



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITO DO INFLIXIMABE (ANTI-TNF α) NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256**

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITO DO INFLIXIMABE (ANTI-TNF α) NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de
Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M636e....Miksz, Daniele Romani.

Efeito do infliximabe (anti-tnf α) nas alterações metabólicas induzidas pelo tumor walker-256 / Daniele Romani Miksz. – Londrina, 2012.
64 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Câncer – tratamento. – Teses. 2. Tumor Walker 256 – Teses. 3. Caquexia – Drogas - metabolismo – Teses. 4. Farmacologia experimental – Teses. I. Souza, Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 616.006.6

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITO DO INFLIXIMABE (ANTI-TNF α) NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Helenir Medri de Souza
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Fábio Bessa Lima
UNESP – São Paulo - SP

Londrina, 24 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

*A Deus, pela sua infinita bondade e misericórdia.
Aos meus pais, Danilo e Romilda, meus exemplos de amor, respeito e humildade.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu o grande privilégio de viver.

Aos meus pais, Danilo e Romilda, que sempre me apoiaram em meus estudos, com orgulho e dedicação. Vocês são os grandes responsáveis por mais um objetivo alcançado na minha vida.

Aos meus irmãos, Reginaldo, Marcela e Lucas, pela alegria, confiança e amizade incondicional que me proporcionam.

Ao meu noivo Rodrigo, mais que meu namorado, meu amigo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, até mesmo aos finais de semana aqui na UEL, administrando infleximabe.

À minha orientadora prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza, um exemplo de profissional. Ensinou-me com dedicação e sabedoria os passos da pesquisa, desde a parte prática à escrita. Sempre sorrindo e disposta a ajudar. Iniciar minha vida profissional ao seu lado é com certeza começar pelo caminho certo.

À prof^a Dr^a Gláucia Regina Borba Murad, tão querida e tão amiga. Me ajudou profissionalmente, com as orientações sobre as disciplinas, empréstimos de livros e também me ajudou pessoalmente, com muitas conversas de final de tarde, com conselhos pessoais que estão guardados no meu coração.

À prof^a Dr^a Silvia Ponzoni, pelo seu grande carinho comigo, me auxiliando e ajudando. Boas conversas tivemos em nosso horário de almoço.

Às meninas do laboratório, Aline, Thais, Camila, Hely, Mirian e Flaviane, pela ajuda e disposição nos experimentos e também pela alegria e amizade que me proporcionaram, tornando minhas horas de trabalho mais agradáveis.

Aos amigos de departamento e de mestrado, pelo apoio e parceria.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a tornar esse projeto uma realidade.

MIKSZA, Daniele Romani. **Efeito do infliximabe (anti-TNF α) nas alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256**. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

O fator de necrose tumoral α (TNF α) é um importante mediador da caquexia e de algumas alterações metabólicas encontradas no câncer. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito do infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF α , no desenvolvimento da caquexia e em alguns parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256 em ratos. O infliximabe (0,5 mg/kg) foi administrado intraperitonealmente, duas vezes ao dia, começando no dia da inoculação das células tumorais. Depois de 12 dias de tratamento, avaliou-se o crescimento tumoral, alguns parâmetros de caquexia/anorexia, as concentrações de triacilglicerol, glicose, lactato e uréia no sangue, a resposta periférica à insulina, a glicólise e a neoglicogênese hepáticas. A resposta periférica à insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância a insulina e a glicólise e neoglicogênese em perfusão de fígado *in situ*. O tratamento com infliximabe não alterou o crescimento do tumor Walker-256, porém, atenuou ($p < 0,05$) a perda de massa corpórea e preveniu ($p < 0,05$) a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal induzidas pelo tumor. Além disso, o tratamento com infliximabe tendeu a amenizar a diminuição da massa do músculo gastrocnêmio, a ingestão alimentar, a resposta periférica a insulina e a neoglicogênese hepática a partir da alanina, bem como o aumento do triacilglicerol plasmático, causados pelo tumor. Entretanto, o tratamento com infliximabe não atenuou a redução da glicólise hepática e da glicemia e nem o aumento do lactato e uréia plasmáticos, induzidos pelo tumor. Foi concluído que o tratamento com infliximabe melhorou algumas alterações associadas com a caquexia, tais como a redução do tecido adiposo e a perda de peso corpóreo e tendeu a amenizar outros parâmetros metabólicos afetados pelo tumor, fornecendo evidências adicionais para o papel do TNF α na patogênese das alterações metabólicas associadas ao tumor Walker-256.

Palavras-chave: Infliximabe. Câncer. Tumor Walker-256. Anti-TNF α . Metabolismo.

MIKSZA, Daniele Romani. **Effect of infliximab on metabolic disorders induced by Walker 256 tumor in rats.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The tumor necrosis factor α (TNF α) is an important mediator of cachexia and some metabolic abnormalities found in cancer. The objective of this study was to investigate the effect of infliximab, a monoclonal anti-TNF α in the development of cachexia and some metabolic parameters affected by the Walker-256 tumor in rats. Infliximab (0.5 mg / kg) was administered intraperitoneally, twice daily, beginning on the day of inoculation of tumor cells. After 12 days of treatment, we evaluated the tumor growth, some parameters of cachexia/anorexia, concentrations of triacylglycerol, glucose, lactate and urea in the blood, the peripheral response to insulin, hepatic gluconeogenesis and glycolysis. The peripheral response to insulin was assessed using the insulin tolerance test and glycolysis and gluconeogenesis in liver perfusion *in situ*. Treatment with infliximab did not alter the growth of the Walker-256 tumor, however, attenuated ($p < 0.05$) loss of body mass and prevented ($p < 0.05$) loss of retroperitoneal adipose tissue mass induced by the tumor. Furthermore, treatment with infliximab tended to mitigate the decline in gastrocnemius muscle mass, food intake, the peripheral insulin response and hepatic gluconeogenesis from alanine, as well as increased plasma triacylglycerol, caused by the tumor. However, treatment with infliximab did not attenuate the reduction of glycolysis and hepatic glucose nor the increase in plasma lactate and urea, induced by the tumor. It was concluded that treatment with infliximab improved some changes associated with cachexia, such as the reduction of adipose tissue and loss of body weight and tended to alleviate other metabolic parameters affected by the tumor, providing additional evidence for the role of TNF in the pathogenesis of α metabolic changes associated with Walker-256 tumor.

Keywords: Infliximab. Cancer. Walker-256 tumor. Anti-TNF α . Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	28
Figura 2 -	Alteração da massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK)	29
Figura 3 -	Massa do tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	30
Figura 4 -	Massa do músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	31
Figura 5 -	Ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	32
Figura 6 -	Concentrações de triacilgliceróis plasmático de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	33
Figura 7 -	Glicemia de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	34
Figura 8 -	Concentrações de lactato plasmático de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	35
Figura 9 -	Concentrações de uréia plasmática de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	36
Figura 10 -	Glicemia (A) e porcentagem de alteração da glicemia (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	37
Figura 11 -	Produção de glicose (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).....	39

Figura 12 - Produção de lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK)	40
Figura 13 - Produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).	41
Figura 14 - Produção de uréia (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK)	42
Figura 15 - Produção de L-lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK)	43
Figura 16 - Produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK)	45
Figura 17 - Glicólise (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar	46

LISTA DE ABREVIÇÕES

4-AAP	4-aminoantipirina
4-AF	4-aminofenazona
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
Anti-TNFα	Anticorpo anti-TNF α
ATP	Adenosina trifosfato
CRH	Fator liberador de corticotrofina
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato
eIF2α	Fator de iniciação eurariótico α 2
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase relacionada com sinal extracelular
GLUT4	Transportador de glicose 4
GOD	Glicose-oxidase
G-1-P	Glicerol-1-fosfato
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HIF	Fator induzido por hipóxia
INFα	Interferon α
INFγ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulina G
IL1	Interleucina 1
IL1β	Interleucina 1 β
IL10	Interleucina 10
IL6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IR	Receptor de insulina

IRS	Substrato do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
KH	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
LDH	Lactato-desidrogenase
LMF	Fator mobilizador de lipídios
LPL	Lipase de lipoproteína
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)
NPY	Neuropeptídio Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfaditilinositol-3-quinase
PIF	Fator indutor de proteólise
PKB/AKT	Proteína quinase B
POD	Peroxidase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNFα	Fator de necrose tumoral α
ZAG	Fator zinco α glicoproteína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	DROGAS.....	20
3.2	ANIMAIS	20
3.3	IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256 E PROTOCOLO DE TRATAMENTO	21
3.4	EXPERIMENTOS PARA AVALIAR O EFEITO DO INFLIXIMABE NO CRESCIMENTO TUMORAL, NOS PARÂMETROS DE CAQUEXIA-ANOREXIA E NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO SANGUE	22
3.5	EXPERIMENTOS PARA AVALIAR O EFEITO DO INFLIXIMABE NA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA.....	22
3.6	EXPERIMENTOS PARA AVALIAR DO EFEITO DO INFLIXIMABE NA NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE HEPÁTICAS	23
3.7	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	25
3.7.1	Determinação Da Concentração De Triacilglicerol	25
3.7.2	Determinação Da Concentração De Glicose	25
3.7.3	Determinação Da Concentração De Lactato	26
3.7.4	Determinação Da Concentração De Piruvato	26
3.7.5	Determinação Da Concentração De Uréia	26
3.8	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	27
4	RESULTADOS	28
4.1	EFEITO DO INFLIXIMABE NA MASSA TUMORAL	28
4.2	EFEITO DO INFLIXIMABE NOS PARÂMETROS RELACIONADOS À CAQUEXIA-ANOREXIA	28
4.2.1	Efeito Do Infiximabe Na Massa Corporal	28
4.2.2	Efeito Do Infiximabe Na Massa Do Tecido Adiposo Retroperitoneal	29
4.2.3	Efeito Do Infiximabe Na Massa Do Músculo Gastrocnêmio.....	30

4.2.4	Efeito Do Infiximabe Na Ingestão Alimentar	31
4.3	EFEITO DO INFLIXIMABE NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO SANGUE.....	32
4.3.1	Efeito Do Infiximabe No Triacilglicerol Plasmático	32
4.3.2	Efeito Do Infiximabe Na Glicemia	33
4.3.3	Efeito Do Infiximabe No Lactato Plasmático	34
4.3.4	Efeito Do Infiximabe Na Uréia Plasmática	35
4.4	EFEITO DO INFLIXIMABE NA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA	36
4.5	EFEITO DO INFLIXIMABE NA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA	38
4.6	Efeito do infiximabe na glicólise hepática	43
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem se consolidado como um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo hoje a principal causa por morte em países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (BRASIL, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (WHO, 2008).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde (MS), estimou para o ano de 2012, válido também para 2013, a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer (BRASIL, 2011).

Cerca de 30% das mortes ocorridas em pacientes com câncer são atribuídas à caquexia, presente em aproximadamente 80% dos pacientes (Aldebracht e Canada, 1996). A caquexia é uma síndrome complexa e multifatorial que se caracteriza por perda progressiva e involuntária de peso corpóreo decorrente do catabolismo muscular e adiposo, geralmente associada à anorexia (Argilés et al., 2010; Inui, 2002; Walsmith e Roubenoff, 2002). Anemia, astenia, balanço nitrogenado negativo, disfunção imune e alterações metabólicas estão também frequentemente associadas à caquexia (Argilés et al., 2010).

Entre os fatores envolvidos no desenvolvimento da caquexia estão o elevado consumo energético pelo tumor e a produção de compostos pelo tumor e pelo hospedeiro (Tazi e Errihani, 2010; Inui, 2002).

Diversos compostos têm sido apontados como mediadores da caquexia, destacando-se por um lado, os fatores circulantes produzidos pelo tumor como o fator mobilizador de lipídios (LMF), o fator indutor de proteólise (PIF), os polipeptídios inibidores de síntese protéica (toxohormônios) e os hormônios catabólicos convencionais (Rubin, 2003; Tisdale, 2000; Tisdale, 1993) e, por outro lado, as citocinas produzidas pelo hospedeiro em resposta à presença do tumor (Tisdale, 1997; Falconer et al., 1994).

Várias citocinas têm sido propostas como mediadoras do processo caquético, entre elas o fator de necrose tumoral- α (TNF α), a interleucina-1 (IL1), a interleucina-6 (IL6) e o interferon- γ (IFN γ) (Tisdale, 2000; Inui, 1999; Tisdale, 1997; Moldawer e Copeland, 1997).

Níveis séricos aumentados de $\text{TNF}\alpha$, IL6 e IL1 têm sido associados, em alguns casos, com a progressão tumoral e a administração crônica, isolada ou combinada, dessas citocinas é capaz de diminuir tanto a ingestão alimentar quanto o peso corporal, reproduzindo a síndrome anorexia-caquexia (Argilés et al., 2003; Inui, 1999; Tisdale, 1997; Strassmann et al., 1992).

O $\text{TNF}\alpha$ e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 são propostos como indutores da anorexia associada ao câncer, por estimularem a liberação do fator de corticotrofina (CRH), hormônio hipotalâmico que atua como neurotransmissor, suprimindo a ingestão alimentar (Argilés et al., 2005, Martignoni et al., 2003). Dados experimentais mostram que animais saudáveis tratados com $\text{TNF}\alpha$, apresentam de forma dose-dependente, menor ingestão de alimentos e perda de massa corporal, condizente com seu efeito anoréxico (Arruda et al., 2010; Stovroff et al., 1988).

O $\text{TNF}\alpha$, também conhecido como caquetina, parece ser a principal citocina envolvida com a caquexia (Beutler et al., 1985). Existem numerosas evidências experimentais apontando para o papel do $\text{TNF}\alpha$ na perda de proteína muscular. O tratamento crônico com $\text{TNF}\alpha$ aumenta a taxa de degradação protéica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Argilés et al., 2006), via ativação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (Argilés e Lopez-Soriano, 1996) e do sistema proteolítico dependente de cálcio (Costelli et al., 2002), promovendo diminuição da proteína corporal, especialmente do músculo esquelético. Em conjunto com a massiva perda de proteína do músculo esquelético presente em situações de caquexia, o DNA muscular é também reduzido por fragmentação, resultando em apoptose das células musculares (Abbas, 2005). Este fenômeno parece estar associado ao $\text{TNF}\alpha$, uma vez que esta citocina é capaz de mimetizar a resposta apoptótica em músculo de animais saudáveis (Argilés et al., 2005; Carbó et al., 2002).

O $\text{TNF}\alpha$ é também responsável pela diminuição da massa adiposa, provavelmente por inibir a lipogênese e adipogênese e por estimular a lipólise e apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (Warne, 2003). Além disto, o $\text{TNF}\alpha$ diminui os níveis de RNAm e a atividade da Lipase de lipoproteína (LPL) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que correlaciona com os maiores níveis de triacilglicerol circulantes (Argilés et al, 2006; Treget et al., 1988). A menor atividade da LPL em portadores de

tumor pode ser também decorrente da resistência à insulina (Noguchi et al., 1996) mediada pelo $\text{TNF}\alpha$.

Pacientes em situações patológicas associadas à alta produção de $\text{TNF}\alpha$ (endotoxemia, câncer, trauma) apresentam menor resposta periférica à insulina e a administração de $\text{TNF}\alpha$ em indivíduos saudáveis é capaz de reduzir a sensibilidade à insulina (Argilés et al, 2006; Hotamisligil et al., 1994).

Numerosos mecanismos são propostos para explicar como o $\text{TNF}\alpha$ induz resistência à insulina sendo o principal através da ativação de serinas quinases, enzimas que fosforilam o receptor de insulina (IR) e os substratos do receptor de insulina (IRS) em resíduos de serina, diminuindo a transmissão de sinal da insulina (Yu et al., 2007; Hotamisligil et al., 1996). O $\text{TNF}\alpha$ induziu estas alterações na sinalização insulínica em vários tipos celulares como em adipócitos murino (Hotamisligil et al., 1996), células hepáticas de ratos (Paz et al., 1997) e células musculares (Del Aguila et al., 1999).

Alterações metabólicas hepáticas em portadores de câncer também parecem estar relacionadas ao $\text{TNF}\alpha$. O $\text{TNF}\alpha$ em baixas doses (18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) diminuiu a expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave da neoglicogênese, em camundongos (Hill e McCall, 1992). Em concordância, a administração de baixas doses de $\text{TNF}\alpha$ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina em ratos portadores de tumor Walker-256 (Kelmer-Bracht, 2006). Entretanto, altas doses de $\text{TNF}\alpha$ (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mostraram efeitos opostos, pois intensificaram a neoglicogênese a partir da alanina em hepatócitos isolados (Blumberg et al., 1995). Esses dados permitem inferir que o efeito do $\text{TNF}\alpha$ na neoglicogênese, estimulatório ou inibitório, parece depender da sua concentração, a qual pode variar com o estágio de desenvolvimento tumoral, tamanho e tipo de tumor, explicando, pelo menos em parte, a falta de consenso na literatura com relação à neoglicogênese em portadores de câncer.

Pacientes com vários tipos de câncer apresentaram neoglicogênese aumentada a partir do lactato, alanina e glicerol (Tayek, 1992; Lundholm et al., 1978). Similarmente, animais portadores de tumor apresentaram aumento da neoglicogênese hepática associada à maior atividade da PEPCK (Noguchi, 1989).

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 o precursor neoglicogênico utilizado foi alanina (Corbello-Pereira et al., 2004). Em concordância, estudos de perfusão de fígado em ratos portadores de tumor Walker-256 realizados em nosso laboratório (Moreira, 2010) demonstraram inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato, lactato, mas não a partir do glicerol.

Estudos prévios de nosso laboratório também demonstraram que ratos portadores do tumor Walker-256 apresentam redução da ingestão alimentar, massa corpórea, massa muscular, glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático e aumento do triacilglicerol, ácidos graxos livres, lactato e uréia plasmáticos (Cassola et al., 2011), bem como diminuição da resposta periférica à insulina e da glicólise hepática (Morais, 2011). Estas alterações não foram decorrentes da menor ingestão alimentar, mas foram mediadas provavelmente por fatores produzidos pelo tumor e/ou por citocinas, como por exemplo, o $TNF\alpha$ produzido pelo hospedeiro e pelo tumor.

Do ponto de vista clínico, as alterações metabólicas presentes na caquexia, em pacientes com câncer, levam a alterações morfológicas e funcionais. No pulmão, podem surgir atelectasias e pneumonias decorrentes da redução da massa muscular diafragmática. No fígado, a desnutrição também modifica a morfologia hepática, provoca edema e atrofia dos hepatócitos, esteatose hepática, degeneração mitocondrial e dos microssomos, e compromete as funções hepáticas, restringindo a capacidade de depuração de fármacos e a síntese de albumina e peptídeos. Pode, ainda, afetar as funções gastrointestinais, provocando síndrome de má-absorção, translocação dos microorganismos da microbiota intestinal normal, através da mucosa intestinal, para outros órgãos devido à deficiência imunológica, hipocloridria, atrofia das mucosas gástrica e intestinal, diminuição das microvilosidades e diminuição da massa celular do tecido linfático associado ao intestino. O sistema imune também fica prejudicado no paciente caquético, devido à diminuição na produção de imunoglobulinas, redução na atividade do sistema complemento, do número de linfócitos T e CD4, o que propicia o aumento da susceptibilidade às infecções de feridas, sepse e pneumonia pós-operatória (Moreira e Waitzberg, 2000).

Consequentemente, esse conjunto de manifestações da síndrome anorexia-caquexia pode contribuir para a diminuição da tolerância ao tratamento

oncológico (Barauna Neto et al., 2001) e para a ocorrência de complicações no período pós-operatório, colaborando para o aumento do tempo de internação, comprometendo a qualidade de vida do paciente e tornando o tratamento mais oneroso (BRASIL, 2009).

O melhor tratamento da caquexia no câncer é curar o câncer, pois isso reverteria completamente a síndrome da caquexia. Infelizmente, isso não acontece com frequência em adultos com tumores sólidos avançados (Inui, 2002). A segunda opção terapêutica poderia ser compensar a perda de peso através do aumento da ingestão alimentar, porém, na maioria dos pacientes caquéticos, a anorexia é somente uma parte do problema, já que em um grande número de ensaios clínicos a intervenção nutricional não mostrou benefício significativo em relação à mudança de peso ou a qualidade de vida (Boddaert et al., 2008).

Em vista disto, novas estratégias tem sido desenvolvidas no intuito de combater as desordens metabólicas relacionadas a perda de peso induzida pelo tumor. Levando em conta o envolvimento de citocinas na caquexia, diferentes estratégias terapêuticas têm sido baseadas no bloqueio da síntese ou ação de citocinas.

Estudos preliminares têm mostrado que algumas drogas inibidoras da ação de citocinas, como os agentes anti-TNF α , podem ser efetivas para o tratamento da caquexia do câncer. Terapias biológicas objetivando a neutralização da atividade do TNF α mostraram efeitos anti-caquéticos significativos em modelos animais de câncer (Argilés et al., 2006; Llovera et al., 1996), sepse (Ghezzi e Cerami, 2005), insuficiência cardíaca (Sharma e Anker, 2002), poliartrite (Shealy et al., 2002) e de caquexia associada com infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* (Truyens et al., 1995). Com base nessas evidências, a terapia anti-TNF α tem sido proposta para o tratamento da caquexia numa variedade de doenças (Llovera et al., 1996; Tuyens et al., 1995; Shealy et al., 2002; Sharma e Anker, 2002; Argiles et al., 2006).

O uso de anticorpos anti-citocinas e antagonistas de receptor de citocinas tem conduzido a resultados interessantes. Em ratos portadores de tumor ascítico de Yoshida AH-130, um tumor caquetizante, a terapia anti-TNF α resultou numa reversão parcial das anormalidades no metabolismo de lipídios (Carbó et al., 1994) e de proteínas (Costelli et al., 1993).

Entre os antagonistas de $\text{TNF}\alpha$ clinicamente utilizados encontra-se o infliximabe (Remicade®), um anticorpo monoclonal IgG, formulado como resultado da tecnologia do DNA recombinante, altamente específico em bloquear a ligação do $\text{TNF}\alpha$ ao seu receptor p55 e p75 (Ghezzi e Cerami, 2005; Jatoi et al., 2004).

O infliximabe é um medicamento aprovado para o tratamento de numerosas doenças inflamatórias crônicas complicadas pela caquexia (Bachmann et al., 2010). Estudos clínicos têm evidenciado o papel benéfico da terapia com infliximabe na prevenção da perda de peso observada em pacientes com doença de Crohn (Franchimont et al., 2005), espondiloartropatia (Briot et al., 2005) e artrite psoriática (Sacareno et al., 2008).

Estudos realizados com o infliximabe, consistentes com o bloqueio do $\text{TNF}\alpha$, verificaram que sua administração intravenosa resultou na redução da expressão de quimiocinas, de moléculas de adesão endotelial e de interleucinas, reguladas pelo $\text{TNF}\alpha$, em pacientes com doença de Crohn e artrite reumatóide. Concentrações circulantes das citocinas inflamatórias $\text{IL1}\beta$ e IL6 , reguladas pelo $\text{TNF}\alpha$, foram reduzidas nestas doenças após administração de infliximabe (Lorenz et al., 1996; Dulleman et al., 1995; Elliot et al., 1993)

Da mesma forma, estudos têm mostrado o efeito benéfico do infliximabe sobre a resistência à insulina. Melhora na resposta à insulina foi reportada em pacientes com diabetes tipo 2 (Yazdani-Biuki et al., 2004), artrite reumatóide (Seriolo et al., 2008; Gonzalez-Gay et al., 2006) e artrite psoriática (Kiortsis et al., 2005) após tratamento com infliximabe. Em animais, o uso crônico de infliximabe também produziu efeitos benéficos sobre a homeostase da glicose em modelo de diabetes induzida por obesidade, e sobre a resistência à insulina induzida por dieta com alto teor de gordura (Araújo et al., 2007; Barbuio et al., 2007).

Contudo, o efeito do infliximabe na caquexia e nos distúrbios metabólicos associados ao câncer ainda são escassos e não conclusivos. Diante disso, seguem-se os objetivos do presente trabalho:

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o efeito do infliximabe (anti-TNF α) no crescimento do tumor Walker-256, no desenvolvimento da caquexia-anorexia e em alguns parâmetros metabólicos afetados pelo tumor.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos portadores de tumor Walker-256 o efeito do infliximabe sobre:

- ✓ Crescimento tumoral;
- ✓ Parâmetros relacionados à caquexia (massa corporal, adiposa e muscular) e anorexia (ingestão alimentar);
- ✓ Parâmetros metabólicos do sangue (triacilglicerol, glicose, lactato e uréia);
- ✓ Resposta periférica à insulina;
- ✓ Neoglicogênese e glicólise hepáticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DROGAS

O infliximabe, um medicamento disponível comercialmente nas farmácias (remicade®), foi adquirido da Schering-Plough (Rio de Janeiro, Brasil). A insulina regular foi obtida da Eli Lilly (Rio de Janeiro, Brasil). Sais do líquido de perfusão, o precursor neoglicogênico e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Merck (Darmstad, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 220 e 230 g, com livre acesso à água e alimentados à vontade com ração Nuvilab® para roedores. 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 animais por gaiola), a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos com os animais foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, n° de registro 06749.

Nos experimentos foram utilizados 5 a 20 animais por grupo, divididos nos seguintes grupos:

- *Grupo saudável*: ratos sem tumor, submetidos à injeção intraperitoneal diária de salina por 12 dias.
- *Grupo Walker-256 (WK)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à injeção intraperitoneal diária de salina por 12 dias.
- *Grupo Walker-256 tratado com infliximabe (WK+infliximabe)*: ratos portadores

de tumor Walker-256, submetidos à injeção intraperitoneal diária de infliximabe por 12 dias.

3.3 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256 E PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de origem espontânea de glândula mamária de rata prenha (Earle, 1935), que apresenta crescimento rápido e é capaz de se desenvolver na forma sólida ou ascítica (Agostino e Cliffton, 1967; Caldarola et al., 1968). Sua implantação em ratos tem sido considerada 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, dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia) 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).

Neste trabalho, células Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0 \times 10^6$ células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais, anestesiados com éter etílico, foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial, por 13 minutos, a 2500 rpm e 4°C para obtenção das células tumorais. As células 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 portadores de tumor (grupo WK) foram inoculados com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. No grupo saudável, foi inoculado PBS no mesmo local. Para este procedimento os animais foram previamente anestesiados com éter etílico.

Os ratos portadores de tumor tratados com infliximabe (grupo WK+infliximabe) foram submetidos à injeção intraperitoneal diária de infliximabe (0,5 mg/kg), duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas), iniciando no dia da inoculação das células tumorais. A solução de infliximabe foi preparada diariamente (100 µg em 100 µl de salina), sendo o esquema de administração e a dose diária baseados em

estudos prévios (Haida et al., 2011; Araújo et al., 2007; Barbuio et al., 2007). Os ratos do grupo WK (não tratados) e também os ratos saudáveis (sem tumor) receberam injeção intraperitoneal de salina no lugar do infliximabe.

Os experimentos foram realizados 12 dias após a administração de infliximabe ou salina. Em todos os experimentos, exceto para avaliação da ingestão alimentar, os animais foram submetidos a 24 horas de privação alimentar para retirar a interferência da menor ingestão alimentar e do menor conteúdo de glicogênio hepático dos ratos portadores de tumor.

3.4 EXPERIMENTOS PARA AVALIAR O EFEITO DO INFLIXIMABE NO CRESCIMENTO TUMORAL, NOS PARÂMETROS DE CAQUEXIA-ANOREXIA E NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO SANGUE

Após avaliação da ingestão alimentar, ratos saudáveis e portadores de tumor (grupos WK e WK+infliximabe) foram pesados e decapitados para coleta de amostras de sangue para determinação do triacilglicerol, glicose, lactato e uréia. Em seguida, o tecido adiposo retroperitoneal, o músculo gastrocnêmio e o tumor foram cuidadosamente dissecados e pesados.

A ingestão alimentar foi calculada pela diferença entre a quantidade de ração ofertada (30 g) aos animais, alojados individualmente em gaiolas metabólicas, e a sobra da ração ao final de 24 horas.

A alteração da massa corporal foi calculada pela diferença entre a massa corporal final (dia 12) e a massa corporal inicial (dia 1).

A ingestão alimentar e as massas dos tecidos adiposo e muscular foram expressas por 100 g de peso corporal (g%).

3.5 EXPERIMENTOS PARA AVALIAR O EFEITO DO INFLIXIMABE NA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA

A resposta glicêmica para insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância à insulina (ITT). Para isto, insulina (0,25 U/kg) foi administrada endovenosamente (veia cava inferior) nos ratos saudáveis e portadores de tumor (grupos WK e Wk+infliximabe), previamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg). Amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior no tempo 0

(basal - antes da injeção de insulina) e nos tempos 5, 10, 15 e 30 minutos após a injeção de insulina para avaliação da glicemia.

3.6 EXPERIMENTOS PARA AVALIAR DO EFEITO DO INFILIXIMABE NA NEOGLICOGÊNESE E GLICÓLISE HEPÁTICAS.

Para avaliar a neoglicogênese e glicólise hepáticas ratos saudáveis e portadores de tumor (grupos WK e WK+infliximabe) foram pesados e submetidos à técnica de perfusão de fígado *in situ*, introduzida no Brasil por Kelmer-Bracht e colaboradores (1984).

O sistema para a perfusão de fígado é 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 ($O_2/CO_2=95/5\%$).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de 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 termostaticada 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 O_2 e CO_2 , nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (captabolhas).

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH), modificado por Souza (1999). 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 O_2 e o CO_2 contidos na atmosfera carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de 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 O_2 , 78% de N_2 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 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 de pressão no 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, que deixa o fígado através da veia hepática, para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada para a coleta do líquido de perfusão efluente.

Logo após, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (aproximadamente 4 mL.min⁻¹.g⁻¹ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos (0,15 mL.min⁻¹.g⁻¹) e visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão.

Após os 20 minutos iniciais de perfusão, para a estabilização do consumo de oxigênio, a perfusão do fígado foi realizada da seguinte forma: de 0 a 10 minutos com KH e de 10 a 40 minutos com alanina 2,5 mM (para avaliação da neoglicogênese) ou glicose 20 mM (para avaliação da glicólise). Durante este período, o líquido efluente do fígado, foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose, uréia, lactato ou piruvato.

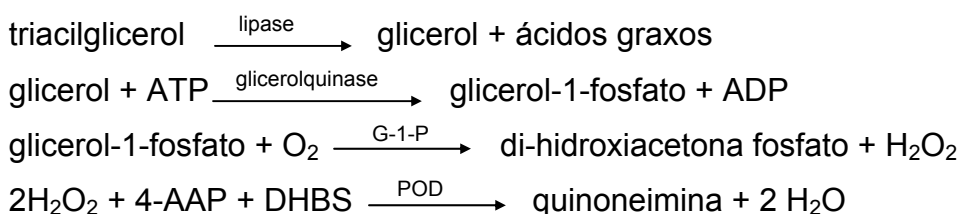
Ao término do experimento, o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose, uréia, lactato ou piruvato por grama de fígado (μmol.min⁻¹.g⁻¹) pudesse ser quantificada. A glicólise foi calculada como a soma da produção e

lactato mais piruvato e as áreas sob as curvas (AUCs) foram calculadas no intervalo de tempo onde o fígado foi submetido à perfusão com o precursor neoglicogênico ou glicose, ou seja, de 10 a 40 minutos.

3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

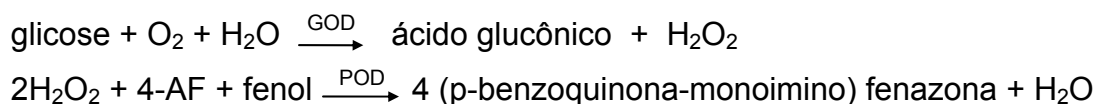
3.7.1 Determinação Da Concentração De Triacilglicerol

A concentração de triacilglicerol no plasma foi determinada por método enzimático baseado na reação de Trinder (1969). Neste método, os triacilgliceróis são convertidos pela lipase a glicerol e ácidos graxos, o glicerol a glicerol-1-fosfato pela glicerolquinase e o glicerol-1-fosfato resultante é oxidado enzimaticamente pela glicerol-1-fosfato oxidase (G-1-P) a peróxido de hidrogênio e di-hidroxiacetona fosfato. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato (DHBS) com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e dá origem a um cromógeno com o máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



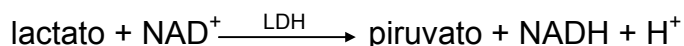
3.7.2 Determinação Da Concentração De Glicose

As concentrações de glicose no plasma e no perfusado foram medidas pelo método da glicose-oxidase (Bergmeyer e 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:



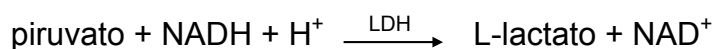
3.7.3 Determinação Da Concentração De Lactato

O lactato plasmático e do perfusado foi quantificado por método enzimático, segundo a técnica de Gutmann e Wahlefeld (1974). Neste método, o lactato é oxidado a piruvato pelo NAD^+ em uma reação catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH), conforme esquematizado a seguir. A formação de NADH é proporcional à concentração de lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



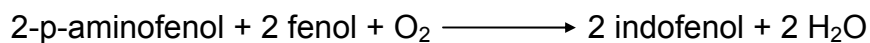
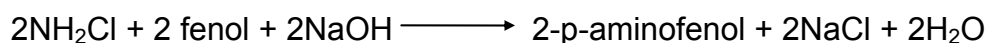
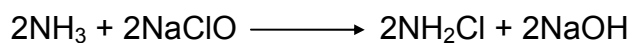
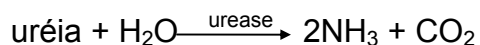
3.7.4 Determinação Da Concentração De Piruvato

A concentração de piruvato no perfusado foi quantificada por método enzimático, de acordo com técnica de Czok e Lamprecht (1974). Nesse método, o piruvato é convertido enzimaticamente em lactato, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em uma reação catalisada pela 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 Uréia

As concentrações de uréia no plasma e no perfusado foram determinadas 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.



3.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

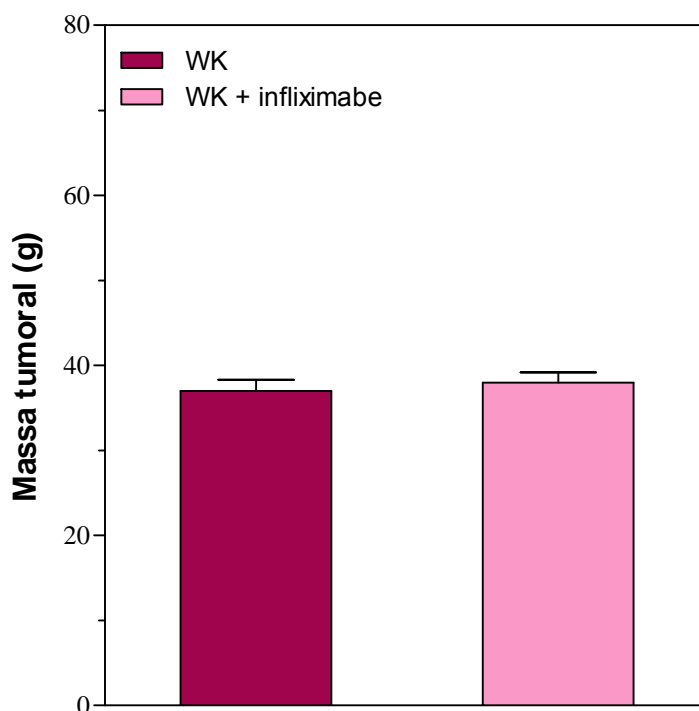
A distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors) e a homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe) foram analisadas e testes estatísticos apropriados (mostrados nas legendas das figuras) foram empregados para análise dos resultados. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0 ou GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO INFLIXIMABE NA MASSA TUMORAL

Como observado na figura 1, o tratamento com infliximabe não alterou o crescimento tumoral. As massas tumorais dos animais Walker-256 não tratados (WK) e dos tratados com infliximabe (WK+infliximabe) durante 12 dias, foram semelhantes.

Figura 1 – Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



Cada barra representa a média \pm EPM de 9 a 12 experimentos. Resultados analisados por test t de Student não-pareado.

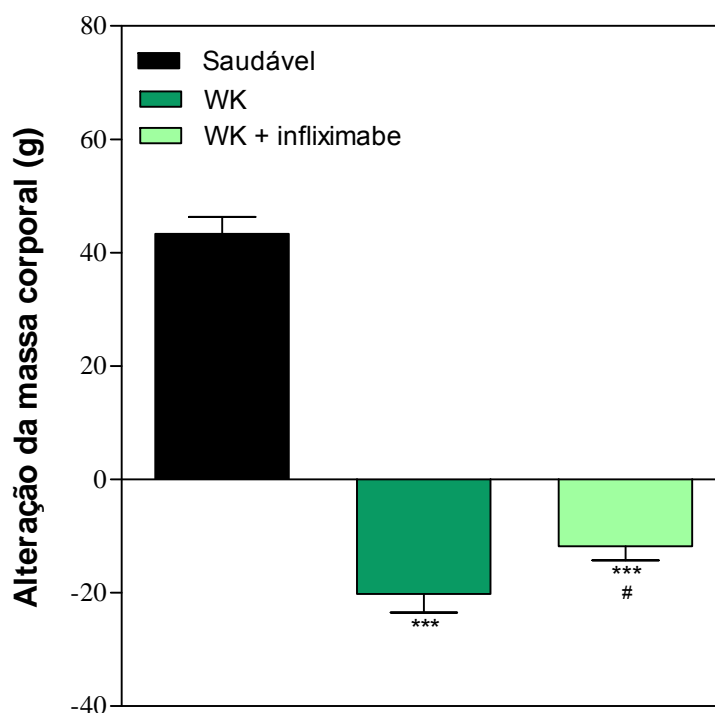
4.2 EFEITO DO INFLIXIMABE NOS PARÂMETROS RELACIONADOS À CAQUEXIA-ANOREXIA

4.2.1 Efeito Do Infliximabe Na Massa Corporal

Os animais dos grupos WK e WK+infliximabe apresentaram significativa perda de massa corporal 12 dias após a implantação do tumor. Enquanto os animais saudáveis ganharam aproximadamente 40 g, o grupo WK

perdeu aproximadamente 20 g e o tratamento com infliximabe reduziu esta perda em 45% (figura 2).

Figura 2 – Alteração da massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.

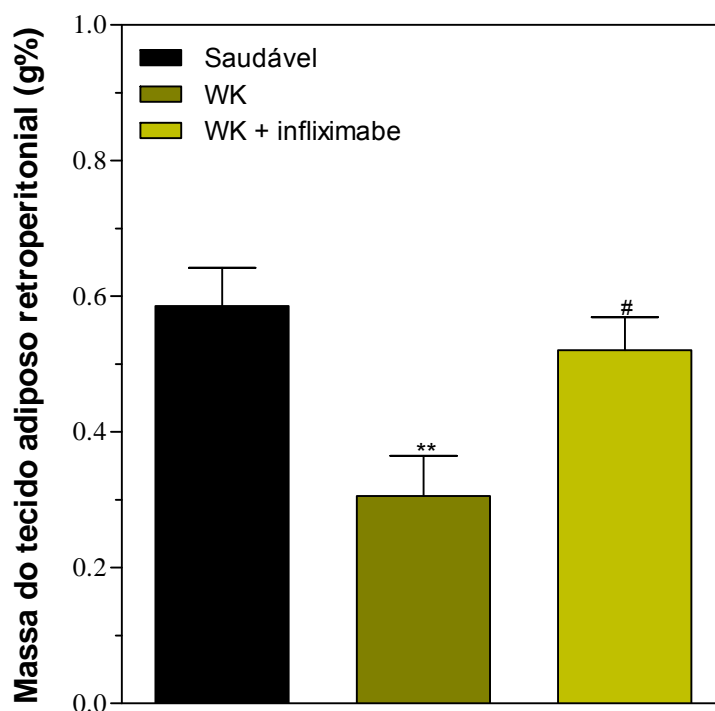


Cada barra representa a média \pm EPM de 9 a 20 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ versus saudável e # $p < 0,05$ versus WK.

4.2.2 Efeito Do Infliximabe Na Massa Do Tecido Adiposo Retroperitoneal

Os animais do grupo WK apresentaram redução significativa (48%) na massa do tecido adiposo retroperitoneal quando comparados aos animais saudáveis. No entanto, esta perda foi prevenida pelo tratamento com infliximabe, uma vez que o grupo WK+infliximabe apresentou massa adiposa retroperitoneal semelhante a dos animais saudáveis e significantemente maior (41%) que o grupo WK (figura 3).

Figura 3 – Massa do tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar

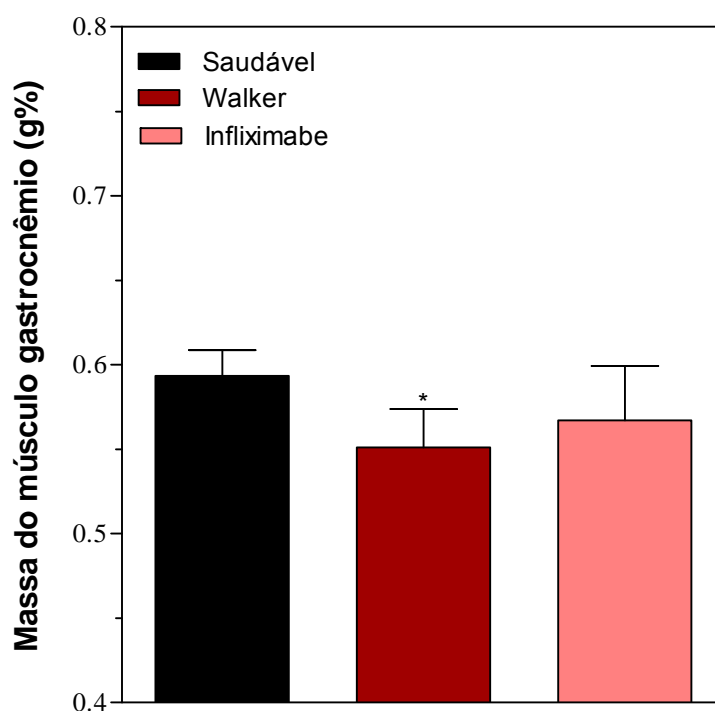


Cada barra representa a média \pm EPM de 9 a 12 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ versus saudável e # $p < 0,05$ versus WK.

4.2.3 Efeito do Infliximabe na Massa do Músculo Gastrocnêmio

A figura 3 demonstra que os animais WK apresentaram redução significativa na massa do músculo gastrocnêmio (7%) quando comparada a dos animais saudáveis. Entretanto, não houve diferença na massa do músculo gastrocnêmio no grupo WK+infiximabe em relação aos grupos saudável e WK.

Figura 4 – Massa do músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar

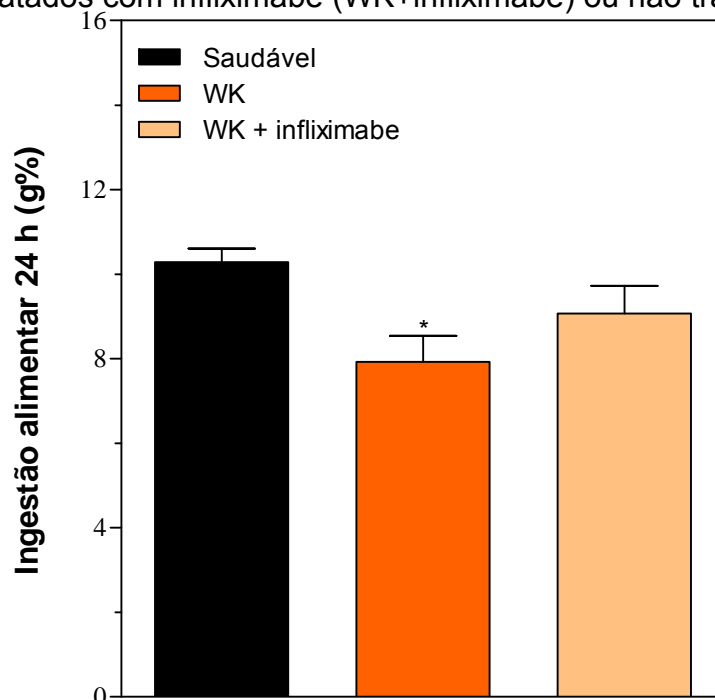


Cada barra representa a média \pm EPM de 6 a 12 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus saudável.

4.2.4 Efeito do Infliximabe na Ingestão Alimentar

Conforme demonstrado na figura 5, houve redução significativa na ingestão alimentar do grupo WK (23%), mas não no grupo WK+infliximabe, quando comparada ao grupo saudável. Os animais WK+infliximabe apresentaram tendência a maior ingestão alimentar que o grupo WK.

Figura 5 – Ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK).



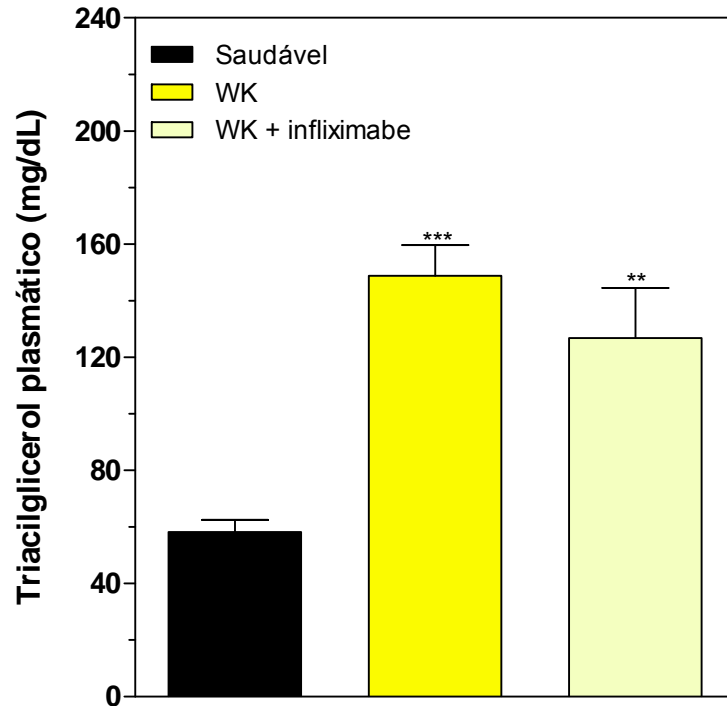
Cada barra representa a média \pm EPM de 9 a 12 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus saudável.

4.3 EFEITO DO INFLIXIMABE NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO SANGUE

4.3.1 Efeito do Infliximabe no Triacilglicerol Plasmático

A concentração plasmática de triacilglicerol nos ratos portadores de tumor (WK e WK+infliximabe) mostrou-se significativamente maior que dos animais saudáveis. O aumento dos triacilglicerol foi de 156% para o grupo WK e 118% para o grupo WK+infliximabe em relação ao grupo saudável. O valor do triacilglicerol do grupo WK+infliximabe tendeu a ser menor que dos animais WK (figura 6).

Figura 6 – Concentrações de triacilgliceróis plasmático de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.

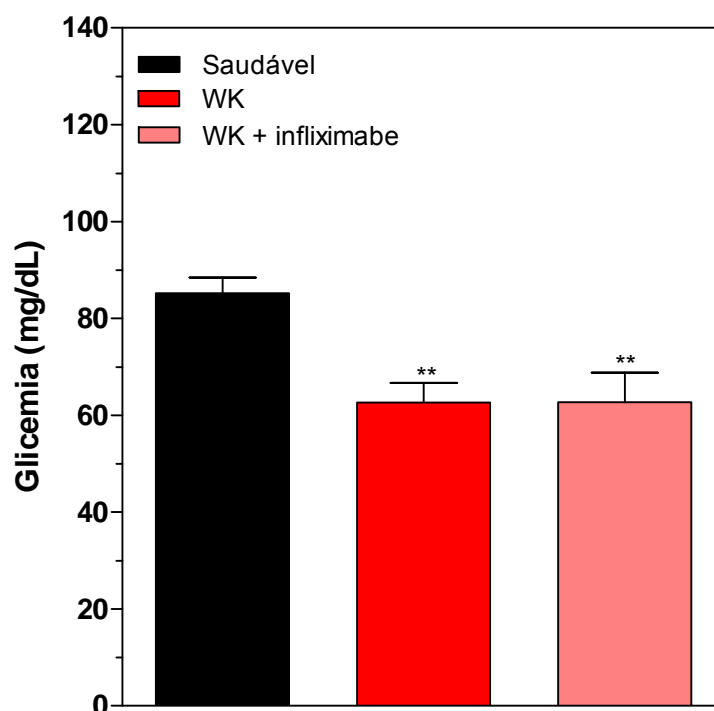


Cada barra representa a média \pm EPM de 13 a 15 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. ***p<0,001 e **p<0,01 versus saudável.

4.3.2 Efeito do Infliximabe na Glicemia

Os valores de glicemia dos animais WK e WK+infliximabe, os quais foram similares, mostraram-se significativamente menores (26%) que os encontrados nos animais saudáveis (figura 7).

Figura 7 – Glicemia de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar

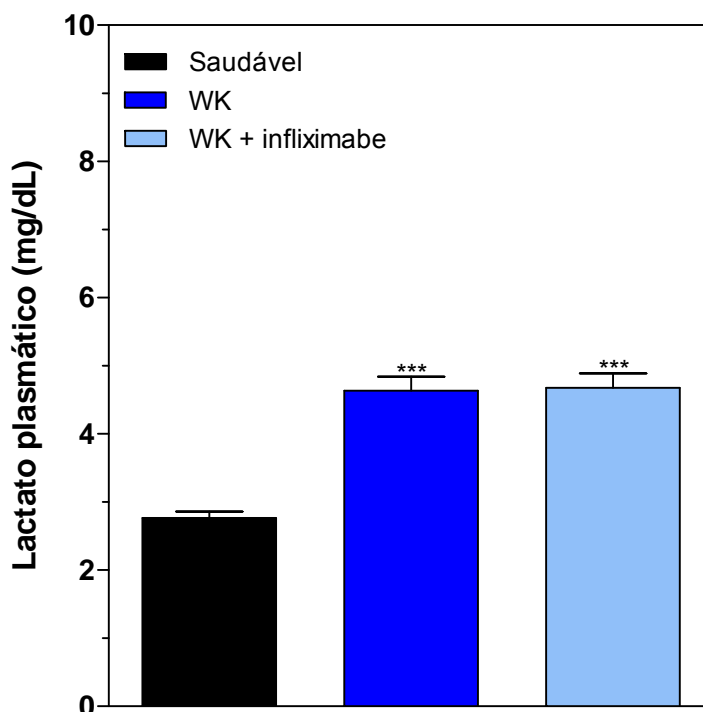


Cada barra representa a média \pm EPM de 10 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguida de Newman-Keuls. **p<0,01 *versus* saudável.

4.3.3 Efeito do Infliximabe no Lactato Plasmático

O lactato plasmático dos animais portadores de tumor (WK e WK+infliximabe) foi significativamente maior que dos saudáveis. O aumento do lactato plasmático dos grupos WK e WK+infliximabe foi muito próximo e aproximadamente 68% maior em relação aos animais saudáveis (figura 8).

Figura 8 – Concentrações de lactato plasmático de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.

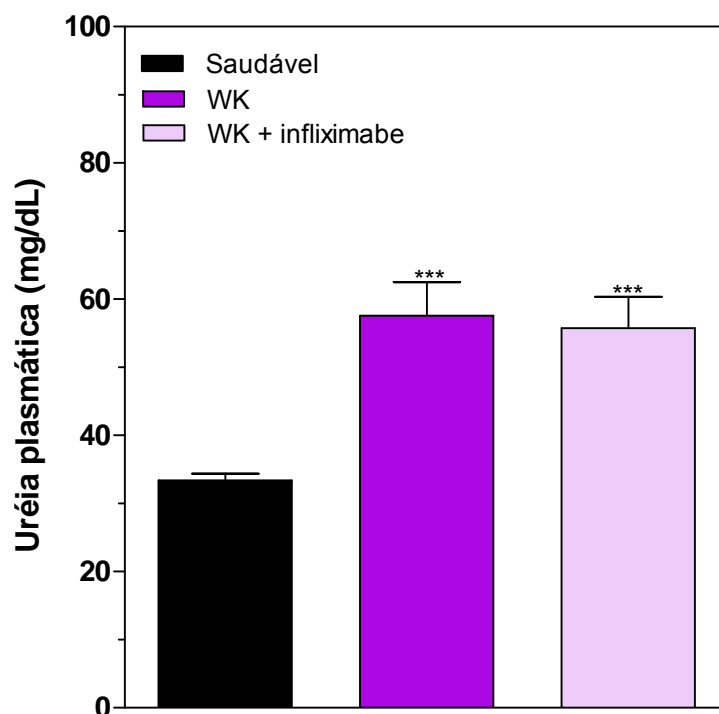


Cada barra representa a média \pm EPM de 13 a 16 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. *** $p < 0,001$ versus saudável.

4.3.4 Efeito do Infliximabe na Uréia Plasmática

Como mostrado na figura 9, não houve diferença nas concentrações de uréia plasmática entre o grupo WK e WK+infliximabe. Ambos apresentaram aumento significativo e semelhante (70%) na concentração de uréia quando comparados aos animais saudáveis.

Figura 9 – Concentrações de uréia plasmática de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



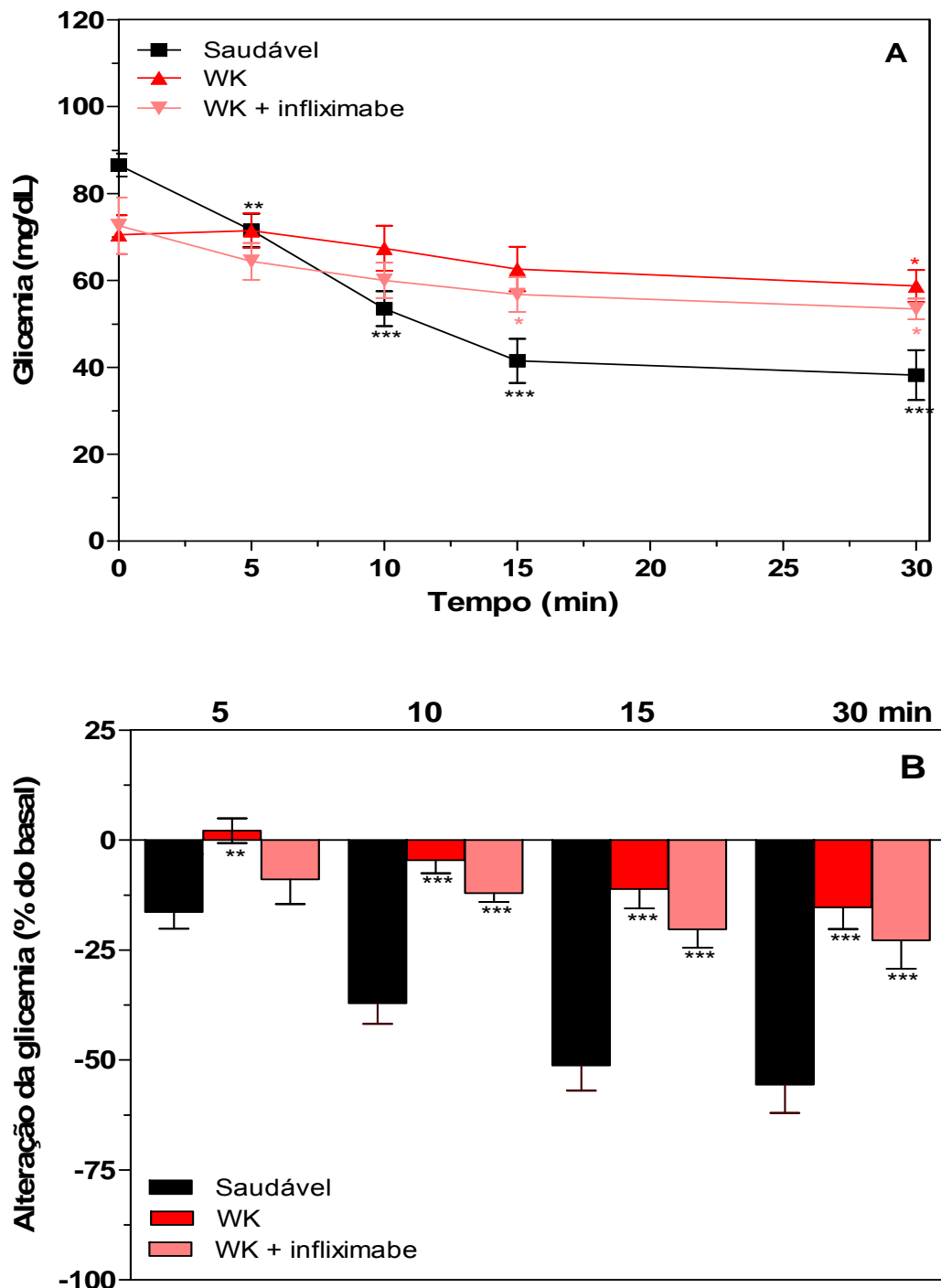
Cada barra representa a média \pm EPM de 13 a 16 experimentos. Resultados analisados por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. *** $p < 0,001$ versus saudável.

4.4 EFEITO DO INFLIXIMABE NA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA

A administração endovenosa de insulina promoveu acentuada e gradativa diminuição da glicemia nos animais saudáveis, sendo mais pronunciada aos 30 minutos (figura 10A).

Entretanto, nos animais portadores de tumor (WK e WK+infliximabe) a administração de insulina promoveu redução mais discreta na glicemia em relação aos animais saudáveis (figura 10A). A porcentagem de redução da glicemia foi significativamente menor no tempo de 5, 10, 15 e 30 minutos para o grupo WK e nos tempos 10, 15 e 30 minutos para o grupo WK+infliximabe em relação aos animais saudáveis (figura 10B).

Figura 10 – Glicemia (A) e porcentagem de alteração da glicemia (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



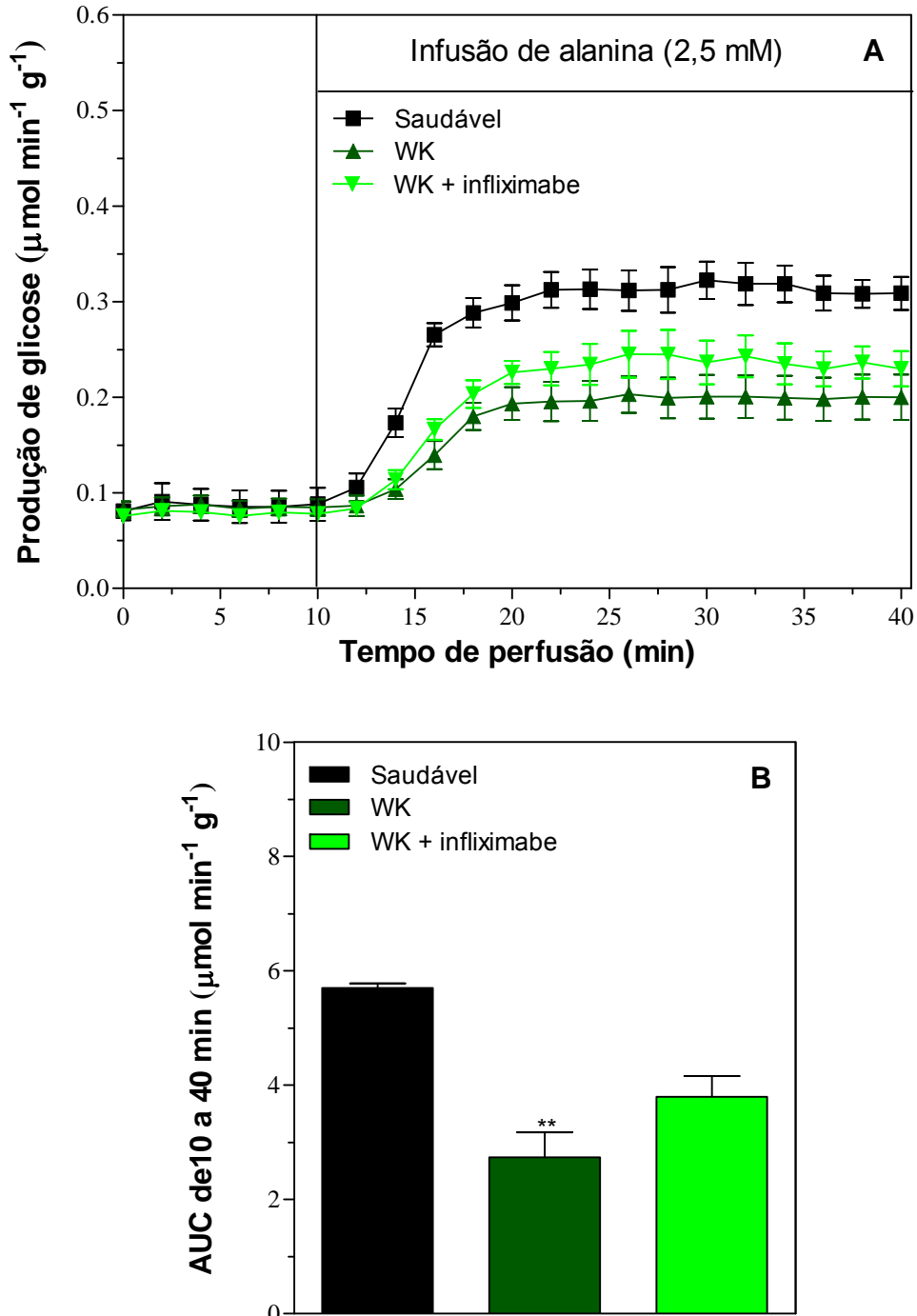
A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30 minutos após administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Os dados representam a média \pm EPM de 9 a 11 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A), em relação ao tempo 0 minuto, foram analisadas pelo teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Diferenças entre os grupos saudável, WK e WK+infliximabe (B), dentro do tempo fixado, foram analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

4.5 EFEITO DO INFLIXIMABE NA NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA

Os valores basais de produção de glicose, observados nos 10 primeiros minutos de perfusão, os quais correspondem a liberação de glicose proveniente do glicogênio residual, foram baixos e não diferiram entre os grupos saudável e portadores de tumor (WK e WK+infiximabe) (figura 11A). Vale ressaltar que todos os animais utilizados nestes experimentos foram submetidos a 24 horas de privação alimentar para depleção do glicogênio hepático.

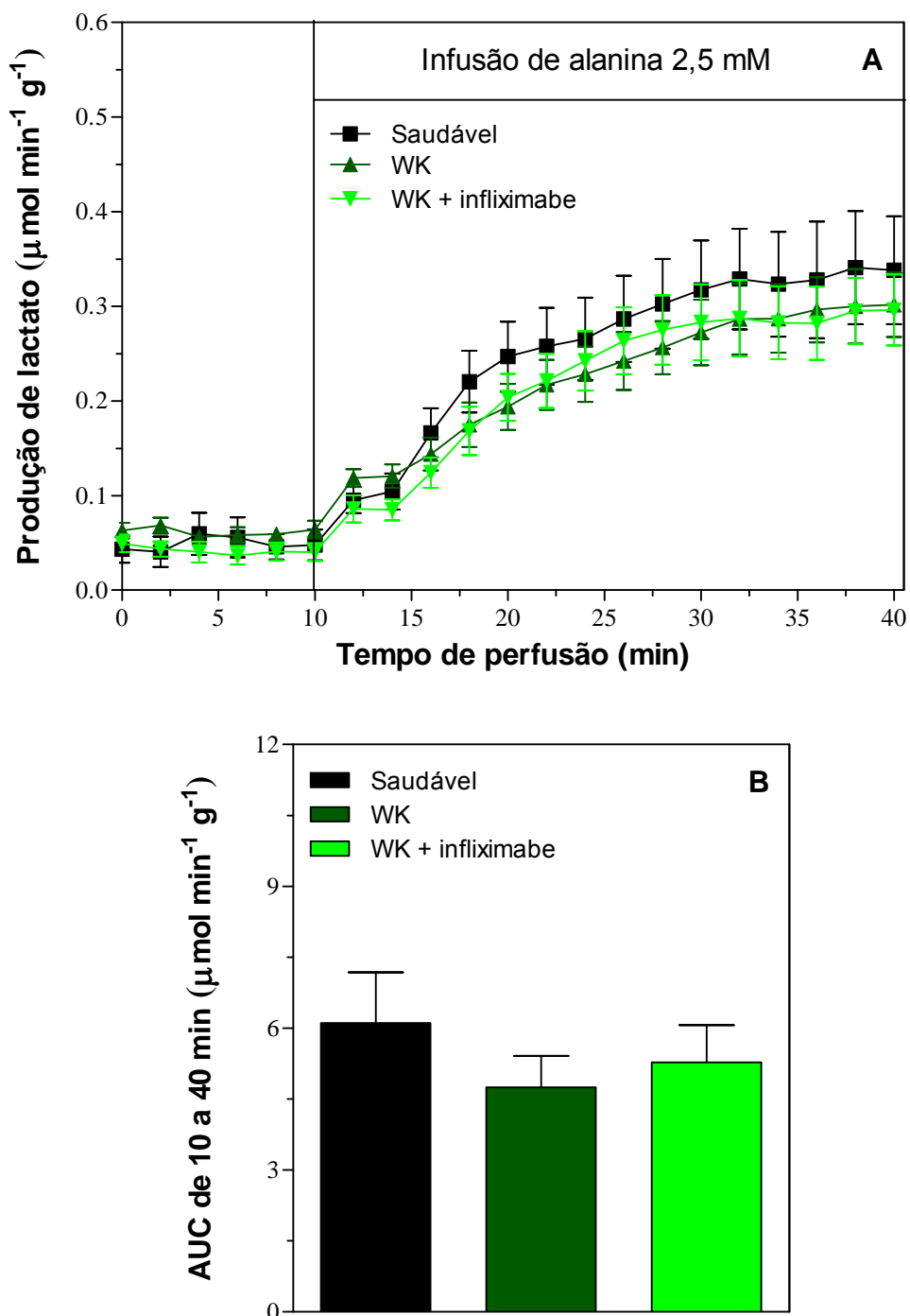
A infusão do precursor neoglicogênico alanina no fígado, aos 10 minutos do período de perfusão, promoveu rápido aumento na produção de glicose (figura 11A), lactato (figura 12A), piruvato (figura 13A) e uréia (figura 14A), nos animais saudáveis e nos portadores de tumor (WK ou WK+infiximabe). No entanto, os fígados dos animais portadores de tumor apresentaram menor produção de glicose, piruvato e uréia (figuras 11B, 13B e 14B) e tendência de redução na produção de lactato (figura 12B) quando comparado ao grupo saudável. Contudo, a redução na produção de glicose e uréia (figuras 11B e 14B) tendeu a ser menor no grupo WK+infiximabe do que no WK, como evidenciado pelas AUCs.

Figura 11 – Produção de glicose (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infliximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



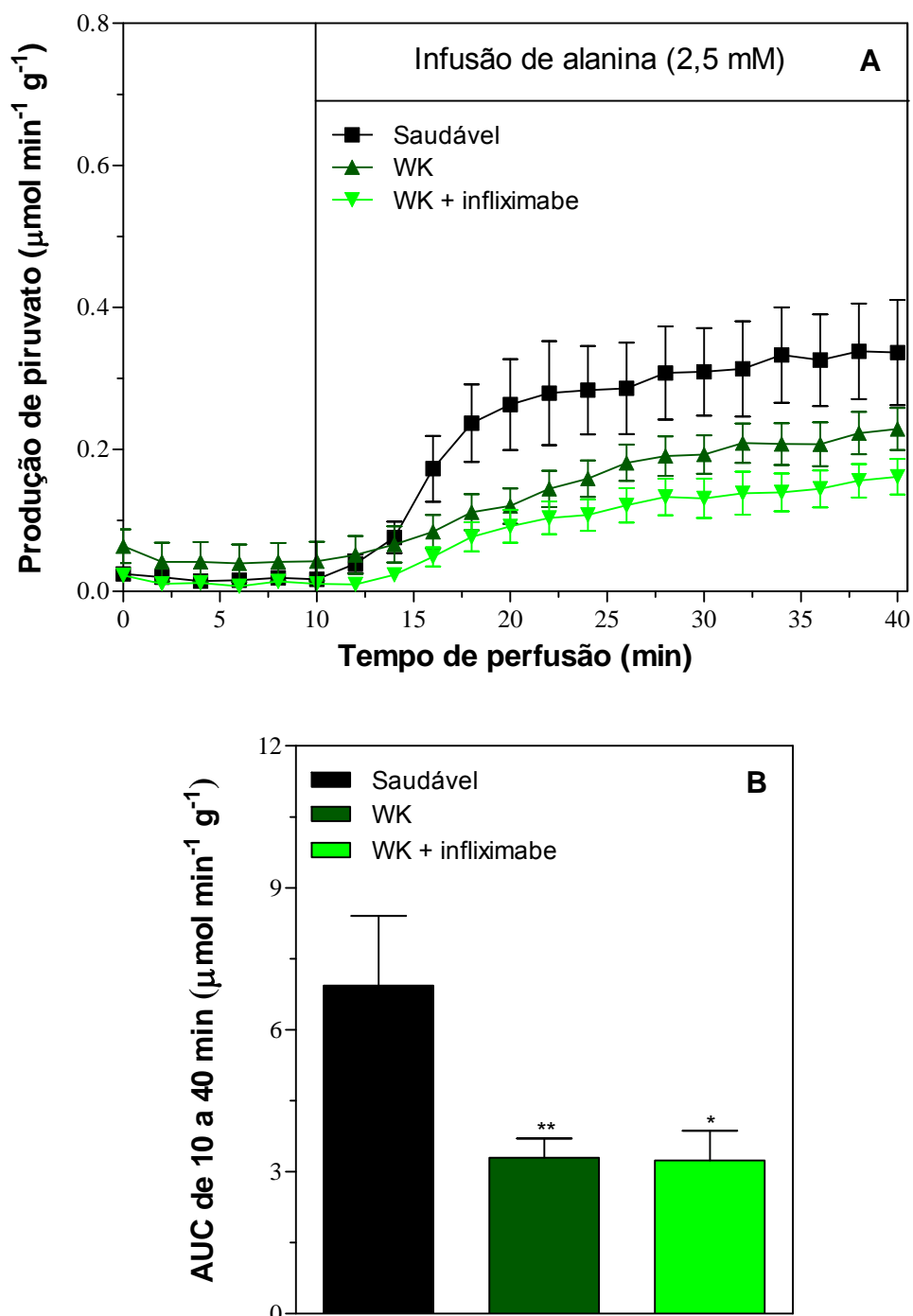
Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 11 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. ** $p < 0,01$ versus saudável.

Figura 12 – Produção de lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar



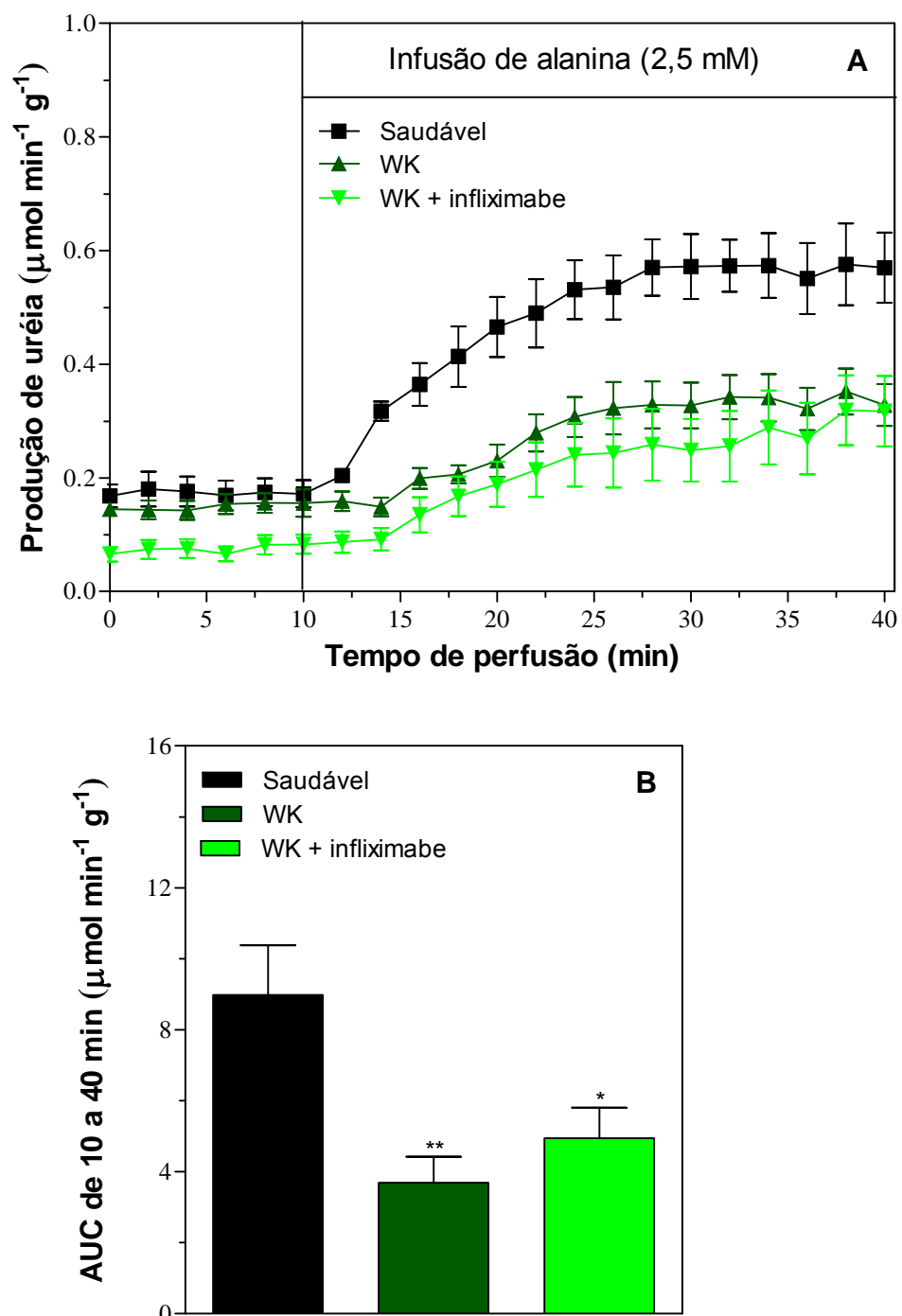
Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls.

Figura 13 – Produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável.

Figura 14 – Produção de uréia (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável.

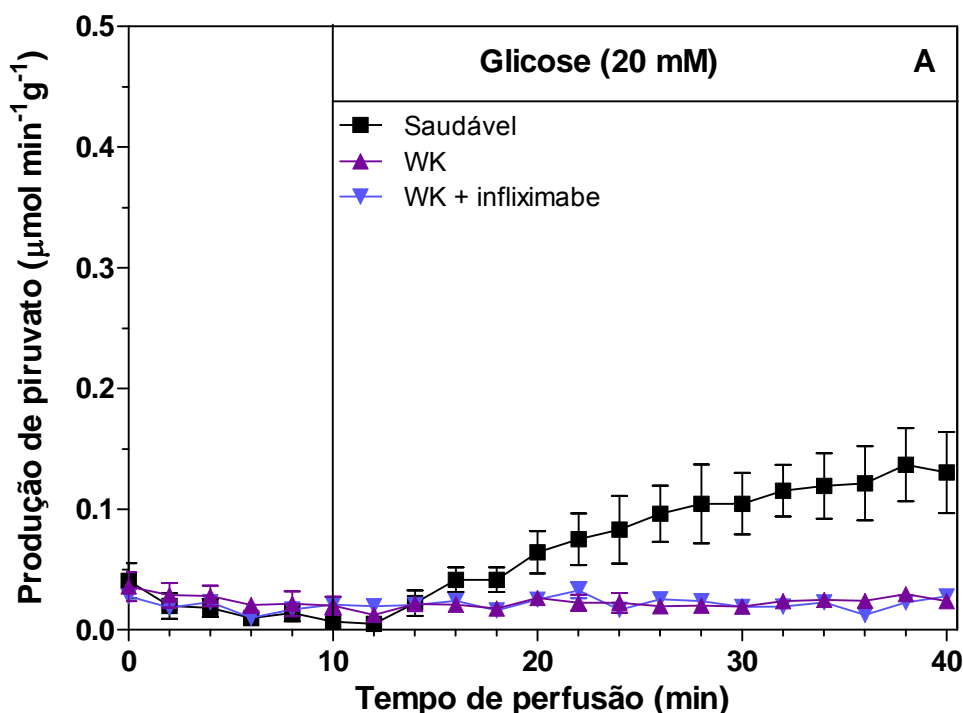
4.6 Efeito do Infiximabe na Glicólise Hepática

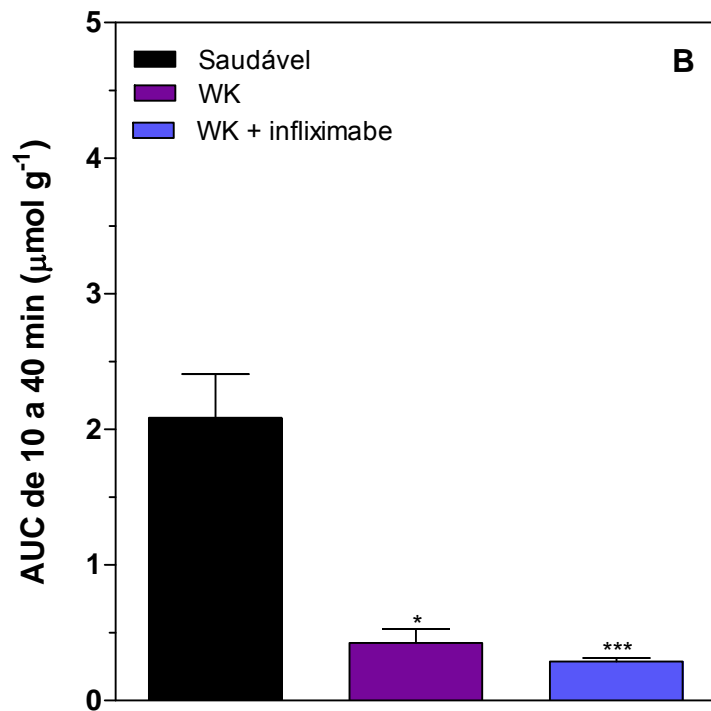
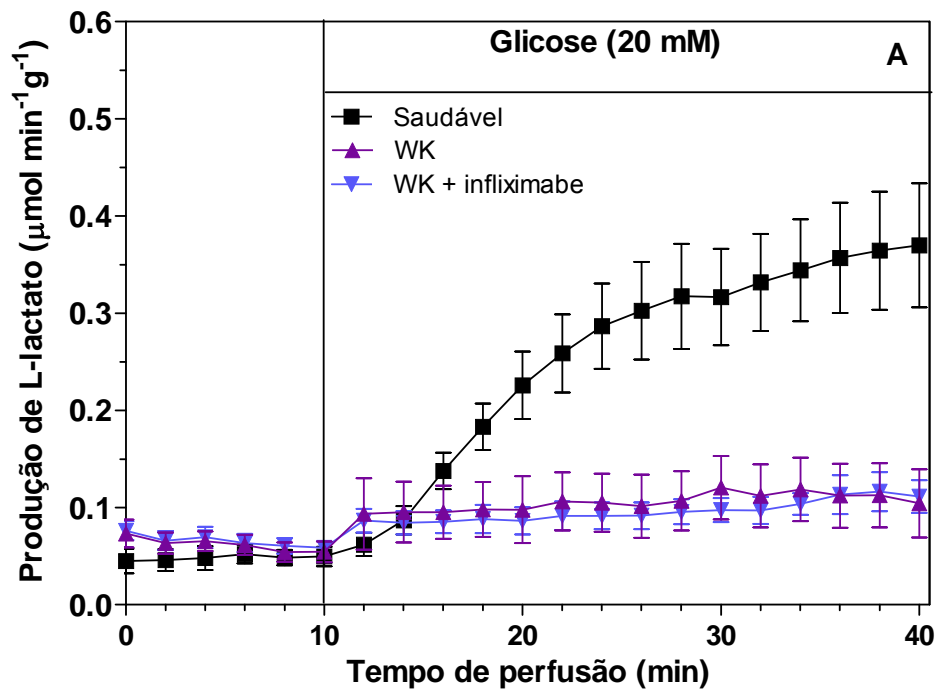
A infusão hepática de glicose (20 mM), aos 10 minutos do período de perfusão, aumentou a produção de lactato nos grupos saudável, WK e WK+infiximabe, porém, o aumento foi significativamente menor (figura 15A), no grupo WK e WK+infiximabe como evidenciado pelas AUCs (figura 15B).

O mesmo observou-se em relação à produção hepática de piruvato, onde, houve aumento da sua produção após infusão de glicose tanto no grupo saudável quanto nos portadores de tumor (WK e WK+infiximabe) sendo este aumento significativamente menor nos grupos WK e WK+infiximabe em relação ao grupo saudável (figuras 16A e 16B).

A glicólise, calculada como a soma da produção hepática de lactato e piruvato, também mostrou-se aumentada após infusão de glicose no grupo saudável e nos grupos WK e WK+infiximabe, sendo este aumento menos acentuado nos grupos portadores de tumor (figura 17A), como poder ser verificado pelas AUCs (figura 17B). Como na produção de lactato e piruvato, também não houve diferença significativa na taxa de glicólise entre os animais WK e WK+infiximabe.

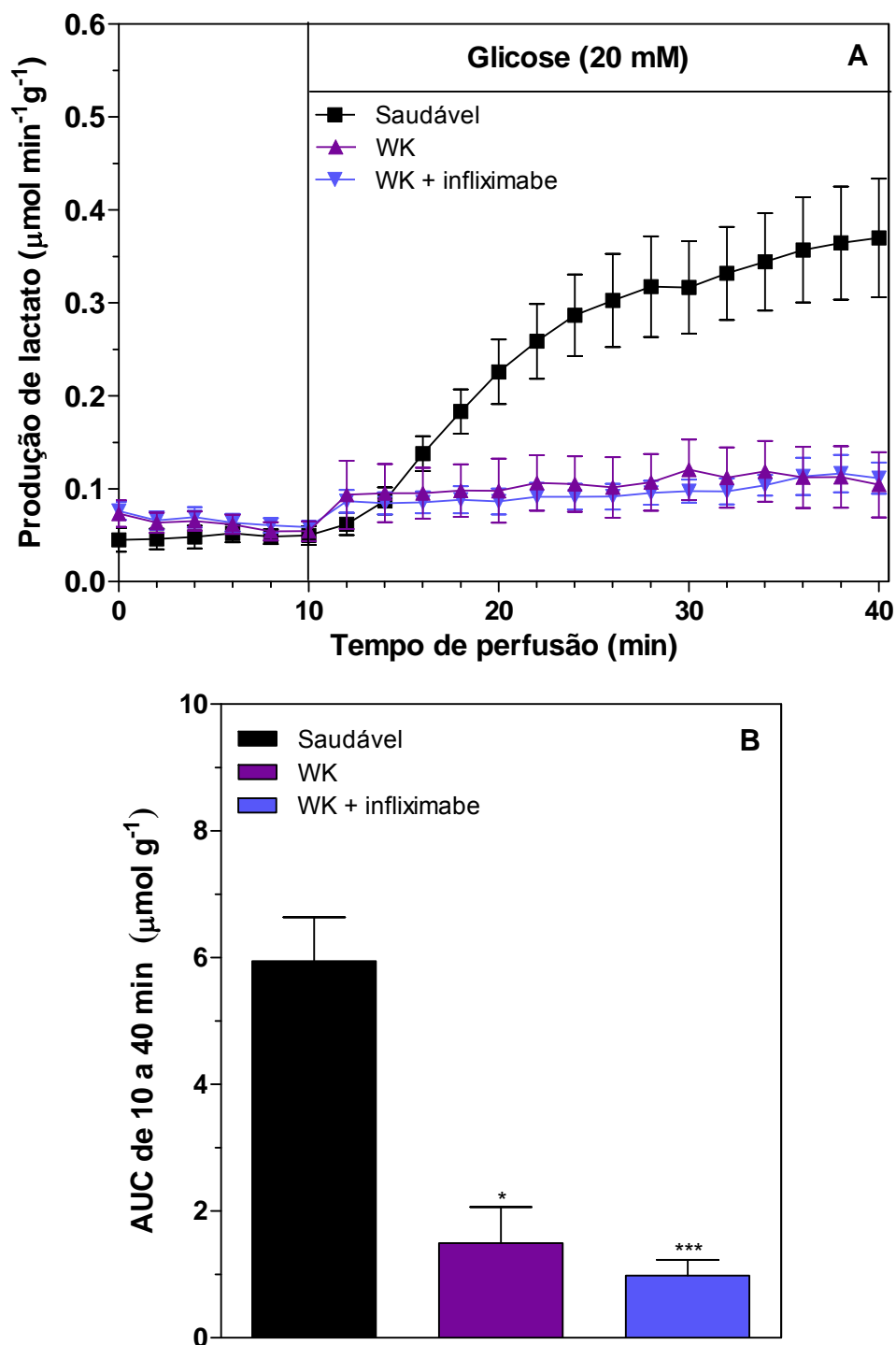
Figura 15 – Produção de lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infiximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar.





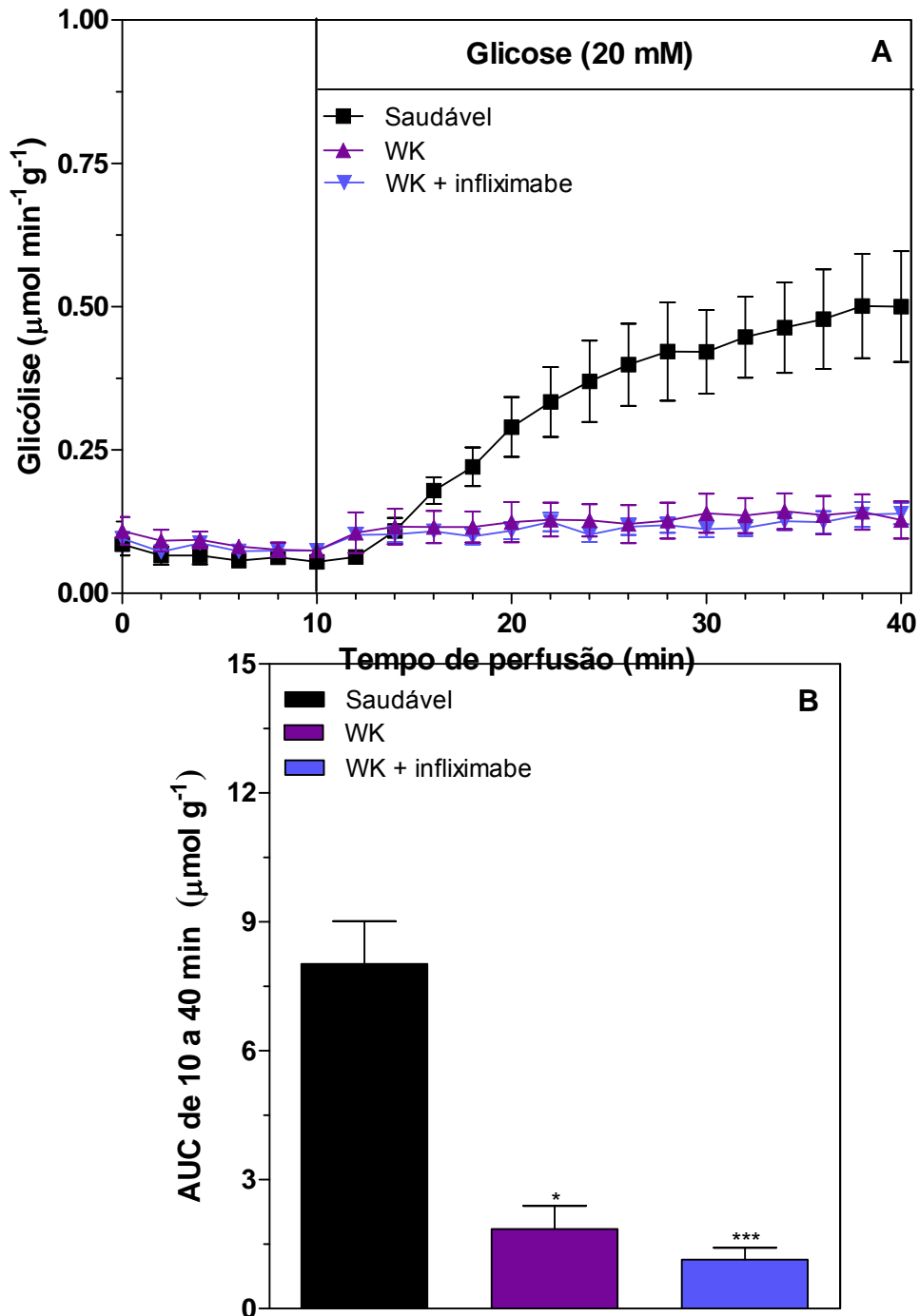
Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

Figura 16 – Produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar



Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável

Figura 17 – Glicólise (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com infliximabe (WK+infiximabe) ou não tratados (WK), submetidos a 24 horas de privação alimentar



Fígados de ratos foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

5 DISCUSSÃO

O infliximabe é um anticorpo anti-TNF α que neutraliza a atividade do TNF α por se ligar a sua forma solúvel e prevenir a sua interação com receptores de superfície celular (Knight, 1993). É uma das drogas disponíveis e aprovadas para uso humano e está sendo amplamente empregado por milhares de pacientes para o tratamento de algumas doenças inflamatórias (Bachmann et al., 2010; Scott e Kingsley, 2006).

Com base nestas evidências e em outros efeitos metabólicos benéficos do infliximabe (Haida et al., 2011; Araújo et al., 2007; Barbuio et al., 2007; Gonzáles-Gay et al., 2006; Yazdani-Biuki et al., 2004) e considerando que o TNF α é um importante mediador da caquexia e de várias alterações metabólicas associadas ao câncer, avaliou-se no presente trabalho, o efeito do infliximabe no crescimento tumoral, nos parâmetros de caquexia-anorexia e em alguns parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256.

Embora o TNF α esteja envolvido no controle do crescimento tumoral e há relatos de que o TNF α endógeno, produzido cronicamente no microambiente do tumor, aumenta o crescimento do tumor (Balkwill, 2002), o tratamento com infliximabe durante 12 dias não alterou o crescimento do tumor Walker-256 (figura 1). Em concordância, a terapia com outros agentes anti-TNF α não alterou o crescimento do tumor Yoshida AH-130 (Costelli, 1993), porém diminuiu o crescimento do tumor induzido por metilcolantreno (MCG-101) (Gelin et al., 1991).

Apesar do tratamento com infliximabe não ter reduzido o crescimento tumoral, ele diminuiu a acentuada perda de massa corpórea (figura 2) e do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 3) induzidas pelo tumor.

A perda de peso na caquexia do câncer é em grande parte devida à depleção de massa adiposa (Tisdale et al., 2010; Argilés et al., 2007, 2005; Augtsson et al., 2007) e o TNF α é apontado como o principal mediador desta alteração. O TNF α diminui a massa adiposa por estimular a lipólise por meio da 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 de AMPc intracelular, o qual ativa a proteína quinase A

(Tisdale, 2003; Warne, 2003), estimuladora da lipase hormônio sensível (HSL).

Além de estimular a lipólise (Tisdale, 2003; Warne, 2003; MacDouglass e Mandrup, 2002), o $TNF\alpha$ é capaz de promover aumento da apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (Warne, 2003; Prins et al., 1997) e inibir a lipogênese e adipogênese (Warne, 2003). O resultado do tratamento com infliximabe sobre a massa adiposa, prevenindo sua perda, indica o $TNF\alpha$ como sendo o principal mediador desta alteração neste modelo experimental de câncer, embora o fator mobilizador de lipídeos (LMF), produzido pelo tumor, e o fator zinco-alfa-2 glicoproteína (ZAG), produzido pelo tumor e hospedeiro, sejam outros mediadores envolvidos na perda de massa adiposa associada ao câncer (Tisdale, 2010, 2004, 2003).

Em concordância com nossos resultados, o tratamento com outros agentes anti- $TNF\alpha$ diminuiu a perda de peso em camundongos portadores de adenocarcinoma de pulmão ou de sarcoma induzido por metilcolantreno, através da redução da depleção de massa adiposa (Sherry et al., 1989).

Além de amenizar a perda de massa corpórea e prevenir a perda de massa adiposa retroperitoneal, o tratamento com infliximabe tendeu a amenizar a diminuição da massa do músculo gastrocnêmio (figura 4) induzida pelo tumor. A falta de efeito significativo do infliximabe na redução da massa muscular esquelética é consistente com seu efeito discreto, embora significativo, na perda de massa corpórea e sugere que o $TNF\alpha$ não é o principal mediador da perda de massa do gastrocnêmio.

A redução da massa muscular esquelética induzida pelo tumor pode ter sido devida a elevada degradação e/ou a reduzida síntese protéica (Tisdale, 2000, 1999) e/ou em decorrência da apoptose celular (Argilés et al., 2005) promovidas pelo $TNF\alpha$ e por outras citocinas (IL6, IL1 e $INF\gamma$), assim como por outros mediadores produzidos pelo tumor, como o (PIF) (Loberg et al., 2007; Kotler, 2000) e os toxormônios (Rubin, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que as citocinas e o PIF induzem degradação protéica através da ativação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (Tisdale, 2003, 2002, 2001) e que o PIF (Tisdale, 2001, 2000) e os toxormônios (Rubin, 2003) reduzem a síntese protéica muscular esquelética através da fosforilação do fator de iniciação eucariótico alfa 2 ($eIF2\alpha$),

uma proteína que medeia um dos passos necessários para a iniciação da tradução do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) (Tisdale, 2010). Estudos têm também mostrado que os níveis circulantes de PIF correlacionam com o aparecimento da caquexia (Wigmore et al., 2002; Cariuk et al. 1997; Todorov et al., 1997), e que antagonistas para o PIF (Smith et al, 2004; May et al, 2002) foram capazes de prevenir a perda muscular em pacientes com câncer, sugerindo que esse fator tumoral possa ser mais importante do que outros fatores na perda de massa muscular esquelética (Donohoe et al., 2011).

Diferente dos resultados do presente estudo, a terapia com outro agente anti-TNF α diminuiu a degradação protéica e a perda de massa do músculo gastrocnêmio em ratos portadores do tumor ascítico Yoshida AH-130 (Costelli et al., 1993). No entanto, a falta de efeito significativo do infliximabe na redução da massa do músculo gastrocnêmio, no presente estudo, não descarta a possibilidade do infliximabe ter efeito protetor sobre a degradação de outros músculos, como, por exemplo, o sóleo, uma vez que o tratamento agudo com TNF α causou elevação da taxa proteolítica e inibição da síntese protéica no músculo sóleo, mas não no gastrocnêmio e extensor digitório (Tisdale, 2005).

O tratamento com infliximabe também tendeu amenizar a diminuição da ingestão alimentar (figura 5), sugerindo que outros fatores, além do TNF α , estão envolvidos na anorexia presente nos ratos portadores de tumor Walker-256. Citocinas como a IL1 e o TNF α induzem anorexia por estimularem a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRH, fator anorexigênico) no hipotálamo (Arruda et al., 2010; Martgnoni et al., 2003) e o disparo de neurônios sensíveis à glicose do núcleo ventromedial do hipotálamo e da área hipotalâmica lateral (Argilés et al., 2003). A IL1, em particular, tem sido associada à anorexia pelo bloqueio da liberação do neuropeptídeo Y (NPY, fator orexigênico). Os níveis desse peptídeo encontram-se reduzidos em ratos anoréxicos portadores de tumor e uma correlação entre ingestão alimentar e IL1 no cérebro tem sido encontrada em ratos com câncer (Chance et al., 1994)

Assim como nos nossos resultados, a administração intracerebroventricular de infliximabe não aumentou a ingestão alimentar em ratos portadores de tumor Walker-256 (Arruda et al., 2010), no entanto, a terapia com outros agentes anti-TNF α aumentou a ingestão alimentar em ratos anoréxicos

portadores de outros tipos de tumor (Torelli et al., 1999; Smith e Kluger, 1993).

Adicionalmente, o tratamento com infliximabe tendeu amenizar o aumento do triacilglicerol plasmático (figura 6) sugerindo também que outros fatores, além do $\text{TNF}\alpha$, devem estar envolvidos na hipertriacilglicerolemia provocada pelo tumor Walker-256.

A hipertriacilglicerolemia dos ratos portadores de tumor pode ter sido causada por inibição da LPL induzida por citocinas ($\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 α , $\text{INF}\alpha$ e $\text{INF}\gamma$) e pelo aumento de ácidos graxos livres no sangue (Delarue e Magnan, 2007; Meter e Gressner, 2004; Tisdale, 1999; Warne, 2003; Yu e Ginsberg, 2005). No fígado, o $\text{TNF}\alpha$ aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, enquanto diminui a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos. Desta forma, o $\text{TNF}\alpha$ estimula a produção de VLDL pelo fígado. O aumento da secreção de VLDL, juntamente com a inibição da LPL, mediada pelo $\text{TNF}\alpha$ no tecido adiposo, resulta em significativa hipertriacilglicerolemia. (Mlinar et al., 2007; Grunfeld e Feingold, 1992).

Além disso, o tratamento com infliximabe tendeu amenizar a redução da resposta periférica à insulina (figura 10) nos ratos portadores de tumor, sugerindo também que o $\text{TNF}\alpha$ não é o único mediador desta alteração nesse modelo experimental de câncer.

A resistência à insulina no câncer tem sido relacionada às citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$ e IL6) (Kanety et al., 1995; Noguchi et al., 1998; Yoshikawa et al., 1999; Moller 2000; Warne, 2003; Kim et al., 2004) e ao aumento dos ácidos graxos livres circulantes (Delarue e Magnan, 2007; Schinner et al., 2005; Boden, 2002; Shulman, 2000) os quais interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina, diminuindo a captação de glicose estimulada pela insulina.

O $\text{TNF}\alpha$ é capaz de promover resistência à insulina por aumentar a fosforilação em resíduos de serina e diminuir a fosforilação da tirosina do IRS-1, diminuindo a ação estimulatória da insulina, além de reduzir a fosforilação da proteína quinase B (PKB ou AKT), diminuindo a captação da glicose, uma vez que a translocação do transportador de glicose GLUT4 é dependente, dentre outros, da fosforilação da PKB (Plomgaard et al., 2005).

A IL6 também tem sido relacionada à diminuição da sensibilidade muscular e hepática à insulina, o que pode ser devida, pelo menos em parte, a

redução da associação do IRS-1 com a fosfaditilinositol-3-quinase (PI3K), reduzindo o transporte de glicose estimulado pela insulina (Kim et al., 2004).

Já o aumento nas concentrações de ácidos graxos circulantes, provenientes do catabolismo aumentado do tecido adiposo, pode prejudicar a sinalização da insulina devido ao acúmulo intracelular de intermediários do metabolismo de ácidos graxos (acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas) e, conseqüentemente de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam serina/treonina quinases, enzimas que fosforilam os aminoácidos serina e treonina, prejudicando a fosforilação da tirosina de proteínas da cascata de sinalização da insulina, reduzindo assim, a captação e oxidação da glicose (Delaure e Magnan, 2007; Schinner et al., 2005; Shulman, 2000).

Em contraste a falta de efeito significativo do infliximabe na resposta periférica à insulina, o tratamento com infliximabe, na mesma dose utilizada no presente estudo, melhorou a transdução de sinal da insulina (Barbuio et al., 2007) e restaurou a homeostase glicêmica (Araújo et al., 2007) em modelo animal de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Outros estudos também reportaram o efeito benéfico do infliximabe no controle glicêmico de pacientes resistentes à insulina (González-Gay et al., 2006; Yazdani-Biuki et al., 2004). Além disso, a neutralização do $TNF\alpha$, com outro agente anti- $TNF\alpha$, aumentou a autofosforilação do IR e a fosforilação do IRS-1 no tecido adiposo e muscular, passos importantes para a sinalização insulínica (Hotamisligil et al., 1994). Entretanto, outros estudos mostraram falha na melhora da sensibilidade à insulina após administração de anticorpo anti- $TNF\alpha$ em pacientes portadores de diabetes tipo 2 (Ofei et al., 1996; Paquot et al., 2000).

Com relação à neoglicogênese hepática a partir da alanina, o tratamento com infliximabe tendeu amenizar sua redução induzida pelo tumor (figura 11), sugerindo também que o $TNF\alpha$ não é o único mediador desta inibição.

A inibição da neoglicogênese hepática nos ratos portadores de tumor, evidenciada pela menor produção de glicose (figura 11), piruvato (figura 13) e uréia (figura 14) e pela tendência na redução da produção de lactato (figura 12), pode ter sido resultante da ação inibitória de citocinas, uma vez que a administração de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina em perfusão de fígado (Kelmer-Bracht et al., 2006). Similarmente, o $TNF\alpha$ inibiu a neoglicogênese a

partir do lactato em cultura de hepatócitos (Caton et al., 2009) e o TNF α (Caton et al., 2009), IL1 β e IL10 (Yerkovich et al., 2004; Metzger et al., 1997) reduziram a atividade da PEPCCK (enzima chave da neoglicogênese).

Diferentemente dos nossos resultados, o tratamento com infliximabe na mesma dose usada no presente estudo, restaurou o aumento da neoglicogênese hepática em modelo animal de obesidade e diabetes induzida por dieta (Haida et al., 2011).

Portanto, é improvável que a falta de efeito significativo do infliximabe nos vários parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256 (figuras 4, 5, 6, 10 e 11) foi devida a utilização de dose insuficiente de infliximabe, uma vez que doses similares foram efetivas na redução dos níveis de TNF α (Barbuio et al., 2007; Woodruff et al., 2003) e reverteram completamente algumas alterações metabólicas em modelos experimentais não associados ao câncer (Haida et al., 2011; Araújo et al., 2007; Barbuio et al., 2007).

Em contraste aos efeitos ou tendência de efeitos benéficos do infliximabe já descritos, o tratamento com infliximabe não atenuou a redução acentuada da glicólise (figura 15) e glicemia (figura 7) e nem o aumento do lactato (figura 8) e uréia (figura 9) no sangue dos ratos portadores de tumor. Esta falta de efeito do infliximabe sugere que o TNF α não está envolvido nestas alterações metabólicas.

A redução da glicólise no fígado dos ratos portadores de tumor Walker-256 parece estar relacionada à inibição da glicoquinase (Vicentino et al., 2002), enzima que fosforila a glicose que entra no hepatócito, favorecendo a sua captação hepática. A redução da atividade da glicoquinase pode ser devida a baixa concentração de insulina no sangue dos ratos portadores de tumor (Fernandes et al., 1990) e/ou a diminuição da resposta hepática à insulina, já que a insulina aumenta a atividade da glicoquinase.

O principal fator que contribui para a redução da glicemia e aumento do lactato no sangue em portadores de tumor de crescimento rápido parece ser a alta taxa de captação e utilização de glicose pelo tumor, ou seja, parece ser o metabolismo das células tumorais. Tumores de crescimento rápido, como o tumor Walker-256, tendem a ter pobre suprimento sanguíneo, levando o tumor à baixa oxigenação e utilização da via glicolítica anaeróbica para a produção de energia (Piffar et al., 2003; Vicentino et al., 2002). A hipóxia desvia o fluxo metabólico da

célula tumoral para a via glicolítica anaeróbica, através da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF), o que promove aumento acentuado no consumo de glicose e produção de lactato pelo tumor, produto final desta via (Brahimi-Horn et al., 2007; Marín-Hernandez et al., 2009; Tisdale, 2002). Assim, o lactato produzido pelas células tumorais pode ter sido, entre outros, responsável pelo aumento da sua concentração no sangue. Similarmente, é possível que a produção de uréia pelas células Walker-256 (Rebeca et al., 2006) tenha contribuído de forma importante para elevação da uremia nos ratos portadores de tumor. A falta de efeito do infliximabe na alteração da glicemia, lactato e uréia no sangue é consistente com a falta de influência desta terapia anti-TNF α no crescimento tumoral.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o tratamento dos ratos portadores de tumor Walker-256 com infliximabe:

- ✓ Não alterou o crescimento tumoral;
- ✓ Amenizou a perda de massa corpórea e preveniu a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal;
- ✓ Tendeu a atenuar a diminuição da massa músculo gastrocnêmio, a ingestão alimentar, a resposta periférica à insulina e a neoglicogênese hepática, assim como o aumento do triacilglicerol plasmático;
- ✓ Não atenuou a redução da glicemia e glicólise e nem o aumento do lactato e uréia plasmáticos.

Estes resultados fornecem evidências adicionais para o papel do $TNF\alpha$ na patogênese das alterações metabólicas associadas ao tumor Walker-256, demonstrando que o $TNF\alpha$ não é o único mediador destas alterações neste modelo experimental de câncer.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.
- Agostino D, Cliffton EE. The growth and transplantability of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. *Cell Mol Life Sci* 1968;24(2):166-7.
- Albrecht J, Canada TM. Cachexia and anorexia in malignancy. *Hematol Oncol Clin N* 1996;10(4):791-800.
- Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 2007;148(12):5991-7.
- Argilés JM, Olivan M, Busquets S, López-Soriano FJ. Optimal management of cancer anorexia-cachexia syndrome. *Cancer Manag Res* 2010;2:27-38.
- Argilés JM. Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1(4):293-8.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cytokines as mediators and targets of cancer cachexia. *Canc Treat Res* 2006;130:199-217.
- Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition* 2005;21(9):977-85.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(4): 401-6.
- Argilés JM, López-Soriano FJ. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17(6):223-6.
- Arruda AP, Milanski M, Romanatto T, Solon C, Coope A, Alberici LC, Festuccia WT, Hirabara SM, Ropelle E, Curi R, Carvalheira JB, Vercesi AE, Velloso LA. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology* 2010;151(2):683-94.
- Augtsson T, Ryden M, Hoffstedt J, Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, Isaksson B, Permert J, Arner P. Mechanisms of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* 2007;67:5531-7.
- Bachmann F, Mast A, Sterry W, Philipp S. Safety and efficacy of the tumor necrosis factor antagonists. *Sem Cutan Med Surg* 2010;29(1):35-45.
- Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:135-41.
- Barauna-Neto JC, Carvalho MB, Franzi SA. Fisiopatologia e tratamento da caquexia neoplásica. *Rev Bras Cancerol* 2001;15(3): 26-32.

Barbuio R, Milanski M, Bertolo M, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high fat diet. *J Endocrinol* 2007;194:539-50.

Bergmeyer HU, Bernt E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York 1974;1205-15.

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. *J Exp Med* 1985;161(5):984-95.

Blumberg D, Hochwald S, Burt M, Donner D, Brennan MF. Tumour necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine in vivo. *J Surg Oncol* 1995;59:220-224.

Boddaert MS, Gerritsen WR, Pinedo HM. On our way to target therapy for cachexia in cancer? *Curr Opin Oncol* 2008;18:335-40.

Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5(5):545-9.

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(2):223-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Briot K, Garnero P, Le Henanff A, Dougados M, Roux C. Body weight, body composition, and bone turnover changes in patients with spondyloarthritis receiving anti tumor necrosis factor- α treatment. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1137-40.

Caldarola L, Poli G, Dei Poli M, Bigliani S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. *Panminerva Medica* 1968;10(6):246-9.

Carbó N, Busquets S, Van Royen M, Alvarez B, López-Soriano FJ, Argilés JM. TNF- α is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer* 2002;86(6):1012-6.

Carbó N, Costelli P, Tessitore L. Anti-TNF α treatment interferes with changes in lipid metabolism in a tumor cachexia model. *Clin Sci* 1994;87:349-55.

Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ, Tisdale MJ. Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer* 1997;76:606-13.

Cassola P, Moreira CCL, Liboni TF, Zaia CTBV, Borba-Murad GR, Souza HM. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumor induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochem Funct* 2011;30(1):1-6.

Caton PW, Nayuni NK, Murch O, Corder R. Endotoxin induced hyperlactatemia and hypoglycemia is linked to decreased mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Life Sci* 2009;84(21-22):738-44.

Chance WT, Balasubramariam A, Dayal R, Brown J, Fischer JE. Hypotalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats. *Life Sci* 1994;54:1869-74.

Corbello-Pereira SR, Darronqui E, Constatin J, Silva MHRA, Yamamoto NS, Bracht A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor bearing rats. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:187-96.

Costelli P, Bossola M, Muscaritoli M, Grieco G, Bonelli G, Bellantone T, Doglieto GB, Baccino FM, Rossi-Fanelli R. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-Ubiquitin and Ca-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour bearing rats. *Citokyne* 2002;19(1):1-5.

Costelli P, Carbó N, Tessitore I, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Baccino FM. TNF- α mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest* 1993;92(6):2783-9.

Czok R, Lamprecht W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by Bergmeyer HU, New York; Academic Press 1974;1446-8.

Del Aguila LF, Claffey K, Kirmwan JP. TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 276:E849-E55.

Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:142-8.

Donohoe CL, Ryan AM, Reynolds JV. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. *Gastroenterol Res Pract* 2011:1-13.

Dulleinen HM, Deventer SJH, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GNJ, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.

Earle WR. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256: in vivo and in vitro. *Am J Cancer* 1935;566-612.

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl JA, WoodyJN. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993;36:681-90

Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. Cytokines, the acute-phase response, and resting expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* 1994;219:325-31.

Fernandes IC, Machado UF, Nogueira CR, Carpinelli, AR, Curi R. Insulin secretion in

walker-256 tumor cachexia. *Am J Physiol* 1990; 258 (6 Pt 1):1033-6.

Franchimont D, Roland S, Gustot T, Quertinmont E, Toubouti Y, Gervy MC, Deviere J, Van Gossum A. Impact of infliximab on serum leptin in patients with Crohn's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3510-16.

Gelin J, Moldawer II, 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 Res* 1991;51(1):415-21.

Ghezzi P, Cerami A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol* 2005;31:239-44.

Gonzalez-Gay MA, Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-A, Andrade A, Martin J, Llorca J. Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(1):83-6.

Grunfeld C, Feingold KR. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992 200:224-7.

Guaitani A, Recchia M, Carli M, Rocchetti M, Bartosek I, Garattini S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. *Oncology* 1982;39(3):173-8.

Gutmann I, Bergmeyer HU. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York 1974;1790-8.

Gutmann I, Wahlefeld W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York 1974;1464-72.

Haida KS, Bertachini G, Tavoni T, Guilhermetti M, Loures MR, Bazotte RB. Infliximab treatment prevents hyperglycemia and intensification of hepatic gluconeogenesis in an animal model of high fat diet-induced liver glucose overproduction. *Arq Biol Tecnol* 2011, in press.

Hill MR, McCall RE. Identification of tumor necrosis factor as a transcriptional regulator of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene following endotoxin treatment of mice. *Infect Immun* 1992;60:4040-50.

Hotamisligil GS, Peraldi O, Budavari A, IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8.

Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994;94(4):1543-9.

Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and

management. *CA Cancer J Clin* 2002;52:72-91.

Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res* 1999;59(18):4493-501.

Jatoi A, Sideras K, Nguyen PL. Tumor necrosis factor alpha as a treatment target for the cancer anorexia/weight loss syndrome. *Supportive Cancer Ther* 2004;1(4):237-42.

Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *J Biol Chem* 1995;270(40):23780-4.

Kelmer-Bracht AM, Broetto-Biazon AC, Sá-Nakanishi AB, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A. Low doses of tumour necrosis factor α and interleukin 1β diminish hepatic gluconeogenesis from alanine in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;99(5):335-9.

Kerlmer-Bracht AM, Ishii EL, Andrade PVM, Bracht A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. *Arq Biol Tecnol* 1984;27(4):419-38.

Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB. Differential effects of interleukin-6 and 10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 2004;53(4):1060-7.

Kiortsis DN, Mavridis AK, Vasakos S, Nikas SN, Drosos AA. Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:765-6.

Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993;30(16):1443-53.

Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med* 2000;133(8):622-34.

Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, Costelli P, Tessitore L, Baccino FM, Agell N, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Argilés JM. Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221(3):653-5.

Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin* 2007;57(4):225-41

Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grünke M, Schwerdtner N, Nüsslein H, Woody J, Kalden JR, Manger B. In vivo blockade of TNF- α by intravenous infusion a chimeric monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis: short term cellular and molecular effects. *J Immunol* 1996;156(4):1646-53.

Lundholm K, Holm G, Schersten T. Insulin resistance in patients with cancer. *Cancer Res* 1978;38:4665-70.

MacDougald O, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:5-11

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009;9(9):1084-101.

Martignoni ME, Kunze P, Priess H. Cancer cachexia. *Mol Cancer* 2003;2(36):1-3.

May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourikhane A, Abumrad NN. Reversal of cancer related wasting using oral supplementation with a combination of β -hidroxy- β -methylbutyrate, arginine and glutamine. *Am J Surg* 2002;183:471-9.

Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50:1511-25.

Metzger S, Begleitner N, Barash V. Tumor necrosis factor inhibits the transcriptional rate of glucose-6-phosphatase in vivo and in vitro. *Metabolism* 1997;46(5):579-83.

Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta* 2007;375:20-35.

Moldawer II, Rogy MA, Lowry SE. The role of cytokines in cancer cachexia. *J Parenter Enteral Nutr* 1993;16:43-9.

Moller DE. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11(6):212-7.

Morais H. Avaliação da resposta à insulina e ao AMPc em ratos com tumor Walker-256. Dissertação de mestrado/UEL, Londrina, 2011.

Moreira CCL. Avaliação da neoglicogênese hepática e das citocinas circulantes na caquexia induzida por tumor Walker-256. Dissertação de mestrado/UEL, Londrina, 2010.

Moreira JC, Waitsberg DL. Consequências funcionais da desnutrição. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 2000;399-410.

Noguchi Y; Yoshikawa T; Marat D; Doi C; Makino T; Fukuzawa K; Tsuburaya A, Satoh S, Ito T, Mitsue S. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- α expression in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(3):887-92.

Noguchi Y, Nomura K, Yashikawa T, Fuzukama K, Makino T, Tsubara A, Matsumoto A. Role of insulin resistance in decreasing lipoprotein lipase activity in tumor-bearing rats. *Surg Today* 1996;26(4):271-5.

Noguchi Y, Vydelligum NA, Brennan MF. The reversal of increased gluconeogenesis in the tumor-bearing rat by tumor removal and food intake. *Surgery* 1989;106(2):423-31.

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996;45(7):881-5.

Paquot N. No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1316-9.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Bio Chem* 1997;272: 29911-8.

Piffar PM, Fernandez R, Tchaikosviski Jr O, Hirabara SM, Folador A, Pinto GJ, Jakobi S, Gobbo-Bordon D, Rohn TV, Fabricio VEB, Moretto KD, Tosta E, Curi R, Fernandes LC. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor bearing rats. *Cancer Lett* 2003; 201:139-48.

Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittenderfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005;54: 2939-45.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997;46:1939-44.

Rebeca R, Bracht L, Noleto GR, Martinez GR, Cadena SMSC, Carnieri EGS, Rocha MEM, Oliveira MBM. Production of cachexia mediators by Walker-256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct* 2008;26:731-8.

Rubin H. Cancer Cachexia: its correlations and causes. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:5384-9.

Saraceno R, Schipani C, Mazzotta A, Esposito M, Di Renzo L, De Lorenzo A, Chimenti S. Effect of tumor necrosis factor- α on body mass index in patients with psoriasis. *Pharmacol Res* 2008;57(4):290-5.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med* 2005;22(6):674-82.

Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2006;355:704-12.

Seriolo B, Ferrone C, Cutolo M. Long term anti tumor necrosis factor alpha treatment in patients with refractory rheumatoid arthritis: relationship between insulin resistance and disease activity. *J Rheumatol* 2008;35(2):355-7.

Sharma R, Anker SD. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol* 2002;85:161-71.

Shealy DJ, Wooley PH, Emmell E, Volk A, Rosenberg A, Treacy G, Wagner CL, Mayton L, Griswold DE, Song XY. Anti-TNF α antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 2002;4(5):R7.

Sherry BA, Gelin J, Fong Y, Marano M, Wi H, Cerami A, Lowry SF, Lundholm KG, Moldawer LL. Anticachectin/tumor necrosis factor alpha antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. *FASEB J* 1989;3:1956-61.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(2):171-6.

Smith BK, Conn CA, Kluger MJ. Experimental cachexia – effects of MCA sarcoma in the fischer rat. *Am J Physiol* 1993;265:376–84.

Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanisms of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by β -hidroxy- β -methylbutyrate. *Cancer Res* 2004;64:8731-35.

Souza HM. Resposta glicogenolítica e responsividade hepática a substratos neoglicogênicos durante hipoglicemia induzida por insulina. 1999. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Stovroff MC, Fraker DL, Swedenborg JA, Norton JA. Cachectin/tumor necrosis factor: a possible mediator of cancer anorexia in the rat. *Cancer Res* 1988;48(16):4567-72.

Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 1992;89:1681-4.

Tayek JA. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *J Am Coll Nutr* 1992;11:445-56.

Tazi EM, Errihani H. Treatment of cachexia in oncology. *Indian J Palliat Care* 2010;16(3):129-37.

Tisdale MJ. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? *Future Oncol* 2010;6(4):503-13.

Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 2009;89(2):381-410.

Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiol* 2005;20:340-8.

Tisdale MJ. Tumor-host interactions. *J Cell Biochem* 2004;93(5): 871-7.

Tisdale MJ. Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol* 2003;1(3):159-68.

Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002;2(11): 862-71.

Tisdale MJ. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 2001;17:438-42.

Tisdale MJ. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition* 2000;16(10): 1013-4

- Tisdale MJ. Wasting in cancer. *Am Soc Nutr Sci* 1999;243-6.
- Tisdale MJ. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition* 1997;13(1):1-7.
- Tisdale, MJ. Cancer Cachexia. *Anticancer Drugs* 1993;4:115-25.
- Todorov PT, Deacon M, Tisdale MJ. Structural analysis of a tumor produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. *J Biol Chem* 1997;272:12279-88.
- Torelli GF, Megued MM, Moldawer LL, Edwards CK, Kim HJ, Laviano A, Fanelli FR. Use of recombinant human soluble TNF receptor in anorectic tumor bearing rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1999;277(3):850-5.
- Tredget EE, Yu YM, Zhong S, Burini R, Okusawa S, Gelfand JA, Dinarello CA, VR, Young VR, Burke JF. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. *Am J Physiol* 1988;255:E760-8.
- Trinder P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 1969;6:24.
- Truyens C, Torrico F, Angelo-Barrios A, Lucas R, Heremans H, Baetselier P, Carlier Y. The cachexia associated with trypanosoma cruzi acute infection in mice is attenuated by anti-TNF α , but not by anti-IL6 or anti-INF γ . *Parasite Immunol* 1995;17(11):561-8.
- Vicentino C, Constantin J, Bracht A, Yamamoto NS. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. *Liver* 2002;22(4):342-50.
- Walmsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol* 2002;85(1):89-99.
- Warne JP. Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol* 2003;177(3):351-5.
- Wigmore SJ, Fearon KCH, Sangster K, Maingay JP, Garden OJ, Ross JA. Cytokine regulation of constitutive production of interleukin 8 and 6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2002;21:881-6.
- Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. A potent human c5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2003;17:5514-20.
- World Health Organization. World cancer report. 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.
- Yazdani-Biuki B, Stelzl H, Brezinschek HP, Hermann J, Mueller T, Krippel P, Graninger W, Wascher TC. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Eur*

J Clin Invest. 2004;34(9):641-2.

Yerkovich ST, Rigby PJ, Fournier PA, Olynyk JK, Yeoh GC. Kupffer cell cytokines interleukin 1 β and interleukin 10 combine to inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cultured hepatocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(8):1462-72.

Yoshikawa T, Noguchi Y, Satoh S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of GLUT4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256(3):678-81.

Yu B, Zangh D, Zheng H, Zhou Y, Tang X, Li J. Association of IL1 beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer* 2007;14:7-45.

Yu Y-H, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. Sequelae of insulin-resistance adipose tissue. *Circ Res* 2005;96:1042-52.