potencial de fosforilação intracelular, prejudicando a fosforilação-dependente de ATP, induzida pelas duas vias de sinalização, de enzimas regulatórias da glicogenólise, neoglicogênese e glicólise.

De fato, os ratos portadores de tumor Walker-256 mostraram menor conteúdo de ATP no fígado (Figura 6), o qual, como esquematizado adiante (Figura 7), pode ter sido devido:

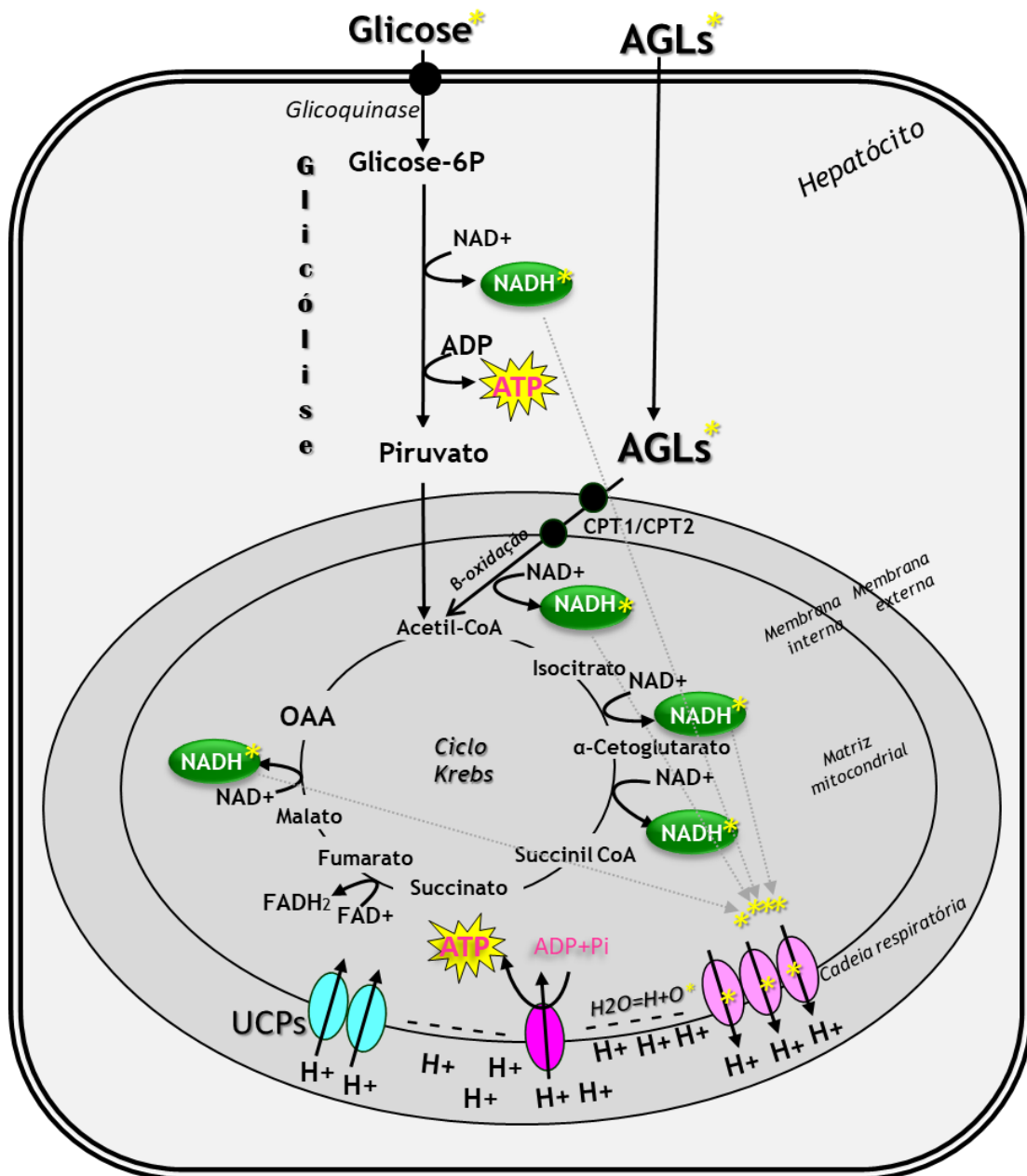


Figura 7 – Síntese de ATP no fígado. A glicose e os ácidos graxos livres (AGLs) que entram nos hepatócitos são oxidados até a geração de acetil-CoA. O transporte da glicose para o hepatócito é favorecido pela glicocinase e o transporte de AGLs para a mitocôndria pelas enzimas transportadoras (CPT1 e CPT2). A acetil-CoA gerada é oxidada no ciclo de Krebs até oxaloacetato (OAA) e neste processo coenzimas na forma oxidada (NAD^+ e FAD^+) são reduzidas (NADH e FADH_2). Elétrons energizados (*) do NADH e FADH_2 , os quais são provenientes da oxidação da glicose e dos AGLs, são transportados na cadeia respiratória e sua energia é usada para o transporte de prótons (H^+) através da membrana interna mitocondrial, criando um gradiente eletroquímico de prótons que é usado na síntese de ATP pelo complexo ATP sintetase. As proteínas desacopladoras (UCPs) transportam prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP.

1) A menor captação hepática de glicose, indicada em nosso estudo pela redução da glicólise a partir da glicose exógena (10 a 40 minutos de perfusão) (Figuras 2C a 5C). Vale lembrar que a atividade da glicoquinase, a qual favorece a captação hepática de glicose, está diminuída nos ratos portadores de tumor Walker-256 (VICENTINO et al., 2002).

2) A redução da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos livres (AGLs), causada pela redução de atividade de enzimas (CPT1 e CPT2) envolvidas no transporte de AGLs do citosol para as mitocôndrias (LIRA et al., 2010; SEELAENDER et al., 1998; VICENTINO et al., 2002).

3) Ao desacoplamento da fosforilação oxidativa promovido por proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs). As UCPs transportam prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente eletroquímico de prótons necessário para a síntese de ATP (TISDALE, 2005). Maior expressão de proteínas UCPs é observada em portadores de câncer (AOYAGI et al., 2015). Produtos derivados do tumor, como o LMF, e algumas citocinas, como o TNF α , parecem aumentar a expressão de UCPs em vários tecidos, incluindo o hepático (MARTIGNONI; KUNZE; FRIESS, 2003).

Enfim, nossos estudos mostram pela primeira vez que o baixo conteúdo de ATP no fígado dos ratos portadores de tumor pode estar associado a redução da resposta hepática tanto ao glucagon quanto ao AMPc, isoproterenol e fenilefrina na glicogenólise e também na neoglicogênese e glicólise, uma vez que estes agentes exercem seus efeitos por induzirem a fosforilação-dependente de ATP de enzimas regulatórias destas três vias metabólicas.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Pode ser concluído que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam menor resposta hepática ao glucagon, aos agonistas adrenérgicos α (fenilefrina) e β (isoproterenol) e ao AMPc na glicogenólise, neoglicogênese e glicólise, a qual pode ser devida a reduzida taxa de fosforilação de enzimas regulatórias destas vias, causada pelo baixo conteúdo de ATP no fígado.

A menor resposta ao glucagon e adrenalina na glicogenólise e neoglicogênese pode estar associada a hipoglicemia presente nos ratos portadores de tumor Walker-256 (CASSOLLA et al., 2011). Assim, é possível que terapias que aumentem o conteúdo de ATP no fígado, como o tratamento com ibuprofeno (anti-inflamatório não esteroideal - AINES) (DE SOUZA et al, 2015a), melhorem a resposta hepática ao glucagon e a adrenalina, previnam a hipoglicemia dos ratos portadores de tumor e tragam uma melhora clínica para estes animais.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINO, D; CLIFFTON E.E. The growth and transplantability of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 24, n. 2, p. 166-167, 1968.
2. AOYAGI, T.; TERRACINA, K.P.; RAZA, A.; MATSUBARA, H.; TABAKE, K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. 4, p. 17–29, 2015.
3. ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
4. ASP, M.L.; TIAN, M.; WENDEL, A.A.; BELURY, M.A. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 756–763, 2010.
5. BERGMAYER, H.U.; BERNT, E. **Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase**. In: BERGMAYER, H.U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, New York: Academic Press, 1974. p. 1205-1215.
6. CALDAROLA, L.; POLI, G.; DEI-POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Panminerva Medica**, v. 10, n. 6, p. 246-149, 1968.
7. CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, v. 57, n. 2–4, p. 91-97, 2012.
8. CASSOLLA, P.; MOREIRA, C.C.L.; LIBONI, T.F.; ZAIA, C.T.B.V.; BORBA-MURAD, G.R.; SOUZA, H.M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumor induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2011.
9. CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; YAMAMOTO, N.S.; BRACHT, A. The action of glucagon infused via the hepatic artery in anterograde and retrograde perfusion of the rat liver is not a function of the accessible cellular spaces. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1244, n. 1, p. 169-178, 1995.
10. COPELAND, G.P.; LEINSTER, S.J.; DAVIS, J.C.; HIPKIN, L.J. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 74, n. 11, p. 1031–1035, 1987.
11. CORBELLO-PEREIRA, S.R.; DARRONQUI, E.; CONSTATIN, 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**, v.

- 1688, n. 3, p. 187-196, 2004.
12. 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.
 13. DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 10, n. 2 , p. 142–148, 2007.
 14. DE FATIMA-SILVA, F.; ORTIZ-SILVA, M.; DE SOUZA-GALIA, W.B.; CASSOLLA, P.; GRACIANO, M.F.; ZAIA, C.T.; ZAIA, D.; CARPINELLI, Â.R.; DA SILVA, F.G.; DE SOUZA, H.M. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. **Life Sciences**, v. 171, n. 1, p. 68-74, 2017.
 15. DE MORAIS, H.; CASSOLLA, P.; MOREIRA, C.C.; BÔAS S. K.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, n. 1-2, p. 9-16, 2012.
 16. DE MORAIS, H.; DE FATIMA SILVA, F.; DA SILVA, F.G.; SILVA, M.O.; GRACIANO, M.F.R.; MARTINS, M.I.L.; CARPINELLI, A.R.; MAZUCCO, T.L.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Insulin, not glutamine dipeptide, reduces lipases expression and prevents fat wasting and weight loss in Walker 256 tumor-bearing rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 806, n. 1, p. 67-74, 2017.
 17. DE SOUZA, C.O.; KURAUTI, M.A.; SILVA F.D.; DE MORAIS, H.; CURI, R.; HIRABARA, S.M.; ROSA-NETO, J.C.; DE SOUZA, H.M. Celecoxib and ibuprofen restore the ATP content and the gluconeogenesis activity in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1659–1669, 2015a.
 18. DE SOUZA, C.O.; KURAUTI, M.A.; DE FATIMA SILVA, F.; DE MORAIS, H.; BORBA-MURAD, G.R.; DE ANDRADE, F.G.; DE SOUZA, H.M. Effects of celecoxib and ibuprofen on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 399, n. 1-2, p. 237–246, 2015b.
 19. EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256: in vivo and in vitro. **American Journal of Cancer**, v. 24, n. 3, p. 566-612, 1935.
 20. EVANS, W.J.; MORLEY, J.E.; ARGILES, J.; BALES, C.; BARACOS, V.; GUTTRIDGE, D.; JATOI, A.; KALANTAR-ZADEH, K.; LOCHS, H.; MANTOVANI, G.; MARKS, D.; MITCH, W.E.; MUSCARITOLI, M.; NAJAND, A.; PONIKOWSKI, P.; ROSSIFANELLI, F.; SCHAMBELAN, M.; SCHOLS, A.; SCHUSTER, M.; THOMAS, D.; WOLFE, R.; ANKER, S.D. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, 2008.
 21. EXTON, J.H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 3, n. 1, p. 163–183, 1987.

22. FEARON, K.C.H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153-166, 2012.
23. FERNANDES, I.C.; MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in walker-256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology**, v. 258, n. 6, p. 1033-1036, 1990.
24. GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: A model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology (Switzerland)**, v. 39, n. 3, p. 173–178, 1982.
25. 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.
26. HIRAI, K.; ISHIKO, O.; TISDALE, M. Mechanism of depletion of liver glycogen in cancer cachexia. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 1, p. 49–52, 1997.
27. HONORS, M.A.; KINZIG, K.P. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 2012.
28. IYNEDJIAN, P. B. Molecular physiology of mammalian glucokinase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 1, p. 27–42, 2009.
29. JIANG, G.; ZHANG, B.B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology**, v. 284, n. 4, p. E671-E678, 2003.
30. KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M.Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor α induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 40, p. 23780–23784, 1995.
31. 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**, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.
32. KELMER-BRACHT, A.M.; FEDATTO-JÚNIOR, Z.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BRACHT, A. The influence of Ca^{2+} on gluconeogenesis stimulation by glucagon in the liver of arthritic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 309-315, 2002.
33. KIM, H.J.; HIGASHIMORI, T.; PARK, S.Y.; CHOI, H.; DONG, J.; KIM, Y.J.; NOH, H.L.; CHO, Y.R.; CLINE, G.; KIM, Y.B.; KIM, J.K. differential effects of interleukin-

- 6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action *in vivo*. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1060–1067, 2004.
34. LAMPRECHT, W.; TRAUTSCHOLD, I. **Enzymatic determination of adenine triphosphate (ATP) with hexokinase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase**. In: Bergmeyer H, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press; 1974. p. 1464-72.
35. LIRA, F.S.; YAMASHITA, A.; CARNEVALI, L.C.; GONÇALVES, D.C.; LIMA, W.P.; ROSA, J.C.; CAPERUTO, E.C.; ROSA, L.F.; SEELAENDER, M. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumor-bearing rats. **Hormone and Metabolic Research**, v.42, n.1, p. 944-949, 2010.
36. 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**, v. 57, n. 4, p. 225–241, 2007.
37. LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTEN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, v. 38, n. 12, p. 4665–4670, 1978.
38. 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**, v. 50, n. 6, p. 1142–1150, 1982.
39. MARTIGNONI, M.E.; KUNZE, P.; PRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer**, v. 36, n. 2, p. 1-3, 2003.
40. MENDES, M.C.S.; PIMENTEL, G.D.; COSTA, F.O.; CARVALHEIRA, J.B. Molecular and neuroendocrine mechanisms of cancer cachexia. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 3, p. 29-43, 2015.
41. MIKSZA, D.R.; DE SOUZA, C.O.; DE MORAIS, H.; DA ROCHA, A.F.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H.M. Effect of infliximab on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 960–969, 2013.
42. MILLER, R.A.; BIRNBAUM, M.J. Glucagon: acute actions on hepatic metabolism. **Diabetologia**, v. 59, n. 7, p. 1376–1381, 2016.
43. MOREIRA, C.C.L.; CASSOLLA, P.; DORNELLAS, A.P.; DE MORAIS, H.; DE SOUZA C.O.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Changes in liver gluconeogenesis during the development of Walker-256 tumour in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 1, p. 47–55, 2013.
44. MUELLER, T.C.; BACHMANN, J.; PROKOPCHUK, O.; FRIESS, H.; MARTIGNONI, M.E. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia - can findings from animal models be translated to humans? **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 75, 2015.

45. PILKIS, S.J.; GRANNER, D.K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review Of Physiology**, v. 54, n. 1, p. 885–909, 1992.
46. PORPORATO, P.E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e200-210, 2016.
47. RAMNANAN, C.J.; EDGERTON, D.S.; KRAFT, G.; CHERRINGTON, A.D. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 118–125, 2011.
48. RAMOS, E.J.B.; 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**, v. 7, n. 4, p. 427–34, 2004.
49. RODGERS, R.L. Glucagon and cyclic AMP: Time to turn the page? **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n. 5, p. 362-381, 2012.
50. ROFE, A.M.; BOURGEOIS, C.S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, EA. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Research**, v. 14, n. 2 B, p. 647–650, 1994.
51. RUBIN, H. Cancer cachexia: its correlations and causes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5384–5389, 2003.
52. SEELAENDER, M.C.L.; CURI, R.; COLQUHOUN, A.; WILLIAMS, J.F.; ZAMMITT, V.A. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma: Effect of indomethacin treatment. **IUBMB Journal**, v. 44, n. 1, p. 185–193, 1998.
53. SHARABI, K.; TAVARES, C.D.J.; RINES, A.K.; PUIGSERVER, P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 46, n. 1, p. 21-33, 2015.
54. TAYEK, J.A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 445–456, 1992.
55. TISDALE, M.J. Biology of Cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 23, p. 1763–1773, 1997.
56. TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, v. 20, n. 37, p. 340–348, 2005.
57. TISDALE, M.J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.
58. TISDALE, M.J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer

- cachexia? **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 503–513, 2010.
59. VARDANEGA-PEICHER, M.; GALLETTO, R.; PAGLIARINI, S.; BAZOTTE, R.B. Comparative effect of glucagon and isoproterenol on hepatic glycogenolysis and glycolysis in isolated perfused liver. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 563-68, 2003.
60. 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**, v. 26, n. 1, p. 51–63, 2008.
61. 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**, v. 8, n. 3, p. 175–182, 2002.
62. WAKELAM, M.J.O.; MURPHY, G.J.; HRUBY, V.J.; HOUSLAY, M.D. Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. **Nature**, v. 323, n. 6083, p. 68–71, 1986.
63. WARNE, J.P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **The Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 351–355, 2003.
64. WATERHOUSE, C.; JEANPRETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Research**, v. 39, n. 6, p. 1968–1972, 1979.
65. WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical Biochemist. Reviews/ Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 26, n. 2, p. 19–39, 2005.