



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELY DE MORAIS

**PAPEL DA INSULINA E GLUTAMINA DIPEPTÍDEO NA
CAQUEXIA E NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS
INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256**

Londrina
2016



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

HELY DE MORAIS

**PAPEL DA INSULINA E GLUTAMINA DIPEPTÍDEO NA CAQUEXIA E
NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR
WALKER-256**

Londrina - Paraná
2016

HELY DE MORAIS

**PAPEL DA INSULINA E GLUTAMINA DIPEPTÍDEO NA
CAQUEXIA E NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS
INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Helenir Medri de Souza.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Moraes, Hely .

Papel da insulina e glutamina dipeptídeo na caquexia e nas alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 / Hely de Moraes. - Londrina, 2016.
84 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

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

Inclui bibliografia.

1. Câncer - Teses. 2. Alterações metabólicas - Teses. 3. Insulina - Teses. 4. Glutamina dipeptídeo - Teses. I. de Souza, Helenir Medri . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

HELY DE MORAIS

**PAPEL DA INSULINA E GLUTAMINA DIPEPTÍDEO NA CAQUEXIA E
NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR
WALKER-256**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Helenir Medri de
Souza
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Cássia Thaïs Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

Prof. Dr. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina- UNESP

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais Jair e Helena, pelo exemplo de vida, carinho e apoio total em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A todos que me apoiaram e ainda apoiam nesta longa jornada que é a vida.

Aos meus pais Jair e Helena, por todo esforço que realizaram para que eu chegasse até aqui, me dando força nos momentos de desânimo e por nunca deixarem de acreditar em mim, e à minha irmã Helen e ao meu cunhado Carlos Eduardo, pela confiança, amparo e pelas horas de conversa. Vocês são o meu porto seguro.

Ao Pipoca, por estar sempre ao meu lado, dando “apoio moral” e carinho, desde a conclusão da graduação até a elaboração deste trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos, que perto ou longe estiveram sempre prontos a me ouvir, incentivar, animar e torcer pelo êxito deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Helenir Medri de Souza, por toda a paciência e dedicação e por estar sempre presente e disposta a realmente me orientar na execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cássia Thaïs B. V. Zaia, por me iniciar no mundo científico e me ensinar as técnicas e procedimentos básicos, os quais foram imprescindíveis não somente para a execução deste trabalho, mas também são extremamente úteis na minha rotina atual de trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Ponzoni, pela sinceridade, auxílio e bons conselhos.

Ao Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte, por ter nos concedido a glutamina dipeptídeo e também pelo auxílio e esclarecimentos no decorrer do projeto.

Ao Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização do Western blotting.

À Prof^a. Dr^a. Tânia Longo Mazzuco, pela dosagem da corticosterona.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Fisiologia Metabólica Flaviane, Gabriel, Mahira, Milene, Priscila e Winny, pela ajuda, principalmente nos finais de semana e feriados, apoio, simpatia e momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas de trabalho. Gostaria de agradecer especialmente à Flaviane, por ter sido não somente o meu braço direito durante a execução deste trabalho, mas, também o esquerdo, realizando parte dos experimentos na minha ausência.

Aos amigos de departamento e de pós-graduação, pelo apoio e parceria em todas as horas.

Às amigas, Deborah e Laira, pelo carinho, atenção, risadas e por abrirem as portas de suas casas em Londrina.

Aos colegas de trabalho e amigos da UFPR, por compreenderem e suportarem o meu mau humor e desespero durante a elaboração deste trabalho, sempre tentando auxiliar e facilitar o meu trabalho e os meus dias durante este período atribulado.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas.

Ao CNPq e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por Sua infinita bondade, pelas chances que temos de aprender, de ensinar, de viver...

"Todo mundo é um cientista maluco e a vida é o laboratório. A gente está sempre experimentando, tentando achar um jeito de viver, de resolver os problemas, de se livrar da loucura do caos."

David Cronenberg

MORAIS, Hely de. **Papel da Insulina e Glutamina dipeptídeo na caquexia e nas alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256.** 2016. 84 f. Tese(Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada pelo predomínio do catabolismo, com acentuada perda de massa muscular e adiposa, anorexia, alterações no sistema imune e no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. O propósito deste estudo foi investigar o efeito dos tratamentos isolado e combinado de insulina (INS) e glutamina dipeptídeo (GDP) na caquexia e em várias alterações metabólicas em ratos portadores de tumor Walker-256. A INS (NPH 40 U/Kg, sc) e a GDP (1,5 g/Kg, oral) foram administradas por 11 dias, 1 vez ao dia, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Os tratamentos com GDP, INS ou INS+GDP não afetaram o crescimento tumoral. Entretanto, os tratamentos com INS e INS+GDP, de modo similar, preveniram a anorexia, a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal e a perda de massa corporal (60%) dos ratos portadores de tumor. Os tratamentos com INS e INS+GDP também, de modo semelhante, impediram completamente a redução da fosforilação da Akt, como mostrado pela elevada relação p-Akt:Akt total, e redução do conteúdo da lipase de triacilgliceróis (ATGL) e da lipase sensível a hormônio (LHS), alterados no tecido adiposo retroperitoneal, e reduziram a hiperlactatemia dos ratos portadores de tumor. Contudo, os tratamentos com INS e INS+GDP acentuaram, de maneira similar, a hipoglicemia, a hipertriacilglicerolemia e a perda de massa dos músculos gastrocnêmio, extensor digital longo e sóleo, mas não afetaram a hiperuremia, a resistência à INS, o conteúdo aumentado do fator de necrose tumoral- α no tecido adiposo retroperitoneal e fígado e nem a redução da glicólise hepática, a partir da glicose exógena, nos ratos portadores de tumor. Já o tratamento com GDP acentuou a hiperlactatemia, a anorexia e a perda de massa corpórea e aumentou a expressão do RNAm do transportador de glicose GLUT-4 no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor e não teve efeito sobre os demais parâmetros avaliados. Pode ser concluído que os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), mas não com GDP, reduziram algumas anormalidades metabólicas presentes nos ratos portadores de tumor Walker-256, como a perda de massa corpórea e adiposa, sem reduzir o crescimento tumoral. Estes efeitos podem ser atribuídos ao aumento induzido pela INS na fosforilação da Akt e a consequente redução do conteúdo de lipases (ATGL e LHS) e também ao aumento da ingestão alimentar. Contudo, os tratamentos com INS e INS+GDP, e também com GDP, acentuaram ou não tiveram efeitos em outras anormalidades induzidas pelo tumor Walker-256.

Palavras-chave: Câncer. Alterações metabólicas. Resistência à insulina. Citocinas.

MORAIS, Hely de. **Role of Insulin and Glutamine peptide in cachexia and in metabolic changes induced by tumor Walker-256**. 2016. 84 p. Thesis (Doctoral degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Cachexia is a multifactorial syndrome characterized by the predominance of catabolism, with severe loss of muscle and fat mass, anorexia, changes in the immune system and metabolism of carbohydrates, proteins and lipids. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of isolated and combined treatments of insulin (INS) and glutamine dipeptide (GDP) in cachexia and in several metabolic changes in rats with Walker-256 tumor. INS (NPH 40 U/kg, sc) and GDP (1,5 g/kg, oral) were administered for 11 days, once a day, from the day of tumor cell inoculation. Treatments with GDP, INS or INS+GDP did not affect tumor growth. However, treatments with INS and INS+GDP, in a similar manner, prevented anorexia, weight loss of the retroperitoneal adipose tissue and body weight loss (60%) of tumor-bearing rats. Treatments with INS and INS+GDP also, similarly, completely prevented the reduction of phosphorylation of Akt, as shown by the high ratio p-Akt:total Akt, and reducing the content of triacylglycerol lipase (ATGL) and hormone sensitive lipase (HSL), altered in the retroperitoneal adipose tissue, and reduced hyperlactatemia of tumor-bearing rats. However, treatments with INS and INS+GDP accentuated, similarly, hypoglycemia, hypertriacylglycerolemia and the mass loss of gastrocnemius, long digital extensor and soleus muscles but does not affect the hyperuremia, resistance to INS, the increased content of tumor necrosis factor- α in the retroperitoneal adipose tissue and liver and not reduction hepatic glycolysis, from exogenous glucose, in the tumor-bearing rats. The treatment with GDP accentuated the hyperlactatemia, anorexia and loss of body mass and increased mRNA expression of GLUT-4 glucose transporter in the gastrocnemius muscle of tumor-bearing rats and had no effect on other parameters. It can be concluded that the treatments with INS (groups INS and INS+GDP), but not with GDP, reduced some metabolic abnormalities present in rats bearing Walker-256 tumors, such as body and fat mass loss, without reducing tumor growth. These effects can be attributed to the increase in INS induced phosphorylation of Akt and the consequent reduction of the lipases content (ATGL and HSL) and also to increased food intake. However, treatments with INS and INS+GDP, and also with GDP, accentuate or had no effect on other abnormalities induced by Walker-256 tumor.

Keywords: Cancer. Metabolic disorders. Insulin resistance. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....37
- Figura 2. Insulinemia (ng/mL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....38
- Figura 3. Concentrações plasmáticas de glicose, lactato, ureia e triacilglicerol de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....39
- Figura 4. Alteração de massa corporal, ingestão alimentar e massa do tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias40
- Figura 5. Conteúdo de TNF- α e IL6 no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....41
- Figura 6. Conteúdo de perilipina total, lipase de triacilglicerol (ATGL) e lipase hormônio sensível (LHS) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias42
- Figura 7. Massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....43
- Figura 8. Conteúdo de miostatina no músculo gastrocnêmio e concentração de corticosterona no plasma e nas fezes de ratos saudáveis e

portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias	44
Figura 9. Insulinemia (ng/mL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	47
Figura 10. Glicemia (mg/dL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker- 256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	48
Figura 11. Constante de decaimento da glicose (kITT) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias	49
Figura 12. Conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal, músculo gastrocnêmio e fígado de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	50
Figura 13. Conteúdo de Akt total Akt fosforilada (p-Akt) e relação p-Akt:Akt total no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias	51
Figura 14. Conteúdo de Akt total Akt fosforilada (p-Akt) e relação p-Akt:Akt total no músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias	52
Figura 15. Conteúdo de GLUT-4 total, GLUT-4 na membrana plasmática e expressão de RNAm do GLUT-4 no músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com	

glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	53
Figura 16. Conteúdo de Akt total Akt fosforilada (p-Akt) e relação p-Akt:Akt total no fígado de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS) ou insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	54
Figura 17. Glicólise e área sob a curva (AUC) da glicólise no fígado de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância unidimensional
ATGL	Lipase de triacilgliceróis
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
bax	Bcl-2 associated protein X
bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDL	Extensor digital longo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDP	Glutamina dipeptídeo L-alanil-L-glutamina
GLUT-4	Transportador de glicose-4
HSL	Lipase hormônio-sensível
IKK β	I κ B quinase subunit β
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
INS	Insulina
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	C-jun N-terminal quinase
KHB	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
KITT	Constante de decaimento da glicose no plasma
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipoproteína lípase
LHS	Lipase hormônio sensível
MCA	Methylcholanthrene-induced sarcoma
NF- κ B	Fator nuclear kappa B

NPH	Neutral protamine hagedorn
p-Akt	Proteína quinase B fosforilada
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	Salina tamponada com fosfato e Tween-20
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Streptavidina-Ficoeritrina
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIC	Proteína envolvida na colonização intestinal
PIF	Fator indutor de proteólise
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tris	Trisaminometano
U	Unidade
UA	Unidade arbitrária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	23
2.1	GERAIS	23
2.2	ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Químicos	25
3.2	Animais	25
3.3	Implantação do tumor Walker-256	25
3.4	Tratamentos	26
3.5	Avaliação do crescimento tumoral e de parâmetros plasmáticos e de caquexia-anorexia	27
3.6	Teste de tolerância à INS para avaliação da resposta periférica à INS	28
3.7	Western blotting para avaliação do conteúdo de Akt total, p-Akt, GLUT-4, TNF-α, IL-6, LPS, perilipina, ATGL e miostatina	29
3.8	PCR em tempo real para avaliação da expressão de RNAm para o GLUT-4	30
3.9	Perfusão de fígado <i>in situ</i> para avaliação da glicólise	31
3.10	Procedimentos analíticos	31
3.10.1	Determinação da concentração de INS	31
3.10.2	<i>Determinação da concentração de corticosterona</i>	32
3.10.3	<i>Determinação de outros parâmetros bioquímicos</i>	32
3.11	Procedimentos estatísticos	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Efeitos dos tratamentos com INS e/ou GDP sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia e parâmetros metabólicos relacionados (ARTIGO 1)	35

4.2	Efeitos dos tratamentos com INS e/ou GDP sobre a resposta periférica a INS, proteínas da via de sinalização da INS e parâmetros metabólicos relacionados (ARTIGO 2)	45
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A incidência mundial de neoplasias vem crescendo ao longo dos anos e aproximadamente 40% das mortes ocorridas em pacientes portadores de câncer são atribuídas à caquexia (TISDALE, 2010). A caquexia é uma das manifestações mais comuns do avanço maligno das neoplasias (ARGILÉS *et al.*, 2003), estando presente em aproximadamente 80% dos pacientes com câncer (ALBRECHT & CANADA, 1996).

A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada por perda progressiva de peso corpóreo decorrente do predomínio do catabolismo, com acentuada perda de massa muscular e adiposa, (TISDALE, 2005; BENNANNI-BAITI & WALSH, 2009; FEARON *et al.*, 2011) e por várias outras anormalidades incluindo anorexia, anemia, alterações no sistema imune e no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (ARGILÉS *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2005; TISDALE, 2010; ARGILÉS *et al.*, 2014).

A caquexia associada ao câncer é resultante de complexas interações entre o tumor e seu hospedeiro (SKIPWORTH *et al.*, 2007). Fatores produzidos pelas células neoplásicas e pelo tecido do hospedeiro, em resposta a presença do tumor, desempenham papel importante no desenvolvimento da caquexia e nas alterações metabólicas observadas nesta síndrome, e são denominados de mediadores da caquexia (TISDALE, 2005; FEARON *et al.*, 2012).

Dentre os mediadores da caquexia produzidos pelo tumor encontram-se: o fator mobilizador de lipídeos (LMF), que degrada diretamente o tecido adiposo; o fator indutor de proteólise (PIF), que induz proteólise no músculo esquelético, pela ativação do sistema ubiquitina-proteossoma dependente de ATP, e reduz a síntese protéica muscular (GORDON *et al.*, 2005; TISDALE, 2010) e os toxohormônios, que são polipeptídeos inibidores da síntese protéica (RUBIN, 2003).

Outras moléculas consideradas mediadores da caquexia, produzidas pelo tumor ou liberadas por células do sistema imune do hospedeiro em resposta à presença do tumor, são as citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (MANTOVANI *et al.*, 2000; ARGILES *et al.*, 2014). O $TNF\alpha$ parece ser a principal citocina mediadora do processo caquético, embora sua atividade possa estar associada a outras citocinas como a IL-6 (VOORZANGER *et al.*, 1996; ALVAREZ *et al.*, 2002; FEARON *et al.*, 2012). A administração isolada ou combinada de $TNF\alpha$, IL-6 e IL-1 reduziu a ingestão alimentar e aumentou a perda de peso corpóreo, reproduzindo a síndrome anorexia-caquexia

observada no câncer (GELIN *et al.*, 1991; MOLDAWER *et al.*, 1992; NOGUCHI *et al.*, 1996; MATTHYS & BILLIAU, 1997; TISDALE, 1997; INUI, 1999, 2002). O TNF- α , a IL-6 e IL-1 α são capazes de inibir a lipase de lipoproteína endotelial (LPL) (BERG *et al.*, 1994), enzima que degrada os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, e a adipogênese pelos adipócitos, e de ativar a lipase hormônio sensível (LHS), estimulando a lipólise nos adipócitos (ARNER, 1995), o que resulta no aumento da concentração de triacilgliceróis e ácidos graxos na circulação (ROFE *et al.*, 1994; TISDALE, 1999). Tem sido sugerido que estas citocinas também podem estar associadas à proteólise e apoptose no músculo esquelético (KOTLER, 2000; TISDALE, 2003; ARGILÉS *et al.*, 2005). A administração de TNF- α aumentou a expressão gênica (via fator de transcrição NF- κ B) e a concentração de ubiquitina em músculo esquelético de ratos, estimulando a degradação proteica pela via ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (HASSELGREN *et al.*, 2002; ARGILÉS *et al.*, 2003; SAINI *et al.*, 2006).

Além dos mediadores da caquexia, outros fatores também podem contribuir para as alterações metabólicas e desenvolvimento da caquexia do câncer, como a atividade metabólica do próprio tumor, drenando nutrientes da corrente sanguínea do hospedeiro (TISDALE, 2001), e também a resistência à insulina (INS) e a hipoinsulinemia (LUNDHOLM *et al.*, 1978; COPELAND *et al.*, 1987; TAYEK, 1992; ROFE *et al.*, 1994; ASP, 2010; MIKSZA *et al.*, 2013).

Estudos têm relacionado o desenvolvimento de resistência à INS à citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, liberadas pelo sistema imune em resposta ao câncer (NOGUCHI *et al.*, 1998), as quais diminuem a sinalização da INS (WARNE, 2003; CAPURSO & CAPURSO, 2012). O TNF- α interfere negativamente na sinalização da INS por inibir a fosforilação do receptor de INS (IR) e do substrato do receptor de INS (IRS-1) (KANETY *et al.*, 1995; WARNE, 2003), diminuindo a translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a membrana celular (YOSHIKAWA *et al.*, 1999). A IL-6 diminui a sensibilidade muscular à INS por reduzir a associação do IRS-1 com a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), diminuindo o transporte de glicose estimulado pela INS para o músculo (KIM *et al.*, 2004).

O aumento de ácidos graxos livres circulantes, resultante do intenso catabolismo observado na caquexia, também pode prejudicar a atuação da INS. O acúmulo intracelular de intermediários do metabolismo dos ácidos graxos (acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas) e, conseqüentemente, de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuem

a fosforilação em resíduos de tirosina do IR e IRS-1 interferindo negativamente na cascata de sinalização da INS (SHULMAN, 2000; BODEN, 2002; SCHINNER *et al.*, 2005; PETERSEN & SHULMAN, 2006; DELARUE & MAGNAN, 2007).

Em conjunto, os mediadores da caquexia, e possivelmente a resistência insulínica e a hipoinsulinemia, promovem aumento acentuado do catabolismo e reduzem o anabolismo em vários tecidos, contribuindo para a progressão da caquexia do câncer.

No sentido de reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com câncer, algumas terapias têm sido propostas para amenizar a caquexia e dentre elas está o tratamento hormonal com INS (MOLEY *et al.*, 1985, 1988; FERNANDES *et al.*, 1991; COSTELLI *et al.*, 1999; LUNDHOLM *et al.*, 2007; CHEN & QIU, 2011).

A INS é um hormônio com efeitos anabólicos e anti-catabólicos potentes, que regula o armazenamento de substratos energéticos como a glicose, ácidos graxos e aminoácidos, (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). O tratamento com INS reverteu a anorexia e preservou o peso corpóreo em ratos portadores de tumor MCA (3-metilcolantreno), evidenciando um efeito anti-caquético da INS (MOLEY *et al.*, 1985). O tratamento com INS também melhorou a ingestão alimentar, diminuiu a perda de peso e recuperou o conteúdo de glicogênio hepático em ratos portadores de tumor Walker-256, mas não recuperou o conteúdo de glicogênio muscular (FERNANDES *et al.*, 1991). Neste estudo, o tratamento com INS também reduziu o peso do tumor, com presença de extensas áreas de necrose no tecido tumoral (FERNANDES *et al.*, 1991).

Além da INS, a suplementação com glutamina também parece estar relacionada com a melhora nos quadros de caquexia. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma, músculo e em alguns tecidos (BERGSTROM *et al.*, 1974; NEWSHOLME *et al.*, 2003). É classificada como aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada pelo organismo, principalmente pelo músculo esquelético (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Contudo, recebe também a classificação de aminoácido condicionalmente essencial, pois, em situações de grande estresse, como no câncer, onde ocorre aumento da demanda fisiológica de glutamina e diminuição da capacidade do organismo em suprir essa demanda, observa-se uma redução significativa da sua concentração no plasma e nos tecidos (MEDINA, 2001; GRIFFITHS, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; FUCHS & BODE, 2006). Quando esta condição permanece, mecanismos de

proteólise são ativados, reduzindo o estoque de proteínas, estabelecendo-se então o quadro caquético.

A glutamina é de extrema importância para o metabolismo celular, pois está envolvida em diversos processos fisiológicos como na transferência de nitrogênio entre órgãos (BIOLO *et al.*, 2005), no fornecimento de energia para as células de proliferação rápida, como enterócitos e células do sistema imune (BERGSTROM *et al.*, 1974; NEWSHOLME *et al.*, 1999; FÜRST, *et al.*, 2004; BIOLO *et al.*, 2005), como precursor de nitrogênio para síntese de DNA e RNA, como precursor neoglicogênico (START & NEWSHOLME, 1970; LAVOINNE *et al.*, 1996; CURI *et al.*, 2005) e como precursor da síntese de glutathione, importante enzima antioxidante que protege as células do estresse oxidativo (ROTH *et al.*; 2002; FÜRST, *et al.*; 2004).

A suplementação parenteral com glutamina ou glutamina dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) em pacientes com doenças crônicas ou múltiplos traumas tem resultado em melhora da sensibilidade à INS (DECHELOTTE *et al.*, 2006; BAKALAR *et al.*, 2006) e aumento da secreção de INS pelas células β (BRENNAN *et al.*, 2003).

A glutamina parece desempenhar papel permissivo nas células β pancreáticas, reforçando a secreção de INS estimulada por glicose. Nestas células o metabolismo da glutamina resulta na geração de glutamato e glutathione, o que indiretamente estimula a produção de ATP e aumenta a secreção de INS (BRENNAN *et al.*, 2003). A glutamina também regula a expressão de genes envolvidos na secreção de INS, incluindo canais iônicos e enzimas (CURI *et al.*, 2005).

Em modelos de obesidade induzida por dieta rica em gordura, em ratos, a suplementação da dieta com glutamina melhorou a sensibilidade à INS no músculo esquelético e fígado, mas não no tecido adiposo (PRADA *et al.*, 2007). Este resultado foi dependente da prévia inativação de enzimas envolvidas com a resistência à INS, tais como, IKK β (*I κ B kinase subunit β*) e JNK (*c-jun N-terminal kinase*). A glutamina também preveniu o aumento de TNF- α e IL-6 no pulmão, sugerindo efeito anti-inflamatório da glutamina, o qual pode estar relacionado com a melhora da sensibilidade à INS (HUANG *et al.*, 2003; SINGLETON *et al.*, 2005).

A suplementação com glutamina também parece ser benéfica em portadores de tumor, embora esse efeito pareça ser controverso, visto que a glutamina é altamente utilizada como fonte energética para células de proliferação rápida, como as células tumorais. Segundo Roth e colaboradores (2002), a suplementação com glutamina em pacientes com câncer pode aumentar a atividade do sistema imunológico, mas

ocasionar aumento da proliferação de células tumorais. Contudo, em estudo utilizando ratos portadores de hepatoma ascítico AH109A, a suplementação com glutamina parenteral aumentou o balanço nitrogenado e evitou a perda de peso excessiva sem proporcionar estímulo para o crescimento tumoral (KAIBARA, *et.al.*; 1994). Adicionalmente, em estudos utilizando ratos inoculados com células do adenocarcinoma de câncer de mama MTF-7, a suplementação com glutamina reduziu em 40% o volume do tumor e evitou o aparecimento de metástases, o que foi correlacionado com aumento na concentração plasmática de glutathione, redução concentração plasmática de prostaglandina E2 (PGE2) e aumento na atividade das células do sistema imune (KLIMBERG *et al.*,1996). Foi também observado que a dieta rica em glutamina, reduziu a concentração de glutathione e a expressão de bcl-2 (proteína anti-apoptótica), assim como aumentou a expressão de bax (proteína pró-apoptótica) e caspase 3 nas células tumorais. Juntos estes efeitos parecem diminuir o tamanho do tumor dos animais portadores de câncer, o que pode estar associado à indução de apoptose nessas células (TODOROVA *et al.*, 2004).

Tanto a melhora na sensibilidade a INS quanto a redução do crescimento tumoral parecem estar relacionadas com a atuação da glutamina no sistema imunológico. A glutamina é um dos principais combustíveis para as células do sistema imune e sua redução pode levar a imunossupressão (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990, NEWSHOLME *et al.*, 1999).

O tumor Walker-256, um tumor maligno de ratos equivalente aos carcinossarcomas que ocorrem em humanos, é um bom modelo experimental para estudar a síndrome da caquexia do câncer (GUAITANI *et al.*, 1982; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2010), pois apresenta crescimento rápido, induz forte estado caquético (VICENTINO *et al.*, 2002) e raramente apresenta regressões (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Estudos do nosso laboratório mostraram que animais portadores de tumor Walker-256 apresentam, além dos sinais característicos da síndrome da caquexia (anorexia, perda de massa corpórea, muscular e adiposa), uma série de alterações metabólicas, incluindo: redução da glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático; aumento dos triacilgliceróis, ácidos graxos livres, lactato e uréia plasmáticos; redução da glicólise, neoglicogênese e resposta ao AMPc no fígado e resistência a INS (CASSOLLA *et al.*, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013; MIKSZA *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2015a; DE SOUZA *et al.*, 2015b). Ratos portadores de tumor Walker-256 também apresentam redução na secreção de INS estimulada por

glicose pelas células β pancreáticas, justificando a hipoinsulinemia observada nestes animais (FERNANDES *et al.*, 1990; LIMIERE, 2009), a qual não é decorrente da menor ingestão alimentar e nem da redução na glicemia destes animais (FERNANDES *et al.*, 1990; LIMIERE, 2009). Estes resultados indicam que a presença do tumor promove alterações nas ilhotas pancreáticas que reduzem a resposta ao estímulo da glicose. A menor secreção de INS e a redução da sensibilidade periférica a este hormônio (FERNANDES *et al.*, 1991; MIKSZA *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2015a) favorecem o consumo de glicose pelo tumor.

Considerando que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam hipoinsulinemia (FERNANDES *et al.*, 1991) e resistência a INS (MIKSZA *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2015a), as quais podem contribuir para as desordens metabólicas e caquexia nestes animais, e tendo em vista que a glutamina parece melhorar a sensibilidade à INS e a secreção de INS, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos isolados e combinados dos tratamentos com INS e GDP em vários parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Investigar os efeitos dos tratamentos isolado e combinado de INS e GDP sobre o crescimento tumoral, caquexia-anorexia e várias desordens metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos portadores de tumor Walker-256 os efeitos dos tratamentos isolado e combinado de INS e GDP sobre:

- Crescimento tumoral;
- Ingestão alimentar;
- Parâmetros de caquexia: massa corpórea, muscular e adiposa;
- Parâmetros plasmáticos: INS, glicose, lactato, uréia, triacilgliceróis e corticosterona;
- Parâmetros das fezes: corticosterona;
- Parâmetros teciduais: TNF- α , IL-6, miostatina, lipase hormônio sensível (LHS), perilipina total, lipase de triacilgliceróis (ATGL), transportador de glicose GLUT-4 e RNA mensageiro do GLUT-4;
- Resposta periférica à INS;
- Proteínas da via de sinalização da INS: Akt total e Akt fosforilada (p-Akt);
- Glicólise hepática.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Químicos

A INS NPH (Humulin®) e a INS regular (Humalog®) foram adquiridas da Eli Lilly do Brasil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (GDP) foi adquirido da Ajinomoto Interamericana Ltda (São Paulo, Brasil). Os kits enzimáticos para dosagens de glicose, triacilglicerol e ureia foram provenientes da Laborclin (Pinhais/PR, Brasil). O kit *MILLIPLEX™* usado para dosar corticosterona foi adquirido da Merck Millipore. Os anticorpos primários foram adquiridos da *Cell Signaling Technology®* (Danvers, USA), os anticorpos secundários da Jackson ImunoResearch Laboratories, Inc (West Grove, USA), os inibidores de proteases da AMRESCO® LLC (Solon, USA), a membrana de nitrocelulose da Perkin Elmer, a transcriptase reversa e o Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), a INS marcada com iodo (¹²⁵I) da Genese, e os demais reagentes da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Merck & Co. (Darmstadt, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) ou Laborclin (Pinhais/PR, Brasil).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 220-230 g, com livre acesso à água e alimentados à vontade com dieta padrão de laboratório (Nuvilab CR-1 Nuvital®, Colombo, Brasil). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas, a uma temperatura de 23±2 °C e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas. Os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), sob nº de registro 07987.

3.3 Implantação do tumor Walker-256

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de crescimento rápido e sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia (GUAITANI *et al.*, 1982). O tumor Walker-256 tem sido utilizado como modelo de indução de caquexia em ratos, pois em um curto espaço de tempo após sua implantação verifica-se redução no peso do animal, anorexia e acentuado catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Após 14 dias de implantação do

tumor, a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre próxima ao 14º dia (VICENTINO *et al.*, 2002).

As células do tumor Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0 \times 10^6$ células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais, anestesiados com éter etílico, foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial a 4 °C para obtenção das células tumorais. As células foram ressuspensas em tampão salina fosfato (PBS: fosfato 16,5 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4) e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer. Os ratos portadores de tumor foram inoculados com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Ratos saudáveis receberam PBS no mesmo local.

3.4 Tratamentos

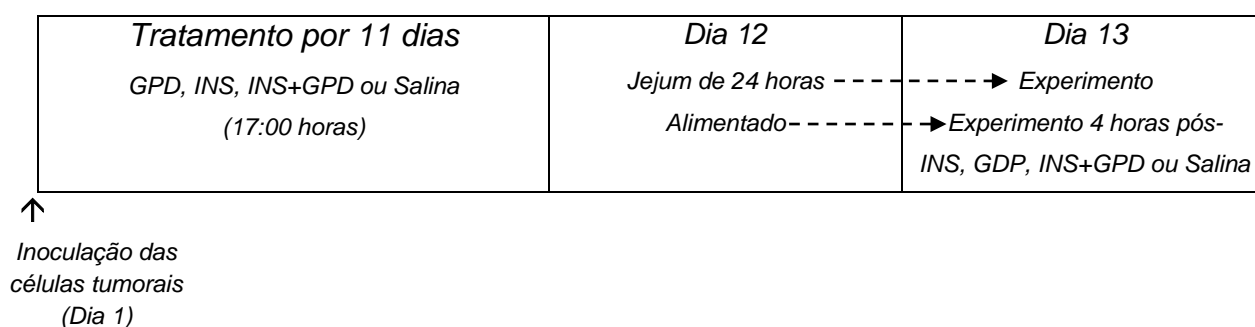
Como mostra o esquema adiante, ratos portadores de tumor Walker-256 foram tratados com GDP (1,5 g/Kg, oral), INS (NPH, 40 U/Kg, sc) ou com a associação INS+GDP, durante 11 dias, uma vez ao dia (17:00 horas), a partir do dia da inoculação das células tumorais. As doses de GDP (CRUZAT & TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT *et al.*, 2010) e INS (FERNANDES *et al.*, 1996) utilizadas no presente estudo foram baseadas em estudos prévios. Ratos controle (portadores de tumor e saudáveis) foram tratados com veículo, ou seja, água no lugar da GDP e salina no lugar da INS.

Com relação ao uso oral de glutamina vale ressaltar que a glutamina dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina, GDP) é mais favorável que a glutamina livre, pois não sofre ação de hidrolases presentes na borda em escova dos enterócitos, evitando sua decomposição e conseqüentemente sua utilização pelos enterócitos, aumentando a biodisponibilidade de glutamina no sangue e tecidos (SOUBA, 1993; MASSAMBI & BAZOTTE, 1998; NEWSHOLME *et al.*, 2003). Outro ponto favorável é que a GDP apresenta melhor solubilidade em água e estabilidade durante a preparação, estocagem, esterilização e administração (FÜRST *et al.*, 1997).

No dia 12, parte dos ratos foi submetida a 24 horas de privação alimentar e parte permaneceu no estado alimentado. O jejum de 24 horas foi feito para prevenir a influência da anorexia e do menor conteúdo de glicogênio hepático, presente nos ratos portadores de tumor (CASSOLLA *et al.*, 2012), em alguns parâmetros metabólicos.

Para evitar a ocorrência de hipoglicemia acentuada nos ratos com 24 horas de jejum, induzida pela administração de INS, e morte dos animais, nenhum tratamento foi

feito no dia 12, dia que antecedeu a realização dos experimentos (dia 13). Este procedimento, além de prevenir a hipoglicemia acentuada, permitiu avaliar os efeitos crônicos da INS e GDP, excluindo os efeitos de curto prazo (agudos) destes fármacos. Para visualizar os efeitos de curto prazo da INS e GDP, principalmente nas proteínas da via de sinalização da INS, ratos alimentados tratados com INS e/ou GDP por 11 dias receberam também estes fármacos 4 horas antes da realização dos experimentos (dia 13), como esquematizado adiante. Ratos controle (portadores de tumor e saudáveis) receberam veículo, ou seja, água no lugar da GDP e salina no lugar da INS.



3.5 Avaliação do crescimento tumoral e de parâmetros plasmáticos e de caquexia-anorexia

No 10º dia após a inoculação das células tumorais ou PBS (grupo saudável), os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, contendo 40 g de ração e água à vontade, para a avaliação da ingestão alimentar. Após 24 horas, 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* (g%)= ingestão alimentar em gramas por cento; *ia*= ingestão alimentar em gramas; *mc*= massa corpórea do animal em gramas; *mt*= massa do tumor em gramas.

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

No dia 12, parte dos ratos foi submetida à privação alimentar e no dia 13 os ratos, com 24 horas de jejum, foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) e laparotomizados para coleta de amostras de sangue da veia cava inferior para avaliação das concentrações plasmáticas de INS, glicose, lactato, ureia e triacilglicerol.

Posteriormente, o tecido adiposo retroperitoneal e os músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor digital longo (EDL) também foram 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 (g%)= massa do tecido em gramas por cento; m = massa do tecido em gramas; mcf = massa corpórea final do animal em gramas; mt = massa do tumor em gramas.

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

O tecido adiposo retroperitoneal e o músculo gastrocnêmio foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para análise do conteúdo de LHS, perilipina, ATGL, TNF- α e IL-6 no tecido adiposo e de miostatina e TNF- α no músculo. O fígado também foi retirado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análise do conteúdo de TNF- α , Akt total e Akt fosforilada (p-Akt).

Finalmente, o tumor foi dissecado e pesado para avaliação do crescimento tumoral (g) e determinação da alteração da massa corporal de acordo com a equação a seguir, onde: mci = massa corpórea inicial em gramas, mcf =massa corpórea final em gramas, mt = massa do tumor em gramas.

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

Amostras de sangue, tecido adiposo retroperitoneal e músculo gastrocnêmio, de ratos alimentados, que receberam os tratamentos (INS, GDP, INS+GPD ou salina) 4 horas antes da realização dos experimentos (dia 13), também foram coletadas, armazenadas pelos procedimentos descritos anteriormente, e usadas para análise das concentrações de corticosterona, INS e glicose plasmáticas e do conteúdo de TNF- α , Akt total e p-Akt no tecido adiposo e de GLUT-4, TNF- α , Akt total, p-Akt, GLUT-4 e RNA mensageiro (RNAm) do GLUT-4 no músculo. Amostras de fezes de ratos alimentados que receberam os tratamentos (INS, GDP, INS+GPD ou salina) também foram coletadas durante 24 horas. A coleta se iniciou 4 horas depois do último tratamento e as fezes foram armazenadas em freezer e usadas para análise das concentrações de corticosterona.

3.6 Teste de tolerância à INS para avaliação da resposta periférica à INS

A resposta glicêmica para INS foi avaliada por meio do teste de tolerância a INS (ITT) em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar. Para tanto, INS regular

(0,25 U/kg) foi administrada endovenosamente (veia cava inferior) nos ratos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg). Amostras de sangue (0,2 mL) foram coletadas da veia cava inferior no tempo 0 (basal - antes da injeção de INS) e nos tempos 5, 10, 15 e 30 minutos após a injeção de INS para avaliação da glicemia.

A constante de decaimento da glicose no plasma (kITT), um indicador da resposta periférica à INS, foi calculada a partir da regressão linear dos valores de glicemia obtidos no ITT, durante o tempo 5 até 15 minutos após a administração de INS, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA *et al.*, 1989; SERAPHIM *et al.*, 2001). A interpretação da kITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicemia, maior o valor da kITT, e portanto, maior é a resposta a INS.

3.7 Western blotting para avaliação do conteúdo de Akt total, p-Akt, GLUT-4, TNF- α , IL-6, LHS, perilipina, ATGL e miostatina

O conteúdo destas proteínas foi avaliado pela técnica de *Western blotting* (TOWBIN *et al.*, 1979; BURNETTE, 1981; GOULART-SILVA *et al.*, 2012). Para tanto, os tecidos (músculo gastrocnêmio, tecido adiposo retroperitoneal e fígado), armazenados a -80 °C, 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 (13362 g, 40 minutos, 4 °C), o precipitado foi desprezado e as proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para quantificação de GLUT-4 na membrana plasmática, parte do homogenato foi centrifugada a 760 g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi submetido à nova centrifugação (31.000 g, 1 hora, 4 °C) e o precipitado gerado na segunda centrifugação corresponde a fração rica em proteínas da membrana plasmática. Proteínas desta fração foram também quantificadas pelo método de Bradford.

Quantidades iguais de proteínas totais ou da fração enriquecida com membrana plasmática foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, submetidas à eletroforese (100 V) e à eletro-transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (2 ciclos de 50 minutos a 80 V). A membrana de nitrocelulose foi corada com ponceau, para detecção reversível rápida das bandas de proteínas durante o *western blotting*, e foi digitalizada para posterior normalização dos *blots*. Em seguida, a membrana foi

lavada com PBST (tampão salina fosfato com 0.1% de Tween-20) por 5 minutos para remover o excesso do corante, submetida ao bloqueio com 5% de leite em pó desnatado por 1 hora, 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-GLUT-4 (1:1000), anti-TNF- α (1:1000), anti-IL-6 (1:1000), anti-LHS (1:1000), anti-perilipina (1:1000), anti-ATGL (1:1000) ou anti-miostatina (1:2000), *overnight* à 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST por quatro vezes, de 5 minutos cada, e incubada com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase (1:5000) por 75 minutos a temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com PBST por 5 minutos 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 por exposição em filmes de raios-X e analisados usando o programa Image J (National Institutes of Health, USA). A densidade dos *blots* foi expressa em unidades arbitrárias.

Os valores de GLUT-4 total, GLUT-4 na membrana plasmática, Akt total, p-Akt, TNF- α , IL-6, LHS, ATGL, miostatina e perilipina foram normalizados pela própria membrana corada com ponceau (ROMERO-CALVO *et al.*, 2010), e não por uma proteína constitutiva específica, devido a possibilidade de sua variação neste modelo experimental de caquexia do câncer.

3.8 PCR em tempo real para avaliação da expressão de RNAm para o GLUT-4

O RNA total do músculo gastrocnêmio dos ratos foi extraído utilizando o método de extração com guanidina-fenol-clorofórmio, como descrito previamente (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Após a análise da integridade do RNA, 1 μ L de RNA total foi transcrito de forma reversa com 200 ng de iniciadores aleatórios (*primers*), 0,1 mM de dNTP, 0,1 mM de tampão *5X First-Strand* e 1 μ L de transcriptase reversa M-MLV (200 U/ μ L) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A expressão de GLUT-4 e da proteína ribossomal 18S foram avaliados em duplicata através da análise de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real usando *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Alterações relativas na expressão do RNAm de GLUT-4 foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a expressão do RNAr de 18S foi usada como controle interno de carga (LIVAK *et al.*, 2001).

3.9 Perfusão de fígado in situ para avaliação da glicólise

A perfusão de fígado foi realizada como previamente descrito (DE MORAIS *et al.*, 2012; DA ROCHA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2015b; BASSOLI *et al.*, 2015).

Para a perfusão, ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg), fixados em mesa cirúrgica e o abdômen foi aberto até a altura do diafragma, por uma incisão longitudinal central, para exposição do fígado. O líquido de perfusão, tampão Krebs-Henseleit-bicarbonato (KHB: 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, 37 °C e saturado de O₂:CO₂ (95:5%) foi introduzido na veia porta por meio de uma cânula. Imediatamente após, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para dessangramento deste órgão. Em seguida, o tórax foi aberto e a veia cava inferior, na região torácica, foi ocluída para desviar o líquido de perfusão para a veia cava inferior infra-hepática, a qual foi canulada. Depois disso, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (aproximadamente 4 mL.min⁻¹.g⁻¹ de fígado).

A perfusão do fígado, depois de um período de 20 minutos para estabilização do consumo de oxigênio, foi do seguinte modo: 10 minutos com KHB e dos 10 aos 40 minutos com KHB contendo glicose (20 mM). Durante a perfusão, o líquido de perfusão efluente do fígado (perfusado) foi coletado da veia cava inferior, em intervalos de 2 minutos, para determinação da concentração de lactato e piruvato. Ao final do experimento o fígado foi retirado e pesado para que as produções de lactato e piruvato por grama de fígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) fossem quantificadas e utilizadas para calcular a taxa de glicólise. A glicólise foi calculada como a soma da produção hepática de piruvato + L-lactato liberados no perfusado.

3.10 Procedimentos analíticos

3.10.1 Determinação da concentração de INS

A concentração plasmática de INS foi avaliada por radioimunoensaio (YALOW & BERSON, 1960), por meio de quantidades conhecidas de anticorpo e do hormônio marcado radioativamente (INS marcada com ¹²⁵I) e uma quantidade desconhecida de hormônio não radioativo (amostra de soro). As duas formas do hormônio, radioativo e não radioativo, competem por um mesmo número de locais de ligação ao anticorpo. O complexo INS-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol (PM

6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo foi plotada como função da concentração do hormônio não radioativo. A curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio presente em cada amostra.

3.10.2 Determinação da concentração de corticosterona

A concentração plasmática e fecal de corticosterona foi avaliada por imunoenensaio, utilizando kit *MILLIPLEX™*, através da tecnologia Luminex™ xMAP (Perfil de Múltiplos Analitos), que consiste na detecção simultânea de múltiplos analitos em um único poço de reação em microplacas de titulação utilizando pequenas quantidades de amostras (10-50 µL). A tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex. O kit *MILLIPLEX™* foi desenvolvido com estas microesferas e se fundamenta no imunoenensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200™ movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

3.10.3 Determinação de outros parâmetros bioquímicos

As concentrações de glicose (BERGMEYER & BERNT, 1974), lactato (GUTMANN & WAHLEFELD, 1974), piruvato (CZOK & LAMPRECHT, 1974), ureia (GUTMANN & BERGMEYER, 1974) e triacilglicerol (TRINDER, 1969) no plasma e/ou perfusado foram quantificadas por métodos enzimáticos.

3.11 Procedimentos estatísticos

A distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors) e a homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe) foram analisadas e testes estatísticos apropriados, indicados nas legendas das figuras, foram empregados para análise dos resultados. As análises foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 7 e GRAPHPAD PRISM 5. 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 dos tratamentos com INS e/ou GDP sobre a massa tumoral, parâmetros de caquexia-anorexia e parâmetros metabólicos relacionados (ARTIGO 1).

Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram, no dia 13 de desenvolvimento tumoral, massa tumoral próxima a 30 g e os tratamentos com GDP, INS ou com a associação INS+GDP não alteraram significativamente o crescimento do tumor, em comparação aos ratos tratados com veículo (Figura 1).

A insulinemia dos ratos portadores de tumor em jejum de 24 horas foi aproximadamente 50% menor que a dos ratos saudáveis e nenhum dos tratamentos preveniu a hipoinsulinemia destes animais (Figura 2).

Ratos portadores de tumor apresentaram redução da glicemia (Figura 3A) e aumento das concentrações plasmáticas lactato (Figura 3B), ureia (Figura 3C) e triacilglicerol (Figura 3D) em comparação aos saudáveis. O tratamento com GDP não alterou a glicemia (Figura 3A), uremia (Figura 3C) e triacilglicerolemia (Figura 3D), mas elevou a lactatemia (Figura 3B) dos ratos com tumor. Já o tratamento com INS acentuou a redução da glicemia (Figura 3A) e os tratamentos com INS e INS+GDP reduziram a lactatemia (Figura 3B), não alteraram as concentrações de ureia (Figura 3C) e aumentaram as concentrações de triacilglicerol (Figura 3D) no sangue dos ratos com tumor.

Ratos portadores de tumor perderam cerca de 10 g de massa corporal ao longo de 13 dias, enquanto ratos saudáveis ganharam aproximadamente 40 g, neste mesmo período (Figura 4A). Os ratos com tumor também apresentaram redução da ingestão alimentar (Figura 4B) e perda de massa adiposa retroperitoneal (Figura 4C) em relação aos saudáveis. O tratamento com GDP acentuou a perda de massa corpórea e a anorexia dos ratos com tumor. Contudo, os tratamentos com INS e INS+GDP recuperaram a massa corporal em aproximadamente 60% (Figura 4A), aumentaram a ingestão alimentar (Figura 4B) e impediram a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 4C) dos ratos com tumor, em comparação aos ratos com tumor tratados com veículo. A ingestão alimentar e a massa adiposa retroperitoneal dos ratos com tumor tratados com INS foi maior que a dos ratos saudáveis (Figuras 4B e 4C).

O conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos portadores de

tumor foi maior que dos ratos saudáveis e nenhum dos tratamentos foi capaz de prevenir esta alteração (Figura 5A). Já em relação a IL6, seu conteúdo no tecido adiposo retroperitoneal tendeu, mas não foi significativamente maior no grupo tumor e não foi alterado pelos tratamentos (Figura 5B).

Houve aumento do conteúdo de perilipina total (Figura 6A), ATGL (Figura 6B) e LHS (Figura 6C) no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos portadores de tumor em relação aos saudáveis. O tratamento com GDP não impediu a alteração destes parâmetros (Figuras 6A, 6B, 6C). Contudo, ratos portadores de tumor tratados com INS apresentaram conteúdo de perilipina total (grupos INS e INS+GDP - Figura 6A) e ATGL (grupo INS+GDP - Figura 6B) similar ao dos ratos saudáveis. Além disso, os tratamentos com INS preveniram o aumento de ATGL (grupo INS - Figura 6B) e LHS (grupos INS e INS+GDP - Figura 6C) dos ratos portadores de tumor.

Ratos portadores de tumor apresentaram redução da massa dos músculos gastrocnêmio (Figura 7A) e EDL (Figura 7B) e aumento da massa do músculo sóleo (Figura 7C) em relação aos ratos saudáveis. Ratos portadores de tumor tratados com GDP apresentaram as massas do gastrocnêmio e EDL similares a dos grupos saudáveis. Já os tratamentos com INS e INS+GDP reduziram a massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo, em comparação aos ratos com tumor tratados com veículo (Figuras 7A, 7B e 7C).

O conteúdo de miostatina do músculo gastrocnêmico (Figura 8A) e a concentração plasmática (Figura 8B) e fecal (Figura 8C) de corticosterona dos ratos com tumor não foram significativamente diferentes dos ratos saudáveis e não foram alterados por nenhum dos tratamentos.

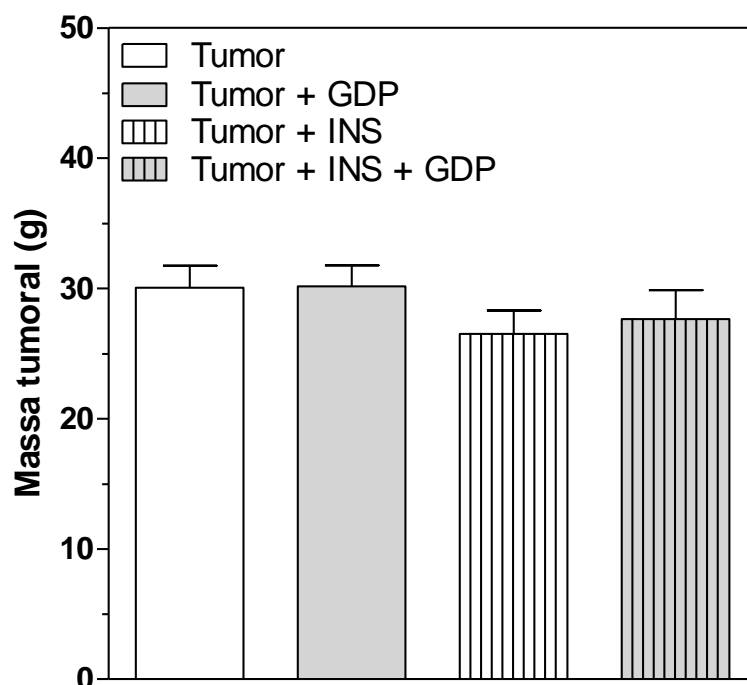


Figura 1. Massa tumoral de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídico (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídico (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média \pm EPM de 16 a 30 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls.

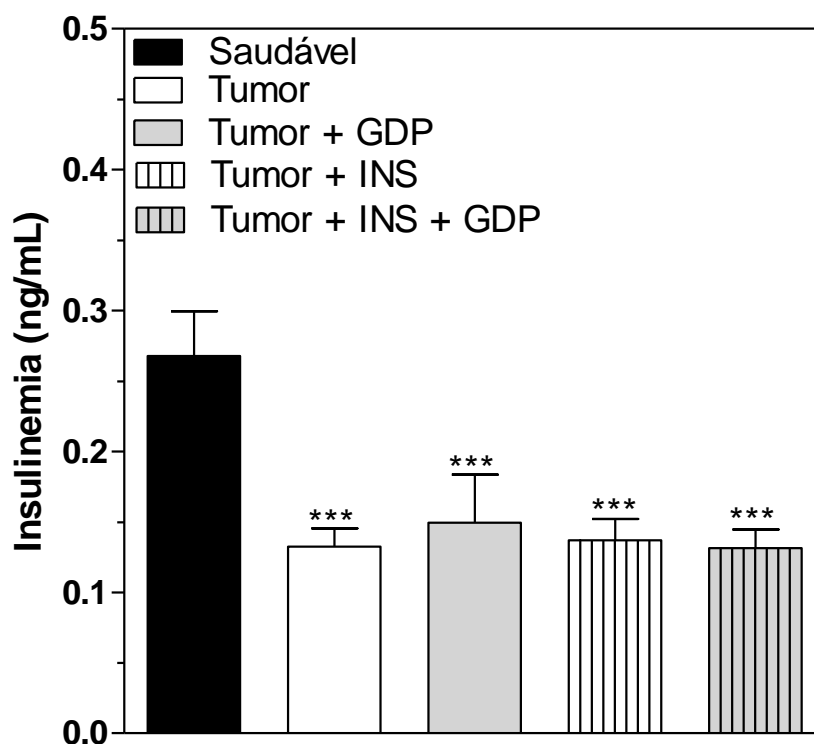


Figura 2. Insulinemia (ng/mL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa média \pm EPM de 14 a 25 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ versus saudável.

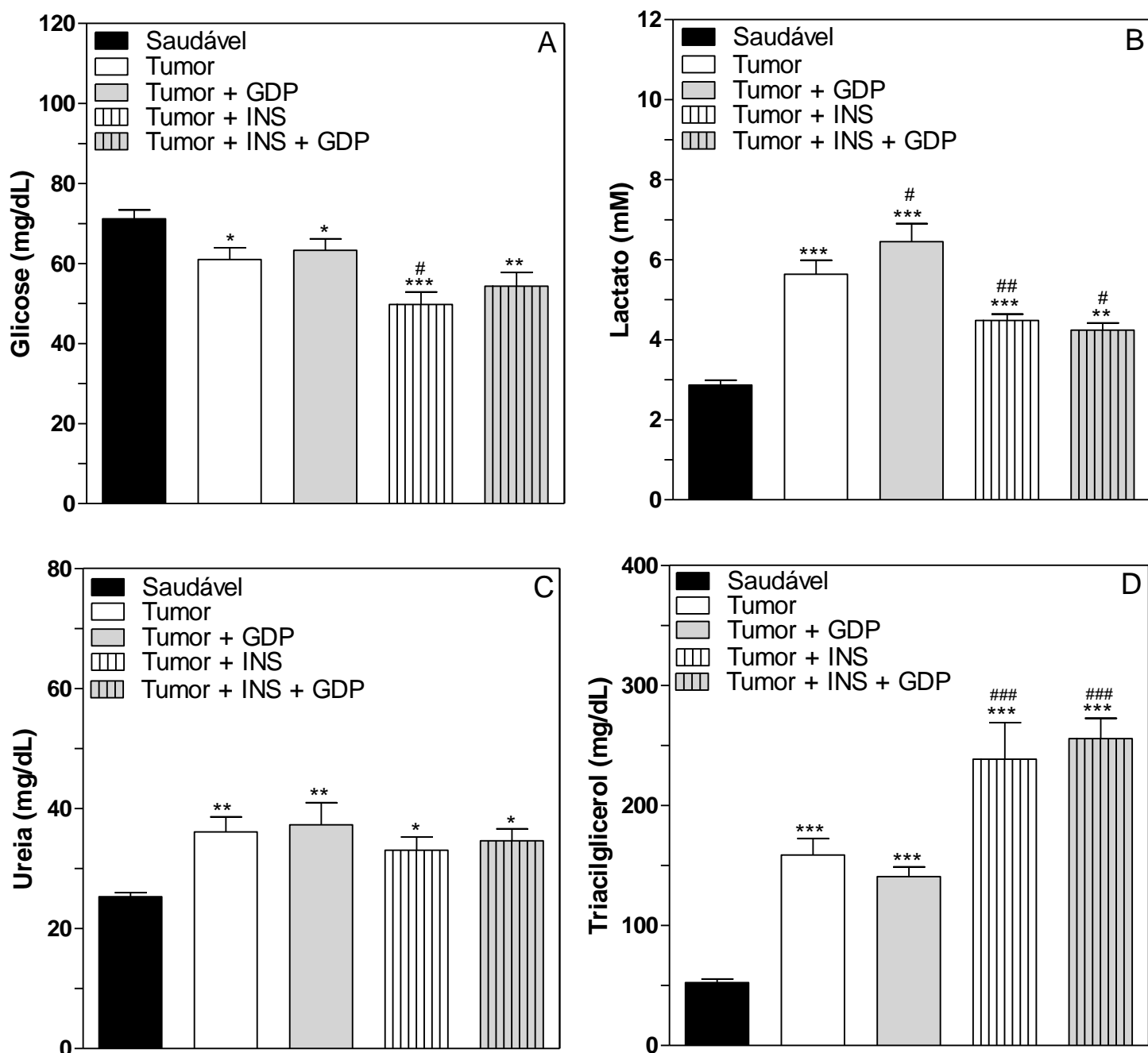


Figura 3. Concentrações plasmáticas de glicose (A), lactato (B), ureia (C) e triacilglicerol (D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa média \pm EPM de 15 a 30 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus tumor.

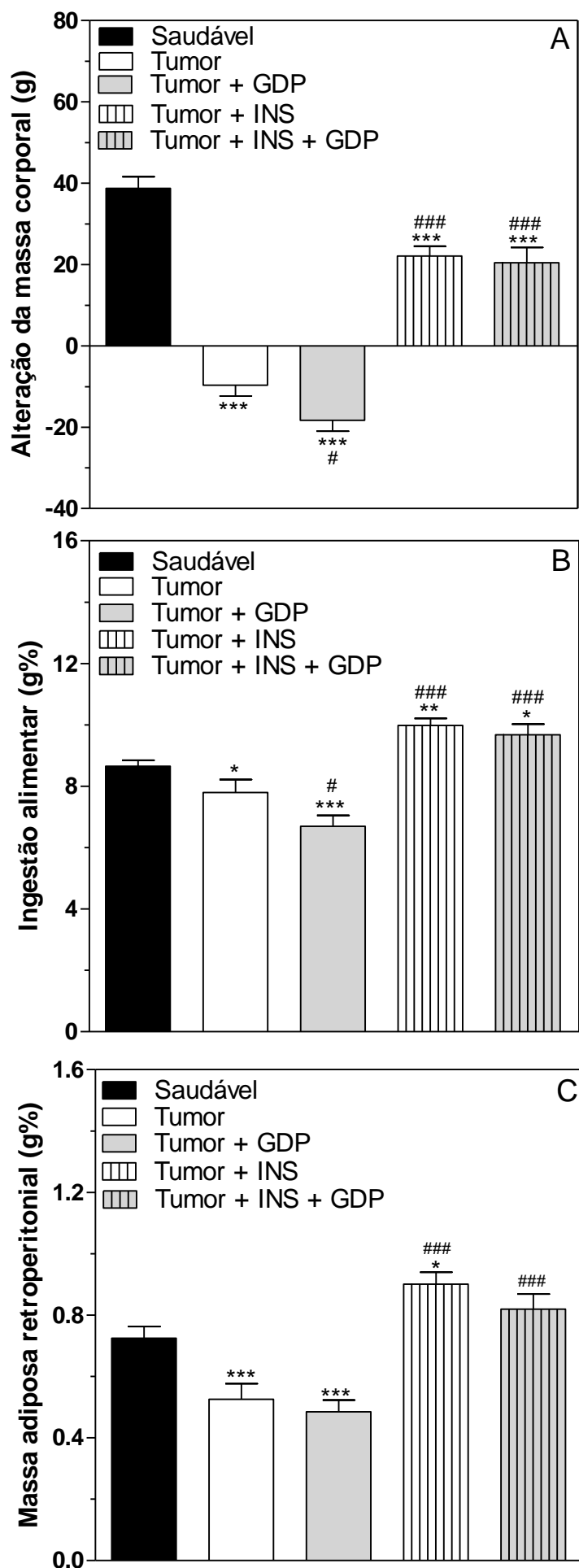


Figura 4. Alteração de massa corporal (A), ingestão alimentar (B) e massa do tecido adiposo retroperitoneal (C) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média \pm EPM de 16 a 30 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus tumor.

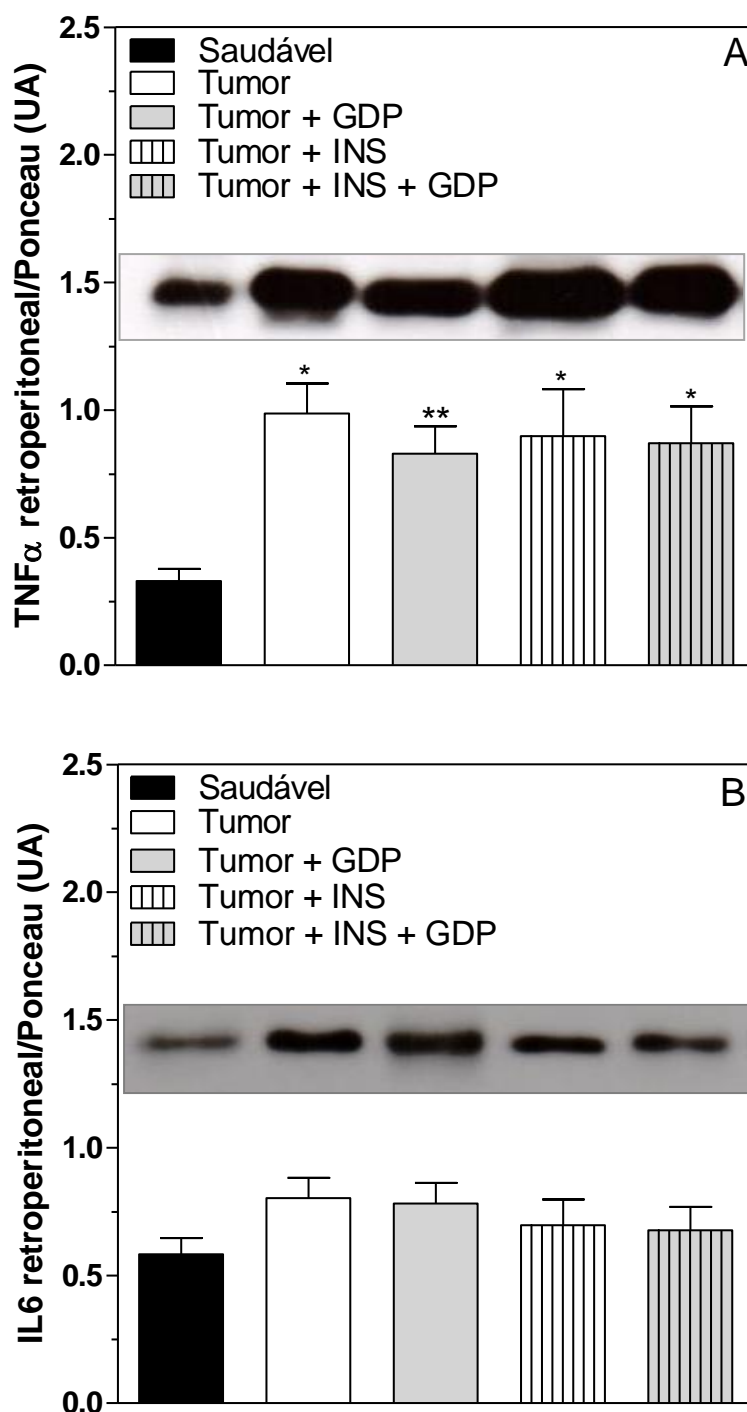


Figura 5. Conteúdo de TNF- α (A) e IL6 (B) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Blots estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 9 a 21 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável.

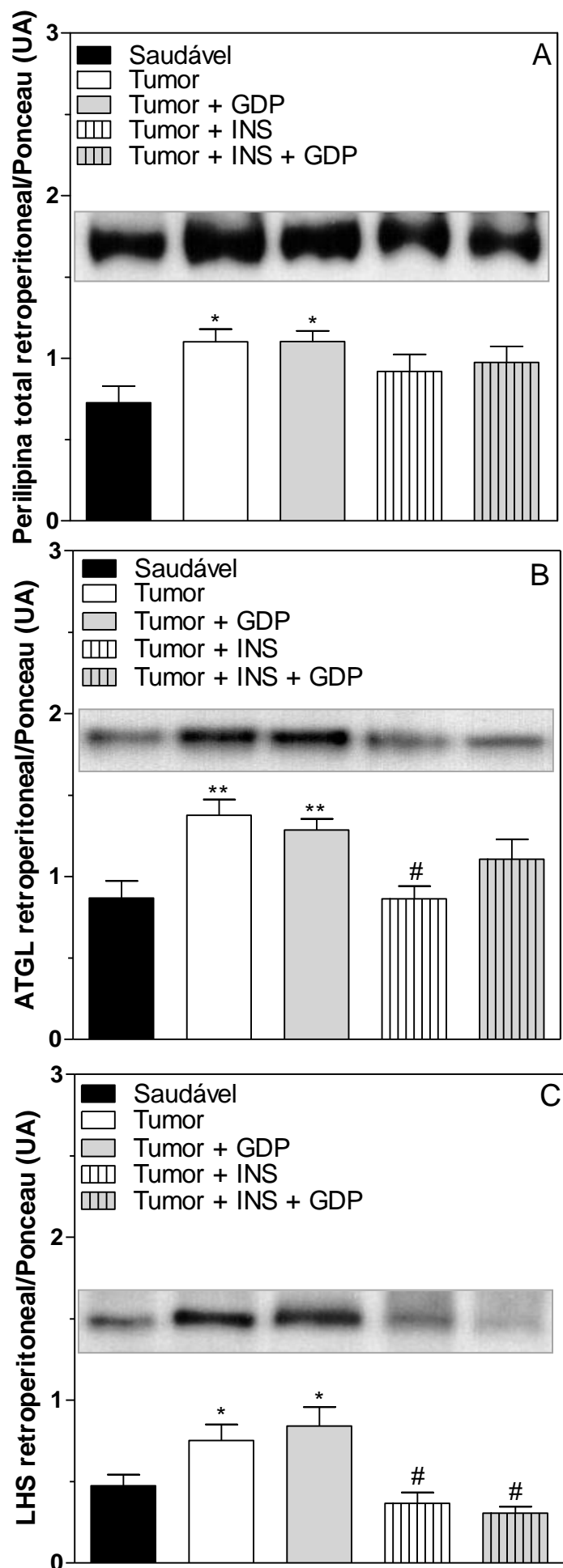


Figura 6. Conteúdo de perilipina total (A), lipase de triacilglicerol (ATGL) (B) e lipase hormônio sensível (LHS) (C) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. *Blots* estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa a média \pm EPM de 7 a 16 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável; # $p < 0,05$ versus tumor.

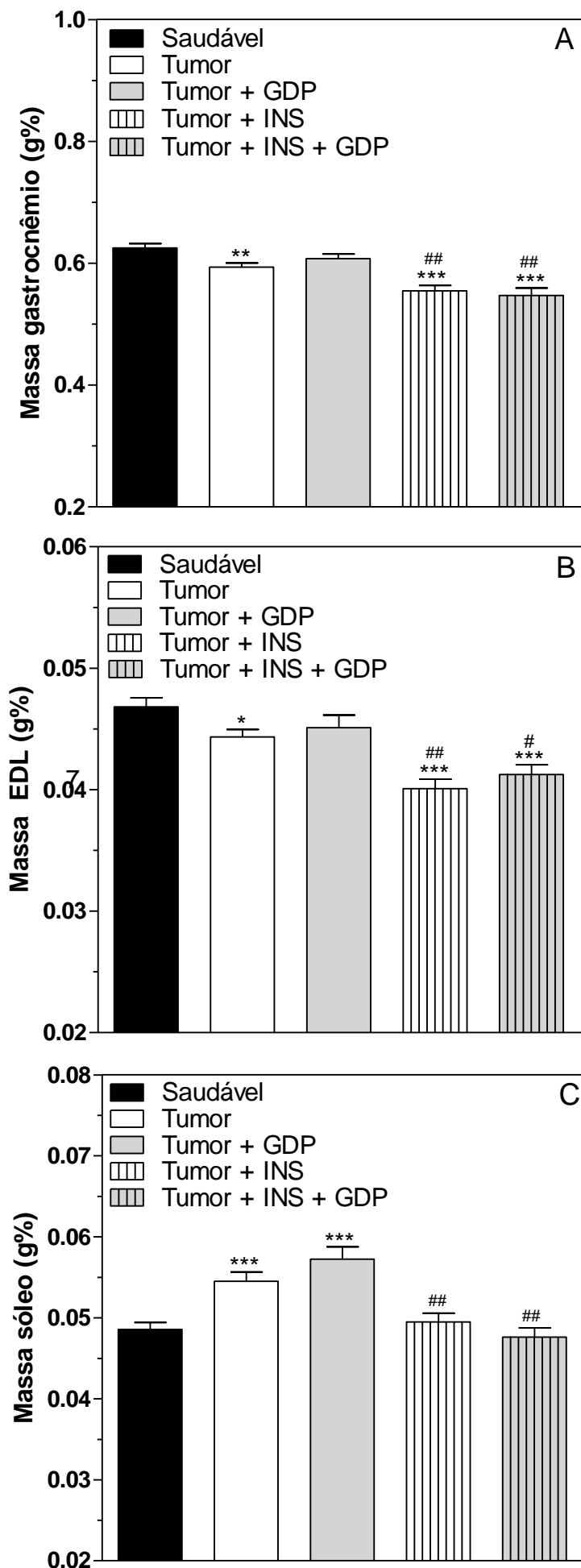


Figura 7. Massa dos músculos gastrocnêmio (A), EDL (B) e sóleo (C) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa média \pm EPM de 16 a 42 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus tumor.

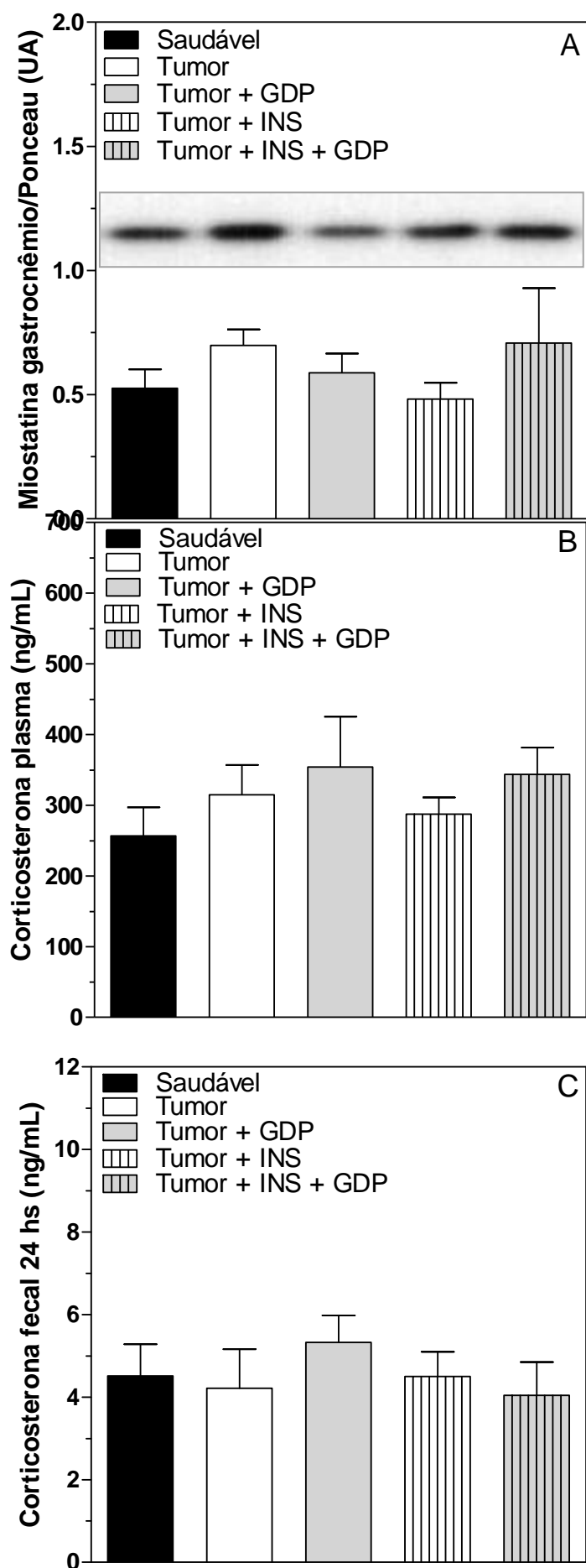


Figura 8. Conteúdo de miostatina no músculo gastrocnêmio (A) e concentração de corticosterona no plasma (B) e nas fezes (C) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar (A) ou em ratos alimentados 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo (B e C), como descrito em Material e Métodos. *Blots* estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 4 a 14 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls.

4.2 Efeitos dos tratamentos com INS e/ou GDP sobre a resposta periférica a INS, proteínas da via de sinalização da INS e parâmetros metabólicos relacionados (ARTIGO 2).

A concentração de INS plasmática nos ratos portadores de tumor Walker-256, alimentados, foi aproximadamente 50% menor do que nos ratos saudáveis. A insulinemia dos ratos portadores de tumor que receberam a última dose de GDP 4 horas antes dos experimentos foi similar a dos ratos saudáveis. Já a insulinemia dos ratos portadores de tumor que receberam a última dose de INS e INS+GDP 4 horas antes dos experimentos foi muito maior que a dos ratos com tumor tratados com veículo e a dos ratos saudáveis (Figura 9).

Ratos portadores de tumor, alimentados, apresentaram redução da glicemia em relação aos saudáveis. A administração de GDP, 4 horas antes do experimento, não alterou significativamente este parâmetro, mas a administração de INS e INS+GDP, reduziu acentuadamente a glicemia dos ratos portadores de tumor (Figura 10).

No teste de tolerância à INS (ITT), a administração de INS reduziu a glicemia ao longo do tempo, em todos os grupos (Figura 11A). No entanto, a redução da glicemia foi menor nos ratos portadores de tumor do que nos saudáveis, como mostrado pela menor kITT (Figura 11B). Os tratamentos com GDP, INS ou INS+GDP não tiveram efeito sobre a redução da resposta periférica a INS dos ratos com tumor (Figura 11B).

O conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 12A) e fígado (Figura 12C) dos ratos portadores de tumor foi maior que dos ratos saudáveis e nenhum dos tratamentos foi capaz de prevenir esta alteração. Já o conteúdo de TNF- α no músculo gastrocnêmio dos ratos com tumor foi similar a dos ratos saudáveis e também não foi afetado pelos tratamentos (Figura 12B).

O conteúdo de Akt total (Figura 13A) e p-Akt (Figura 13B) não foi significativamente menor, mas a relação p-Akt:Akt total (Figura 13C) foi menor, no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos portadores de tumor em relação aos saudáveis. O tratamento com GDP, 4 horas antes dos experimentos, aumentou o conteúdo de Akt total (Figura 13A), mas não alterou a razão p-Akt/Akt total (Figura 13C), enquanto os tratamentos com INS e INS+GDP aumentaram acentuadamente o conteúdo de p-Akt (Figura 13B) e a razão p-Akt/Akt total (Figura 13C) no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos com tumor em relação aos ratos com tumor tratados com veículo.

O conteúdo de Akt total (Figura 14A), p-Akt (Figura 14B) e relação p-Akt:Akt total

(Figura 14C) no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor foi semelhante ao dos ratos saudáveis. O tratamento com GDP, 4 horas antes dos experimentos, reduziu o conteúdo de Akt total (Figura 14A), mas não alterou a relação p-Akt:Akt total dos ratos com tumor (Figura 14C). Já o tratamento com INS e INS+GDP reduziu o conteúdo de Akt total (Figura 14A), aumentou o conteúdo de p-Akt (Figura 14B) e também a relação p-Akt:Akt total (Figura 14C) no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor em comparação aos ratos com tumor tratados com veículo.

O conteúdo de GLUT-4 total (Figura 15A) e GLUT-4 na membrana plasmática (Figura 15B) no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor foi semelhante ao dos ratos saudáveis e nenhum dos tratamentos tiveram efeitos sobre estes parâmetros. Com relação ao RNAm do GLUT-4, os tratamentos com GDP ou INS+GDP aumentaram acentuadamente sua expressão em comparação aos ratos portadores de tumor tratados com veículo.

No fígado, os conteúdos de Akt total (Figura 16A), p-Akt (Figura 16B) e a relação p-Akt:Akt total (Figura 16C) dos ratos portadores de tumor foram similares a dos ratos saudáveis e os tratamentos com GDP, INS ou INS+GDP não afetaram estes parâmetros.

Com relação a glicólise, houve redução do catabolismo da glicose exógena pelo fígado dos ratos portadores de tumor em relação aos ratos saudáveis (Figura 17A), como mostrado pelas áreas sob as curvas (AUCs) (Figura 17B). Os tratamentos com GDP, INS ou INS+GDP não tiveram efeito sobre a redução da glicólise dos ratos com tumor.

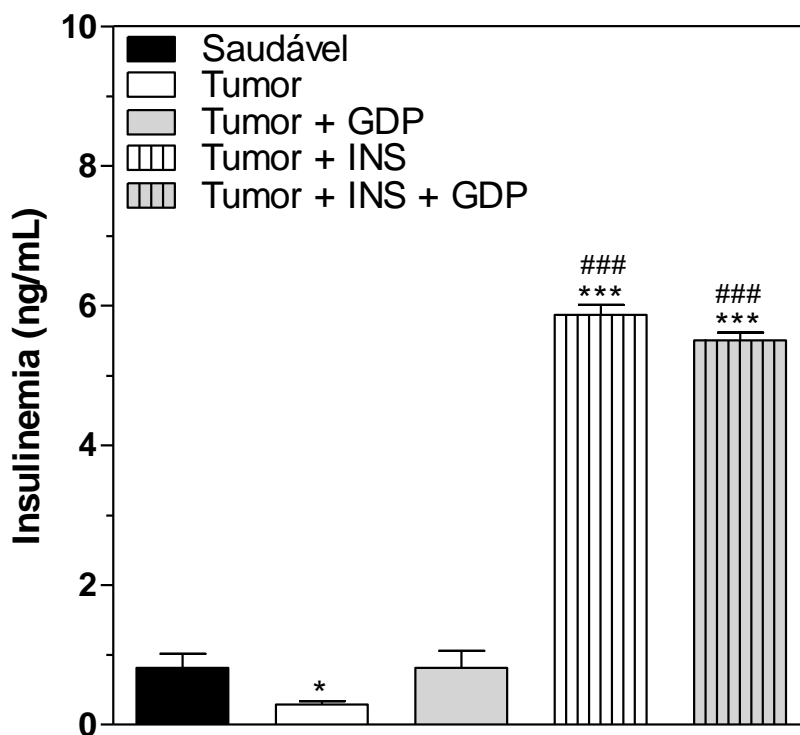


Figura 9. Insulinemia (ng/mL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo, em ratos alimentados, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa média \pm EPM de 7 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; ### $p < 0,001$ versus tumor.

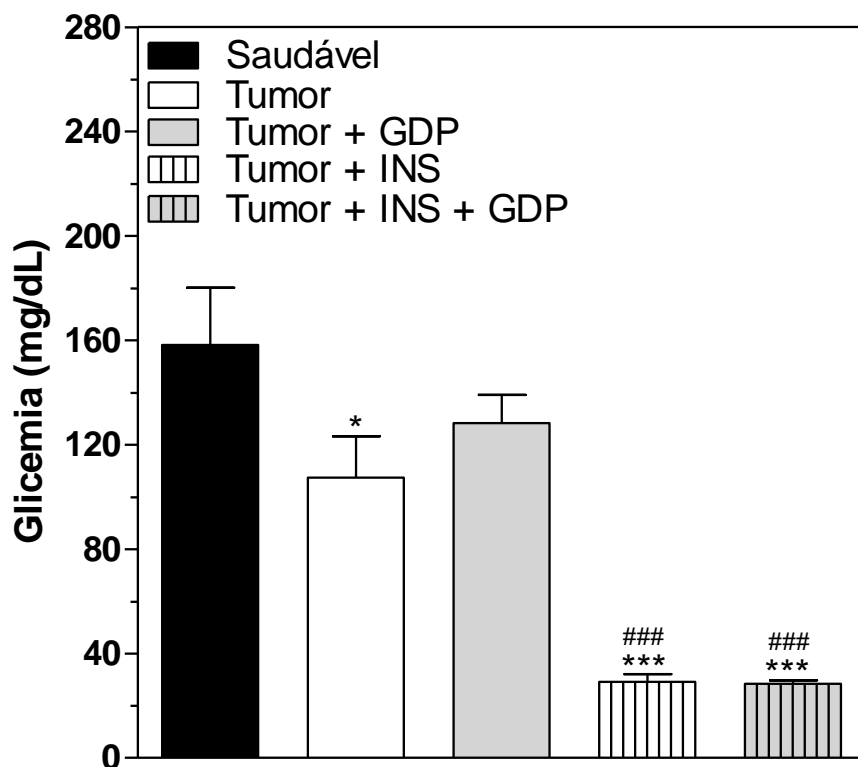


Figura 10. Glicemia (mg/dL) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou salina, em ratos alimentados, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa média \pm EPM de 7 a 8 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; ### $p < 0,001$ versus tumor.

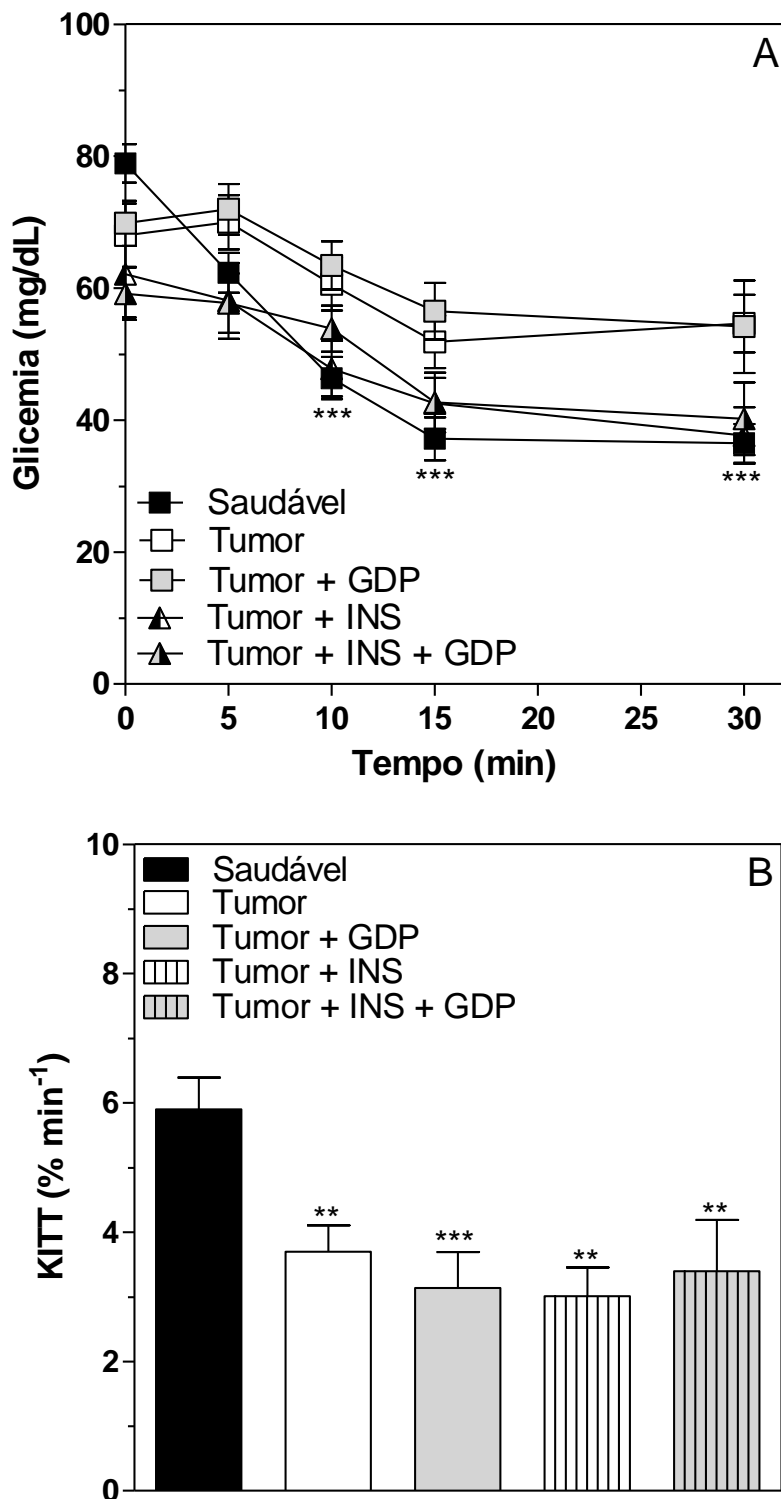


Figura 11. Constante de decaimento da glicose (kITT) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15 e 30 min após a administração de insulina (0,25 U/Kg). Cada barra representa média \pm EPM de 6 a 18 experimentos. Resultados analisadas por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

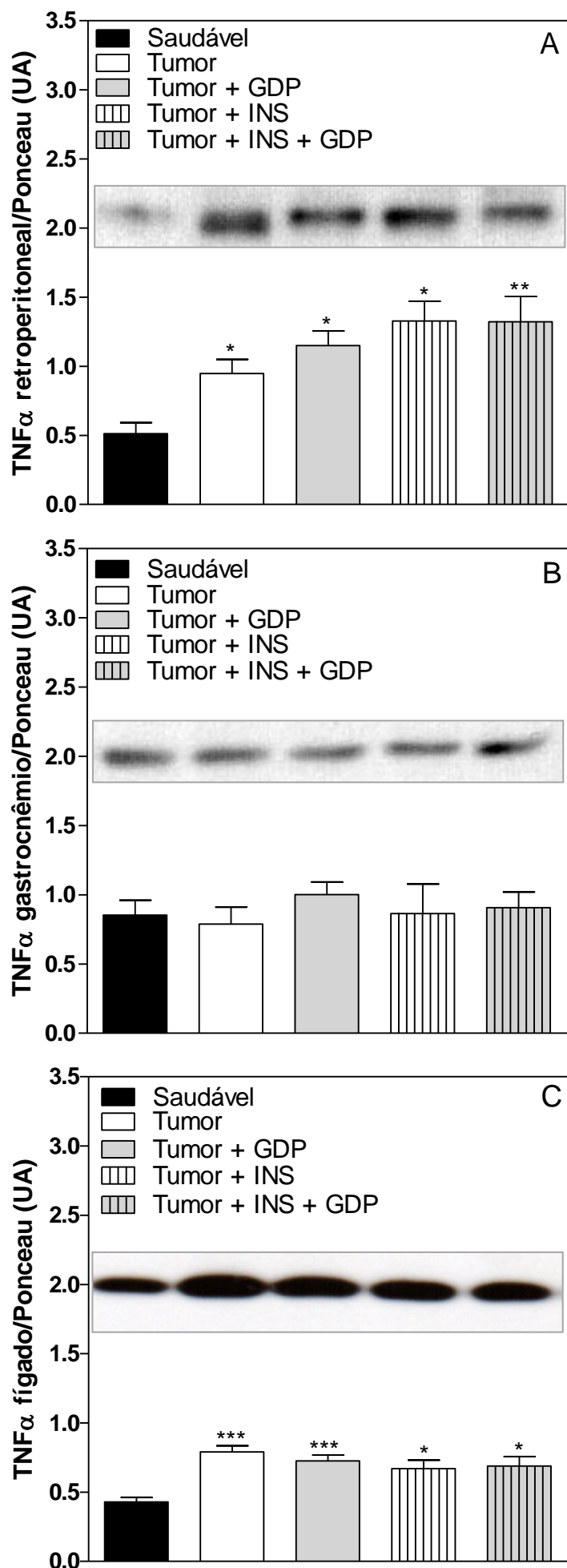


Figura 12. Conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal (A), músculo gastrocnêmio (B) e fígado (C) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos alimentados, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo (A), ou em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar (B, C), como descrito em Material e Métodos. *Blots* estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 5 a 28 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável.

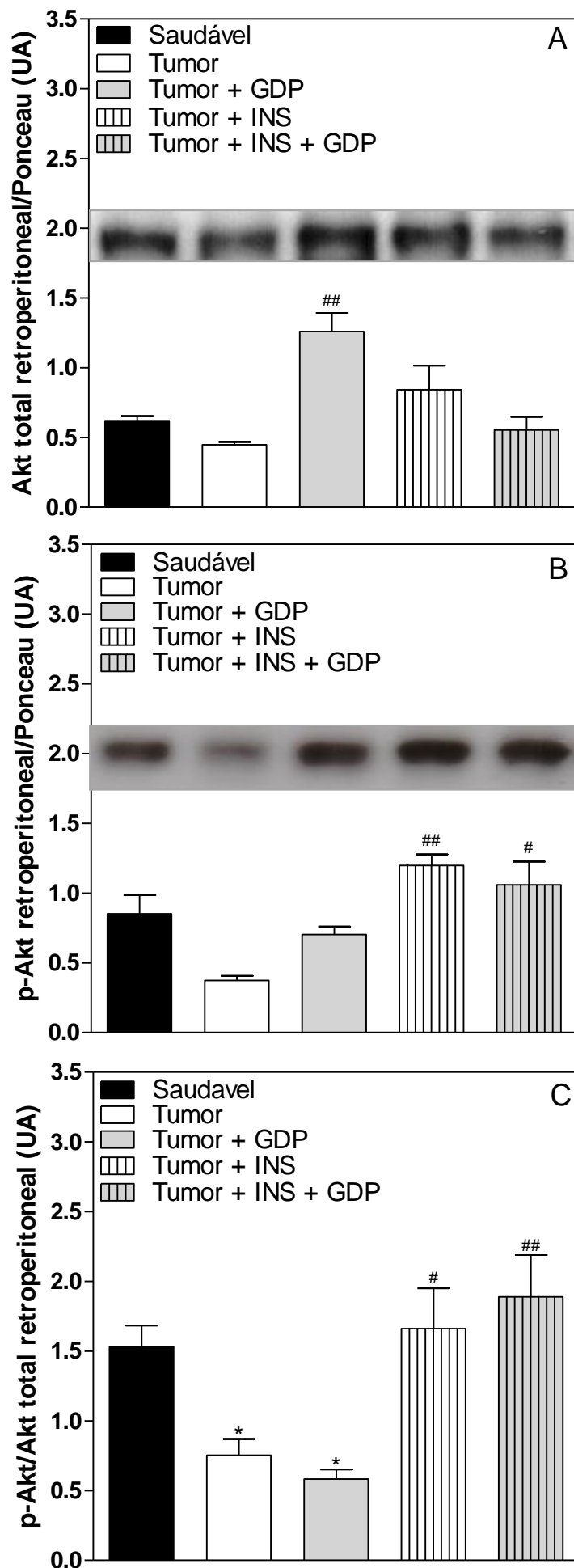


Figura 13. Conteúdo de Akt total (A) Akt fosforilada (p-Akt) (B) e relação p-Akt:Akt total (C) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo em ratos alimentados, como descrito em Material e Métodos. Blots estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 5 a 7 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus saudável; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus tumor.

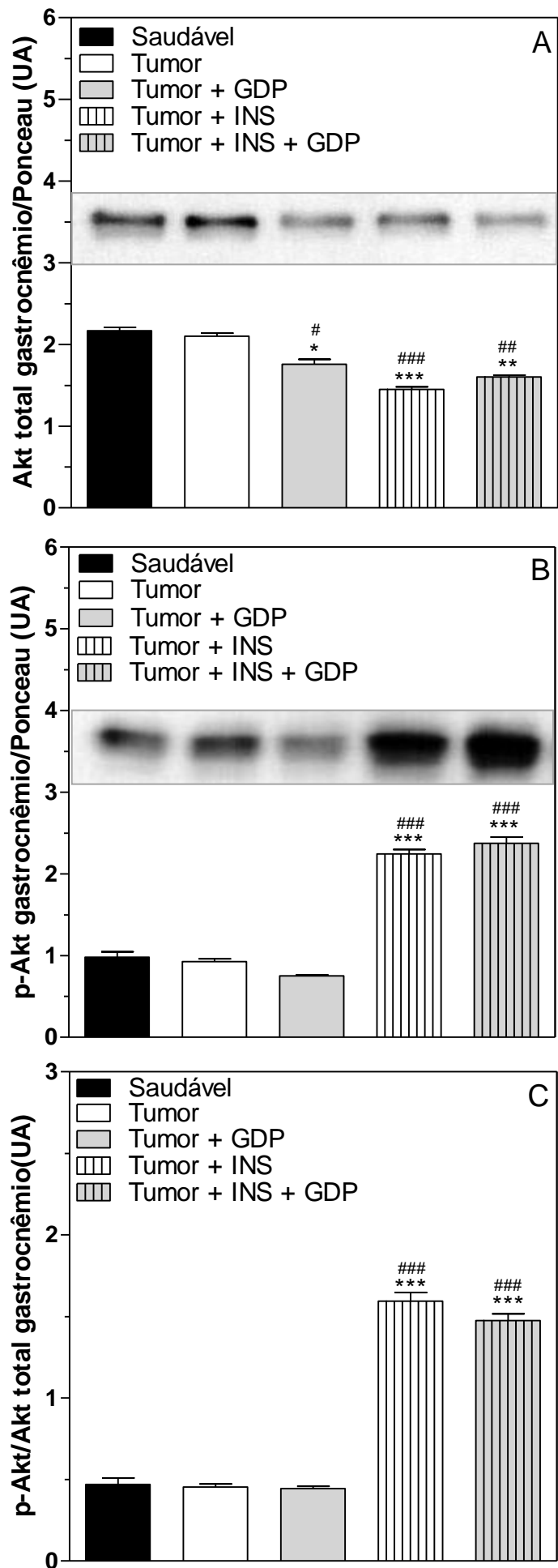


Figura 14. Conteúdo de Akt total (A) Akt fosforilada (p-Akt) (B) e relação p-Akt:Akt total (C) no músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo, em ratos alimentados, como descrito em Material e Métodos. Blots estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 6 a 8 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus tumor.

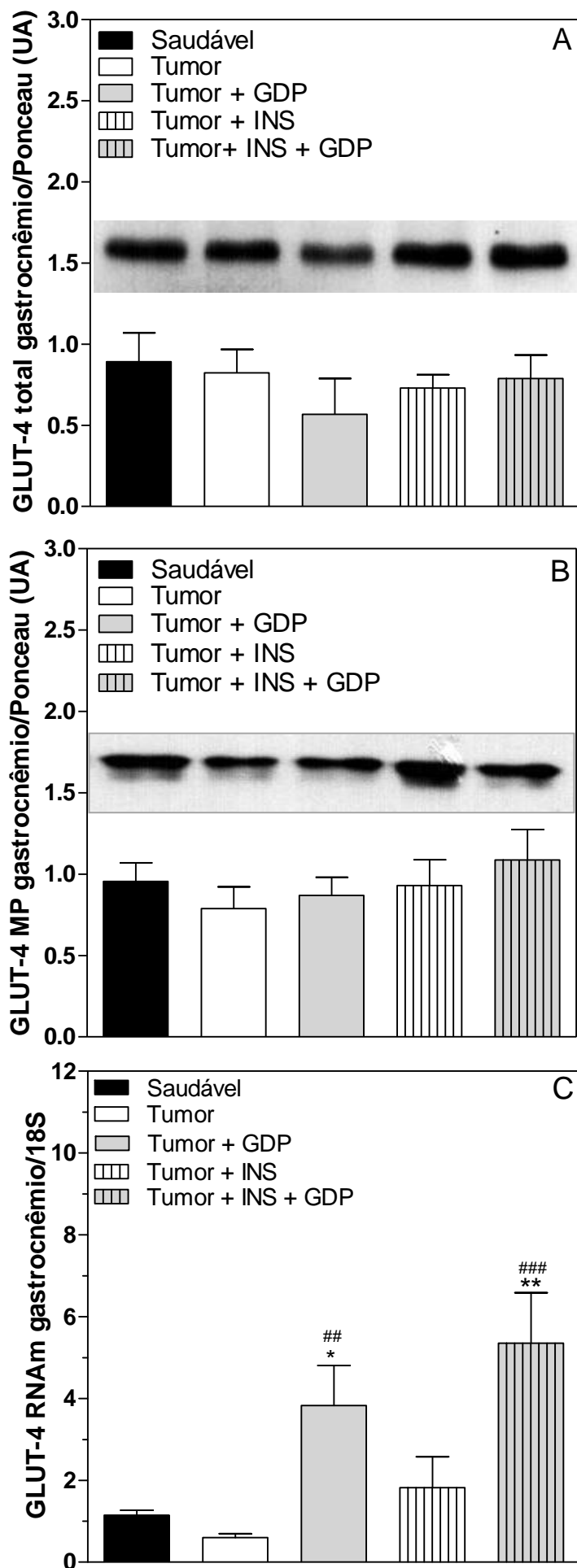


Figura 15. Conteúdo de GLUT-4 total (A), GLUT-4 na membrana plasmática (B) e expressão de RNAm do GLUT-4 (C) no músculo gastrocnêmio de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13, 4 horas pós-administração de INS e/ou GDP ou veículo, em ratos alimentados, como descrito em Material e Métodos. *Blots* estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 6 a 8 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ versus saudável; ### $p < 0,001$ versus tumor.

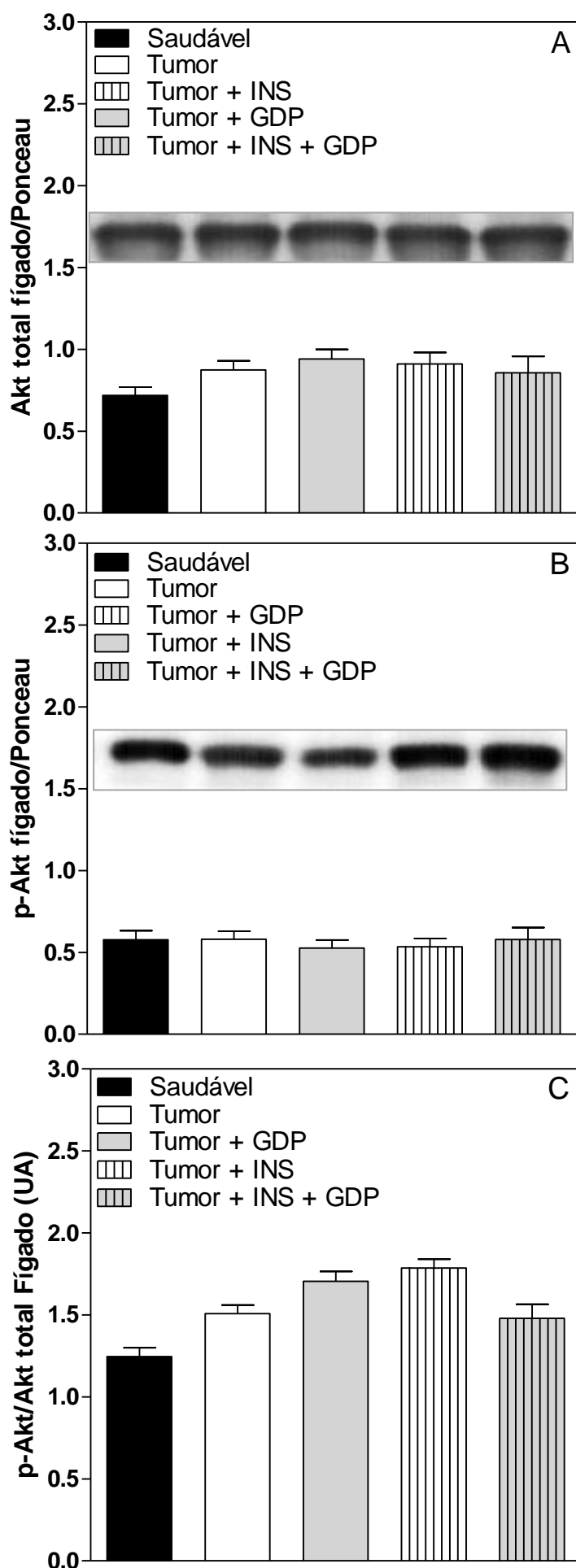


Figura 16. Conteúdo de Akt total (A) Akt fosforilada (p-Akt) (B) e relação p-Akt:Akt total (C) no fígado de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. *Blots* estão representados acima de cada grupo respectivo. Cada barra representa média \pm EPM de 7 a 29 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls.

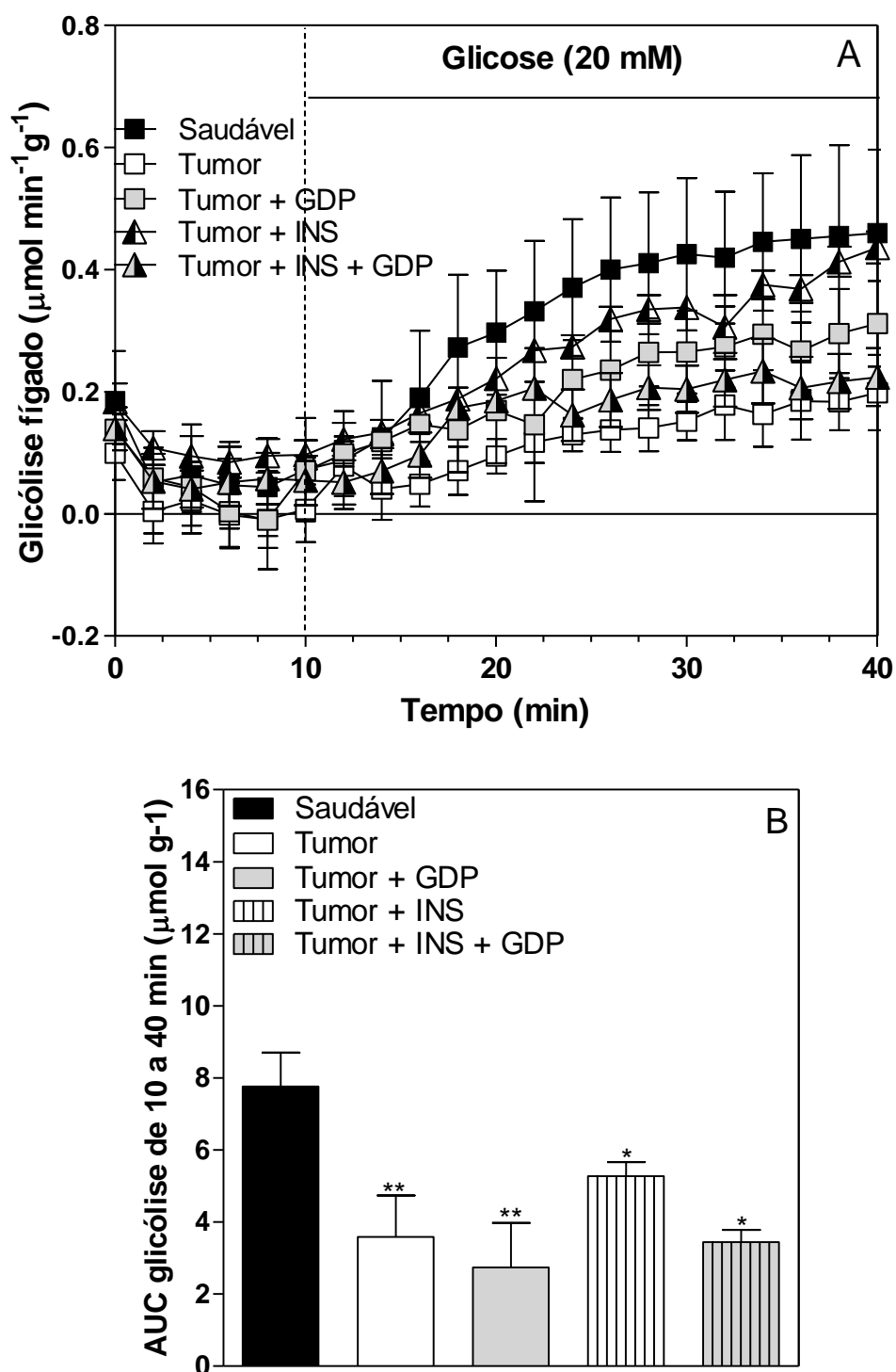


Figura 17. Glicólise (A) e área sob a curva (AUC) da glicólise (B) no fígado de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com glutamina dipeptídeo (GDP), insulina (INS), insulina + glutamina dipeptídeo (INS+GDP) ou veículo durante 11 dias. Experimentos realizados no dia 13 em ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way, seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus saudável.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com relação aos resultados do **ARTIGO 1**, a maioria dos estudos foi realizada em ratos com 24 de jejum, 40 horas depois do último tratamento, com o propósito de excluir os efeitos de curto prazo da INS e/ou GDP.

Os tratamentos com INS e/ou GDP por 11 dias não alteraram o crescimento do tumor Walker-256 (Figura 1), apesar de um estudo evidenciar redução do peso tumor Walker-256 em ratos tratados com maiores doses (50 U/Kg) de INS (FERNANDES *et al.*, 1991). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos onde os tratamentos com INS (MOLEY *et al.*, 1985, 1988; COSTELLI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2011) ou glutamina (KLIMBERG, *et al.*, 1990; KAIBARA, *et al.*; 1994) também não afetaram o crescimento de vários tipos de tumor. A falta de efeito da GDP no crescimento tumoral é um resultado interessante, visto que a GDP promove reparo da mucosa e função da parede intestinal (KLIMBERG *et al.*, 1989; YOSHIDA *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 2001) e é usada para melhorar o trato gastrointestinal, danificado pelo tratamento quimioterápico ou radioterápico, em pacientes com câncer e ainda paira dúvidas se ela estimula o crescimento tumoral, uma vez que a glutamina é um substrato energético importante para a proliferação de células tumorais (REITZER *et al.*, 1979; MAZUREK *et al.*, 1997; MAZUREK *et al.*, 2005).

Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram baixos níveis de INS no sangue, confirmando achados anteriores (FERNANDES *et al.*, 1990; SALOMÃO *et al.*, 2014), e os tratamentos com GDP e/ou INS não alteraram a hipoinsulinemia desses animais (Figura 2), provavelmente devido a metabolização da INS, visto que a insulinemia foi avaliada 40 horas depois do último tratamento.

Os tratamentos com INS acentuaram a hipoglicemia (grupo INS) e hipertriacilglicerolemia (grupos INS e INS+GDP), reduziram a hiperlactatemia (grupos INS e INS+GDP) e não alteraram a hiperuremia (grupos INS e INS+GDP), enquanto o tratamento com GDP aumentou a hiperlactatemia dos ratos com tumor (Figura 3). A hipoglicemia, hiperlactatemia e hiperuremia nos ratos com tumor parecem ser resultantes do metabolismo das células tumorais, as quais consomem grandes quantidades de glicose e produzem lactato e ureia (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007; REBECA *et al.*, 2008; MARÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009), enquanto a hipertriacilglicerolemia tem sido atribuída a inibição da LPL (MORIN *et al.*, 1994; WARNE, 2003; CHEN *et al.*, 2009) e também a estimulação da lipogênese hepática, promovida pelo TNF- α , IL-6 e IL-1 α (KOTLER, 2000). Nos ratos tratados com INS, a

intensificação da hipoglicemia provavelmente envolveu aumento da captação periférica de glicose, enquanto a redução da hiperlactatemia pode ser devida a redução da massa muscular, visto que o músculo esquelético produz lactato. O aumento da lactatemia pela GDP pode ter ocorrido pela maior disponibilidade e utilização de glutamina (glutaminólise) pelas células tumorais (REITZER *et al.*, 1979; MAZUREK *et al.*, 1997; LOBO *et al.*, 2000) e do sistema imune (NEWSHOLME *et al.*, 1999; FRISINA *et al.*, 1994). A ausência de efeito da GDP, INS e INS+GDP na uremia pode estar relacionada com a falta de efeito destes tratamentos no crescimento tumoral. Já o aumento da hipertriacilglicerolemia pela INS pode ser devido a sua ação lipogênica no fígado, aumentando a conversão de glicose em ácidos graxos, os quais são direcionados para a síntese de triacilgliceróis (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP) reduziram a perda de massa corporal dos ratos portadores de tumor (Figura 4A) e isso pode ser devido ao aumento acentuado da ingestão alimentar (Figura 4B) e da massa adiposa (Figura 4C). De fato, os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP) aumentaram a ingestão alimentar e a massa adiposa retroperitoneal dos ratos portadores de tumor, os quais são anoréxicos (Figura 4B) e apresentam depleção de massa adiposa (Figura 4C), para valores superiores aos dos ratos saudáveis. Corroborando nossos resultados, o tratamento com INS aumentou a ingestão alimentar e o ganho de massa adiposa e corporal em ratos portadores de vários tipos de tumor (MOLEY *et al.*, 1985; MOLEY *et al.*, 1988; BECK & TISDALE, 1989; COSTELLI *et al.*, 1999). O aumento acentuado da massa adiposa dos ratos portadores de tumor pelo tratamento com INS condiz com as ações lipogênica e antilipolítica da INS (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; RUAN & LODISH, 2003).

A anorexia no câncer tem sido atribuída a ação hipotalâmica de citocinas estimuladoras da via anorexigênica (TNF- α e IL-6) e inibidoras da via orexigênica (IL-1) (MARTIGNONI *et al.*, 2003; ARGILÉS *et al.*, 2005; PATRA & ARORA, 2012). O mecanismo envolvido no aumento da ingestão alimentar pela INS nos ratos portadores de tumor é desconhecido, visto que encontra-se bem estabelecido que a INS é um hormônio anorexigênico (SCHWARTZ *et al.*, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2001; FLIER, 2004; VELLOSO, 2006). É possível que a hipoglicemia acentuada e sustentada, ocasionada pela administração diária de INS possa ter aumentado a ingestão alimentar nos ratos portadores de tumor (STEFFENS, 1969; MOZET *et al.*, 1977; ARVANITI *et al.*, 1998; JEONG *et al.*, 2013), por ativação dos glicorreceptores localizados no hipotálamo, os quais são sensíveis aos níveis glicêmicos (KOEPPEN & STANTON,

2009). Diferentemente da INS, o tratamento com GDP acentuou a anorexia (Figura 4B) e este efeito pode ser devido a maior disponibilidade de glutamina, um precursor de GABA (BATTAGLIOLI & MARTIN, 1996; PATEL *et al.*, 2001). Foi observado que a administração de GABA, glutamato ou outros aminoácidos no hipotálamo de ratos reduz a ingestão alimentar (PANKSEPP & BOOTH, 1971; PANKSEPP & MEEKER, 1980). Em consistência com a redução da ingestão alimentar, o tratamento com GDP acentuou a perda de massa corporal (Figura 4A) e não preveniu a perda de massa adiposa retroperitoneal (Figura 4C) dos ratos com tumor.

A perda de massa adiposa em portadores de câncer é devida a ação do LMF e de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1) que reduzem a lipogênese e estimulam a lipólise (BERG *et al.*, 1994; ARNER, 1995; GORDON *et al.*, 2005). Em nosso estudo, ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram aumento significativo do conteúdo de TNF- α (Figuras 5A), mas não de IL-6 (Figuras 5B), no tecido adiposo retroperitoneal e estes parâmetros não foram afetadas por nenhum dos tratamentos. Estudos prévios mostraram aumento da expressão de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo retroperitoneal neste mesmo modelo experimental de câncer (LIRA *et al.*, 2012).

O LMF e as citocinas estimulam a lipólise por aumentar ou ativar proteínas como a perilipina, ATGL e LHS. Em nosso estudo ratos portadores de tumor apresentaram aumento do conteúdo de perilipina total (Figura 6A), ATGL (Figura 6B) e LHS (Figura 6C). A ATGL e a LHS são as principais enzimas lipolíticas (lipases), as quais hidrolisam os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (LANGIN & ARNER, 2006; AGUSTSSON *et al.*, 2007; JAWORSKI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2011). As perilipinas são proteínas localizadas na superfície das gotículas de gordura e formam uma barreira protetora contra a ação das lipases (ATGL e LHS), prevenindo a degradação dos triacilgliceróis pelas ATGL e LHS em condições basais, ou seja, na ausência de estímulos, quando se encontram defosforiladas. As perilipinas precisam ser fosforiladas para que a ATGL e a LHS exerçam seus efeitos lipolíticos (SOUZA *et al.*, 1998; BRASAEMLE *et al.*, 2000; TANSEY *et al.*, 2003). O LMF, por estimular a adenilciclase, aumenta o AMPc intracelular (HIRAI *et al.*, 1997), o qual ativa a proteína quinase A que fosforila a perilipina na superfície da gotícula de gordura, e também a LHS, estimulando a lipólise no tecido adiposo (KHAN & TISDALE, 1999; TISDALE, 2004; DUCHARME & BICKEL, 2008). O TNF- α e a IL-6 também são capazes de ativar a LHS (ARNER, 1995). Foi verificado que o TNF- α aumentou a fosforilação da perilipina, por ativação da proteína quinase A (SOUZA *et al.*, 2003) e diminuiu a transcrição de ATGL (KIM *et al.*, 2006).

Além disso, o TNF- α interfere negativamente na via de sinalização da INS (KANETY *et al.*, 1995; WARNE, 2003), diminuindo os efeitos inibitórios da INS sobre as enzimas lipolíticas.

Em consistência com nossos achados, ratos portadores de tumor de Colon-26 apresentaram aumento de ATGL (TSOLI *et al.*, 2014) no tecido adiposo e ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram aumento do conteúdo de LHS (BATISTA *et al.*, 2012), anormalidades que foram acompanhadas pela redução das massas adiposas. Além disso, pacientes com caquexia associada ao câncer apresentaram aumento do conteúdo de LHS e de seu RNAm no tecido adiposo (THOMPSON *et al.*, 1993; AGUSTSSON *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2010). Em outro estudo, foi observado aumento na atividade da ATGL e LHS no tecido adiposo de pacientes com câncer, alterações que foram acompanhadas de redução do índice de massa corpórea, sugerindo que o aumento na atividade das lipases está relacionado ao desenvolvimento da caquexia (DAS *et al.*, 2011).

Os tratamentos com INS (grupos INS e/ou INS+GDP), mas não com GDP, preveniram o aumento do conteúdo de ATGL e LHS (Figura 6), confirmando a função fisiológica de supressão da lipólise pela INS no tecido adiposo (CHAKRABARTI & KANDROR, 2011). A redução do conteúdo de ATGL e LHS pela INS pode ser devida ao seu efeito regulador negativo na expressão da ATGL (KERSHAW *et al.*, 2006; KRALISCH *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; CHAKRABARTI, *et al.*, 2013) e LHS (MCTERNAN *et al.*, 2002). Com relação à perilipina, ratos portadores de tumor tratados com INS (grupos INS e INS+GDP) apresentaram conteúdo de perilipina total similar ao dos ratos saudáveis, mas não significativamente menores que dos ratos com tumor não tratados. Vale ressaltar que os ratos tratados com INS (alta dose) apresentaram completa recuperação da ATGL (grupo INS), LHS (Figuras 6B e 6C) e da massa do tecido adiposo retroperitoneal (grupos INS e +INS+GDP) (Figura 4C), mesmo na presença de elevado conteúdo de TNF- α (Figura 5A). Em consistência, nós mostramos previamente que alta concentração de INS impediu a ação inibitória do TNF- α nos efeitos da INS no fígado (DA ROCHA *et al.*, 2014).

Ratos portadores de tumor apresentaram redução das massas dos músculos gastrocnêmio e EDL, porém aumento da massa do músculo sóleo (Figura 7). O aumento do sóleo provavelmente foi devido ao trabalho realizado por este músculo para sustentação e mobilidade do animal, já que o músculo sóleo avaliado foi o do flanco contralateral a localização do tumor. Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP),

mas não com GDP, acentuaram a redução da massa do gastrocnêmio, EDL e sóleo dos animais com tumor (Figura 7), um efeito que não condiz com a ação anabólica e anticatabólica direta da INS, estimulando a síntese proteica e inibindo a proteólise muscular (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; RUAN & LODISH, 2003).

A redução da massa muscular no câncer é causada por diversos fatores como o PIF, TNF- α , IL-1 e IL-6 que ativam o sistema ubiquitina-proteossoma dependente de ATP e reduzem a síntese protéica muscular (HASSELGREN *et al.*, 2002; ARGILÉS *et al.*, 2003; GORDON *et al.*, 2005; SAINI *et al.*, 2006). A miostatina, um importante regulador negativo da massa muscular, produzida principalmente no músculo esquelético e liberada na circulação, parece também estar envolvida na depleção de massa muscular associada ao câncer (ELKINA *et al.*, 2011). A inibição da miostatina melhorou a depleção de massa muscular em vários estudos com camundongos portadores de tumor (BENNY KLIMEK *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; BUSQUETS *et al.*, 2012). Contudo, o conteúdo de miostatina (Figura 8A) no músculo gastrocnêmio dos ratos com tumor foi similar ao dos ratos saudáveis e não foi alterado pelos tratamentos com GDP, INS e INS+GDP. Porém, este resultado não exclui a participação da miostatina na depleção de massa muscular nos ratos com tumor, desde que foi observado aumento de sua concentração no sangue de portadores de câncer (COSTELLI *et al.*, 2008).

Sabe-se que a hipoglicemia induzida pela INS aumenta os glicocorticóides no sangue (cortisol e corticosterona) (DE FEO *et al.*, 1989; BOYLE & CRYER, 1991), os quais são críticos para a correção da hipoglicemia de longo prazo (GREENWOOD *et al.*, 1966; DE FEO *et al.*, 1989; BOYLE & CRYER, 1991). Sabe-se também que o aumento prolongado de corticosterona estimula a proteólise e causa depleção de massa muscular (HASSELGREN *et al.*, 2010; SCHAKMAN *et al.*, 2013), e isto poderia ter contribuído para a maior perda de massa muscular nos ratos com tumor tratados com INS. Entretanto, ratos portadores de tumor, 4 horas depois do último tratamento com INS (INS e INS+GDP), não apresentaram aumento da concentração de corticosterona no sangue (Figura 8B) e nas fezes (Figura 8C).

Portanto, o mecanismo pelo qual o tratamento com alta dose de INS acentuou a depleção de massa muscular nos ratos portadores de tumor necessita de investigações futuras. Contudo, parece que o efeito da INS na regulação da massa muscular esquelética ocorre principalmente por meio de alterações na degradação protéica e depende de sua concentração (HONORS & KINZIG, 2012). Enquanto concentrações

fisiológicas de INS suprimem a degradação protéica (CAHILL *et al.*, 1972), sem afetar a síntese protéica (GELFAND & BARRETT, 1987), concentrações suprafisiológicas de INS não tem efeito sobre a degradação proteica, ou seja não inibem a acentuada proteólise que ocorre nos ratos portadores e tumor.

Com relação aos resultados do **ARTIGO 2**, a maioria dos estudos foi realizada em ratos alimentados, 4 horas depois do último tratamento, com o propósito de visualizar, além dos efeitos crônicos, os efeitos de curto prazo da INS e/ou GDP, principalmente nas proteínas da via de sinalização da INS.

A insulinemia dos ratos portadores de tumor, alimentados, foi menor do que dos ratos saudáveis (Figura 9). Esta redução, foi similar (aproximadamente 50%) a encontrada nos ratos com 24 horas de jejum (Figura 2), o que corrobora achados anteriores de que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam baixos níveis de INS no sangue (FERNANDES *et al.*, 1990; SALOMÃO *et al.*, 2014). O GDP, administrado 4 horas antes dos experimentos, aumentou a insulinemia dos ratos com tumor para valores similares a dos ratos saudáveis (Figura 9), possivelmente por aumentar a disponibilidade de aminoácidos (alanina e glutamina), os quais estimulam a secreção de INS (YANG *et al.*, 2010; NEWSHOLME *et al.*, 2014; BAUMGARD *et al.*, 2016). A glutamina também atua nas células β pancreáticas reforçando a secreção de INS estimulada por glicose (BRENNAN *et al.*, 2003), além de regular a expressão de genes envolvidos na secreção de INS, incluindo canais iônicos e enzimas (CURI *et al.*, 2005). Como esperado, a administração de INS ou INS+GDP, 4 horas antes dos experimentos, aumentou acentuadamente a insulinemia dos ratos com tumor (Figura 9).

Ratos portadores de tumor, alimentados, apresentaram redução da glicemia (Figura 10) de modo similar ao observado nos animais com 24 horas de jejum (Figura 3), o que está de acordo com nossos achados prévios de que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam baixos valores de glicose no sangue (CASSOLLA *et al.*, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013; MIKSZA *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2015a; DE SOUZA *et al.*, 2015b). A administração aguda de GDP não alterou significativamente a glicemia, embora a glutamina seja usada como precursor neoglicogênico em ratos com tumor Walker 256 (CORBELLO-PEREIRA *et al.*, 2004). Já os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), 4 horas antes dos experimentos, reduziram acentuadamente a glicemia dos ratos portadores de tumor (Figura 10), o que está de acordo com o efeito hipoglicêmico da INS (LUNDSGAARD, 1939).

Ratos portadores de tumor apresentaram resistência à INS, como observado pela menor kITT (Figura 11B), e nenhum dos tratamentos preveniu esta redução da sensibilidade à INS. A resistência à INS no câncer tem sido associada ao aumento de TNF- α , IL-6 (SALOMÃO *et al.*, 2014) e de ácidos graxos livres (CASSOLLA *et al.*, 2012) no sangue e/ou tecidos, os quais prejudicam a via de transdução de sinal da INS (WARNE, 2003; CAPURSO & CAPURSO, 2012).

Em nosso estudo, ratos portadores de tumor apresentaram aumento do conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 12A) e fígado (Figura 12C), mas não no músculo gastrocnêmio (Figuras 12B), e estas alterações não foram prevenidas por nenhum dos tratamentos. Estes resultados confirmam nossos achados anteriores de aumento do TNF- α no tecido adiposo (Figura 5A) e fígado (DE SOUZA *et al.*, 2015b) de ratos portadores de tumor Walker-256. Sabe-se que o TNF- α , por ativação de serinas quinases, diminui a fosforilação em tirosina do IRS-1 (KANETY *et al.*, 1995; WARNE, 2003) e conseqüentemente a fosforilação da Akt, diminuindo a translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a membrana plasmática (YOSHIKAWA *et al.*, 1999; KANE *et al.*, 2002; SANO *et al.*, 2003; FAKUDA, 2011), resultando em redução da captação periférica de glicose.

Em consistência com este efeito do TNF- α , ratos portadores de tumor apresentaram menor relação p-Akt:Akt total no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 13C), indicando menor fosforilação da Akt, o que resulta em menor translocação de GLUT-4 e menor captação de glicose pelo tecido adiposo, corroborando com a menor resposta à INS observada durante o ITT (Figura 11). Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), 4 horas antes dos experimentos, mas não com GDP, aumentaram acentuadamente o conteúdo de p-Akt (Figura 13B) e a relação p-Akt:Akt total (Figura 13C) no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos com tumor. Esta fosforilação aumentada da Akt pelo tratamento com altas doses de INS (grupos INS e INS+GDP) é consistente com a acentuada redução da glicemia (Figura 10), aumento da massa adiposa (Figura 4C) e redução das lipases ATGL (Figura 6B) e LHS (Figura 6C) no tecido adiposo retroperitoneal dos ratos portadores de tumor resistentes à INS. De fato, altas doses de INS podem atenuar a redução da sensibilidade à INS induzida por fatores causadores da resistência à INS, como o TNF- α (DA ROCHA *et al.*, 2014). Foi observado que concentrações suprafisiológicas de INS, como ocorre na hiperinsulinemia compensatória durante a resistência à INS associada à obesidade e ao diabetes tipo 2, podem sobrepor os efeitos inibitórios dos fatores indutores de

resistência à INS, nas ações da INS (LIANG *et al.*, 2008; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994).

Diferentemente do tecido adiposo retroperitoneal, a relação p-Akt:Akt total (Figura 14C) no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor não diferiu dos ratos saudáveis, evidenciando que a fosforilação da Akt neste tecido não está alterada. Em consistência com os resultados da p-Akt, o conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática (Figura 15B) do músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor também não foi alterado. Embora este resultado sugira ausência de resistência à INS 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 e conseqüentemente ter estimulado a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática.

Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), mas não com GDP, aumentaram o conteúdo de p-Akt (Figura 14B) e a relação p-Akt:Akt total (Figura 14C) no músculo gastrocnêmio dos ratos portadores de tumor, como ocorreu no tecido adiposo retroperitoneal. Contudo, apesar dos tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP) terem aumentado a fosforilação da Akt, nenhum dos tratamentos aumentou o conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática (Figura 15C) e isto pode ser porque no estado alimentado a maior parte do GLUT-4 já foi translocada para a membrana plasmática.

Os tratamentos com GDP (grupos GDP e INS+GDP) aumentaram acentuadamente a expressão de RNAm do GLUT-4 (Figura 15C) dos ratos portadores de tumor. O gene do GLUT-4 parece ser regulado negativamente pelo NF- κ B (fator nuclear κ B) (RUAN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005), o qual é ativado pela IKKB (I κ B quinase subunit β), e foi observado que o tratamento com glutamina reduziu a atividade da IKKB no músculo de ratos com obesidade induzida por dieta rica em lipídeos (PRADA *et al.*, 2007). Uma redução na atividade da IKKB pelo tratamento com glutamina, pode diminuir a ativação do NF- κ B e conseqüentemente o seu efeito inibitório sobre a expressão do gene do GLUT-4, aumentando o RNAm do GLUT-4.

No fígado, os conteúdos de Akt total (Figura 16A), p-Akt (Figura 16B) e a relação p-Akt:Akt total (Figura 16C) não foram alterados pela presença do tumor, apesar das quantidades aumentadas de TNF- α hepático (Figura 12C). Estes

parâmetros hepáticos não foram afetados por nenhum dos tratamentos. A falta de efeito dos tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP) em aumentar a fosforilação da Akt no fígado, como fez no tecido adiposo retroperitoneal e músculo gastrocnêmio, onde as avaliações foram realizadas 4 horas depois do último tratamento (Figuras 13 e 14), possivelmente se deve ao fato que neste caso os experimentos foram realizados 40 horas depois da administração de INS, momento em que a concentração plasmática de INS nestes animais estava baixa, semelhante a dos ratos com tumor que não receberam INS (Figura 2).

Finalmente, ratos portadores de tumor apresentaram redução da glicólise a partir da glicose infundida no fígado (glicose exógena) e os tratamentos com GDP, INS ou INS+GDP não tiveram efeito sobre este parâmetro (Figura 17). No entanto, não houve redução da glicólise a partir da glicose endógena, ou seja da glicose proveniente do glicogênio hepático, como visualmente observado pelas taxas glicolíticas basais entre 0 e 10 minutos, antes da infusão de glicose no fígado (Figura 17A). Esta redução da glicólise a partir da glicose exógena, mas não a partir da glicose endógena, parece estar relacionada com a menor atividade da glicoquinase observada nos ratos portadores de tumor (VICENTINO *et al.*, 2002). A glicoquinase fosforila a glicose assim que esta entra no hepatócito, favorecendo a captação de glicose pelo fígado e conseqüentemente sua metabolização (glicólise). Sabe-se que a INS, por ativar a quicoquinase, aumenta indiretamente a captação de glicose no fígado dos ratos saudáveis, reduzindo a glicemia. Portanto, a inibição da quicoquinase nos ratos portadores de tumor, a qual reduz a captação de glicose pelo fígado, pode ter contribuído para a menor resposta periférica a INS (kITT) encontrada nestes animais (Figura 11), além, é claro, da resistência a INS observada no tecido adiposo (Figura 13C).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados deste estudo mostram que:

1. Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), mas não com GDP, de modo similar, preveniram completamente a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal e preveniram a perda de massa corporal (60%) dos ratos portadores de tumor, sem reduzirem o aumentado conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal e sem afetarem o crescimento tumoral. Estes efeitos benéficos dos tratamentos podem ser atribuídos a redução do conteúdo de lipases (ATGL e LHS), as quais estão aumentadas no tecido adiposo, e ao aumento da ingestão alimentar dos ratos portadores de tumor anoréxicos. Além disso, os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), mas não com GDP, de modo similar, preveniram a hiperlactatemia, porém acentuaram a hipoglicemia, a hipertriacilglicerolemia e a perda de massa muscular dos ratos portadores de tumor (**ARTIGO 1**).

2. Os tratamentos com INS (grupos INS e INS+GDP), mas não com GDP, de modo similar, promoveram aumento acentuado da insulinemia, redução acentuada da glicemia e preveniram completamente a redução da fosforilação da Akt no tecido adiposo retroperitoneal, como mostrado pela elevada relação p-Akt:Akt total, a qual está reduzida nos ratos portadores de tumor. Já os tratamentos com GDP e GDP+INS aumentaram, de modo similar, a expressão do RNAm do GLUT-4 no músculo gastrocnêmio, mas não aumentaram o conteúdo de GLUT-4 na membrana plasmática neste tecido. Contudo, os tratamentos com GDP, INS e INS+GDP, não reduziram a resistência a INS, o aumentado conteúdo de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal e fígado e nem a redução da glicólise hepática, a partir da glicose exógena, dos ratos portadores de tumor (**ARTIGO 2**).

Pode ser concluído que os tratamentos com INS e INS+GDP, mas não com GDP, reduziram algumas anormalidades metabólicas presentes nos ratos portadores de tumor Walker-256, como a perda de massa adiposa e corpórea, sem reduzir o crescimento tumoral. Estes efeitos podem ser atribuídos ao aumento induzido pela INS na fosforilação da Akt, a qual está reduzida no tecido adiposo, e a consequente redução do conteúdo de lipases (ATGL e LHS), as quais estão aumentadas no tecido adiposo, e ao aumento da ingestão alimentar. Contudo, os tratamentos com INS e INS+GDP, e também com GDP, acentuaram ou não tiveram efeitos em outras anormalidades induzidas pelo tumor Walker-256.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTSSON, T.; RYDÉN, M.; HOFFSTEDT, J.; VAN HARMELEN, V.; DICKER, A.; LAURENCIKIENE, J.; ISAKSSON, B.; PERMERT, J.; ARNER, P. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. **Cancer Research**, v. 67, p. 5531-5537, 2007.

ALBRECHT, J.; CANADA, T. W. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 10, p. 791-800, 1996.

ALVAREZ, B.; QUINN, L. S.; BUSQUETS, S.; QUILES, M. T.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Tumor necrosis factor-alpha exerts interleukin-6-dependent and -independent effects on cultured skeletal muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1542, p. 66-72, 2002.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 4, p. 401-406, 2003.

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.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; STEMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754-762, 2014.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 435-438, 1995.

ARVANITI, K.; RICQUIER, D.; CHAMPIGNY, O.; RICHARD, D. Leptin and corticosterone have opposite effects on food intake and the expression of UCP1 mRNA in brown adipose tissue of lep(ob)/lep(ob) mice. **Endocrinology**, v.139, n.9, p. 4000-4003, 1998.

ASP, M. L.; TIAN, M.; WENDEL, A. A.; BELURY, M. A. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 756-763, 2010.

BAKALAR, B.; DUSKA, F.; PACHL, J.; FRIC, M.; OTAHAL, M.; PAZOUT, J.; ANDEL, M. Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 381-386, 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 Chemother Pharmacol**, v. 65, p. 267-276, 2010.

BATISTA, M. L. JR.; NEVES, R. X.; PERES, S. B.; YAMASHITA, A. S.; SHIDA, C. S.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M. Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. **Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 3, p. 363-373, 2012.

BATTAGLIOLI, G.; MARTIN, D. L. Glutamine stimulates gamma-aminobutyric acid synthesis in synaptosomes but other putative astrocyte-to-neuron shuttle substrates do not. **Neuroscience Letters**, v. 209, n. 2, p. 129-133, 1996.

BAUMGARD, L. H.; HAUSMAN, G. J.; SANZ FERNANDEZ, M. V. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 76-84, 2016.

BECK, S. A.; TISDALE, M. J. Effect of insulin on weight loss and tumour growth in a cachexia model. **British Journal of Cancer**, v. 59, n. 5, p. 677-681, 1989.

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.

BENNY KLIMEK, M. E.; AYDOGDU, T.; LINK, M. J.; PONS, M.; KONIARIS, L. G.; ZIMMERS, T. A. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 3, p. 1548-1554, 2010.

BERG, M.; FRAKER, D. L.; ALEXANDER, H. R. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**, v. 6, n. 4, p. 425-32, 1994.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H. U. (Editor), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York: Academic Press, v. 2, p. 1205-1215, 1974.

BERGSTRÖM, J.; FÜRST, P.; NORÉE, L. O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **Journal of Applied Physiology**, v. 36, n. 6, p. 693-697, 1974.

BÉZAIRE, V.; LANGIN, D. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. **Proceedings Of The Nutrition Society**, v. 68, p. 350-360, 2009.

BIOLO, G.; ZORAT, F.; ANTONIANI, R.; CIOCCHI, B. Muscle glutamine depletion in the intensive care unit. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2169-2179, 2005.

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.; YANCOPOULOS, G. D. 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.

BOYLE, P. J.; CRYER, P. E. Growth hormone, cortisol, or both are involved in defense against, but are not critical to recovery from, hypoglycemia. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. E395-E402, 1991.

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.

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

BRASAEMLE, D. L.; RUBIN, B.; HARTEN, I. A.; GRUIA-GRAY, J.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 38486-38493, 2000.

BRENNAN L.; CORLESS M.; HEWAGE C.; MALTHOUSE J. P. G.; MCCLENAGHAN N. H.; FLATT P. R.; NEWSHOLME P. ¹³C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and gamma-glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic b-cell line. **Diabetologia**, v. 46, p. 1512–1521, 2003.

BURNETTE, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981

BUSQUETS, S.; TOLEDO, M.; ORPÍ, M.; MASSA, D.; PORTA, M.; CAPDEVILA, E.; PADILLA, N.; FRAILIS, V.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; HAN, H. Q.; ARGILÉS, J. M. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 1, p. 37-43, 2012.

CAHILL, G. F.; AOKI, E. E.; BRENNAN, M. F.; MULLER, W. A. Insulin and muscle amino acid balance. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 31, p. 233–238, 1972.

CAO, D.X.; WU, G.H.; YANG, Z. A.; ZHANG, B.; JIANG, Y.; HAN, Y. S.; HE, G. D.; ZHUANG, Q. L.; WANG, Y. F.; HUANG, Z. L.; XI, Q. L. Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. **Cancer Science**, v. 101, p. 1639-1645, 2010.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, v. 57, n. 2-4, p. 91-97, 2012.

CARVALHEIRA, J. B. C.; SILOTO, R. M.; IGNACCHITTI, I.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R.; LEITE, A.; VELLOSO, L. A.; GONTIJO, J. A.; SAAD, M. J. A. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Letters**, v. 500, p. 119-124, 2001.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T.; 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 Function**, v. 30, n. 4, p. 265-270, 2012.

CHAKRABARTI, P.; KANDROR, K. V. Adipose triglyceride lipase: a new target in the regulation of lipolysis by insulin. **Current Diabetes Reviews**, v. 7, p. 270-277, 2011.

CHAKRABARTI, P.; KIM, J. Y.; SINGH, M.; SHIN, Y. K.; KIM, J.; KUMBRINK, J.; WU, Y.; LEE, M. J.; KIRSCH, K. H.; FRIED, S. K.; KANDROR, K. V. Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 18, p. 3659-3666, 2013.

CHEN, S. Z.; QIU, Z. G. Combined treatment with GH, insulin, and indomethacin alleviates cancer cachexia in a mouse model. **Journal of Endocrinology**, v. 208, n. 2, p. 131-136, 2011.

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.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

COPELAND, G. P.; LEINSTER, S. J.; DAVIS, J. C.; HIPKIN, L. J. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 74, p. 1031-1035, 1987.

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

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M. F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F. M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 700-706, 1999.

COSTELLI, P.; MUSCARITOLI, M.; BONETTO, A.; PENNA, F.; REFFO, P.; BOSSOLA, M.; BONELLI, G.; DOGLIETTO, G. B.; BACCINO, F. M.; ROSSI, FANELLI, F. Muscle

myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n. 7, p. 531-538, 2008.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 392-401, 2005.

CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 428-433, 2009.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell Biochemistry Function**, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2010.

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

DA ROCHA, A. F.; LIBONI, T. F.; KURAUTI, M. A.; DE SOUZA, C. O.; MIKSZA, D. R.; MOREIRA, C. C.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Tumor necrosis factor alpha abolished the suppressive effect of insulin on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by cAMP. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 3, p. 380-385, 2014.

DAS, S. K.; EDER, S.; SCHAUER, S.; DIWOKY, C.; TEMMEL, H.; GUERTL, B.; GORKIEWICZ, G.; TAMILARASAN, K. P.; KUMARI, P.; TRAUNER, M.; ZIMMERMANN, R.; VESELY, P.; HAEMMERLE, G.; ZECHNER, R.; HOEFLER, G. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. **Science**, v. 333, p. 233-238, 2011.

DE FEO, P.; PERRIELLO, G.; TORLONE, E.; VENTURA, M. M.; FANELLI, C.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; GERICH, J. E.; BOLLI, G. B. Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. E35-E42, 1989.

DE MORAIS, H.; CASSOLA, P.; MOREIRA, C. C.; BÔAS S. K.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, n. 1-2, p. 9-16, 2012.

DE SOUZA, C. O.; KURAUTI, M. A.; DE FATIMA SILVA, F.; DE MORAIS, H.; BORBA-MURAD, G. R.; DE ANDRADE, F. G.; DE SOUZA, H. M. Effects of celecoxib and ibuprofen on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 399, n. 1-2, p. 237-246, 2015a.

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, 1659-1669, 2015b.

DECHELOTTE, P.; HASSELMANN, M.; CYNOBER, L.; ALLAOUCHICHE, B.; COËFFIER, M.; HECKETSWEILER, B.; MERLE, V.; MAZEROLLES, M.; SAMBA, D.; GUILLOU, Y. M.; PETIT, J.; MANSOOR, O.; COLAS, G.; COHENDY, R.; BARNOUD, D.; CZERNICHOW, P.; BLEICHNER, G. L-Alanyl-Lglutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 598-604, 2006.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 2, p. 142-8, 2007.

DUCHARME, N. A.; BICKEL, P. E. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. **Endocrinology**, v. 149, p. 942-949, 2008.

ELKINA, Y.; VON, HAEHLING, S.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

FAHR, M. J.; KORNBLUTH, J.; BLOSSOM, S.; SCHAEFFER, R.; KLIMBERG, V. S. Harry M. Vars Research Award. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 471-476, 1994.

FAKUDA, M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? **Bioscience Reports**, v. 31, n. 3, p. 159-168, 2011.

FEARON, K.; STRASSER, F.; ANKER, S. D.; BOSAEUS, I.; BRUERA, E.; FAINSINGER, R. L.; JATOI, A.; LOPRINZI, C.; MACDONALD, N.; MANTOVANI, G.; DAVIS, M.; MUSCARITOLI, M.; OTTERY, F.; RADBRUCH, L.; RAVASCO, P.; WALSH, D.; WILCOCK, A.; KAASA, S.; BARACOS, V. E. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489-495, 2011.

FEARON, K. C.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153-166, 2012.

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **The American Journal of Physiology**, v. 258, p. E1033-6, 1990.

FERNANDES, L. C.; CARPINELLI, A. R.; HELL, N. S.; CURI, R. Improvement of Cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Therapy and Control**, v. 1, p. 259-268, 1991.

FERNANDES, L. C.; MATTOZO, C. A.; MACHADO, U. F.; ROSA, L. F.; CURI, R. Insulin treatment can abolish changes in glucose and glutamine metabolism of lymphocytes and macrophages caused by the implantation of the Walker 256 tumour. **Cell Biochemistry and Function**, v. 14, n. 3, p. 187-192, 1996.

FLIER, J. S. Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337-350, 2004.

FRISINA, J. P.; GAUDIERI, S.; CABLE, T.; KEAST, D.; PALMER, T. N. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, n. 1, p. 36-41, 1994.

FUCHS, B. C.; BODE, B. P. Stressing out over survival: Glutamine as an Apoptotic modulator. **Journal Surgery Research**, v. 131, p. 26-40, 2006.

FÜRST, P.; POGAN, K.; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. **Nutrition**, v. 13, p. 731-737, 1997.

FÜRST, P.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P. Why should a single nutrient – glutamine – improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, p. 3-15, 2004.

GELFAND, R. A.; BARRETT, E. J. Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, p. 1-6, 1987.

GELIN, J.; MOLDAWER, L. L.; LÖNNROTH, C.; LÃ, C.; SHERRY, B.; CHIZZONITE, R.; LUNDHOLM, K. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. **Cancer Research**, v. 15, p. 415-421, 1991.

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

GOULART-SILVA, F.; TEIXEIRA, S. D. A. S.; LUCHESSI, A. D.; DOS SANTOS, L. R.; REBELATO, E.; CARPINELLI, A. R.; NUNES, M. T. Potential contribution of translational factors to triiodo-L-thyronine-induced insulin synthesis by pancreatic beta cells. **Thyroid**, v. 22, n. 6, p. 637-642, 2012.

GREENWOOD, F. C.; LANDON, J.; STAMP, T. C. The plasma sugar, free fatty acid, cortisol, and growth hormone response to insulin. I. In control subjects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 4, p. 429-36, 1966.

GRIFFITHS, R. D. The evidence for glutamine use in the critically-ill. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 403-410, 2001.

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, p. 173-178, 1982.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, p. 1790-1798, 1974.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**, Academic Press, New York, p. 1464-1472, 1974.

HASSELGREN, P. O.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 1-10, 2002.

HASSELGREN, P. O.; ALAMDARI, N.; AVERSA, Z.; GONNELLA, P.; SMITH, I. J.; TIZIO, S. Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 4, p. 423-428, 2010.

HIRAI, K.; ISHIKO, O.; TISDALE, M. Mechanism of depletion of liver glycogen in cancer cachexia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 1, p. 49-52, 1997.

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, p. 5-11, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 4854-4858, 1994.

HUANG, Y.; LI, N.; LIBONI, K.; NEU, J. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells through a non-NF-kappaB p50 mechanism. **Cytokine**, v. 22, p. 77-83, 2003.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? **Cancer Research**, v. 59, n. 18, p. 4493-4501, 1999.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: Current issues in research and management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, p. 72-91, 2002.

JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; DUNCAN, R. E.; AHMADIAN, M.; SUL, H. S. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, p. G1-G4, 2007.

JEONG, J. Y.; LEE, D. H.; KANG, S. S. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. **Endocrinology and Metabolism (Seoul)**, v. 28, n. 4, p. 288-296, 2013.

KAIBARA, A.; YOSHIDA, S.; YAMASAKI, K.; ISHIBASHI, N.; KAKEGAWA T. Effect of glutamine and chemotherapy on protein metabolism in tumor bearing rats. **Journal Surgery Research**, v. 57, p. 143-149, 1994.

KANE, S.; ASNO, H.; LIU, S. C.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; GARNER, C. C.; LIENHARD, G. E. A method to identify serine kinase substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 25, p. 22115-22118, 2002.

KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M. Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible

mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, 1995.

KERSHAW, E. E.; HAMM, J. K.; VERHAGEN, L. A.; PERONI, O.; KATIC, M.; FLIER, J. S. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. **Diabetes**, v. 55, p. 148-157, 2006.

KHAN, S.; TISDALE, M. J. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. **International Journal of Cancer**, v. 80, n. 3, p. 444-447, 1999.

KIM, H. J.; HIGASHIMORI, T.; PARK, S. Y.; CHOI, H.; DONG, J.; KIM, Y. J.; NOH, H. L.; CHO, Y. R.; CLINE, G.; KIM, Y. B.; KIM, J. K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1060-1067, 2004.

KIM, J. Y.; TILLISON, K.; LEE, J. H.; REARICK, D. A.; SMAS, C. M. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. E115-E127, 2006.

KLIMBERG, V. S.; SOUBA, W. W.; DOLSON, D. J. Oral glutamine supports crypt cell turnover and accelerates intestinal healing following abdominal radiation. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 13, p. 11, 1989.

KLIMBERG, V. S.; SOUBA, W. W.; SALLOUM, R. M.; PLUMLEY, D. A.; COHEN, F. S.; DOLSON, D. J.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. 3rd. Glutamine-enriched diets support muscle glutamine metabolism without stimulating tumor growth. **Journal of Surgical Research**, v. 48, n. 4, p. 319-323, 1990.

KLIMBERG, V. S.; KORNBLUTH, J.; CAO, Y.; DANG, A.; BLOSSOM, S.; SCHAEFFER, R. F. Glutamine Suppresses PGE2 Synthesis and Breast Cancer Growth. **Journal of Surgical Research**, v. 63, 293-297, 1996.

KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 8, p. 622-634, 2000.

KRALISCH, S.; KLEIN, J.; LOSSNER, U.; BLUHER, M.; PASCHKE, R.; STUMVOLL, M.; FASSHAUER, M. Isoproterenol, TNF-alpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 240, p. 43-49, 2005.

LANGIN, D.; ARNER, P. Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 17, p. 314-320, 2006.

LAVOINNE, A.; HUSSON, A.; QUILLARD, M.; CHEDEVILLE, A.; FAIRAND, A. Glutamine inhibits the lowering effect of glucose on the level of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in isolated rat hepatocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, p. 537-543, 1996.

LIANG, H.; YIN, B.; ZHANG, H.; ZHANG, S.; ZENG, Q.; WANG, J.; JIANG, X.; YUAN, L.; WANG, C. Y.; LI, Z. Blockade of tumor necrosis factor (TNF) receptor type-1-mediated TNF- α signaling protected Wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 2943-2951, 2008.

LIMIERE, L. C. *A resposta secretora de ilhotas pancreáticas em ratos portadores de tumor Walker-256*. Monografia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

LIRA, F.S.; YAMASHITA, A. S; ROSA, J. C.; KOYAMA, C. H.; CAPERUTO, E. C.; BATISTA JR, M. L.; SEELAENDER, M.C. L. Exercise Training Decreases Adipose Tissue Inflammation in Cachectic Rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOBO, C.; RUIZ-BELLIDO, M. A.; ALEDO, J. C.; MÁRQUEZ, J.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. **Biochemical Journal**, v. 348, p. 257-261, 2000.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTEN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, v. 38, p. 4665–4670, 1978.

LUNDHOLM, K.; KÖRNER, U.; GUNNEBO, L.; SIXT-AMMILON, P.; FOULADIUN, M.; DANERYD, P.; BOSAEUS, I. Insulin treatment in cancer cachexia: effects on survival, metabolism, and physical functioning. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2699-2706, 2007.

LUNDSGAARD, E. On the mode of action of insulin. **Uppsala Läkareförenings Förhandlingar**, v. 45, p. 143-152, 1939.

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.

MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; GALLARDO-PÉREZ, J. C.; RALPH, S. J.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MORENO-SÁNCHEZ, R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1084-1101, 2009.

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

MASSAMBI, E. M.; BAZOTTE, R. R. Importância da glutamina na terapia nutricional. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v, 2, n. 3, p. 295-298, 1998.

MATTHYS, P.; BILLIAU, A. Cytokines and cachexia. **Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 763-770, 1997.

MAZUREK, S.; MICHEL, A.; EINGEBRODT, E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cells lines with high and low glycolytic rates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4941-4951, 1997.

MAZUREK, S.; BOSCHEK, C. B.; HUGO, F.; EINGEBRODT, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 4, p. 300-308, 2005.

MCTERNAN, P. G.; HARTE, A. L.; ANDERSON, L. A.; GREEN, A.; SMITH, S. A.; HOLDER, J. C.; BARNETT, A. H.; EGGO, M. C.; KUMAR, S. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1493-1498, 2002.

MEDINA, M. Á. Glutamine and cancer. **Journal of Nutrition**, v. 31, p. 2539S-2542S, 2001.

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.

MOLDAWER, L. L.; ROGY, M. A.; LOWRY, S. F. The role of cytokines in cancer cachexia. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, n. 6, p. 43S-49S, 1992.

MOLEY, J. F.; MORRISON, S. D.; NORTON, J. A. Insulin reversal of cancer cachexia in rats. **Cancer Research**, v. 45, n. 10, p. 4925-4931, 1985.

MOLEY, J. F.; MORRISON, S. D.; GORSCHBOTH, C. M.; NORTON, J. A. Body composition changes in rats with experimental cancer cachexia: improvement with exogenous insulin. **Cancer Research**, v. 48, n.10, p. 2784-2787, 1988.

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 tumour in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 1, p. 47-55, 2013.

MORIN, C. L.; SCHLAEPFER, I. R.; ECKEL, R. H. Tumor necrosis factor- α eliminates binding of NF- κ B and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 4, p. 1684-1689, 1994.

MOZES, S.; KUCHÁR, S.; BODA, K. Hypoglycaemia and food intake in rats given graduated doses of insulin. **Physiol Bohemoslov**, v.2, p. 159-164, 1977.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health ad disease. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 10, n. 6, 316-324, 1999.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 153-163, 2003.

NEWSHOLME, P.; CRUZAT, V.; ARFUSO, F.; KEANE, K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **Journal of Endocrinology**, v. 221, p. 105–120, 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-alpha expression in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 887-92, 1998.

NOGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; MATSUMOTO, A.; SVANINGER, G.; GELIN, J. Are cytokines possible mediators of cancer cachexia? **Surgery Today**, v. 26, n. 7, p. 467-75, 1996.

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

PANKSEPP, J.; BOOTH, D. A. Decreased feeding after injections of amino-acids into the hypothalamus. **Nature**, v. 233, n. 5318, p. 341-342, 1971.

PANKSEPP, J.; MEEKER, R. B. The role of GABA in the ventromedial hypothalamic regulation of food intake Original. **Brain Research Bulletin**, v. 5, n. 2, p. 453-460, 1980.

PARRY-BILLINGS, M.; EVANS, J.; CALDER, P. C.; NEWSHOLME, E. A. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? **Lancet**, v. 336, n. 8714, p. 523-525, 1990.

PATEL, A. B.; ROTHMAN, D. L.; CLINE, G. W.; BEHAR, K. L. Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex in vivo following acute GABA-transaminase inhibition. **Brain Research**, v. 919, n. 2, p. 207-220, 2001.

PATRA, S. K.; ARORA, S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 13-14, p. 1025-1034, 2012.

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

PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; DE SOUZA, C. T.; SCHENKA, A. A.; ZECCHIN, H. G.; VASSALLO, J.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E.; CARVALHEIRA, J. B. C.; CURI, R.; SAAD, M. J. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. **Diabetologia**, v. 50, p. 1949–1959, 2007.

REBECA, R.; BRACHT, L.; NOLETO, G. R.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ROCHA, M. E. M.; OLIVEIRA, M. B. M. Production of cachexia mediators by Walker-256 cells from ascitic tumors. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, p. 731–738, 2008.

REITZER, L. J.; WICE, B. M.; KENNEL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 8, p. 2669-2676, 1979.

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, p. 647-650, 1994.

ROMERO-CALVO, B.; OCÓN, P.; MARTÍNEZ-MOYA, M. D.; SUÁREZ, A.; ZARZUELO, O.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, F. S.; DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine – Relation to glutathiones metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 2002.

RUAN, H.; HACOEN, N.; GOLUB, T. R.; VAN PARIJS, L.; LODISH, H. F. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1319-1336, 2002.

RUAN, H.; LODISH, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . **Cytokine & Growth Factor Review**, v. 14, n. 5, p. 447-455, 2003.

RUBIN, H. Cancer Cachexia: its correlations and causes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5384-5389, 2003.

SAINI, A.; AL-SHANTI, N.; NASSER, A. S.; STEWART, C. E. H. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 6, p. 475-86, 2006.

SALOMÃO, E. M.; TONETO, A. T.; SILVA, G. O.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-rich diet and light aerobic training modulate GLUT4 expression and increase the glycogen content in the gastrocnemius muscle of Walker-256 tumour-bearing rats. **Journal of Physiochemical Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2014.

SANO, H.; KANE, S.; SANO, E.; MINEA, C. P.; ASARA, J.M.; LANE, W. S.; GARNER, C. W.; LIENHARD, G. E. Insulin-stimulated phosphorylation of Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. **The journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 14599-14602, 2003.

SCHAKMAN, O.; KALISTA, S.; BARBÉ, C.; LOUMAYE, A.; THISSEN, J. P. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2163-2172, 2013.

SCHINNER, S.; SCHERBAUM, W. A.; BORNSTEIN, S. R.; BARTHEL, A. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 6, p. 674-82, 2005.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, J. R. D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

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. 1353-62, 2001.

SHEWCHUK, L. D.; BARACOS, V. E.; FIELD, C. J. Dietary l-glutamine supplementation reduces the growth of the morris hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 158-166, 1997.

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

SILVA, J. L.; GIANNOCCO, G.; FURUYA, D. T.; LIMA, G. A.; MORAES, P. A.; NACHEF, S.; BORDIN, S.; BRITTO, L. R.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 240, n. 1-2, p. 82-93, 2005.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF-kappaB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**, v. 24, p. 583-589, 2005.

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

SOUBA, W. W. Glutamine and cancer. **Annals of Surgery**, v. 218, n. 6, p. 715-728, 1993.

SOUZA, S. C.; VARGAS, L. M. D.; YAMAMOTO, M. T.; LIEN, P.; FRANCIOSA, M. D.; MOSS, L. G. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor- α to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24665-24669, 1998.

SOUZA, S. C.; PALMER, H. J.; KANG, Y. H.; YAMAMOTO, M. T.; MULIRO, K. V.; PAULSON, K. E.; GREENBERG, A. S. TNF- α induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, p. 1077-1086, 2003.

START, C.; NEWSHOLME, E. A. As witch mechanism in the regulation of glycolysis and gluconeogenesis in rat liver. **FEBS Letters**, v. 6, p. 171-173, 1970.

STEFFENS, A. B. The influence of insulin injections and infusions on eating and blood glucose level in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 4, n. 5, p. 823-828, 1969.

TANSEY, J. T.; HUML, A. M.; VOGT, R.; DAVIS, K. E.; JONES, J. M.; FRASER, K. A.; BRASAEMLE, D. L.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Functional studies on native and

mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8401-8406, 2003.

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, p. 445–456, 1992.

THOMPSON, M. P.; COOPER, S. T.; PARRY, B. R.; TUCKEY, J. A. Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1180, p. 236–242, 1993.

TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 23, p. 1763-73, 1997.

TISDALE, M. J. Wasting in cancer. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 243-246, 1999.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438-42, 2001.

TISDALE, M. J. Pathogenesis of cancer cachexia. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 1, n. 3, p. 159-68, 2003.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, n. 4, p. 299-305, 2004.

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

TISDALE, M. J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 503-513, 2010.

TODOROVA, V. K.; HARMS, S. A.; KAUFMANN, Y.; et.al. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 88, n. 3, p. 247-256, 2004.

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.

TRINDER, P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

TSOLI, M.; SCHWEIGER, M.; VANIASINGHE, A. S.; PAINTER, A.; ZECHNER, R.; CLARKE, S.; ROBERTSON, G. Depletion of white adipose tissue in cancer cachexia syndrome is associated with inflammatory signaling and disrupted circadian regulation. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e92966, 2014.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 165-176, 2006.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; STECANELLA, L. A.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology**, v. 8, n. 3, p. 175-182, 2002.

VOORZANGER, N.; TOUITOU, R.; GARCIA, E.; ROUSSET, F.; JOAB, I.; FAVROT, M. C. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-hodgkin' s lymphoma cells and act as cooperative growth factors. **Cancer Research**, v. 56, p. 5499-5505, 1996.

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.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 39, p. 1157-1175, 1960.

YANG, J.; CHI, Y.; BURKHARDT, B. R.; GUAN, Y.; WOLF, B. A. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. **Nutrition Reviews**, v. 68, p. 270-279, 2010.

YOSHIDA, S.; MATSUI, M.; SHIROUZU, Y.; FUJITA, H.; YAMANA, H.; SHIROUZU, K. Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. **Annals of Surgery**, v. 227, n. 4, p. 485-491, 1998.

YOSHIDA, S.; KAIBARA, A.; ISHIBASHI, N.; SHIROUZU, K. Glutamine supplementation in cancer patients. **Nutrition**, v. 17, n. 9, p. 766-768, 2001.

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.

ZECHNER, R.; STRAUSS, J. G.; HAEMMERLE, G.; LASS, A.; ZIMMERMANN, R. Lipolysis: pathway under construction. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, p. 333-340, 2005.

ZHOU, X.; WANG, J. L.; LU, J.; SONG, Y.; KWAK, K. S.; JIAO, Q.; ROSENFELD, R.; CHEN, Q.; BOONE, T.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; GOLDBERG, A. L.; HAN, H.Q. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonist leads to prolonged survival. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 531-543, 2010.