



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLAVIANE DE FATIMA SILVA

**EFEITOS DA METFORMINA E PIOGLITAZONA, ISOLADAS
OU ASSOCIADAS COM INSULINA, SOBRE A RESISTÊNCIA
INSULÍNICA E ANORMALIDADES METABÓLICAS
RELACIONADAS À CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR
WALKER-256 EM RATOS**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

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

FLAVIANE DE FATIMA SILVA

**EFEITOS DA METFORMINA E PIOGLITAZONA, ISOLADAS OU
ASSOCIADAS COM INSULINA, SOBRE A RESISTÊNCIA INSULÍNICA E
ANORMALIDADES METABÓLICAS RELACIONADAS À CAQUEXIA
INDUZIDA PELO TUMOR WALKER-256 EM RATOS**

Londrina - Paraná
2016

FLAVIANE DE FATIMA SILVA

**EFEITOS DA METFORMINA E PIOGLITAZONA, ISOLADAS
OU ASSOCIADAS COM INSULINA, SOBRE A RESISTÊNCIA
INSULÍNICA E ANORMALIDADES METABÓLICAS
RELACIONADAS À CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR
WALKER-256 EM RATOS**

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

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

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Flaviane de Fatima.

Efeitos da metformina e pioglitazona, isoladas ou associadas com insulina, sobre a resistência insulínica e anormalidades metabólicas relacionadas à caquexia induzida pelo tumor Walker-256 em ratos / Flaviane de Fatima Silva. – Londrina, 2016.
65 f.: il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

Inclui bibliografia.

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

CDU 616-092

FLAVIANE DE FATIMA SILVA

EFEITOS DA METFORMINA E PIOGLITAZONA, ISOLADAS OU ASSOCIADAS COM INSULINA, SOBRE A RESISTÊNCIA INSULÍNICA E ANORMALIDADES METABÓLICAS RELACIONADAS À CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR WALKER-256 EM RATOS

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a todos que sempre estão ao meu lado,
me incentivando e apoiando,
principalmente nos momentos difíceis.
Todo o esforço valerá a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus acima de tudo.

Aos meus pais, Fatima e Venceslau, por sempre me apoiarem. Agradeço especialmente à minha mãe, por estar sempre presente, inclusive nos tratamentos aos finais de semana. Obrigada por todo apoio e por muitas vezes fazer o impossível para me proporcionar uma educação de qualidade. Agradeço também à minha irmã Eliane e à Lili (Luluzinho), por sempre estarem presentes nos melhores e piores momentos.

Aos meus “primos-pais” Claudemir e Maria Sebastiana (Tia Ninha), aos meus avós Paulina e João e também ao Carlinhos por todo o apoio, principalmente financeiro, e por sempre se preocuparem com minha formação.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza. Não tenho palavras para agradecer toda a atenção, dedicação e disposição para ensinar. Sempre será um exemplo como profissional e como pessoa para mim. Obrigada pela confiança em meu trabalho no laboratório, por acreditar que eu seria capaz de atingir nossos objetivos, foi um período de muito crescimento para mim. Obrigada também pelos sábios conselhos profissionais e pessoais, sempre me incentivando a buscar algo maior.

Aos professores Dr Francemilson Goulart Silva e Dr^a Maria Tereza Nunes, por me receberem em seus laboratórios e pelo suporte na realização dos inúmeros *westerns blottings* em tão pouco tempo. Agradeço também à Leonice Poyares (Lhô) e aos alunos do Laboratório de Fisiologia Endócrina da Regulação Hormonal e Expressão Gênica por me receber tão bem e me auxiliar em tudo o que precisei durante os meus experimentos.

Aos professores Dr^a Cássia Thaís Zaia e Dr Dimas Zaia pela disposição em realizar a dosagem de ácidos graxos livres. Agradeço também aos alunos do LaFiNeM que me auxiliaram.

À Milene, Winny e Mahira, que me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto. Obrigada por sempre estarem dispostas a ajudar.

A Priscila Cassolla (Pri), parceira para todos os momentos. Obrigada por todas as dicas, pelos ensinamentos, por ajudar quando eu estava sozinha nos experimentos, por todas as conversas, por todas as risadas, por todas as gordices e pela companhia durante todo o mestrado e durante os altos e baixos da vida.

À Camila, Fernando e Jhonny, pela amizade, por me hospedar e sempre me receber tão bem durante as disciplinas e experimentos em São Paulo.

Aos amigos Fernanda Novi (Fer), Hely, Deborah, Eric, Laira, Ernane. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelas festas, pelas gordices.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas pelo apoio estrutural e a todos os funcionários, sempre dispostos a ajudar.

À CAPES e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e que não foram citados. Muito obrigada.

“Descobrir consiste em olhar para o que todos estão vendo e pensar uma coisa diferente”.

Roger Von Oech

SILVA, Flaviane de Fatima. **Efeitos da metformina e pioglitazona, isoladas ou associadas com insulina, sobre a resistência insulínica e anormalidades metabólicas relacionadas à caquexia induzida pelo tumor Walker-256 em ratos.** 2016. 65 f. Dissertação (Mestre em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Resistência insulínica tem sido relacionada à caquexia do câncer. Entretanto, poucos estudos têm avaliado o efeito de agentes sensibilizadores da insulina na prevenção da perda de peso associada ao câncer. O presente estudo investigou os efeitos da metformina e pioglitazona, isoladas ou associadas com a insulina, sobre a resistência insulínica, caquexia, crescimento tumoral e outras anormalidades metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos. A metformina (300 ou 500 mg.kg^{-1}) ou pioglitazona (5 mg.kg^{-1}), isoladas ou associadas com insulina NPH ($1,0$ UI.kg^{-1}), foram administradas uma vez ao dia, por 12 dias, iniciando no mesmo dia da inoculação das células tumorais. A resposta periférica à insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância a insulina (ITT), a glicólise, glicogenólise e neoglicogênese em perfusão de fígado e as proteínas teciduais por *western blotting*. Os tratamentos com metformina (300 ou 500 mg.kg^{-1}), isolado ou associado com insulina, de modo similar, não alteraram o crescimento tumoral, a perda de massa corporal, adiposa retroperitoneal e mesentérica e dos músculos gastrocnêmio e extensor digital longo e nem a anorexia dos ratos portadores de tumor. A resposta periférica à insulina, o conteúdo de Akt fosforilada (p-Akt) e a relação p-Akt/Akt total no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico, que estão reduzidas nos ratos portadores de tumor, também não foram afetadas pelos tratamentos. No fígado, os tratamentos dos ratos portadores de tumor com metformina 500 mg.kg^{-1} , isolado ou associado com insulina, não tiveram efeito sobre a inibição da glicólise e neoglicogênese e nem sobre a glicogenólise. Nos experimentos com pioglitazona, devido à variação no padrão desenvolvimento tumoral, os ratos foram separados em ratos com tumores menores (17 g) ou maiores (30 g). Os tratamentos com pioglitazona, isolado ou associado com insulina não alteraram o crescimento tumoral, mas, de modo similar, preveniram parcialmente a perda de massa corporal e adiposa retroperitoneal, reduziram a resistência à insulina e a concentração de triacilgliceróis e ácidos graxos livres no sangue dos ratos portadores de tumores menores, mas não tiveram efeitos sobre a perda de massa do tecido adiposo mesentérico e músculo gastrocnêmio, anorexia, conteúdo aumentado de LHS e TNF α no tecido adiposo retroperitoneal, redução do conteúdo de p-Akt e da relação p-Akt/Akt total no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico desses animais. Nos ratos portadores de tumores maiores, os tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina não tiveram efeitos sobre a maioria dos parâmetros. Pode ser concluído que o tratamento com metformina, isolado ou associado com insulina, não atenuou a caquexia induzida pelo tumor Walker-256, possivelmente por não melhorar a resistência à insulina e não reduzir o crescimento do tumor. Já o tratamento com pioglitazona melhorou a sensibilidade periférica a insulina, possivelmente por reduzir a concentração de ácidos graxos livres no sangue, e reduziu a perda de peso corpóreo dos ratos com tumores menores, sem alterar o crescimento tumoral, sugerindo um papel da resistência à insulina no

desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor Walker-256. Os resultados sugerem benefícios clínicos da pioglitazona na prevenção da perda de peso quando o tumor é pequeno ou em estágios menos severos de caquexia.

Palavras-chave: Câncer. Hipercatabolismo. Hipoinsulinemia. Alterações metabólicas. Perfusão de fígado in situ.

SILVA, Flaviane de Fatima. **Effects of metformin and pioglitazone, isolated or associated with insulin, on insulin resistance and metabolic abnormalities relating to cachexia induced by tumor Walker -256 in rats.** 2016. 65 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Insulin resistance has been associated to cancer cachexia. However, few studies have evaluated the effect of insulin sensitizers agents in the prevention of weight loss associated with cancer. The present study investigated the effects of metformin and pioglitazone, isolated or associated with insulin, on insulin resistance, cachexia, tumor growth and other metabolic abnormalities induced by Walker-256 tumor in rats. Metformin (300 or 500 mg.kg⁻¹) or pioglitazone (5 mg.kg⁻¹), isolated or associated with NPH insulin (1.0 UI.kg⁻¹) were administered for 12 days, once a day, starting on the day of tumor cell inoculation. Peripheral insulin response was evaluated by the insulin tolerance test (ITT), glycolysis, glycogenolysis and gluconeogenesis in liver perfusion and tissue proteins by western blotting. Treatment with metformin (300 or 500 mg.kg⁻¹), isolated or in combination with insulin, similarly, did not affect tumor growth, loss of body weight, retroperitoneal and mesenteric fat, gastrocnemius and long digital extensor muscles and anorexia of the tumor-bearing rats. Peripheral insulin response, the content of phosphorylated Akt (p-Akt) and the p-Akt/total-Akt ratio at retroperitoneal and mesenteric adipose tissue, which are reduced in the tumor-bearing rats were not affected by treatments. In the liver, the treatments of tumor-bearing rats with metformin 500 mg.kg⁻¹, isolated or in combination with insulin, had no effect on the inhibition of glycolysis and gluconeogenesis and nor in glycogenolysis. In experiments with pioglitazone, due to variation in standard tumor development, the rats were divided into rats with smaller (17 g) or larger tumors (30 g). Treatment with pioglitazone, isolated or in combination with insulin did not affect tumor growth but, in a similar manner, partially prevented the loss of body weight and retroperitoneal fat, reduced insulin resistance and the concentrations of triglycerides and free fatty acids in the blood of rats with smaller tumors, but had no effect on the loss of mesenteric fat and gastrocnemius muscle mass, anorexia, increased LHS and TNF α content in the retroperitoneal adipose tissue, reducing the p-Akt content and the p-Akt/total Akt ratio in mesenteric and retroperitoneal adipose tissue of these animals. In rats with larger tumors, treatment with pioglitazone or pioglitazone and insulin had no effect on most parameters. It can be concluded that treatment with metformin, isolated or associated with insulin, did not attenuate cachexia induced by Walker-256 tumor, possibly by not improve insulin resistance and not reduce tumor growth. However, the pioglitazone treatment, isolated or associated with insulin, similarly improved peripheral insulin sensitivity, possibly by reducing the concentration of free fatty acids in the blood, and reduced the loss of body weight in rats with smaller tumors, without changing tumor growth, suggesting a role of insulin resistance in the development of cachexia induced by Walker-256 tumor. The results suggest clinical benefits of pioglitazone to preventing weight loss when the tumor is small or in less severe stages of cachexia.

Keywords: Cancer. Hypercatabolism. Hyperinsulinemia. Metabolic disorders. Liver perfusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 ou 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos.....29
- Figura 2. Alteração de massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal, massa do tecido adiposo mesentérico, massa do músculo gastrocnêmio, massa do músculo extensor digital longo (EDL) e ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 ou 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos30
- Figura 3. Glicemia e constante de desaparecimento da glicose (KITT) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 ou 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos31
- Figura 4. Blots representativos e conteúdo de Akt total, p-Akt e relação p-Akt/Akt no tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo mesentérico e músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos32
- Figura 5. Produção de lactato, piruvato, glicólise e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos.....33
- Figura 6. Produção de glicose, glicogenólise basal e os respectivos valores médios de produção de glicose e glicogenólise em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg-1 ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos34
- Figura 7. Produção de glicose, lactato e piruvato a partir da L-alanina e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com

metformina 500 mg.kg ⁻¹ ou com metformina e insulina, ou com os respectivos veículos	35
Figura 8. Massa tumoral, alteração de massa corporal e relação entre massa corporal e tumoral de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos.....	38
Figura 9. Massa do tecido adiposo retroperitoneal, massa do tecido adiposo mesentérico, massa do músculo gastrocnêmio e ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos	39
Figura 10. Blots representativos e conteúdo de LHS e TNF α no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos.....	40
Figura 11. Glicemia e constante de desaparecimento da glicose (kITT) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou não tratados com os respectivos veículos.....	41
Figura 12. Blots representativos, conteúdo de Akt total, p-Akt e relação p-Akt/Akt no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos.....	42
Figura 13. Blots representativos, conteúdo de Akt total, p-Akt e relação p-Akt/Akt no tecido adiposo mesentérico de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos.....	43
Figura 14. Concentração sérica de triacilglicerol e ácidos graxos livres de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, ou com os respectivos veículos	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt (PKB)	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
AP2	Proteína do adipócito-2
AS160	Substrato da Akt de 160 kDA
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
EDL	Extensor digital longo
EPM	Erro padrão da média
GLUT4	Transportador de glicose 4
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
ITT	Teste de tolerância à insulina
KH	Tampão Krebs-Hanseleit
kITT	Constante de decaimento da glicose
LHS	Lipase hormônio sensível
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
Met	Metformina
NFkB	Fator nuclear kB
p-Akt	Akt fosforilada
PGC1 α	Coativador de PPAR γ 1 α
PI3K	Proteína quinase 3
PIF	Fator indutor de proteólise
Pio	Pioglitazona
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TZDs	Tiazolidinedionas
UA	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Químicos	21
3.2	Animais e implantação do tumor Walker-256	21
3.3	Tratamento	22
3.4	Avaliação dos parâmetros relacionados à caquexia-anorexia e do crescimento tumoral	22
3.5	Western blotting para avaliação da Akt total, p-Akt, LHS e TNFα	23
3.6	Teste de tolerância à insulina para avaliação da resposta insulínica periférica	24
3.7	Perfusão de fígado in situ para avaliação da glicólise, glicogenólise e neoglicogênese	24
3.8	Análises bioquímicas	25
3.8.1	Determinação da concentração de glicose	25
3.8.2	Determinação da concentração de lactato	25
3.8.3	Determinação da concentração de piruvato	26
3.8.4	Determinação da concentração do triacilglicerol	26
3.8.5	Determinação da concentração de ácidos graxos livres	26
3.9	Análises estatísticas	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Efeitos do tratamento com metformina, isolado ou associado com insulina, sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia, resposta periférica à insulina, proteínas da via de sinalização da insulina e parâmetros hepáticos (ARTIGO 1)	28

4.2	<i>Efeitos do tratamento com pioglitazona, isolado ou associado com insulina, sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia, resposta periférica à insulina, proteínas da via de sinalização da insulina, LHS, TNFα, triacilgliceróis e ácidos graxos livres (ARTIGO 2)</i>	36
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS.....	57

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, até o ano de 2025 serão cerca de 19 milhões de mortes por câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Destas mortes, cerca de 50% estão relacionadas à síndrome da caquexia (TISDALE, 2009).

A caquexia do câncer é caracterizada por perda progressiva de peso corpóreo, ocasionada por um desbalanço metabólico, onde ocorre predomínio do catabolismo e anorexia (TISDALE, 2005; BENNANNI-BAITI; WALSH, 2009). Nesse quadro há alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, bem como resistência à insulina, com intensa perda de massa muscular, acompanhada ou não de perda de massa adiposa (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2005; GORDON; GRENN; GOGGIN, 2005; EVANS et al., 2008; TISDALE, 2010).

As alterações metabólicas presentes na caquexia do câncer resultam da complexa interação entre o tumor e o hospedeiro (SKIPWORTH et al., 2007). Tanto as células tumorais quanto as células do sistema imune do hospedeiro, em resposta a presença do tumor, produzem fatores denominados mediadores da caquexia (TISDALE, 2005). Moléculas como o fator indutor de proteólise (PIF), o fator mobilizador de lipídios (LMF) e as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas 1 (IL1) e 6 (IL6) estão associadas à proteólise e lipólise (MANTOVANI et al., 2000; GORDON; GRENN; GOGGIN, 2005), contribuindo para a perda de massa muscular e adiposa observada na caquexia. Além disso, a atividade metabólica do próprio tumor, que utiliza os nutrientes da corrente sanguínea do hospedeiro para a proliferação celular também contribui para as alterações metabólicas e desenvolvimento da caquexia (TISDALE, 2001).

Além dos mediadores da caquexia e da demanda metabólica do tumor, é possível que a resistência à insulina presente em portadores de câncer (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; HONORS; KINZIG, 2012) também contribua para as alterações metabólicas observadas neste estado patológico.

A resistência insulínica é caracterizada por alterações na via de sinalização da insulina, resultando em redução da translocação de transportadores de glicose GLUT4 e conseqüentemente da captação de glicose pelos tecidos periféricos (KANETY et al., 1995; YOSHIKAWA; NAGUCHI; SATOH, 1999; WARNE, 2003; KIM et al., 2004), assim como em aumento dos processos catabólicos e redução dos processos anabólicos, entre outros efeitos (REGINATO; LAZAR, 1999).

Citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL6 interferem negativamente na via de sinalização da insulina e têm sido relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina no câncer (NOGUCHI et al., 1998). O aumento de ácidos graxos livres circulantes no câncer (ROFE et al., 1994; CASSOLLA et al., 2012) também pode prejudicar a atuação da insulina, pois o acúmulo de intermediários do metabolismo dos ácidos graxos e, em consequência, de espécies reativas de oxigênio (EROs), também interfere negativamente na via de sinalização da insulina (SHULMAN, 2000; BODEN, 2002; SCHINNER et al., 2005; DELARUE; MAGNAN, 2007).

Os efeitos de agentes farmacológicos sensibilizadores da ação da insulina como metformina e rosiglitazona foram investigados em alguns modelos experimentais de câncer, demonstrando melhora na sensibilidade à insulina e prevenção da perda de massa corporal (ROPELLE et al., 2007; ASP et al., 2010), redução da expressão de marcadores associados à proteólise muscular (ASP et al., 2010), redução dos níveis plasmáticos de TNF α e aumento da sobrevida (ROPELLE et al., 2007), sem alterar a massa tumoral. Tais resultados sugerem que o uso de sensibilizadores da insulina pode ter efeitos benéficos em algumas alterações metabólicas associadas ao câncer, já que a resistência insulínica está associada ao hipercatabolismo, resultando principalmente em perda de massa corporal associada ao câncer. É também possível que a melhora da sensibilidade periférica à insulina reduza a oferta de nutrientes para as células tumorais, desfavorecendo o desenvolvimento tumoral.

A metformina, disponível comercialmente como cloridrato de metformina (Glifage[®]), é um antidiabético da classe das biguanidas, também utilizado como sensibilizador da ação da insulina no tratamento do diabetes mellitus tipo II. A metformina parece ter efeitos diretos na via de sinalização da insulina, sendo capaz de aumentar a atividade tirosino-quinase do receptor de insulina (GUNTON et al., 2003), favorecendo a captação de glicose. No entanto, grande parte dos efeitos da metformina parece ser resultante da ativação da proteína quinase ativada pelo monofosfato de adenosina (AMPK) (ZHOU et al., 2001; HADAD; FLEMING; THOMPSON, 2008), enzima que participa da manutenção da homeostase energética celular em vários tecidos, principalmente no fígado (VIOLLET et al., 2009). A metformina é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória (STEPHENNE et al., 2011), reduzindo os níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP), com consequente aumento de adenosina monofosfato (AMP), ocasionando a ativação da AMPK (HAWLEY et al., 2010; VIOLLET et al., 2012). Quando ativada, a AMPK estimula proteínas da via de sinalização da

insulina, como a proteína quinase 3 (PI3K) e o substrato da Akt (AS160), as quais induzem a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando a captação periférica de glicose pelos tecidos (JAKOBSEN et al., 2001; TREEBAK et al., 2006; KURTH-KRACZEK et al., 1999).

A AMPK também leva as células a um estado catabólico, estimulando vias geradoras de ATP, como a oxidação da glicose (glicólise) e de ácidos graxos, e inibindo vias que consomem ATP, como a neoglicogênese hepática e a lipogênese, reduzindo assim a produção hepática de glicose e a interferência dos lipídios na sensibilidade à insulina (ZHOU et al., 2001; HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2010; ANDÚJAR-PLATA; PI-SUNYER; LAFERRÈRE, 2012).

Além dos efeitos sensibilizadores da insulina, a metformina também é apontada como capaz de reduzir o crescimento tumoral de diversos tipos de tumores (BHALLA et al., 2012; VITALE-CROSS et al., 2012; SANCHEZ-ALVAREZ et al., 2013), incluindo o tumor Walker-256, porém em ratos obesos MSG (FONSECA et al., 2011).

A pioglitazona, disponível comercialmente como cloridrato de pioglitazona (Actos[®]) é um antidiabético da classe das tiazolidinedionas (TZDs), utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo II como sensibilizador da insulina. As TZDs são moléculas agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), um fator de transcrição pertencente à família dos receptores nucleares, altamente expresso no tecido adiposo e, em menor quantidade, no músculo esquelético e fígado (BARISH; NARKAR; EVANS, 2006; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). O PPAR γ regula a expressão de genes responsivos à insulina, relacionados principalmente ao metabolismo, armazenamento e transporte de lipídios (BARISH; NARKAR; EVANS, 2006).

As TZDs, por ativação do PPAR γ , promovem a expressão de genes responsáveis pela captação e armazenamento de lipídeos no tecido adiposo, reduzindo as concentrações plasmáticas de ácidos graxos e triacilglicerol e, conseqüentemente, a lipotoxicidade no músculo e fígado, melhorando a sinalização da insulina nestes tecidos (YAMAUCHI et al., 2001a; EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). Além disso, ao ativar o PPAR γ , as TZDs também são capazes de reduzir a liberação de adipocinas que promovem a resistência à insulina, como TNF α (PERALDI; XU; SPIEGELMAN, 1997) e resistina (STEPAN et al., 2001), além de aumentar a liberação de adiponectina (YAMAUCHI et al., 2001b), molécula que estimula a oxidação de ácidos graxos e reduz a produção hepática de glicose, além de

melhorar a sensibilidade à insulina no músculo e fígado (EVANS; BARISH; WANG, 2004).

A pioglitazona é apontada como capaz de reduzir a proliferação celular em alguns tipos de tumores (SHEN; DENG; ZHANG, 2007; TAKANO et al., 2008), mas também apresentou efeitos pró-tumorais (LI et al., 2011). Foi mostrado que o tratamento com pioglitazona durante 14 dias não afetou o crescimento do tumor Walker-256 (TRUDA et al., 2012).

O tumor Walker-256 tem sido considerado um bom modelo experimental para estudar a síndrome da caquexia no câncer (GUAITANI et al., 1982; BASTOS-PEREIRA et al., 2010), por apresentar crescimento rápido e induzir a um forte estado caquético no animal (VICENTINO et al., 2002). Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam diversas alterações metabólicas características da caquexia como anorexia; redução da massa muscular e adiposa; redução da glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático; aumento do triacilglicerol, ácidos graxos livres, lactato e ureia plasmáticos; redução da glicólise e neoglicogênese hepática; diminuição da resposta hepática ao AMPc, tanto no catabolismo do glicogênio quanto na glicólise; redução da resposta periférica à insulina, sugerindo resistência periférica à insulina (CASSOLLA et al., 2012; MORAIS et al., 2012; MOREIRA et al., 2013), além de hipoinsulinemia (FERNANDES et al., 1990).

Em suma, é possível que a resistência insulínica e a hipoinsulinemia possam estar envolvidas no aumento do catabolismo em vários tecidos, contribuindo para a progressão e agravamento da caquexia do câncer. Desse modo, estudos visando encontrar estratégias terapêuticas para a correção da resistência insulínica e da hipoinsulinemia associadas ao câncer são muito importantes.

Diante disso, o presente estudo buscou avaliar os efeitos da metformina e pioglitazona, isoladas ou associadas com a insulina, visto que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam hipoinsulinemia, sobre vários distúrbios metabólicos induzidos pelo tumor Walker-256 em ratos. O efeito destes fármacos sobre o crescimento do tumor também foi avaliado.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da metformina ou pioglitazona, isoladas ou associadas com a insulina, sobre a resistência insulínica, caquexia e outras anormalidades metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256.

2.2 Específicos

Avaliar em ratos portadores de tumor Walker-256 o efeito dos tratamentos com metformina ou pioglitazona, bem como da associação destes fármacos com insulina, sobre:

- Crescimento tumoral;
- Parâmetros relacionados à caquexia (massa corpórea, muscular e adiposa) e anorexia (ingestão alimentar);
- Resposta periférica à insulina;
- Proteínas da via de sinalização da insulina: Akt total e Akt fosforilada (p-Akt);
- Glicólise, glicogenólise e neoglicogênese hepática;
- Parâmetros teciduais: TNF α e lipase hormônio sensível (LHS);
- Concentrações séricas de triacilglicerol e ácidos graxos livres.

Materialis e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Químicos

A metformina (Glifage®) foi adquirida da Merck & Co. (Darmstad, Germany), a pioglitazona (Actos®) da Abbott Laboratories (Chicago, USA) e a insulina NPH (Humulin®) e regular (Humalog®) da Eli Lilly do Brasil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os anticorpos primários foram adquiridos da Cell Signaling Technology® (Danvers, USA), Abcam® (Cambridge, USA) ou Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, USA), os anticorpos secundários da Jackson ImunoResearch Laboratories, Inc (West Grove, USA) e os inibidores de proteases da AMRESCO® LLC (Solon, USA). Os sais do líquido de perfusão, os precursores neoglicogênicos e os demais reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Merck & Co. (Darmstad, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) ou Laborclin (Pinhais/PR, Brasil).

3.2 Animais e implantação do tumor Walker-256

Nos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar (220-230 g), alimentados com dieta padrão para roedores (Nuvilab, CR-1 Nuvital®). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas em caixas coletivas, a uma temperatura de 23±2°C, ciclo claro/escuro de 12 horas.

Células do carcinossarcoma Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de 1,0x10⁶ células por animal. Após sete dias de crescimento ascítico, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido a centrifugação diferencial (2500 rpm, 15 min, 4°C) para obtenção das células tumorais. As células tumorais foram ressuspensas em tampão salina fosfato (PBS: fosfato 16,5 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM), pH 7,4, e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer. Para a implantação do tumor, foram inoculadas 8x10⁷ células tumorais viáveis no flanco direito dos ratos. Ratos saudáveis receberam PBS no mesmo local.

Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas. Para a análise de cada parâmetro foram utilizados de 5 a 30 animais por grupo. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, nº de registro 09161).

3.3 Tratamentos

Ratos portadores de tumor Walker-256 foram tratados por via oral (gavagem) com metformina (300 ou 500 mg.kg⁻¹) ou pioglitazona (5 mg.kg⁻¹), isoladas ou associadas com insulina NPH (1,0 UI.kg⁻¹, subcutâneo), uma vez ao dia (17:00 hs), durante 12 dias, a partir do dia da inoculação das células tumorais. As doses de metformina (FONSECA et al., 2011; ROPELLE et al., 2007), pioglitazona e insulina (TAKADA et al., 2008) utilizadas foram baseadas em estudos prévios. Ratos controle (portadores de tumor ou saudáveis) receberam água (veículo) no lugar da metformina e pioglitazona ou salina (veículo) no lugar de insulina. Os experimentos foram realizados 12 dias após o início dos tratamentos. No dia 12, os ratos foram tratados 3 horas antes dos experimentos. Para a análise do conteúdo de Akt e p-Akt e de parâmetros hepáticos em perfusão de fígado, os ratos foram tratados com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolada ou associada com insulina, mas não com metformina 300 mg.kg⁻¹.

3.4 Avaliação de parâmetros relacionados à caquexia-anorexia e do crescimento tumoral

Para a avaliação da ingestão alimentar, no 10º dia após a inoculação das células tumorais ou PBS (ratos saudáveis), os ratos foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas, contendo 50 g de ração e água à vontade. Após 24 horas (11º dia), a sobra da ração foi pesada e subtraída da quantidade ofertada inicialmente, para o cálculo da quantidade diária ingerida por 100 gramas de peso corporal (g%), de acordo com a equação a seguir, onde: **ia**= ingestão alimentar em gramas; **mc**= massa corpórea do animal; **mt**= massa do tumor.

$$ia (g\%) = \frac{ia}{mc - mt} \times 100$$

Após a avaliação da ingestão alimentar, os ratos foram pesados, anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) e laparotomizados para a coleta de amostras de sangue da veia cava inferior para avaliação das concentrações de glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres no soro. Em seguida, os ratos foram eutanasiados por dessangramento e o tumor, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo mesentérico, músculo gastrocnêmio e músculo extensor digital longo (EDL) foram cuidadosamente retirados e pesados. As massas dos tecidos foram expressas por 100 gramas de peso corporal (g%), de acordo com a equação a seguir, onde: **m**= massa do tecido; **mc**= massa corpórea; **mt**= massa do tumor.

$$m (g\%) = \frac{m}{mc - mt} \times 100$$

A alteração da massa corporal, em gramas, foi avaliada de acordo com a equação a seguir, onde: **mcf** =massa corpórea final do animal, **mt**= massa do tumor em gramas e **mci**= massa corpórea inicial do animal.

$$\text{Alteração de massa corporal (g)} = [(mcf - mt) - mci]$$

O tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo mesentérico e músculo gastrocnêmio foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análise por *Western blotting* da lipase sensível a hormônio (LHS), TNF α e de proteínas da via de sinalização da insulina, como a Akt total e Akt fosforilada (p-Akt).

3.5 Western blotting para avaliação da Akt total, p-Akt, LHS e TNF α

Para avaliação do conteúdo destas proteínas, por *Western blotting* (TOWBIN et al., 1979; MAHMOOD; YANG, 2012; ESLAMI; LUJAN, 2010; JENSEN, 2012), o tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico e o músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em solução tampão (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1 mM, Na₄P₂O₇ 5 mM, NaF 10 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, Na₃VO₄ 0,5 mM, Tris 20 mM, pH 7,8) contendo inibidores de proteases (PIC e PMSF 0,2 mM). O homogenato foi centrifugado (12.000 rpm, 40 min, 4°C) e as proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Quantidades iguais de proteínas totais foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, submetidas a eletroforese (100 V) e a eletro-transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (2 horas - 80 V). A membrana de nitrocelulose foi corada com ponceau, para detecção reversível rápida das bandas de proteínas após a transferência. Em seguida, a membrana foi lavada com PBST (tampão salina fosfato com 0,1% de Tween-20), submetida ao bloqueio com leite em pó por 1 h, para impedir ligações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo, e incubada com anticorpo primário anti-Akt (1:1000), anti-p-Akt (1:1000), anti-LHS (1:1000), ou anti-TNF α (1:1000) *overnight* à 4° C. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST e incubada com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase (1:5000) por 75 min a temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com PBST e submetidas à reação de quimioluminescência, por meio da incubação com substrato que fluoresce quando exposto à peroxidase, para detecção dos blots. Os blots foram visualizados em fotodocumentador (Amersham Image®) e analisados usando o programa Image J (National Institutes of Health, USA). Os valores de Akt total, p-Akt, LHS e TNF α foram normalizados pela proteína constitutiva γ -tubulina. A densidade dos blots foi expressa em unidades arbitrárias (UA).

3.6 Teste de tolerância à insulina para avaliação da resposta insulínica periférica

A resposta glicêmica para insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância à insulina (ITT). Neste teste, insulina regular (0,25 UI.kg⁻¹) foi administrada na veia cava inferior em ratos anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹). Amostras de sangue para avaliação da glicemia foram coletadas da veia cava inferior nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15 e 30 minutos após a administração de insulina. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (kITT), um indicador da resposta periférica a insulina, foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 5 a 15 minutos após a injeção de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA et al., 1989; SERAPHIM; NUNES; MACHADO, 2001).

3.7 Perfusão de fígado *in situ* para avaliação da glicólise, glicogenólise e neoglicogênese

Para a perfusão do fígado *in situ*, os ratos foram anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) e as veias porta e cava inferior foram canuladas como previamente descrito (MORAIS et al., 2012; DA ROCHA et al., 2014; DE SOUZA et al., 2015; BASSOLI et al., 2015). O líquido de perfusão, tampão Krebs-Henseleit (KH: NaCl 115 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 5,8 mM, Na₂SO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1,18 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM e CaCl₂ 2,5 mM), pH 7,4 a 37°C e saturado de O₂:CO₂ (95:5%), foi introduzido na veia porta (4 ml.min⁻¹ por grama de fígado) e o líquido efluente do fígado foi coletado da veia cava inferior, em intervalos de 2 minutos, para determinar as concentrações de glicose, lactato e piruvato.

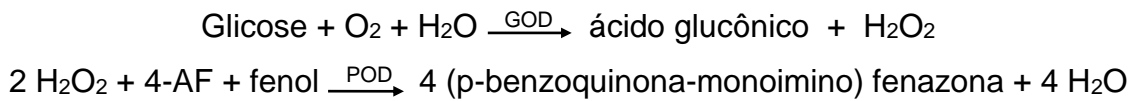
Para avaliação da glicólise e neoglicogênese, fígados de ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, para depleção do glicogênio hepático, foram perfundidos com KH por 10 minutos, seguido de perfusão por 30 minutos com KH + glicose 20 mM (avaliação da glicólise) ou KH + L-alanina 2,5 mM (avaliação da neoglicogênese). Para a avaliação da glicogenólise, fígados de ratos alimentados foram perfundidos com KH por 30 minutos.

A glicólise foi calculada como a soma da produção de lactato e piruvato e a glicogenólise como a soma da produção de glicose + ½ (lactato + piruvato) liberados no perfusado efluente do fígado. As diferenças na produção de lactato, piruvato e glicose antes e durante a infusão de glicose ou L-alanina, foram utilizadas para calcular as áreas sob a curva (AUCs).

3.8 Análises bioquímicas

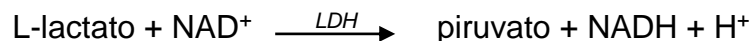
3.8.1 Determinação da concentração de glicose

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



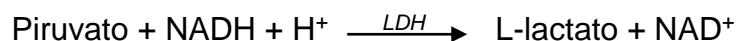
3.8.2 Determinação da concentração de lactato

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



3.8.3 Determinação da concentração de piruvato

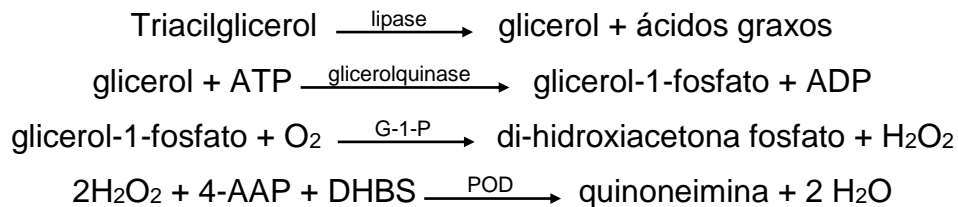
As concentrações de piruvato no perfusado foram quantificadas de acordo com o método enzimático de Czok & Lamprecht (1974). Nesse método, o piruvato é convertido enzimaticamente em L-lactato, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em uma reação catalisada pela LDH. A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato convertido e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



3.8.4 Determinação da concentração do triacilglicerol

A concentração de triacilglicerol no soro 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-fostato resultante é oxidado enzimaticamente pela glicerol-1-fostato 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.



3.8.5 Determinação da concentração de ácidos graxos livres

A concentração de ácidos graxos livres foi determinada pelo método de Falholt et al. (1973). Neste método os ácidos graxos livres são extraídos do soro por meio solução extratora (clorofórmio-heptano-metanol e tampão fosfato pH7,4). Os ácidos graxos reagem com o reagente de cor (difenilcarbazida + difenilcarbazona em etanol) dando origem a um cromógeno, quantificado espectrofotometricamente a 550 nm.



3.9 Análises estatísticas

Os dados foram testados em relação à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Brown Forsythe) e testes estatísticos apropriados, indicados nas legendas das figuras, foram utilizados para analisar os resultados. As análises foram realizadas utilizando os programas Statistica 7 e GraphPad Prism 6.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do tratamento com metformina, isolado ou associado com insulina, sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia, resposta periférica à insulina, proteínas da via de sinalização da insulina e parâmetros hepáticos (ARTIGO 1).

A massa tumoral dos ratos portadores de tumor, 12 dias após a inoculação das células Walker-256, foi próxima a 25 g, representando uma fração considerável do peso dos animais. Os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, isolados ou combinados com a insulina, não alteraram o crescimento tumoral (Figura 1).

Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram perda de massa corpórea (Figura 2A), redução do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 2B), tecido adiposo mesentérico (Figura 2C), músculo gastrocnêmio (Figura 2D) e músculo EDL (Figura 2E) e redução da ingestão alimentar (Figura 2F), em comparação aos ratos saudáveis. Os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, não tiveram efeito sobre nenhum destes parâmetros (Figura 2).

Ratos portadores de tumor apresentaram redução da resposta periférica à insulina em comparação aos saudáveis (Figura 3A), como evidenciado pela menor KITT (Figura 3B). Os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, não foram capazes de melhorar a menor resposta insulínica dos ratos portadores de tumor (Figura 3B).

O conteúdo de Akt total, p-Akt e a relação p-Akt/Akt total no tecido adiposo retroperitoneal (Figuras 4D, 4E e 4F), assim como o conteúdo de p-Akt e a relação p-Akt/Akt total no tecido adiposo mesentérico (Figuras 4H e 4I) dos ratos portadores de tumor foi menor do que dos ratos saudáveis. Contudo, não houve diferenças no conteúdo de Akt total, p-Akt e na relação p-Akt/Akt total no músculo gastrocnêmio entre os ratos portadores de tumor e saudáveis (Figuras 4J, 4K e 4L). O tratamento com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, não teve efeito sobre o conteúdo de Akt total, p-Akt e na relação p-Akt/Akt total em nenhum dos 3 tecidos.

Com relação aos parâmetros hepáticos, ratos portadores de tumor apresentaram redução da produção de lactato (Figura 5A), piruvato (Figura 5B) e glicólise (Figura 5C) a partir da glicose exógena, em comparação aos ratos saudáveis. O tratamento com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, não teve efeito sobre esses parâmetros, como mostrado pelas AUCs (Figura 5D).

Ratos portadores de tumor apresentaram redução da produção de glicose (Figuras 6A) e da glicogenólise hepática (Figuras 6B) em comparação aos ratos saudáveis. O tratamento isolado com metformina 500 mg.kg⁻¹ não alterou estes parâmetros. No entanto, o tratamento combinado com metformina 500 mg.kg⁻¹ e insulina aumentou a produção de glicose e a glicogenólise hepática nos animais portadores de tumor em relação aos saudáveis, como evidenciado pelas AUCs (Figuras 6C e 6D).

Finalmente, ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram inibição da neoglicogênese hepática a partir da L-alanina, como observado pela menor produção hepática de glicose (Figura 7A), lactato (Figura 7B) e piruvato (Figura 7C), em comparação aos ratos saudáveis. O tratamento com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, não alterou a produção de glicose, mas aumentou a produção de lactato e piruvato no fígado dos ratos portadores de tumor, como mostrado pelas AUCs (Figura 7D).

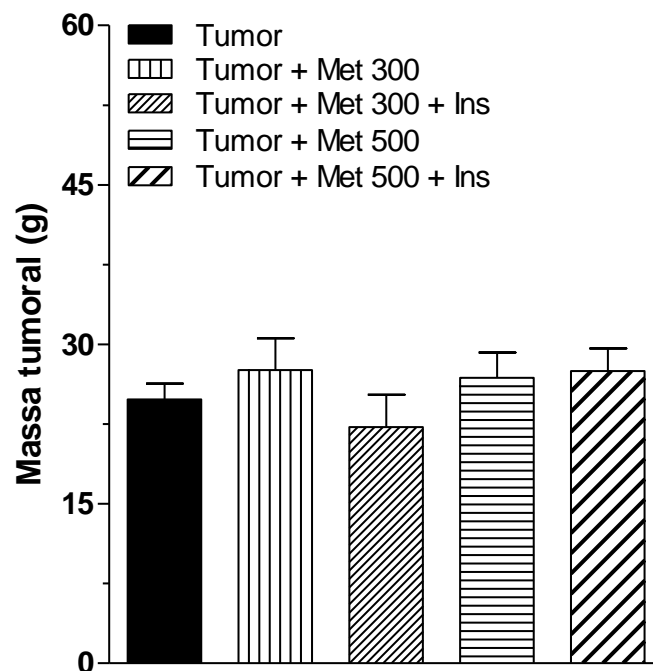


Figura 1. Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 (Tumor + Met 300) ou 500 (Tumor + Met 500) mg.kg⁻¹ ou com metformina + insulina (Tumor + Met + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Dados representam a média ± EPM de 8 a 23 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey.

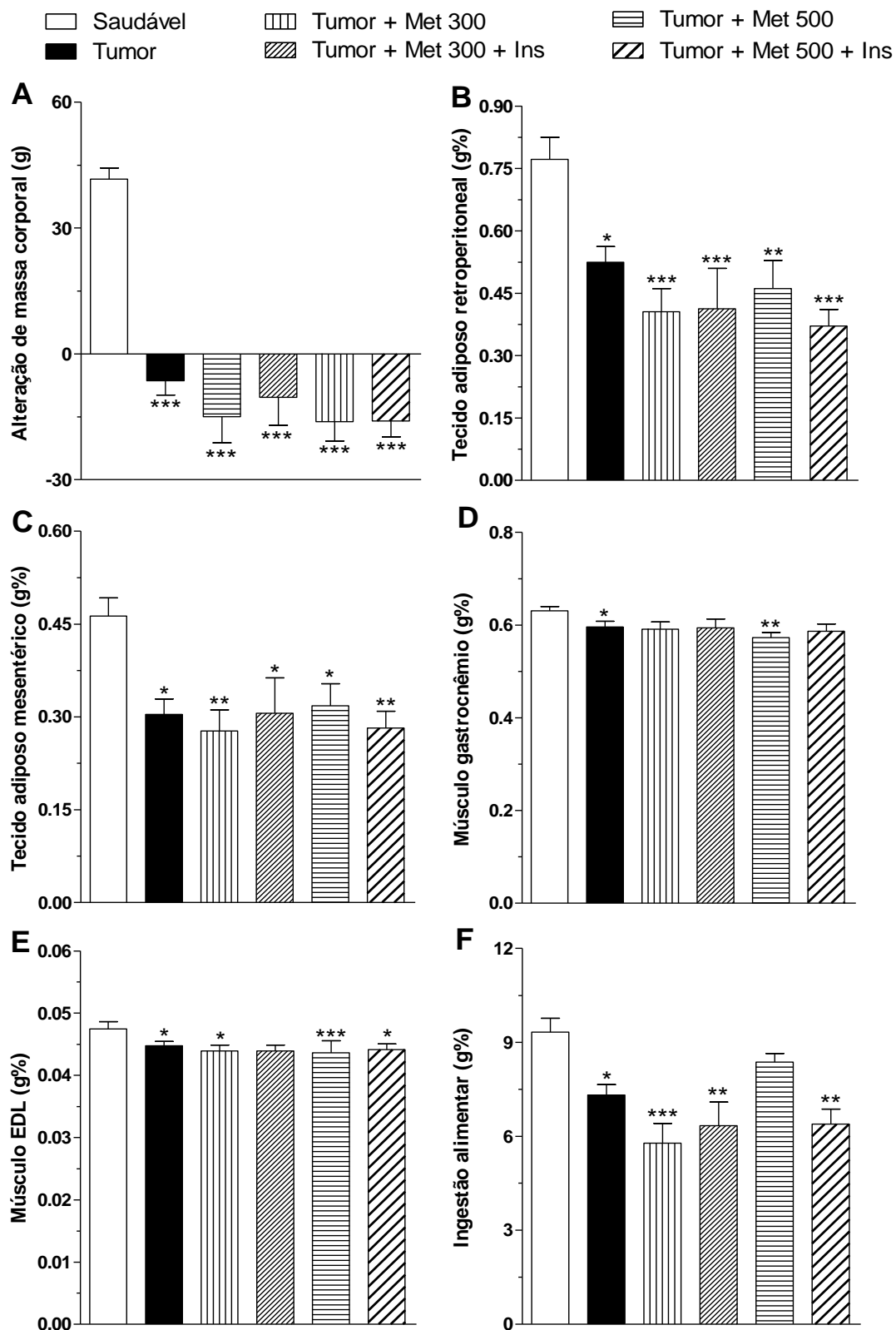


Figura 2. Alteração de massa corporal (A), massa do tecido adiposo retroperitoneal (B), massa do tecido adiposo mesentérico (C), massa do músculo gastrocnêmio (D), massa do músculo extensor digital longo (EDL) (E) e ingestão alimentar (F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 (Tumor + Met 300) ou 500 (Tumor + Met 500) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou com metformina + insulina (Tumor + Met + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Dados representam a média \pm EPM de 7 a 25 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável.

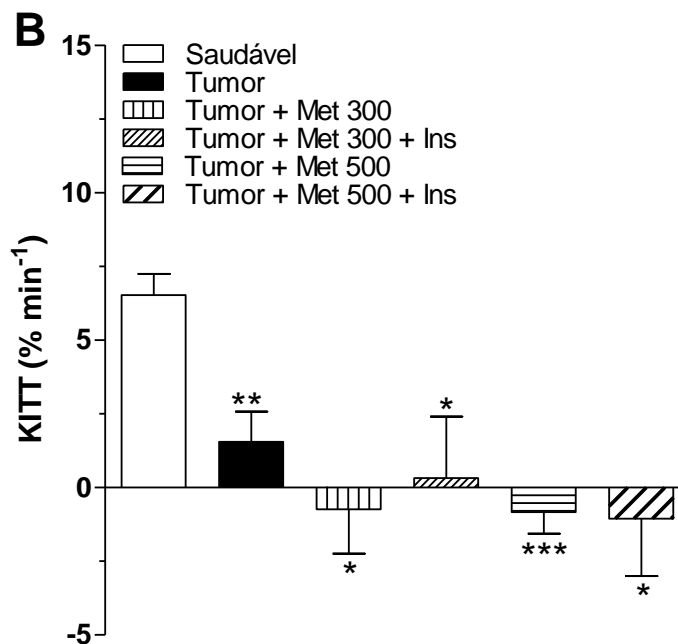
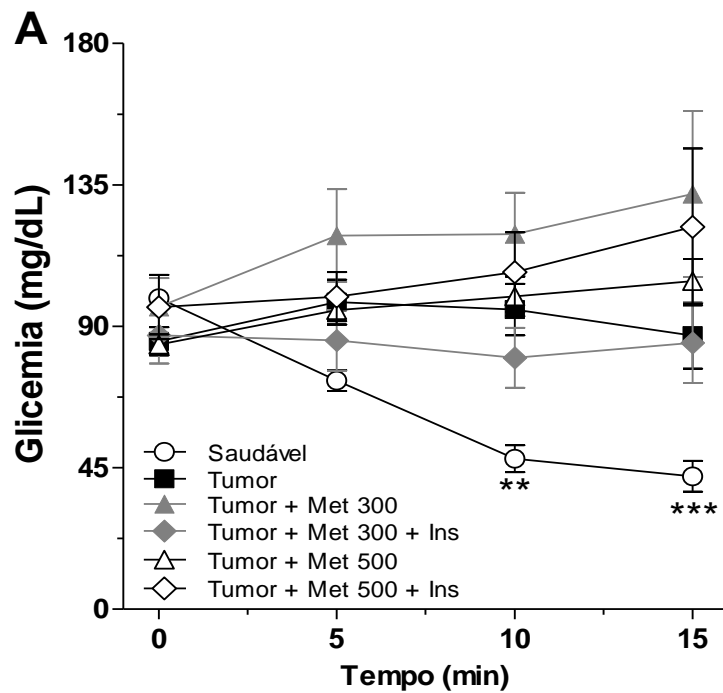


Figura 3. Glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (kITT) (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 300 (Tumor + Met 300) ou 500 (Tumor + Met 500) mg.kg⁻¹ ou com metformina + insulina (Tumor + Met + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. A glicemia foi avaliada em 0 (basal), 5, 10 e 15 minutos após a administração endovenosa de insulina. Dados representam a média ± EPM de 5 a 15 animais. Diferenças dentro do mesmo grupo (A) em relação ao basal foram avaliadas por ANOVA para mensurações repetidas. Diferenças entre as kITTs (B) foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Tukey: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 versus Saudável.

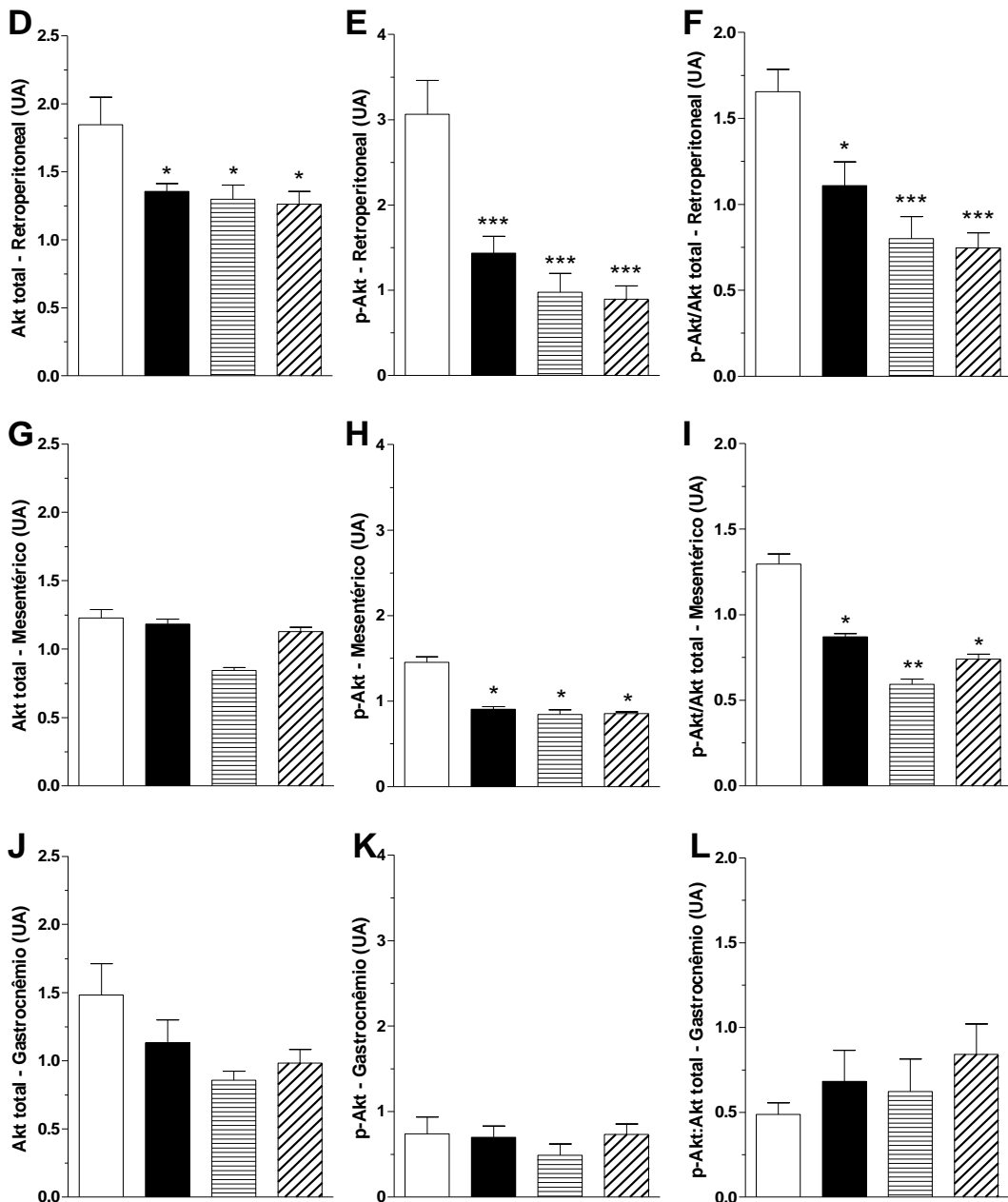
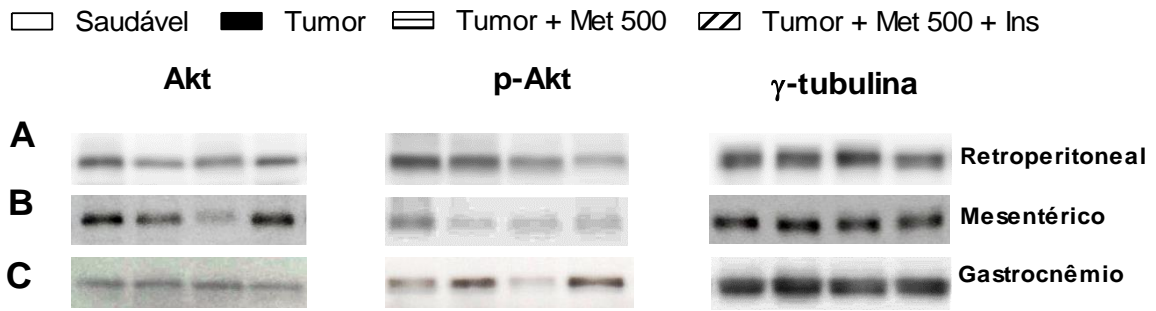


Figura 4. Blots representativos e conteúdo de Akt total, p-Akt e relação p-akt/Akt no tecido adiposo retroperitoneal (A,D,E,F), tecido adiposo mesentérico (B,G,H,I) e músculo gastrocnêmio (C,J,K,L) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg⁻¹ (Tumor + Met 500) ou com metformina + insulina (Tumor + Met 500 + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias, ou não tratados. Normalização por γ-tubulina. Dados representam a média ± EPM de 8 a 12 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 versus Saudável.

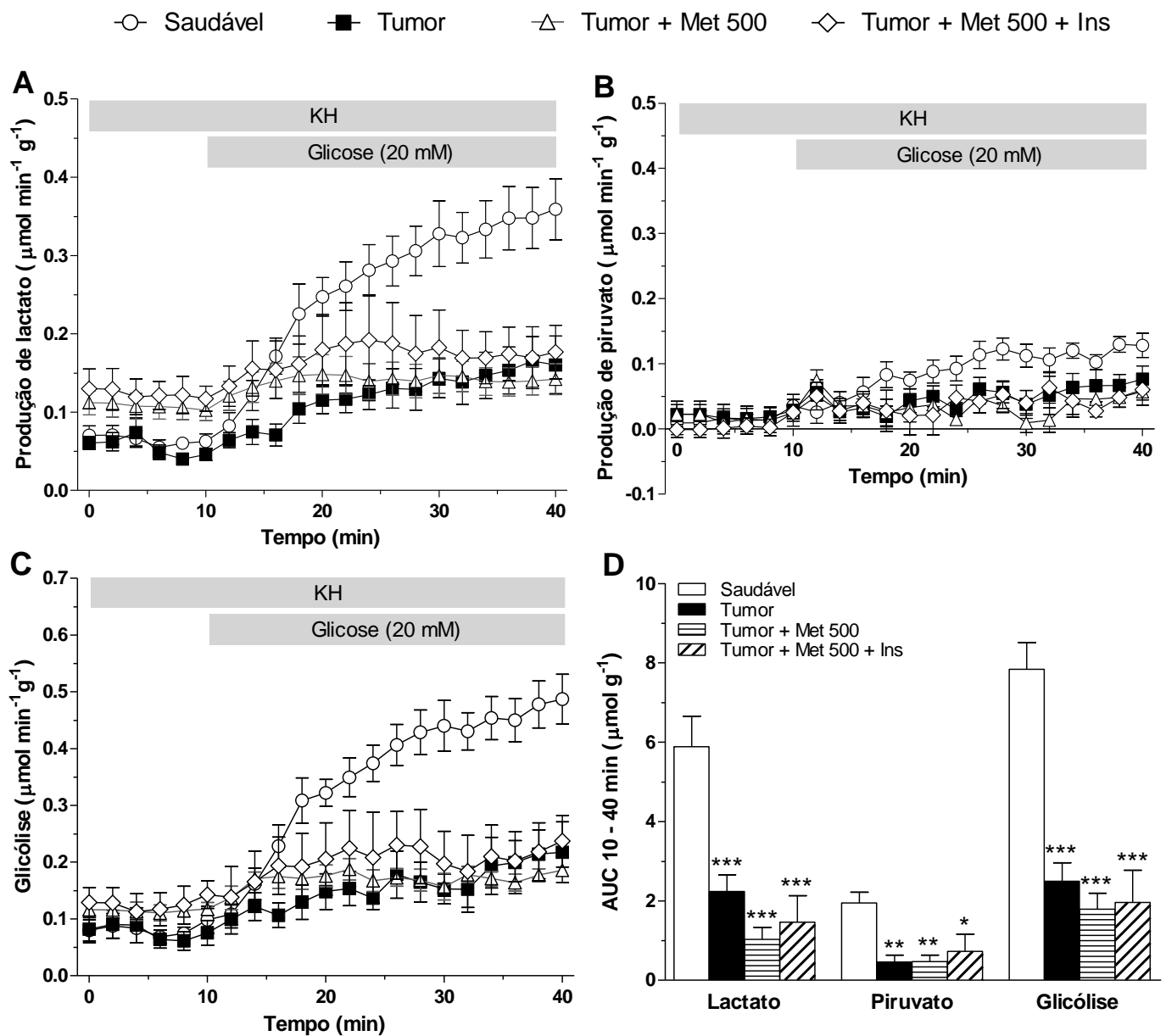


Figura 5. Produção de lactato (A), piruvato (B), glicólise (C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg^{-1} (Tumor + Met 500) ou com metformina + insulina (Tumor + Met 500 + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Fígados de ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*, com Krebs Henseleit (KH), como descrito em Materiais e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 6 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável.

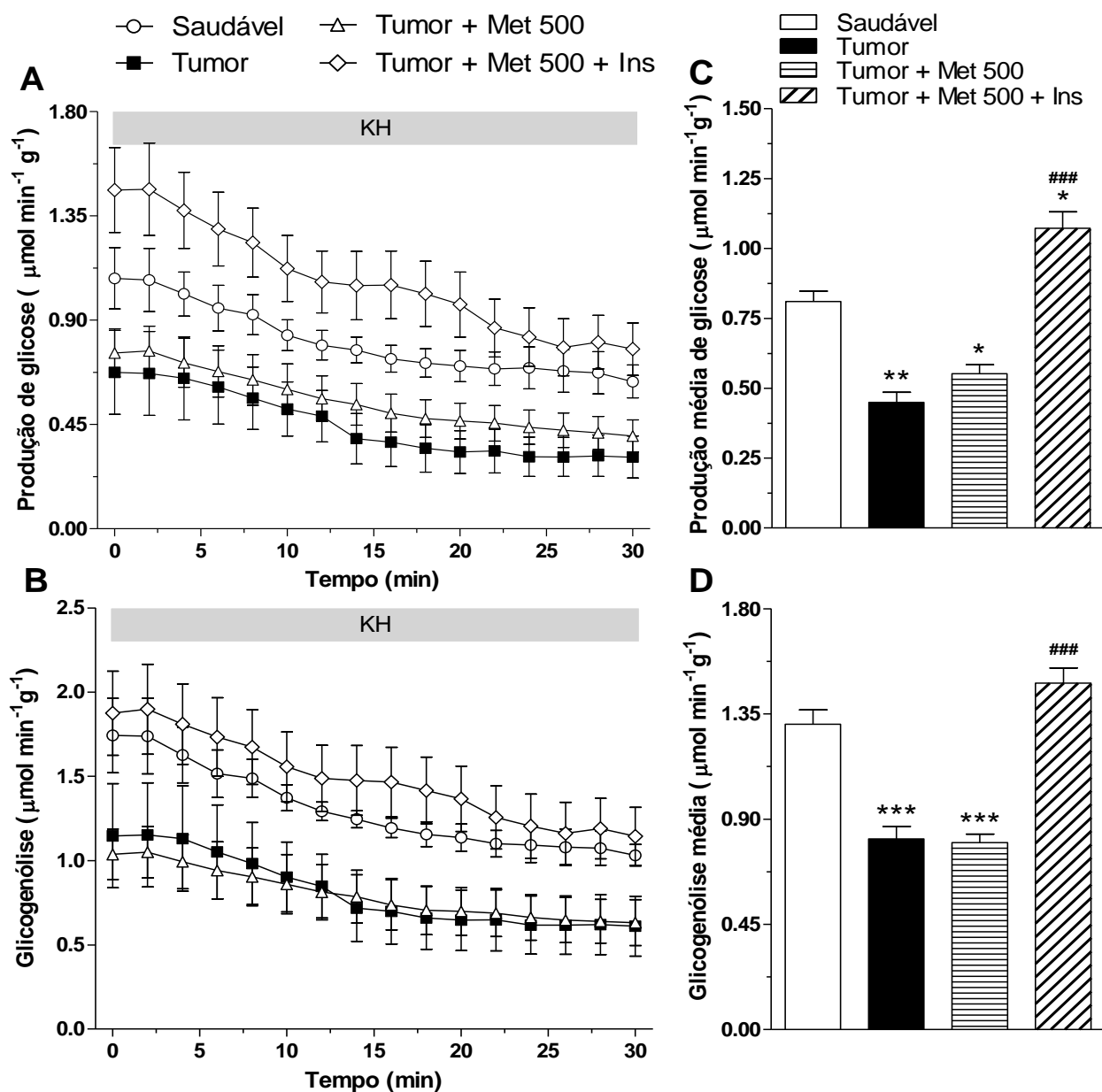


Figura 6. Produção de glicose (A), glicogenólise basal (B) e os respectivos valores médios de produção de glicose (C) e glicogenólise (D) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg^{-1} (Tumor + Met 500) ou com metformina + insulina (Tumor + Met 500 + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*, com Krebs Henseleit (KH), como descrito em Materiais e Métodos. Dados representam a média \pm EPM de 3 a 7 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável; ### $p < 0,001$ versus Tumor.

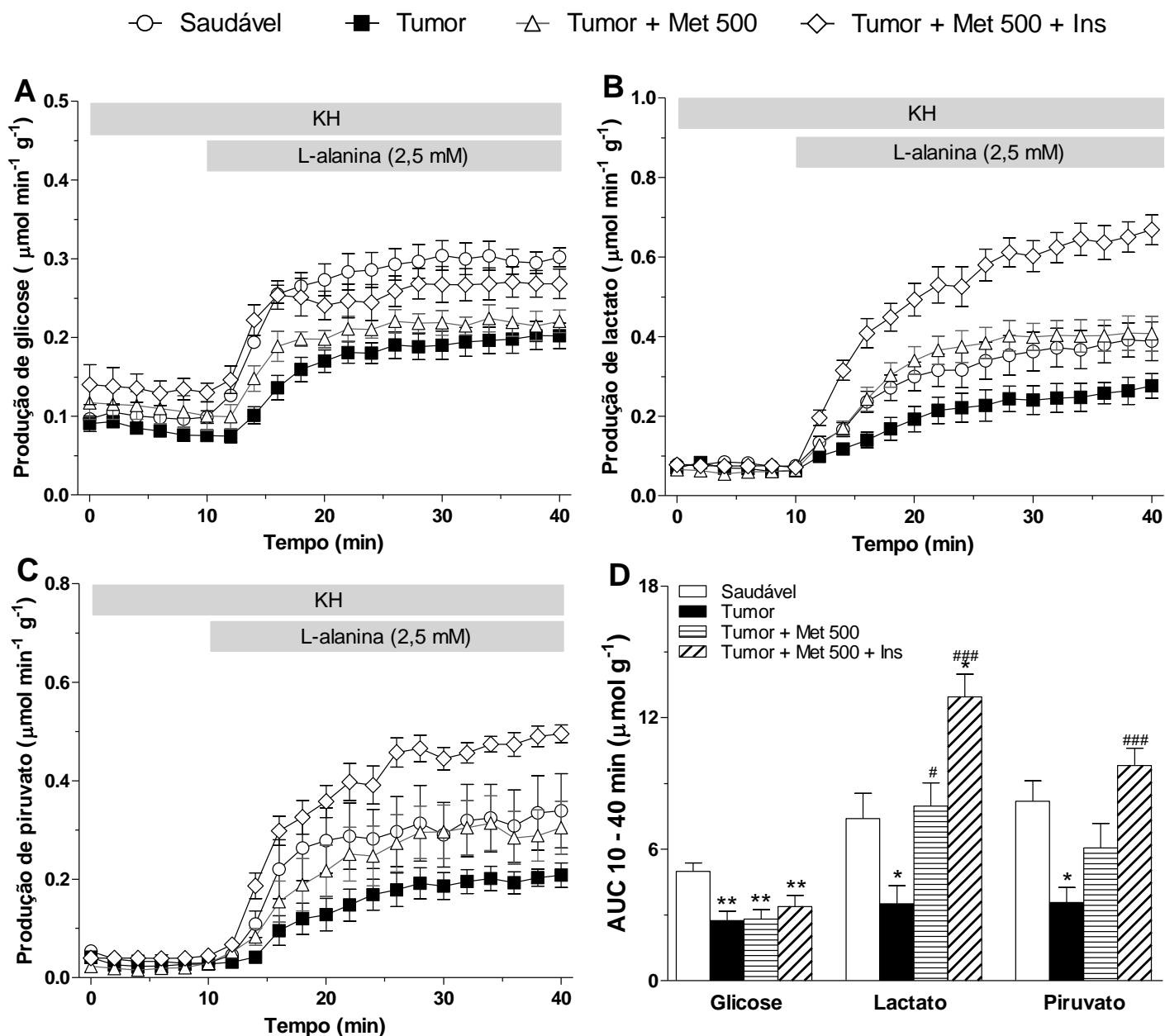


Figura 7. Produção de glicose (A), lactato (B) e piruvato (C) a partir da L-alanina e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com metformina 500 mg.kg^{-1} (Tumor + Met 500) ou com metformina + insulina (Tumor + Met 500 + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Fígados de ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*, com Krebs Henseleit (KH), como descrito em Materiais e Métodos. L-alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 6 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Saudável; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus Tumor.

4.2 Efeitos do tratamento com pioglitazona, isolado ou associado com insulina, sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia, resposta periférica à insulina, proteínas da via de sinalização da insulina, LHS, TNF α , triacilgliceróis e ácidos graxos livres (ARTIGO 2).

Como nestes experimentos houve variação no padrão de desenvolvimento tumoral dentro de cada grupo, mas não houve diferença no tamanho tumoral entre ratos tratados e não tratados, os ratos foram separados do seguinte modo: ratos com tumores menores (17 g, Figura 8A) e ratos com tumores maiores (30 g, Figura 8D). O tratamento com pioglitazona 5 mg.kg⁻¹ durante 12 dias, isolado ou combinado com insulina, não afetou o desenvolvimento do tumor Walker-256 (Figuras 8A e 8D).

Ratos portadores de tumores menores apresentaram menor ganho de massa corporal (Figura 8B), enquanto os ratos portadores de tumores maiores apresentaram acentuada perda de massa corporal (Figura 8E) em relação ao grupo saudável, como evidenciado pela relação entre massa tumoral e alteração de massa corporal (Figuras 8C e 8F). O tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, aumentou o ganho de massa corporal dos ratos portadores de tumores menores em relação aos ratos com tumor não tratados (Figura 8B). No entanto, o tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, não teve efeito sobre a acentuada perda de massa corporal apresentada pelos ratos portadores de tumores maiores (Figura 8E).

Ratos portadores de tumor, tanto menores quanto maiores, apresentaram redução do tecido adiposo retroperitoneal (Figuras 9A e 9E), tecido adiposo mesentérico (Figuras 9B e 9F) músculo gastrocnêmio (Figuras 9C e 9G) e ingestão alimentar (Figuras 9D e 9H) em relação ao grupo saudável. O tratamento isolado com pioglitazona tendeu ($p=0,052$) prevenir a perda de tecido adiposo retroperitoneal, enquanto o tratamento com pioglitazona e insulina preveniu a perda deste tecido nos ratos com tumores menores (Figura 9A). No entanto, o tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, não melhorou os demais parâmetros afetados pelo tumor Walker-256 (Figura 9).

Ratos com tumores menores tenderam ($p=0,072$) apresentar aumento (Figura 10B) e ratos com tumores maiores apresentaram aumento (Figura 10E) do conteúdo de LHS no tecido adiposo retroperitoneal em relação ao grupo saudável. Os tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina não tiveram efeito sobre o conteúdo de LHS, independente do padrão de desenvolvimento tumoral (Figuras 10B, 10E).

Ratos portadores de tumores menores apresentaram aumento do conteúdo de TNF α (Figura 10C), o qual não foi afetado pelos tratamentos com pioglitazona e

pioglitazona e insulina. O conteúdo de TNF α não foi significativamente aumentado nos ratos com tumores maiores (Figura 10F).

No teste de tolerância à insulina (ITT), a administração de insulina promoveu o decaimento da glicemia em todos os grupos. No entanto, o decaimento da glicemia foi menor nos ratos portadores de tumor (Figuras 11A e 11C) em comparação aos ratos saudáveis, como mostrado pelos menores valores de kITT (Figuras 11B e 11D). Visualmente, os ratos com tumores maiores apresentaram menor kITT do que os ratos com tumores menores. O tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, melhorou a resposta periférica a insulina dos ratos com tumores menores, como mostrado pela maior kITT em relação aos ratos portadores de tumor não tratados (Figura 10B). Todavia, o tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, tendeu, mas não aumentou significativamente a acentuada redução da resposta periférica a insulina (kITT) dos ratos com tumores maiores (Figura 11D).

Ratos portadores de tumores, menores ou maiores, apresentaram redução do conteúdo de Akt total (Figuras 12B e 12F), p-Akt (Figuras 12C e 12G) e da relação p-Akt/Akt total (Figuras 12D e 12H) no tecido adiposo retroperitoneal, em relação aos ratos saudáveis. O tratamento com pioglitazona, isolado ou combinado com insulina, não teve efeito sobre estes parâmetros afetados pelo tumor Walker-256.

Ratos portadores de tumores, menores ou maiores, não apresentaram diferença no conteúdo de Akt total no tecido adiposo mesentérico em relação aos ratos saudáveis (Figuras 13B e 13F), mas o conteúdo de p-Akt (Figuras 13C e 13G) e a relação p-Akt/Akt total nesse tecido foi menor em relação aos ratos saudáveis (Figuras 13D e 13H). O tratamento com pioglitazona ou pioglitazona e insulina não teve efeito no conteúdo de p-Akt e na relação p-Akt/Akt total nos ratos portadores de tumores menores (Figuras 13C e 13D) ou maiores (Figuras 13G e 13H).

A concentração sérica de triacilglicerol nos ratos com tumores menores foi similar a dos ratos saudáveis (Figura 14A), entretanto, ratos portadores de tumores maiores apresentaram hipertriacilglicerolemia (Figura 14C), a qual foi revertida pelos tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina. Adicionalmente, ratos portadores de tumores menores e maiores apresentaram aumento da concentração de ácidos graxos livres em comparação aos ratos saudáveis (Figuras 14B e 14D). Os tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina reverteram o aumento de ácidos graxos livres dos ratos portadores de tumores menores (Figura 14B), mas somente o tratamento isolado teve efeito significativo nos ratos portadores de tumores maiores (Figura 14D).

Tumor menor

Tumor maior

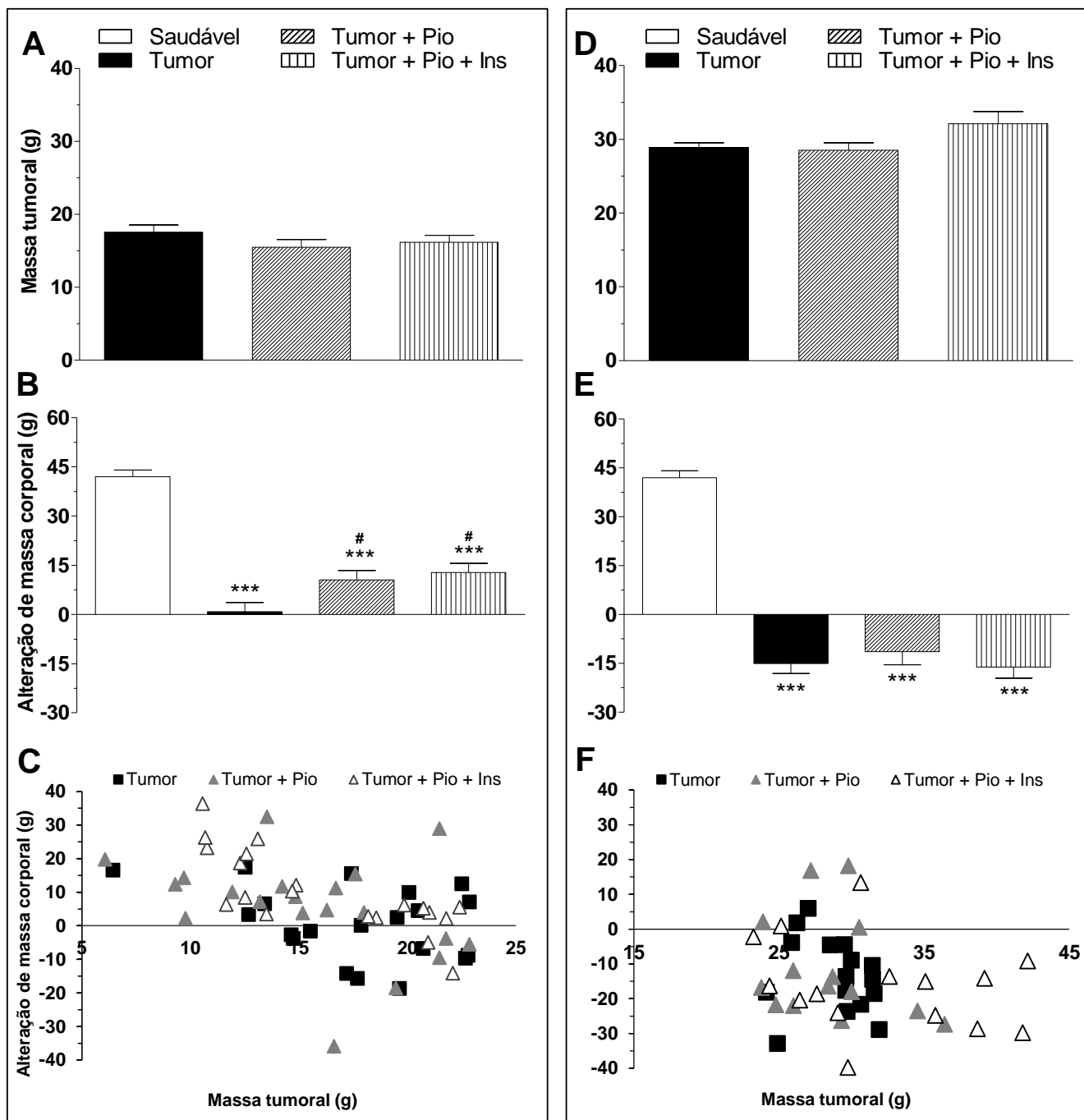


Figura 8. Massa tumoral (A,D), alteração de massa corporal (B,E) e relação entre massa corporal e tumoral (C,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Dados representam a média \pm EPM de 14 a 18 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. *** $p < 0,001$ versus Saudável; # $p < 0,05$ versus Tumor.

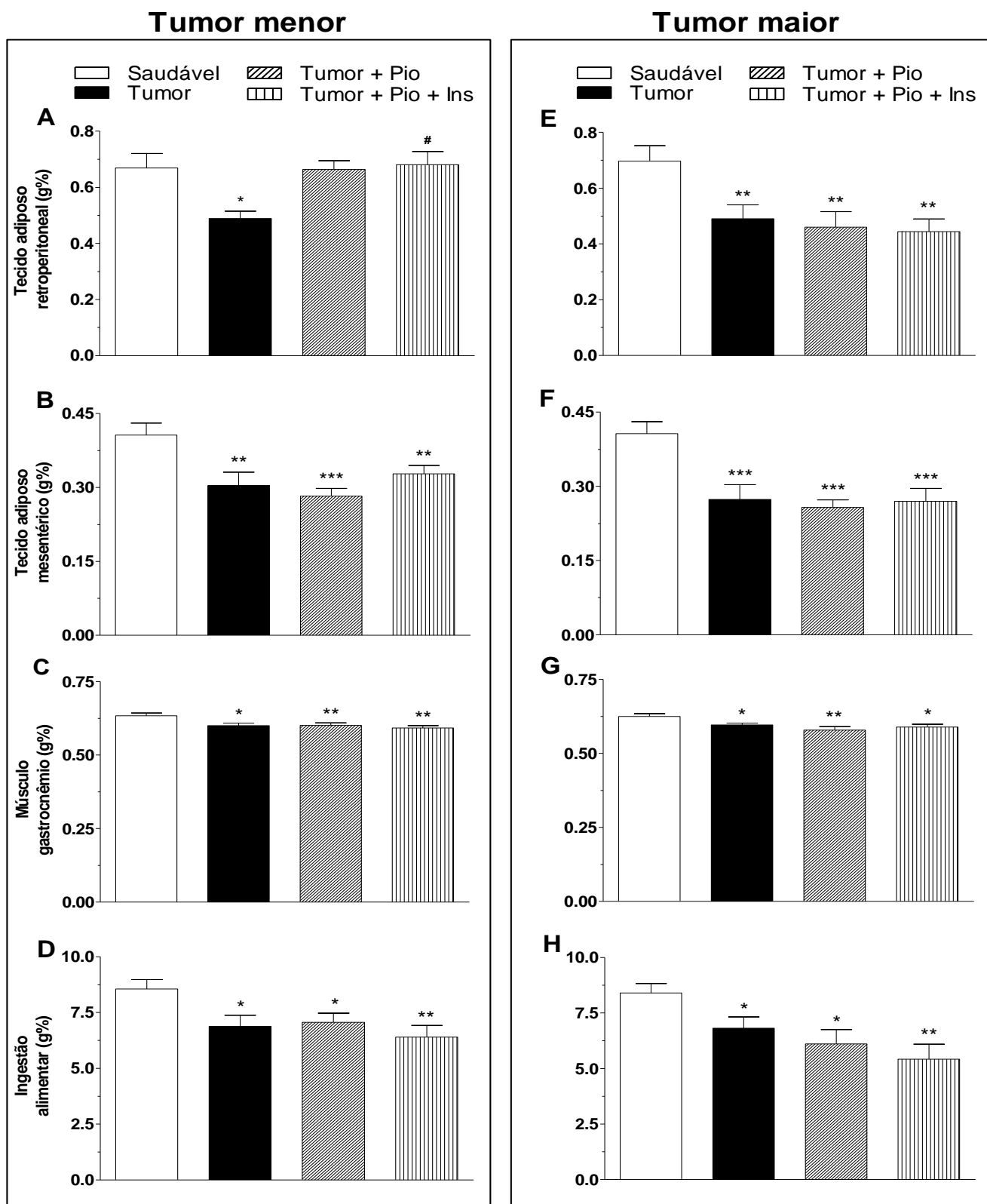
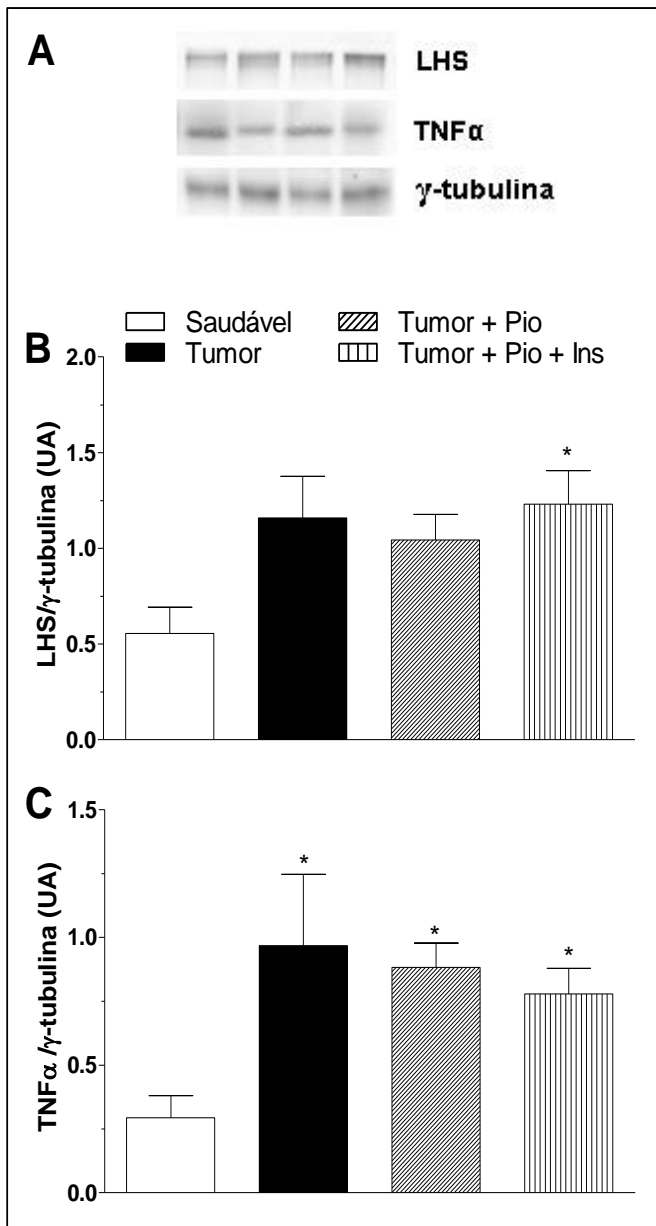


Figura 9. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A,E), massa do tecido adiposo mesentérico (B, F), massa do músculo gastrocnêmio (C,G) e ingestão alimentar (D, H) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Dados representam a média \pm EPM de 12 a 27 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável; # $p < 0,05$ versus Tumor.

Tumor menor



Tumor maior

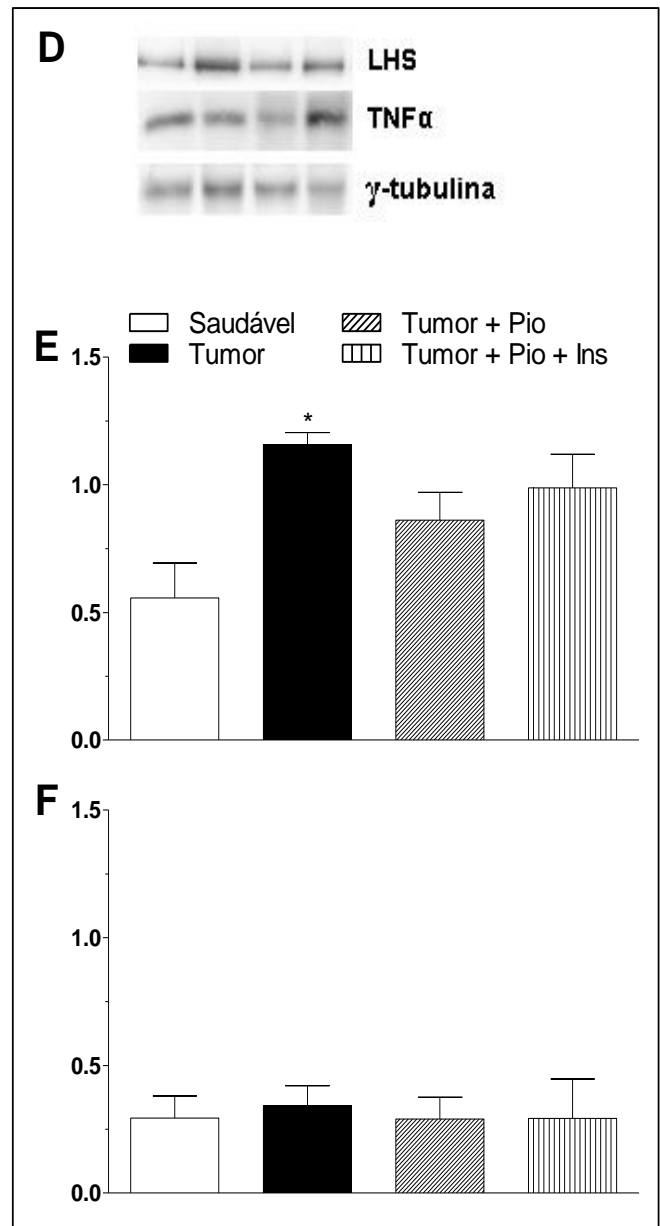


Figura 10. Blots representativos (A,D) e conteúdo de LHS (B,E) e TNF α (C,F) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Normalização por γ -tubulina. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 12 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ versus Saudável.

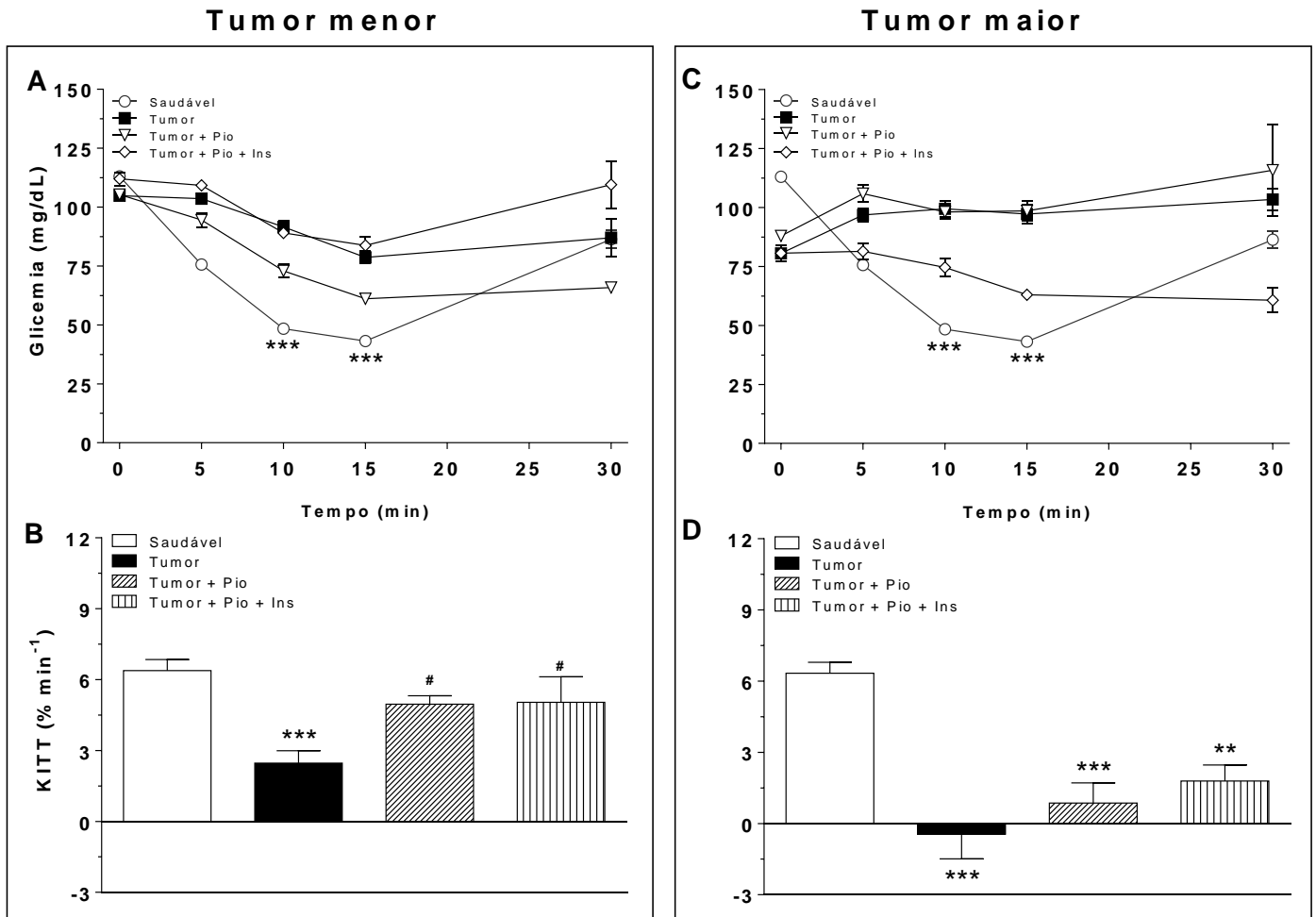
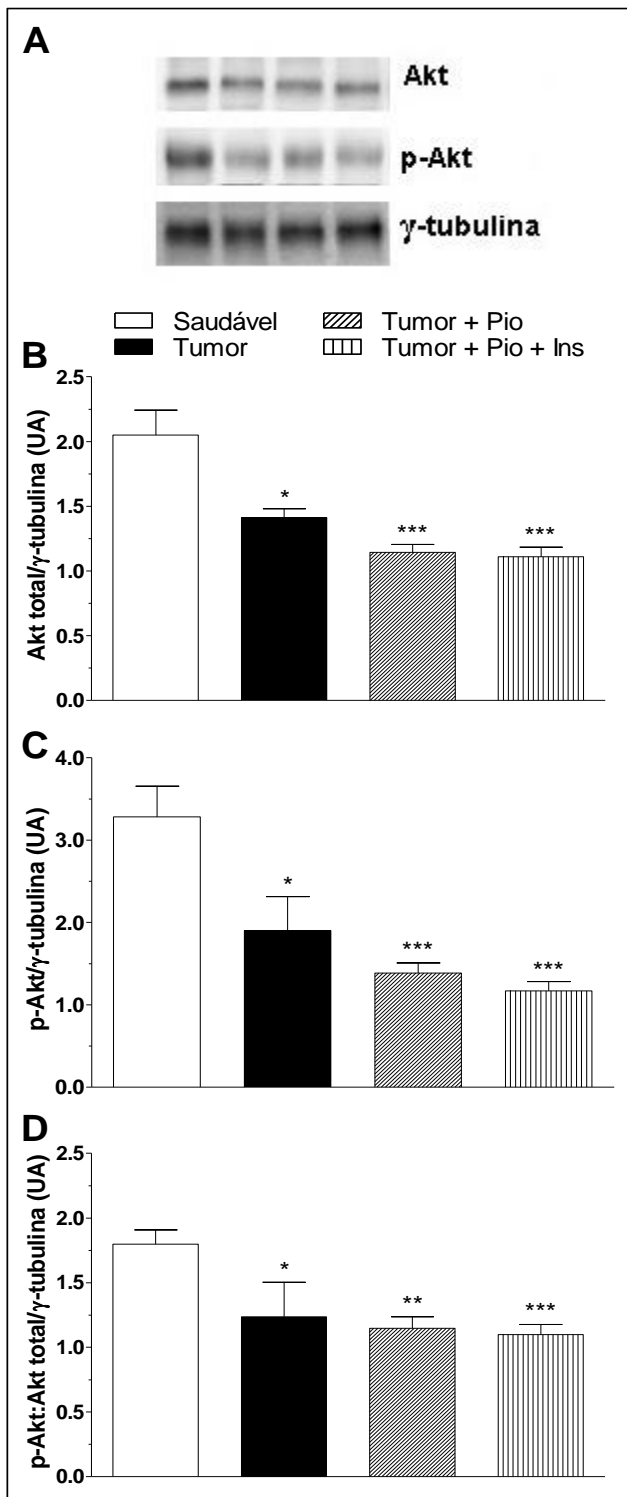


Figura 11. Glicemia (A,C) e constante de desaparecimento da glicose (kITT) (B,D) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. A glicemia foi avaliada em 0 (basal), 5, 10, 15 e 30 minutos após a administração endovenosa de insulina. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 9 animais. Diferenças dentro do mesmo grupo (A,C) em relação ao basal foram avaliadas por ANOVA para mensurações repetidas. Diferenças entre as kITTs (B,D) foram analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável; # $p < 0,05$ versus Tumor.

Tumor menor



Tumor maior

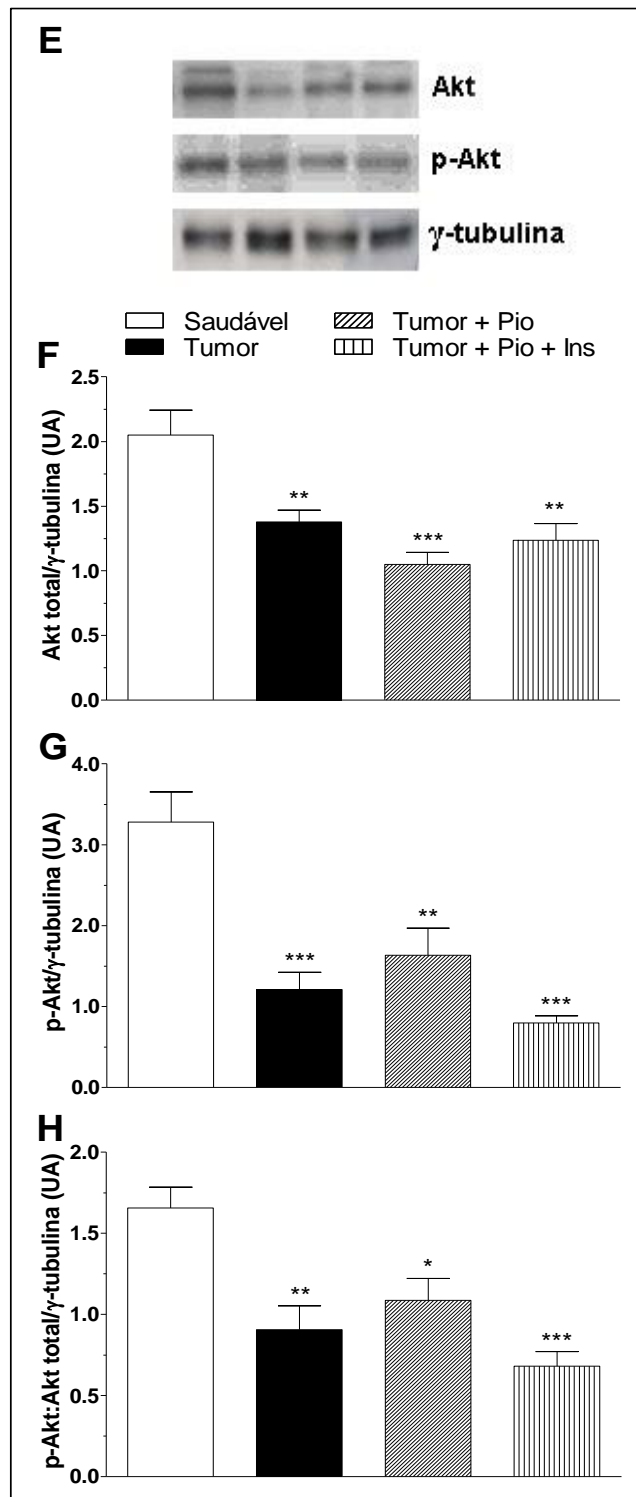


Figura 12. Blots representivos (A,E), conteúdo de Akt total (B,F), p-Akt (C,G) e relação p-akt/Akt (D,H) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias.. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Normalização por γ -tubulina. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 12 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Saudável.

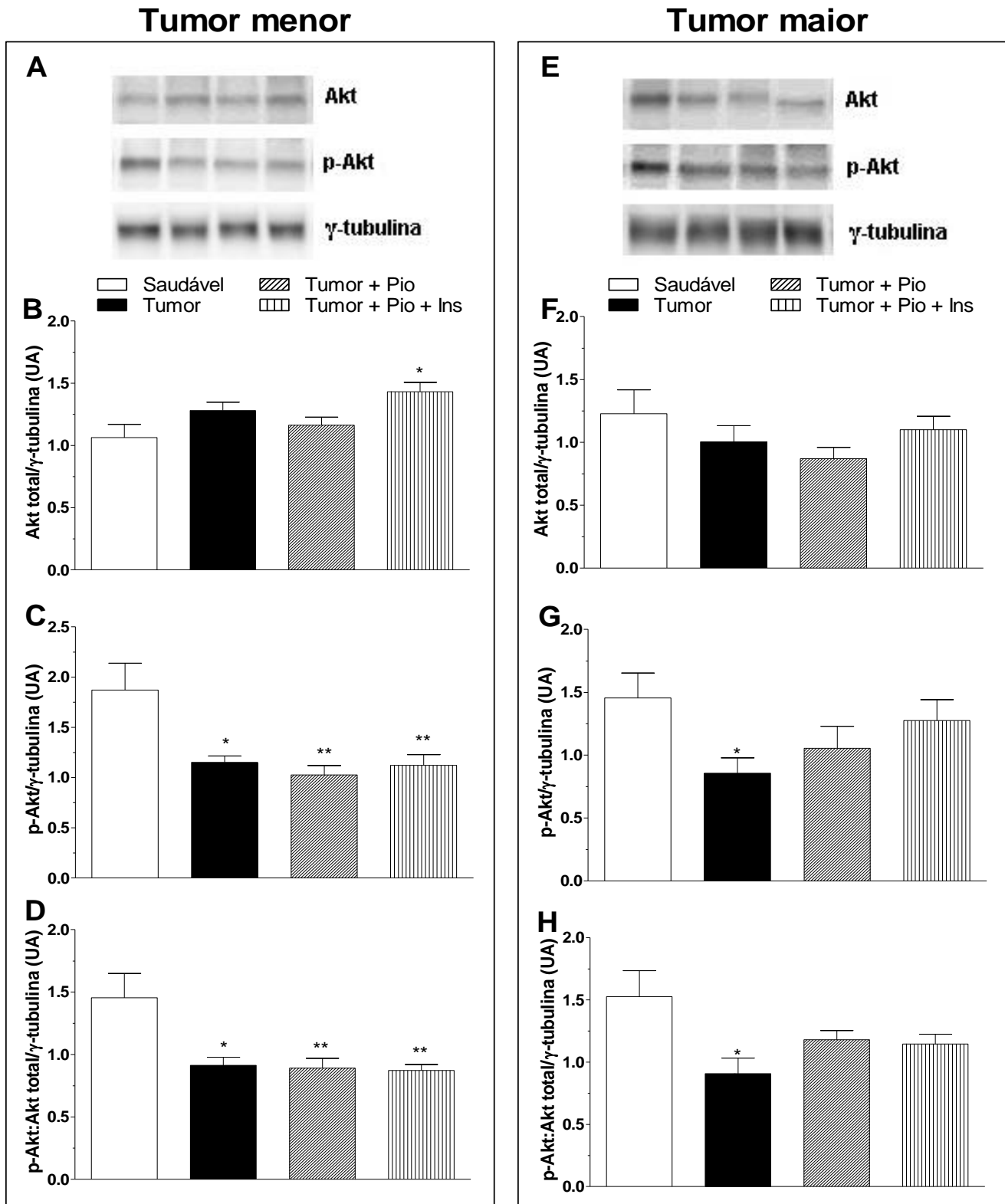


Figura 13. Blots representativos (A,E), conteúdo de Akt total (B,F), p-Akt (C,G) e relação p-akt/Akt (D,H) no tecido adiposo mesentérico de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Normalização por γ -tubulina. Dados representam a média \pm EPM de 5 a 12 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Saudável.

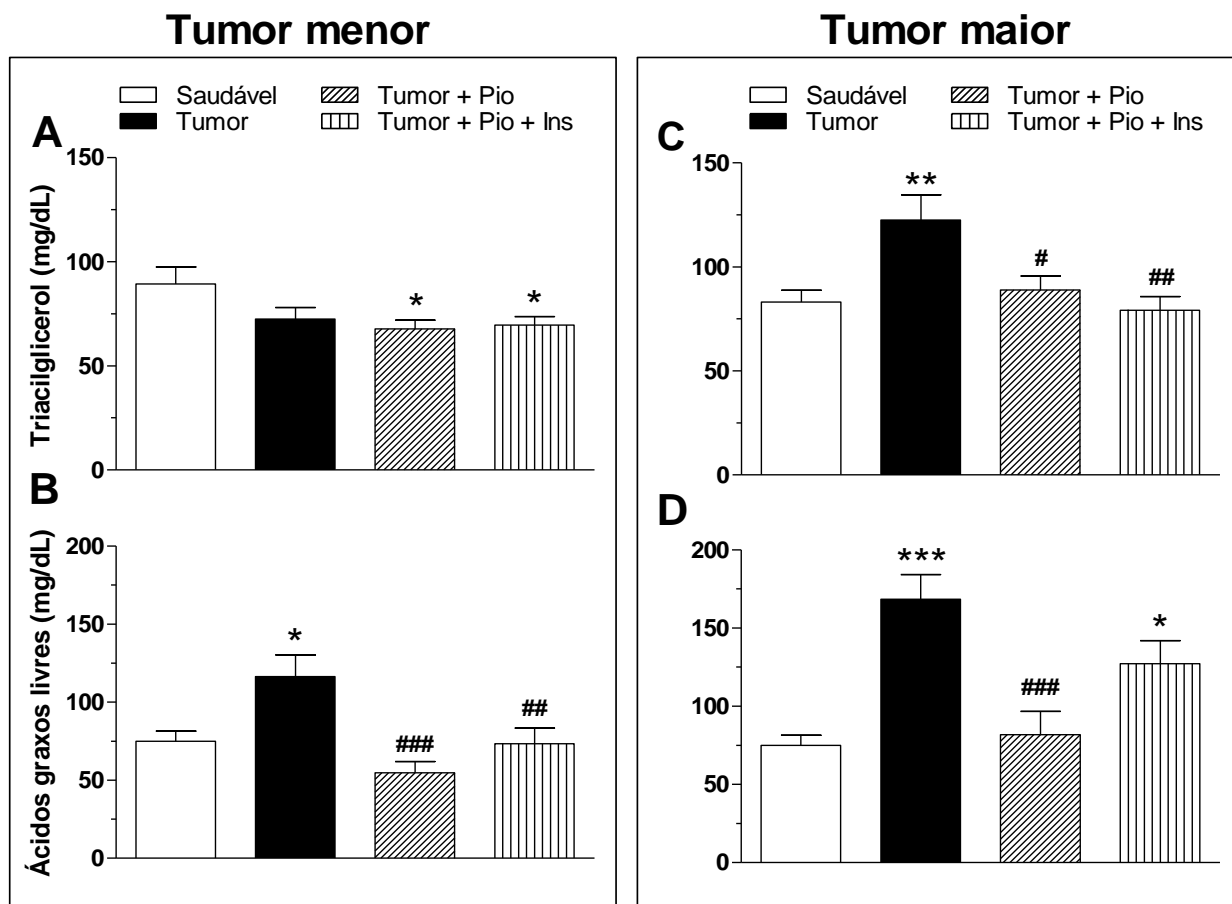


Figura 14. Concentração sérica de triacilglicerol (A,C) e ácidos graxos livres (B,D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, tratados com pioglitazona (Tumor + Pio) ou pioglitazona e insulina (Tumor + Pio + Ins) ou com os respectivos veículos durante 12 dias. Parâmetros à esquerda correspondem aos dos ratos com tumores menores e à direita ao dos ratos com tumores maiores. Dados representam a média \pm EPM de 8 a 21 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Saudável; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus Tumor

Discussão

5 DISCUSSÃO

Dentre os fatores que podem estar relacionados com desenvolvimento da caquexia do câncer está a resposta anormal dos tecidos à insulina, visto que a resistência insulínica pode contribuir para a exacerbação dos processos catabólicos.

Considerando que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam caquexia, resistência à insulina (MIKSZA et al., 2013; DE SOUZA et al., 2015) e hipoinsulinemia (FERNANDES et al., 1990), o efeito da metformina e pioglitazona, fármacos sensibilizadores da ação da insulina, isolados ou associados com a insulina, sobre a resistência à insulina, caquexia e outras anormalidades metabólicas relacionadas foram investigados neste modelo experimental de câncer. Considerando também que o efeito da metformina e pioglitazona sobre o crescimento do tumor Walker-256 não está estabelecido, o efeito destes fármacos no desenvolvimento tumoral também foi avaliado.

Com relação a **METFORMINA**, os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com a insulina, por 12 dias, a partir do início da inoculação das células tumorais, não alteraram o desenvolvimento do tumor Walker-256 (Figura 1), corroborando com estudos onde o tratamento com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹ também não afetou o crescimento do tumor Walker-256 (ROPELLE et al., 2007; FONSECA et al., 2011), embora teve efeito antitumoral em outros tipos de tumores e linhagens celulares (CEREZO et al., 2013; CHOI; PARK, 2013; QUINN et al., 2013; NANGIA-MAKKER et al., 2014).

No que se refere aos parâmetros associados à caquexia, os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, ou metformina e insulina, não preveniram a acentuada perda de massa corporal, adiposa e muscular dos ratos portadores de tumor (Figura 2), corroborando com outros estudos (ROPELLE et al., 2007; FONSECA et al., 2011; DE QUEIROZ et al., 2015). A perda de massa corporal observada na caquexia do câncer está associada à intensa proteólise muscular e lipólise, resultante da ação de fatores como o PIF, LMF e de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL1 e IL6, que ativam vias proteolíticas e lipolíticas, além de reduzir a síntese proteica e a adipogênese (MANTOVANI et al., 2000; GORDON; GRENN; GOGGIN, 2005).

A perda de massa corpórea em portadores de tumor é atribuída, em parte à anorexia associada à caquexia. Em nosso estudo, ratos portadores de tumor apresentaram redução da ingestão alimentar e os tratamentos com metformina 300 ou

500 mg.kg⁻¹, ou metformina e insulina, não afetaram a anorexia induzida pelo tumor (Figura 2). A anorexia no câncer parece estar relacionada ao efeito de citocinas (TNF α e IL6) que estimulam a liberação de fatores anorexigênicos, como o fator liberador de corticotrofina, e reduzem a liberação de neuropeptídeo Y, um neurotransmissor orexigênico, no núcleo paraventricular do hipotálamo (MARTIGNONI et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005; PATRA; ARORA, 2012). Em concordância com nossos achados, o tratamento com metformina 300 mg.kg⁻¹ não reverteu a anorexia de ratos portadores de tumor Walker-256 (FONSECA et al., 2011; DE QUEIROZ et al., 2015).

A resistência à insulina, frequentemente observada em pacientes (LUNDHOLM et al., 1978; COPELAND et al., 1987; TAYEK, 1992; ROFE et al., 1994; HONORS; KINZIG, 2012) e em modelos animais com câncer (ASP et al., 2010; MIKSZA et al., 2013; DE SOUZA et al., 2015), parece também contribuir para a perda de massa corporal observada na caquexia do câncer, visto que a insulina tem importantes efeitos anabólicos e anti-catabólicos (WILCOX, 2005). Foi mostrado que camundongos portadores de adenocarcinoma de cólon-26 apresentam resistência à insulina antes do início da perda de peso, e que o tratamento com rosiglitazona (antidiabético) melhorou a sensibilidade à insulina e atenuou a degradação de proteínas no músculo esquelético, mostrando que a resistência à insulina pode ter um papel na patogênese da caquexia (ASP et al., 2010). Contudo, os tratamentos com metformina 300 ou 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com-insulina, não melhoraram a resistência à insulina dos ratos portadores de tumor Walker-256, como indicado pela reduzida KITT (Figura 3), justificando a ausência de algum efeito dos tratamentos sobre a perda de massa corporal, adiposa e muscular.

A resistência à insulina no câncer tem sido relacionada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL6), produzidas pelo tumor e sistema imune (ROFE et al., 1987; McCALL et al., 1992; NOGUCHI et al., 1998), e de ácidos graxos livres no sangue (ROFE et al., 1994; CASSOLLA et al., 2012), resultantes da intensa lipólise na caquexia. Estes fatores diminuem a fosforilação de proteínas da cascata de sinalização da insulina, como a proteína Akt, inibindo passos essenciais da transdução do sinal insulínico (SENN et al., 2002; WARNE, 2003; KIM et al., 2004; SCHINNER et al., 2005; PETERSEN et al. 2006; DELARUE; MAGNAN, 2007). Em nosso estudo, houve redução da fosforilação da Akt no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico dos ratos portadores de tumor, como mostrado pelo menor conteúdo de p-Akt e pela menor

relação p-Akt/Akt total (Figura 4), sugerindo resistência à insulina nestes tecidos e corroborando com a redução da resposta periférica à insulina (Figura 3). Entretanto, não houve diferença nos conteúdos de p-Akt e na relação p-Akt/Akt total no músculo gastrocnêmio (Figura 4). Embora este resultado sugira ausência de resistência à insulina no gastrocnêmio, é preciso considerar que este músculo foi submetido a uma sobrecarga compensatória, pela incapacidade de uso do membro contralateral para sustentação e locomoção, devido a presença do tumor. Sabe-se, por exemplo, que a hipertrofia compensatória do músculo resulta em aumento na p-Akt (BODINE et al., 2001). A sobrecarga compensatória poderia, em hipótese, ter induzido a fosforilação da Akt no gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor.

O tratamento com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolado ou associado com insulina, não melhorou a fosforilação da Akt no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico dos ratos portadores de tumor, como mostrado pela falta de efeito sobre o conteúdo de p-Akt e na relação p-Akt/Akt (Figura 4), resultados que são consistentes com a falta de efeito dos tratamentos na resposta periférica à insulina (Figura 3). A falta de efeito dos tratamentos sobre a resposta periférica à insulina e sobre a fosforilação da Akt pode ser devida ao aumento de citocinas (TNF α e IL6), produzidas pelo tumor e sistema imune (ROFE et al., 1987; McCALL et al., 1992; NOGUCHI et al., 1998), e de ácidos graxos livres no sangue (ROFE et al., 1994; CASSOLLA et al., 2012), resultantes da intensa lipólise na caquexia. Estes fatores aumentam proporcionalmente com a progressão do tumor e poderiam anular os efeitos terapêuticos dos tratamentos neste estágio avançado da doença. Em consistência com nossa sugestão, o tratamento com roziglitazona melhorou a sensibilidade à insulina e atenuou a perda de peso em camundongos portadores do adenocarcinoma de cólon-26 em estágios precoces da caquexia (ASP et al., 2010), mas não teve efeito na perda de massa muscular em estágio avançado (ASP et al., 2011) da caquexia.

Com relação aos parâmetros hepáticos, ratos portadores de tumor apresentaram redução da produção de lactato e piruvato e, conseqüentemente, redução da glicólise a partir da glicose exógena, como evidenciado pelas AUCs de 10 a 40 minutos (Figura 5). No entanto, não houve inibição da glicólise a partir da glicose endógena, ou seja, da glicose proveniente do glicogênio, como observado pela similaridade da taxa glicolítica basal, antes da infusão de glicose no fígado, entre 0 e 10 minutos (Figura 5). Estes resultados são consistentes com a menor atividade da glicoquinase previamente observada em ratos portadores de tumor Walker-256

(VICENTINO *et al.*, 2002) e indicam menor captação de glicose pelo fígado dos ratos com tumor. A glicoquinase converte a glicose que entra no hepatócito em glicose-6-fosfato, gerando um gradiente de concentração que favorece a captação de glicose pelo fígado. Enquanto a insulina aumenta a captação hepática de glicose nos ratos saudáveis, por ativação da glicoquinase, a inibição desta enzima nos ratos com tumor reduz a captação de glicose pelo fígado e pode ter contribuído para a menor resposta à insulina (kITT) nestes animais. Embora a metformina estimula vias geradoras de ATP em ratos saudáveis, como a glicólise, por alterar o estado energético e ativar a AMPK (VIOLLET *et al.*, 2012; HAWLEY *et al.*, 2010), o tratamento com metformina 500 mg.kg⁻¹, isolado ou combinado com insulina, não teve efeito sobre este parâmetro nos ratos portadores de tumor (Figura 5).

Tendo em vista que o efeito da metformina sobre a produção hepática de glicose em ratos portadores de tumor é desconhecido, nós avaliamos o efeito dos tratamentos sobre as duas vias hepáticas liberadoras de glicose, ou seja, sobre a glicogenólise e a neoglicogênese. Ratos portadores de tumor apresentaram menor produção de glicose e menor taxa de glicogenólise basais do que os ratos saudáveis (Figura 6), provavelmente devido ao menor conteúdo de glicogênio no fígado, como observado em nossos estudos prévios (CASSOLLA *et al.*, 2012). O tratamento isolado com metformina 500 mg.kg⁻¹ não alterou a produção de glicose e glicogenólise, entretanto o tratamento com metformina e insulina aumentou a produção de glicose e glicogenólise hepática dos ratos portadores de tumor (Figura 6), provavelmente porque a insulina aumentou o conteúdo de glicogênio e a metformina, por ativação da AMPK, tenha estimulado a glicogenólise (SALANI *et al.*, 2014). Ratos portadores de tumor também apresentaram menor neoglicogênese hepática a partir da alanina do que os ratos saudáveis (Figura 7), confirmando nossos achados prévios (MOREIRA *et al.*, 2013). O tratamento isolado com metformina 500 mg.kg⁻¹ não alterou a menor produção de glicose dos ratos com tumor, mas o tratamento com metformina e insulina aumentou a produção de lactato e piruvato (Figura 7), efeito que pode ser resultante da ação estimulatória da metformina sobre o catabolismo da glicose (glicólise) proveniente da neoglicogênese (SALANI *et al.*, 2014).

Em síntese, o tratamento com metformina, isolado ou associado com insulina, não atenuou a perda de massa corpórea, adiposa e muscular (caquexia) induzidas pelo tumor Walker-256 possivelmente por não reduzir a resistência à insulina e o crescimento tumoral.

Com relação a **PIOGLITAZONA**, seus efeitos foram avaliados no presente estudo porque este fármaco melhora a sensibilidade à insulina, em diabéticos tipo II, por mecanismos distintos da metformina. A pioglitazona é uma TZD e estudos têm mostrado que, por ativarem o PPAR γ , as TZDs aumentam a expressão de genes responsáveis pela captação e armazenamento de lipídeos no tecido adiposo, reduzindo as concentrações de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no sangue, e conseqüentemente sua lipotoxicidade no músculo e fígado, melhorando a sinalização da insulina nestes tecidos (YAMAUCHI et al., 2001a; EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008).

Como nestes experimentos o padrão de desenvolvimento tumoral dentro de cada grupo não foi homogêneo, os ratos foram separados em dois grupos: ratos com tumores menores e ratos com tumores maiores. Embora tenha ocorrido variação no padrão de desenvolvimento tumoral, o tratamento com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, por 12 dias, a partir do início da inoculação das células tumorais, não afetou a massa tumoral (Figura 8A e 8D). Esses resultados corroboram com estudos onde o tratamento com pioglitazona 5 mg.kg⁻¹ durante 14 dias não afetou o crescimento do tumor Walker-256 (TRUDA et al., 2012) e onde as TZDs e outros agonistas de PPAR γ não afetaram o crescimento de outros tipos de tumor (MOORE-CARRASCO et al., 2008; ASP et al., 2011; CHEN; XIAO, 2014; TROBEC et al., 2014).

Mesmo sem efeito sobre a massa tumoral, os tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina preveniram a perda de massa corporal em 25% e 28% respectivamente, nos ratos com tumores menores, porém não nos ratos com tumores maiores (Figura 8). A prevenção da perda de massa corporal dos ratos com tumores menores, pelos tratamentos, foi acompanhada por prevenção da perda do tecido adiposo retroperitoneal, mas não do tecido adiposo mesentérico e do músculo gastrocnêmio (Figura 9). De fato, o tratamento isolado com pioglitazona tendeu prevenir ($p=0,052$) a perda de massa adiposa retroperitoneal, enquanto o tratamento com pioglitazona e insulina reverteu completamente este parâmetro (Figura 9). Nos ratos portadores de tumores maiores, a redução da massa adiposa retroperitoneal, mesentérica e do músculo gastrocnêmio não foi prevenida pelos tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, corroborando com a ausência de efeito dos tratamentos sobre a alteração de massa corporal (Figura 9).

É possível que a prevenção da perda de massa corporal dos ratos com tumores menores tenha envolvido a ação da pioglitazona em outros depósitos de gordura e

músculos. A TZDs, e outros agonistas de PPAR γ , têm efeitos diferenciados nos distintos depósitos adiposos. As TZDs estimulam a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e aumentam a captação de ácidos graxos livres, promovendo hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo (YAMAUCHI et al., 2001b), sendo estes efeitos mais proeminentes no tecido adiposo subcutâneo do que nos depósitos viscerais (LEFEBVRE et al., 1998; FESTUCCIA et al., 2009), como no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico avaliados neste estudo. Nos depósitos subcutâneos, as TZDs aumentam a expressão de AP2 (*adipocyte protein 2*), alvo importante da adipogênese, e de diacilglicerol acetil-transferase-1 (DGTA-1), enzima que catalisa etapa limitante na formação de triacilgliceróis (PROENÇA et al., 2014; FESTUCCIA et al., 2009). Em contraste, no depósito visceral as TZDs, e outros agonistas de PPAR γ , favorecem a lipólise por aumentar a expressão gênica da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT1), que capta ácidos graxos para a mitocôndria para a β -oxidação, e também do coativador de PPAR γ 1 α (PGC-1 α) e da proteína desacopladora mitocondrial-1 (UCP-1), cofatores chaves da termogênese (LAPLANTE et al., 2006; FESTUCCIA et al., 2009). Desse modo, a ativação do PPAR γ promove remodelamento do tecido adiposo, induzindo proliferação celular e hipertrofia preferencialmente nos depósitos adiposos subcutâneos e estimulando a lipólise e termogênese nos depósitos adiposos viscerais. Portanto, a prevenção da perda de massa corporal, pelos tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, nos ratos portadores de tumores menores possivelmente também é resultado do efeito desses tratamentos sobre o tecido adiposo subcutâneo, não analisado no presente estudo.

A prevenção da perda de massa corpórea e adiposa retroperitoneal dos ratos portadores de tumores menores, pelos tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, não envolveu melhora da ingestão alimentar (Figura 9) e nem redução do conteúdo de LHS e TNF α (Figura 10), visto que os tratamentos não afetaram estes parâmetros. O aumento do conteúdo de LHS e TNF α no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos portadores de tumor (Figura 10) corrobora com a depleção de massa adiposa deste tecido. A LHS é uma enzima lipolítica estimulada pelo TNF α (ARNER, 1995).

Em concordância com os efeitos da pioglitazona ou pioglitazona e insulina, atenuando a perda de massa corpórea e adiposa retroperitoneal dos ratos com tumores menores, os tratamentos com estes fármacos melhoraram a reduzida sensibilidade periférica à insulina nesses animais, como mostrado pelo aumento da KITT (Figura 11). Contudo, esses tratamentos não aumentaram a fosforilação da Akt, a qual está

reduzida nos ratos portadores de tumor, no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 12) e mesentérico (Figura 13). No entanto, estes resultados não excluem a possibilidade de que esses tratamentos restaurem a fosforilação da Akt e melhorem a sinalização da insulina em outros tecidos, incluindo outros depósitos adiposos e músculos. De fato, as TZDs, por aumentarem a captação e armazenamento de lipídeos no tecido adiposo, diminuem os ácidos graxos livres e triacilgliceróis no sangue e melhoram a sinalização da insulina no músculo (EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONOZ; SPIEGELMAN, 2008; YAMAUCHI et al., 2001b)

O efeito sensibilizador da insulina pelas TZDs no tratamento do diabetes mellitus tipo II está relacionado principalmente à redução das concentrações de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no sangue (YAMAUCHI et al., 2001b; EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONOZ; SPIEGELMAN, 2008). Os produtos do metabolismo dos ácidos graxos, como as ceramidas e diacilglicerol, ativam serina-treonina quinases, como a PKC (protein kinase C), IKKb (inhibitory kinase b) e o NFkB (fator nuclear kB) (DELARUE; MAGNAN, 2007), as quais fosforilam o receptor de insulina e outras proteínas da via de sinalização da insulina em resíduos de serina, ao invés de tirosina, prejudicando a transdução do sinal insulínico (BODEN, 2002; PETERSEN; SHULMAN, 2006; SCHINNER et al., 2005).

Nossos estudos prévios mostraram que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam aumento nas concentrações de ácidos graxos livres, como resultado do intenso catabolismo, e triacilgliceróis no sangue (CASSOLLA et al., 2012). Confirmando estes resultados, no presente estudo nós mostramos que ratos portadores de tumores apresentam hipertriacilglicerolemia (tumores maiores) e elevada concentração de ácidos graxos livres no sangue (tumores menores e maiores), alterações que foram completamente revertidas pelos tratamentos com pioglitazona ou pioglitazona e insulina, exceto para o grupo tumor maior onde o tratamento com pioglitazona e insulina não reverteram significativamente a elevada concentração de ácidos graxos livres (Figura 14).

As TZDs promovem redução de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no sangue por diferentes mecanismos, incluindo: aumento da expressão de genes relacionados à captação, armazenamento e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo, como LPL, AP2 e acetil-CoA sintetase (TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994; SCHOONJANS; WATANABE; SUZUKI, 1995; SCHOONJANS; STAELS; AUWERX, 1996); aumento da liberação de adiponectina (YAMAUCHI et al., 2001a, 2001b) e por alteração do estado

energético celular (aumento da razão AMP:ATP), através da inibição do complexo I da cadeia respiratória (BRUNMAIR et al., 2004), aumentando a razão AMP/ATP, o qual ativa a AMPK (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012; VIOLLET et al., 2012) e consequentemente estimulando vias geradoras de ATP, como a oxidação de ácidos graxos.

A redução da concentração de ácidos graxos livres no sangue pelos tratamentos com pioglitazona, isolada ou associada com insulina, nos ratos portadores de tumor menor, é consistente com a melhora da sensibilidade periférica à insulina durante o ITT (Figura 11). Contudo, nos ratos com tumores maiores, a falta de efeito da pioglitazona, a qual também diminui a concentração de ácidos graxos livres no sangue, sobre a resposta periférica à insulina, pode ser devida a maior presença de outros fatores circulantes causadores de resistência à insulina, como as citocinas, em função do maior tamanho do tumor.

Em síntese, o tratamento com pioglitazona melhorou a sensibilidade periférica a insulina, provavelmente por reduzir a concentração de ácidos graxos livres no sangue, e reduziu a perda de peso corpóreo dos ratos com tumores menores, sem alterar o crescimento tumoral, sugerindo um papel da resistência à insulina no desenvolvimento da caquexia. No entanto, o tratamento não teve efeitos benéficos nos ratos com tumores maiores. Os resultados sugerem benefícios clínicos da pioglitazona na prevenção da perda de peso quando o tumor é pequeno.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

O tratamento com metformina, isolado ou associado com a insulina, não atenuou a caquexia induzida pelo tumor Walker-256, possivelmente por não melhorar a resistência à insulina e não reduzir o crescimento do tumor (ARTIGO 1).

O tratamento com pioglitazona melhorou a sensibilidade periférica a insulina, provavelmente por reduzir a concentração de ácidos graxos livres no sangue, e reduziu a perda de peso corpóreo dos ratos com tumores menores, sem alterar o crescimento tumoral, sugerindo um papel da resistência à insulina no desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor Walker-256. Esses resultados sugerem benefícios clínicos da pioglitazona na prevenção da perda de peso quando o tumor é pequeno (ARTIGO 2).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A falta de efeito da metformina e o efeito benéfico discreto da pioglitazona nos ratos com tumores menores, mas não nos ratos com tumores maiores, na correção da resistência à insulina e na caquexia pode ser devida ao fato que os estudos foram realizados em uma fase muito avançada do desenvolvimento tumoral, onde a maior presença de fatores circulantes como o LMF, PIF, TNF α , IL1, IL6 (CAMPS et al., 2006; BING; CHEN et al., 2009; TISDALE, 2010), estresse oxidativo (GUARNIER et al., 2010), corticosterona (MAZZUCO et al., 2012), ácidos graxos livres (CASSOLLA et al., 2012), entre outros, os quais aumentam proporcionalmente com a progressão do tumor, podem prejudicar ou mesmo anular os efeitos terapêuticos benéficos do tratamento. Estudos com tratamentos que melhorem ou corrijam a resistência insulínica associada ao câncer poderão esclarecer a real contribuição da resposta anormal para insulina no desenvolvimento da caquexia do câncer. Se a resistência à insulina, assim como a hipoinsulinemia, contribuírem para o desenvolvimento da caquexia, a correção destas anormalidades poderão reduzir a caquexia e ter impacto na morbidade e mortalidade de pacientes com câncer.

Referências

REFERÊNCIAS

- ANDÚJAR-PLATA, P.; PI-SUNYER, X.; LAFERRÈRE, B. Metformin effects revisited. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2012.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2036-2046, 2005.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 435-438, 1995.
- ASP, M. L.; TIAN, M.; WENDEL, A. A.; BELURY, M. A. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 756–763, 2010.
- ASP, M. L.; TIAN, M.; KLIEWER, K. L.; BELURY, M. A. Rosiglitazone delayed weight loss and anorexia while attenuating adipose depletion in mice with cancer cachexia. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 11, p. 957–965, 2011.
- BARISH, G. D.; NARKAR, V. A.; EVANS, R. M. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 590–597, 2006.
- BASSOLI, B. K.; CASSOLLA, P.; BORBA-MURAD, G. R.; CONSTANTIN, J.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Instant coffee extract with high chlorogenic acids content inhibits hepatic G-6-Pase in vitro, but does not reduce the glycaemia. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 4, p. 183-187, 2015.
- BASTOS-PEREIRA, A. L.; LUGARINI, D.; OLIVEIRA-CHRISTOFF, A.; ÁVILA, T. V.; TEIXEIRA, S.; PIRES, A. R. A.; MUSCARÁ, M. N.; CADENA, S. M. S. C.; DONATTI, L.; ASSIS, H. C. S.; ACCO, A. Celecoxib prevents tumor growth in an animal model by a COX-2 independent mechanism. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 267-276, 2010.
- BELUZI, M.; PERES, S. B.; HENRIQUES, F. S.; SERTIÉ, R. A. L.; FRANCO, F. O.; SANTOS, K. B.; KNOBL, P.; ANDREOTTI, S.; SHIDA, C. S.; NEVES, R. X.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M.; LIMA, F. B.; BATISTA JR., M. L. Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing animals: possible anti-cachectic effect. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.
- BENNANI-BAITI, N.; WALSH, D. What is cancer anorexia-cachexia syndrome? A historical perspective. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 39, n. 3, p. 257-262, 2009.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**, Academic Press, v. 2, p. 1205-1215, 1974.
- BHALLA, K.; HWANG, B. J.; DEWI, R. E.; TWASSWL, W.; GOLOUBEVA, O. G.; WONG, K-K.; SAXENA, N. K.; BISWAL, S.; GIRNUN, G. D. Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 5, p. 544-552, 2012.

- BING, C.; TRAYHURN, P. New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 385–392, 2009.
- BODEN, G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 5, p. 545–549, 2002.
- BODINE, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; STOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 1014-1019, 2001.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRUNMAIR, B.; STANIEK, K.; GRAS, F.; SCHARF, N.; ALTHAYM, A.; CLARA, R.; RODEN, M.; GNAIGER, E.; NOHL, H.; WALDHAUSL, W.; FURNSINN, C. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1052–1059, 2004
- CAMPS, C.; IRANZO, V.; BREMNES, R. M.; SIRERA, R. Anorexia–cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin–proteasome pathway. **Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 12, p. 1173–1183, 2006
- CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C. L.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T. B. V.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, p. 265–270, 2012.
- CEREZO, M.; TICHET, M.; ABBE, P.; OHANNA, M.; LEHRAIKI, A.; ROUAUD, F.; ALLEGRA, M.; GIACCHERO, D.; BAHADORAN, P.; BERTOLOTTO, C.; TARTARE-DECKERT, S.; BALLOTTI, R.; ROCCHI, S. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 8, p. 1605-1615, 2013.
- CHEN, S. Z.; XIAO, J. D. Rosiglitazone and imidapril alone or in combination alleviate muscle and adipose depletion in a murine cancer cachexia model. **Tumor Biology**, v. 35, p. 323–332, 2014.
- CHEN, X.; XUN, K.; CHEN, L.; WANG, Y. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 7, p. 407–416, 2009.
- CHOI, Y. K.; PARK, K. G. Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells. **Molecules and Cells**, v. 36, n. 4, p. 279-287, 2013.
- COPELAND, G. P.; LEINSTER, S. J.; DAVIS, J. C.; HIPKIN, L. J. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 74, n. 11, p. 1031-1035, 1987.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Academic Press, p. 1446-1448, 1974.

DA ROCHA, A. F.; LIBONI, T. F.; MOREIRA, C. C.; MIKSZA, D. R.; DE SOUZA, C. O.; DE FATIMA SILVA, F.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Inhibitory effect of tumor necrosis factor α on gluconeogenesis in perfused rat liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 375, n. 1-2, p. 89-96, 2013.

DE QUEIROZ, E. A.; AKAMINE, E. H.; DE CARVALHO, M. H.; SAMPAIO, S. C.; FORTES, Z. B. Metformin reduces the Walker-256 tumor development in obese-MSG rats via AMPK and FOXO3a. **Life Sciences**, v. 121, p. 78-87, 2015.

DE SOUZA, C. O.; KURAUTI, M. A.; DE FATIMA SILVA, F.; DE MORAIS, H.; CURI, R.; HIRABARA, S. M.; ROSA NETO, J. C.; DE SOUZA, H. M. Celecoxib and ibuprofen restore the ATP content and the gluconeogenesis activity in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1659-1669, 2015.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care**, v. 10, p.142-148, 2007.

ESFAHANI, M.; MOVAHEDIAN, A.; BARANCHI, M.; GOODARZI, M. T. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 5, p. 430-442, 2015.

ESLAMI, A.; LUJAN, J. Western blotting: sample preparation to detection. **Journal of Visualized Experiments**, v. 14, n. 44, p. e2359, 2010.

EVANS R.M.; BARISH G.D.; WANG Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004.

EVANS, W. J.; MORLEY, J. E.; ARGILES, J.; BALES, C.; BARACOS, V.; GUTTRIDGE, D.; JATOI, A.; KALANTAR-ZADEH, K.; LOCHS, H.; MANTOVANI, G.; MARKS, D.; MITCH, W. E.; MUSCARITOLI, M.; NAJAND, A.; PONIKOWSKI, P.; ROSSIFANELLI, F.; SCHAMBELAN, M.; SCHOLS, A.; SCHUSTER, M.; THOMAS, D.; WOLFE, R.; ANKER, S. D. Cachexia: a new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793-799, 2008.

FALHOLT, K.; LUND, D.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fat acids in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 46, p. 105-111, 1973.

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 258, n. 6, p. 1033-1036, 1990.

FESTUCCIA, W. T.; BLANCHARD, P.G.; TURCOTTE, V.; LAPLANTE, M.; SARIAHMETOGLU, M.; BRINDLEY, D. N.; DESHAIES, Y. Depot-specific effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 6, p. 1185-1194, 2009.

FONSECA, E. A. I.; DE OLIVEIRA, M. A.; LOBATO, N. S.; AKAMINE, E. H.; COLQUHOUN, A.; DE CARVALHO, M. H. C.; ZYNGIER, S. B.; FORTES, Z. B. Metformin reduces the stimulatory effect of obesity on in vivo Walker-256 tumor development and increases the area of tumor necrosis. **Life Sciences**, v. 88, p. 846-852, 2011.

GORDON, J. N.; GRENN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 98, p. 779-788, 2005.

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v. 39, n. 3, p. 173-178, 1982.

GUARNIER, F. A.; CECCHINI, A. L.; SUZUKAWA, A. A.; MARAGNO, A. L. G. C.; SIMÃO, A. N. C.; GOMES, M. D.; CECCHINI, R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker-256 solid tumor. **Muscle & Nerve**, v. 42, n. 6, p. 950–958, 2010.

GUNTON, J. E.; PATRIC, J. D. D.; SHIN-ICHIRO, T.; BAXTER, R. C. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1323-1332, 2003.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. Academic press, p. 1464-1472, 1974.

HADAD, S. M.; FLEMING, S.; THOMPSON, A. M. Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 67, n. 1, p. 1-7, 2008.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 251-262, 2012.

HAWLEY, S. A.; ROSS, F. A.; CHEVTZOFF, C.; GREEN, K. A.; EVANS, A.; FOGARTY, S.; TOWLER, M. C.; BROWN, L. J.; OGUNBAYO, O. A.; EVANS, A. M.; HARDIE, D.G. Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 6, p. 554 – 565, 2010.

HONORS, M. A.; KINZIG, K. P. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 2012.

JAKOBSEN, S. N.; HARDIE, D. G.; MORRICE, N.; TORNQVIST, H. E. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 46912-46916, 2001.

JENSEN, E. C. The basics of western blotting. **The Anatomical Record**, v. 295, n. 3, p. 369-371, 2012.

KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M. Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, 1995.

KIM, H.-J.; HIGASHIMORI, T.; PARK, S.-Y.; CHOI, H.; DONG, J.; KIM, Y.-J.; NOH, H.-L.; CHO, Y.-R.; CLINE, G.; KIM, Y.-B.; KIM, J. K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1060-7, 2004.

KURTH-KRACZEK, E. J.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; WINDER, W. W. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 48, n. 8, p. 1667-1671, 1999.

LAPLANTE, M.; FESTUCCIA, W. T.; SOUCY, G.; GÉLINAS, Y.; LALONDE, J.; BERGER, J. P.; DESHAIES, Y. Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor γ action on adipose tissue metabolism. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2771–2778, 2006.

LEFEBVRE, A. M.; LAVILLE, M.; VEGA, N.; RIOU, J. P.; VAN GAAL, L.; AUWERX, J.; VIDAL, H. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. **Diabetes**, v. 47, p. 98–103, 1998.

LI, H.; SORENSON, A. L.; POCZOBUTT, J.; AMIN, J.; JYAL, T.; SULLIVAN, T.; CROSSNO, J. T. Jr.; WEISER-EVANS, M. C.; NEMENOFF, R. A. Activation of PPAR in myeloid cells promotes lung cancer progression and metastasis. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28133, 2011.

LIU, Q.; YUAN, B.; LO, K. A.; PATTERSON, H. C.; SUN, Y.; LODISH, H. F. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 36, p. 14568–14573, 2012.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTÉN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, v. 38, n. 12, p. 4665-4670, 1978.

MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western blot: technique, theory and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429-434, 2012.

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

MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer**, v. 2, p. 36, 2003.

MAZZUCO, T.; CRESPIGIO, J.; FONSECA, E.; MACIOSZEK, M.; LAZARI-BERBEL, L.; DE, F. R.; SOUZA, H. Cancer induces adrenal and pituitary alterations during the development of cachexia-anorexia syndrome. **Endocrine Abstracts**, v. 29, p. 41, 2012.

McCALL, J. L.; TUCKEY, J. A.; PARRY, B. R. Serum tumour necrosis factor alpha and insulin resistance in gastrointestinal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 79, n. 12, p.1361-1363, 1992.

MIKSZA, D. R.; DE SOUZA, C. O.; DE MORAIS, H.; DA ROCHA, A. F.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Effect of infliximab on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 960-969, 2013.

MOORE-CARRASCO, R.; FIGUERAS, M.; AMETLLER, E.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S. Effects of the PPAR γ agonist GW1929 on muscle wasting in tumour-bearing mice. **Oncology Reports**, v. 19, p. 253–256, 2008.

MORAIS, H.; CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C. L.; VILAS-BÔAS, S. K. F.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, H. M. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, p. 9-16, 2012.

MOREIRA, C. C.; CASSOLLA, P.; DORNELLAS, A. P.; DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. O.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in liver gluconeogenesis

during the development of Walker-256 tumor in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 1, p. 47-55, 2013.

NANGIA-MAKKER, P.; YU, Y.; VASUDEVAN, A.; FARHANA, L.; RAJENDRA, S. G.; LEVI, E.; MAJUMDAR, A. P. Metformin: a potential therapeutic agent for recurrent colon cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84369, 2014.

NOGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; MARAT, D.; DOI, C.; MAKINO, T.; FUKUZAWA, K.; TSUBURAYA, A.; SATOH, S.; ITO, T.; MITSUSE, S. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- α expression in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 887–892, 1998.

PATRA, S. K.; ARORA, S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 13, n. 13-14, p. 1025-1034, 2012.

PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1863-1869, 1997.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 5, p. S10–S16, 2006.

PROENÇA, A. R.; SERTIÉ, R. A.; OLIVEIRA, A. C.; CAMPAÑA, A. B.; CAMINHOTTO, R. O.; CHIMIN, P.; LIMA, F. B. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 192-205, 2014.

QUINN, B. J.; DALLOS, M.; KITAGAWA, H.; KUNNUMAKKARA, A. B.; MEMMOTT, R. M.; HOLLANDER, M. C.; GILLS, J. J.; DENNIS, P. A. Inhibition of lung tumorigenesis by metformin is associated with decreased plasma IGF-I and diminished receptor tyrosine kinase signaling. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 8, p. 801-810, 2013.

REGINATO, M. J.; LAZAR, M. A. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 9 – 13, 1999.

ROFE, A. M.; CONYERS, R. A. J.; BAIS, R.; GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A. The effects of recombinant tumor necrosis factor (cachetin) on metabolism in isolated rat adipocyte, hepatocyte and muscle preparations. **Biochemical Journal**, v. 247, p. 789-792, 1987.

ROFE, A. M.; BOURGEOIS, C. S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, E. A. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Research**, v. 14, n. 2B, p. 647-650, 1994.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; ZECCHIN, K. G.; UENO, M.; DE SOUZA, C. T.; MORARI, J.; FARIA, M. C.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. A central role for neuronal adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. **Endocrinology**, v. 148, n. 11, p. 5220-5229, 2007.

SALANI, B.; DEL RIO, A.; MARINI, C.; SAMBUCETI, G.; CORDERA, R.; MAGGI, D. Metformin, cancer and glucose metabolism. **Endocrine-Related Cancer**, v. 21, n. 6, p. R461-471, 2014.

SANCHEZ-ALVAREZ, R.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; LAMB, R.; HULIT, J.; HOWELL, A.; GANDARA, R.; SARTINI, M.; RUBIN, E.; LISANTI, M. P.; SOTGIA, F. Mitochondrial

dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth: understanding chemoprevention with metformin. *Cell Cycle*, v. 12, n. 1, p. 172-182, 2013.

SCHINNER, S.; SCHERBAUM, W. A.; BORNSTEIN, S. R.; BARTHEL, A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabetic Medicine*, v. 22, n. 6, p. 674-682, 2005.

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, M.; MAHFOUDI, A.; KREY, G.; WAHLI, W.; GRIMALDI, P.; STAELS, B.; YAMAMOTO, T.; AUWERX, J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 33, p. 19269-19276, 1995.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of Lipid Research*, v. 37, n. 5, p. 907-925, 1996.

SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; MOONEY, R. A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*, v. 51, n. 12, p. 3391-3399, 2002.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 10, p. 1353-1362, 2001.

SHEN, D.; DENG, C.; ZHANG, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgraduated Medical Journal*, v. 83, n. 980, p. 414-419, 2007.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 2, p. 171-176, 2000.

SKIPWORTH, R. J.; STEWART, G. D.; DEJONG, C. H.; PRESTON, T.; FEARON, K. C. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumor interaction? *Clinical Nutrition*, v. 74, n. 26, p. 3211-3222, 2007.

STEPHENNE, X.; FORETZ, M.; TALEUX, N.; VAN DER ZON, G. C.; SOKAL, E.; HUE, L.; VIOLLET, B.; GUIGAS, B. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*, v. 54, n. 12, p. 3101-3110, 2011.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 307-312, 2001.

TAKADA, J.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; DE CAMPOS, T. B. F.; ANDREOTTI, S.; CAMPANA, A. B.; OKAMOTO, M.; BORGES-SILVA, C. D. N.; MACHADO, U. F.; LIMA, F. B. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. *The Journal of Endocrinology*, v. 198, n. 1, p. 51-60, 2008.

TAKANO, S.; KUBOTA, T.; NISHIBORI, H.; HASEGAWA, H.; ISHII, Y.; NITORI, N.; OCHIAi, H.; OKABAYASHI, K.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, M.; KITAJUMA, M. Pioglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma acts as an inhibitor of colon cancer liver metastasis. *Anticancer Research*, v. 28, n. 6A, p. 3593-3599, 2008.

- TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v. 51, n. 4, p. 526-533, 2007.
- TAYEK, J. A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 445-456, 1992.
- TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438-442, 2001.
- TISDALE, M. J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. **Physiology**, v. 20, p. 340-348, 2005.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.
- TISDALE, M.J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 503-513, 2010.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147-1156, 1994.
- TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 289-312, 2008.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TREEBAK, J. T.; TAYLOR, E. B.; WITCZAK, C. A.; AN, D.; TOYODA, T.; KOH, H-J.; XIE, J.; FEENER, E. P.; WOJTASZEWSKI, J. F. P.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. Identification of a novel phosphorylation site on TBC1D4 regulated by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 298, n. 2, p. C377-385, 2010.
- TRINDER, P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v.22, n. 2, p. 158-161, 1969.
- TROBEC, K.; PALUS, S.; TSCHIRNER, A.; VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; LAINSCAK, M.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. Rosiglitazone reduces body wasting and improves survival in a rat model of cancer cachexia. **Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 1069–1075, 2014.
- TRUDA, V. S.; KIMIMURA, F.; BELUZI, M. E. A.; BATISTA-JUNIOR, M. L. Análise dos efeitos anticaquéticos causados pela pioglitazona em ratos Wistar inoculados com tumor de Walker-256. In: **Anais do XV Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2012.
- VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Liver**, v. 22, n. 4, p. 342-350, 2002.

- VIOLLET, B.; LANTIER, L.; DEVIN-LECLERC, J.; HEBRARD, S.; AMOUYAL, C.; MOUNIER, R.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 3380-3400, 2009.
- VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; SANZ GARCIA, N.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v. 122, n. 6, p. 253-270, 2012.
- VITALE-CROSS, L.; MOLINOLO, A. A.; MARTIN, D.; YOUNIS, R. H.; MARUYAMA, T.; PATEL, V.; CHEN, W.; SCHNEIDER, A.; GUTKIND, J. S. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 4, p. 562-573, 2012.
- WARNE, J. P. Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass. **Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 351-355, 2003.
- WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19-39, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – International Agency for Research on Cancer. *Latest world cancer statistics*. PRESS RELEASE N° 223, 12 Dec 2013. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf>. Acesso em: 30 nov 2015.
- YAMAUCHI, T.; IWABU, M.; OKADA-IWABU, M.; KADOWAKI, T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 15–23, 2014.
- YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; MURAKAMI, K.; MOTOJIMA, K.; KOMEDA, K.; IDE, T.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; MIKI, H.; TSUCHIDA, A.; AKANUMA, Y.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; KADOWAKI, T. The Mechanisms by Which Both Heterozygous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ) Deficiency and PPAR Agonist Improve Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41245–41254, 2001a.
- YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; HARA, K.; MORI, Y.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; AKANUMA, Y.; GAVRILOVA, O.; VINSON, C.; REITMAN, M. L.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K.; YODA, M.; NAKANO, Y. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001b.
- YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; SATOH, S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of GLUT4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 678-681, 1999.
- ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167-1174, 2001.