



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA OLIVEIRA DE SOUZA

**EFEITO DO CELECOXIBE E DO IBUPROFENO NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL E EM VÁRIAS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR
WALKER-256 EM RATOS**

CAMILA OLIVEIRA DE SOUZA

**EFEITO DO CELECOXIBE E DO IBUPROFENO NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL E EM VÁRIAS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR
WALKER-256 EM RATOS**

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

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

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729e Souza, Camila Oliveira de.
Efeito do celecoxibe e do ibuprofeno no desenvolvimento tumoral e em
várias alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em
ratos/ Camila Oliveira de Souza. – Londrina, 2013.
76 f.: il.

Orientador: Loredana Limoli.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.
Inclui bibliografia

1. Agentes antiinflamatórios – Efeito fisiológico – Teses. 2. Distúrbios do
metabolismo – Teses. 3. Câncer – Teses. 4. Caquexia – Teses. I. Souza,
Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

CDU 612:615.276

CAMILA OLIVEIRA DE SOUZA

**EFEITO DO CELECOXIBE E DO IBUPROFENO NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL E EM VÁRIAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256 EM RATOS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rui Curi
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 22 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho a pessoa que sempre me apoiou e acreditou no meu sucesso, que me ensinou a viver a vida com alegria e a enfrentar todos os problemas com bom humor e positividade, uma amiga muito especial, que sempre será para mim uma heroína, exemplo de fé, força, coragem e altruísmo, minha mãe, Luzia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Ao meu pai, Cordovil, pelo amor, carinho, amizade e pelos sábios conselhos que orientaram minha vida, me incentivando a acreditar em sonhos e buscar o sucesso.

À minha irmã, Isabela, minha querida amiga, que me fez ser forte e responsável nas ocasiões propícias, mas que também sempre me confortou, apoiou e me trouxe muita alegria nestes anos de mestrado.

Ao meu namorado Fernando, um grande companheiro, amigo e confiante, agradeço pela paciência, pelos momentos de felicidade e por estar ao meu lado mesmo em meio a problemas, dificuldades ou em ocasiões tristes.

À Helenir, mais que minha orientadora, uma segunda mãe, uma pessoa exemplar que me estendeu o braço na hora mais turbulenta de minha vida, que sempre me incentivou e me fez acreditar em mim mesma. Obrigada Helenir por todo o seu carinho, preocupação, e principalmente por poder sempre contar com sua ajuda e seus conselhos.

À Gláucia, minha querida amiga e co-orientadora, por ser um exemplo de fé, força e humildade e por transformar nosso ambiente de trabalho em um lar com sua bondade e alegria contagiante.

À todas as meninas do laboratório, principalmente a Flaviane, Hely e Mirian, que me ajudaram na elaboração deste trabalho. Agradeço pela parceria, amizade dentro e fora do laboratório e pelos momentos de descontração, que acabaram tornando as horas de trabalho mais leves e com certeza mais produtivas.

Ao professor Fábio, por me ensinar e ajudar com toda a parte histológica deste trabalho e ao Departamento de Histologia da UEL, pelo apoio estrutural.

Ao professor Rui Curi, por abrir a portas de seu laboratório para mim e por me ajudar a chegar na próxima etapa de vida acadêmica. Agradeço também ao Sandro e a Hosana, que me receberam no laboratório do professor Rui e me ajudaram em tudo que foi necessário.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas pelo apoio estrutural.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

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

"A coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo"

Nelson Mandela

SOUZA, Camila Oliveira de. **Efeito do celecoxibe e do ibuprofeno no desenvolvimento tumoral e em várias alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos.** 2013. 76 f. Dissertação (Mestre em Ciências Fisiológicas) - Londrina, 2013.

RESUMO

Alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) reduzem o crescimento tumoral e algumas alterações metabólicas da caquexia do câncer. O efeito antitumoral dos AINES são atribuídos a inibição da ciclooxigenase 2 (COX2) e prostaglandina E₂ (PGE₂) ou a mecanismos independentes da inibição desta via. Já os efeitos benéficos dos AINES nas alterações metabólicas da caquexia do câncer parecem ser decorrentes da redução do crescimento tumoral e/ou da síntese de prostaglandinas. O propósito deste trabalho foi investigar o efeito dos AINES, celecoxibe (inibidor seletivo da COX2) ou ibuprofeno (inibidor da COX1 e COX2), no desenvolvimento tumoral e em várias alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos. O celecoxibe (25 mg/Kg) ou ibuprofeno (25 mg/Kg) foi administrado por via oral, uma vez ao dia, iniciando no mesmo dia em que as células tumorais Walker-256 foram inoculadas nos ratos. Após 12 dias de tratamento, o crescimento tumoral, a área de necrose do tumor, os sinais de apoptose das células Walker-256, a ingestão alimentar, massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal, massa do músculo gastrocnêmio e extensor digital longo, as concentrações plasmáticas de triacilglicerol, lactato, ureia e glicose, a resposta periférica a insulina, a glicólise e neoglicogênese hepática, o infiltrado leucocitário no fígado e a concentração hepática de adenosina trifosfato (ATP) foram investigados. A resposta periférica à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância a insulina, a glicólise e neoglicogênese em perfusão de fígado *in situ*. O tratamento com celecoxibe reduziu o crescimento do tumor Walker 256, aumentou a área de necrose do tumor e os sinais de apoptose das células Walker-256. O tratamento com celecoxibe também reduziu a perda de massa corporal, tecido adiposo retroperitoneal, músculo gastrocnêmio e extensor digital longo, os níveis plasmáticos elevados de triacilglicerol, ureia e lactato, a inibição da resposta periférica a insulina e da glicólise hepática e o aumento do infiltrado leucocitário no fígado de ratos portadores de tumor, mas não teve efeito na redução da ingestão alimentar e glicemia induzida pelo tumor Walker-256. Em contraste, o tratamento com ibuprofeno não reduziu o crescimento tumoral e nem melhorou nenhum destes parâmetros afetados pelo tumor Walker-256. Além disso, tanto o celecoxibe como o ibuprofeno reverteram a inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e lactato e aumentaram a concentração de ATP no fígado de ratos portadores de tumor Walker-256. Pode ser concluído que o celecoxibe, mas não o ibuprofeno, reduziu o crescimento tumoral e melhorou vários parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256, sugerindo que o efeito antitumoral do celecoxibe foi mediado por mecanismos independentes da inibição de COX2 e PGE₂, e seu efeito nas alterações metabólicas ocorreram por redução do crescimento tumoral e não por inibição da síntese de PGE₂. Além disso, o celecoxibe e ibuprofeno reverteram a inibição da neoglicogênese hepática, independente de seus efeitos no crescimento tumoral, demonstrando o papel central das prostaglandinas na inibição da neoglicogênese em ratos portadores de tumor Walker-256.

Palavras-chave: Câncer. Caquexia. Prostaglandinas. Anti-inflamatórios não esteroidais. Alterações metabólicas. Perfusão de fígado.

SOUZA, Camila Oliveira de. **Celecoxib and ibuprofen effect on tumor development and various metabolic changes induced by tumor-256 in rats.** 2013. 76 p. (Dissertation) Masters in Physiological Sciences - Londrina, 2013.

ABSTRACT

Some anti-inflammatory drugs (NSAIDs) reduce tumor growth and some metabolic changes in cancer cachexia. The NSAIDs antitumor effect is attributed to cyclooxygenase 2 (COX2) and prostaglandin E₂ (PGE₂) inhibition, or independent mechanisms of this pathway inhibition. The AINES benefits effects on metabolic changes seem to be due tumor growth reduction and/or prostaglandins synthesis reduction. This study purpose was to investigate the NSAIDs, celecoxib (selective COX2 inhibitor) or ibuprofen (COX1 and COX2 inhibitor) effects on tumor development and various metabolic changes induced by Walker-256 tumor in rats. Celecoxib (25 mg/kg) or ibuprofen (25 mg/kg) was administered orally, once a day, beginning at same day on which Walker-256 tumor cells were inoculated in rats. After 12 days of treatment, tumor growth, tumor necrosis area, cells Walker-256 apoptosis signals, food intake, body weight, retroperitoneal adipose tissue mass, gastrocnemius muscle mass, long digital extensor muscle mass, triacylglycerol, lactate, urea and glucose plasma concentrations, peripheral insulin response, gluconeogenesis, glycolysis, leukocyte infiltrate and adenosine triphosphate (ATP) concentrations in liver were investigated. The peripheral insulin response was evaluated by insulin tolerance test, glycolysis and gluconeogenesis *in situ* liver perfusion. The celecoxib treatment reduced Walker-256 tumor development, increased tumor necrosis area and Walker-256 cells apoptosis signals. Celecoxib treatment also reduced the loss of body mass, retroperitoneal adipose tissue mass, gastrocnemius muscle and long digital extensor muscle mass, the triacylglycerol, urea and lactate high plasma levels, the peripheral response to insulin and hepatic glycolysis inhibition, and the increased leukocyte infiltrate in Walker-256 tumor-bearing rats liver, but had no effect on food intake and blood glucose levels reduced by tumor. In contrast, ibuprofen treatment doesn't reduced tumor development or improved any of these parameters affected by Walker-256 tumor. Furthermore, both celecoxib and ibuprofen reversed gluconeogenesis from alanine, pyruvate and lactate inhibition, increased ATP concentration reduced in Walker -256 tumor-bearing rats liver. It can be concluded that celecoxib, but not ibuprofen, reduced tumor development and improved several metabolic parameters affected by tumor Walker-256, suggesting that celecoxib antitumoral effect was mediated by COX2 and PGE₂ inhibition independent mechanisms and their effects on metabolic changes occurred by tumor growth reduction rather than PGE₂ synthesis inhibition. In addition, celecoxib and ibuprofen reversed the hepatic gluconeogenesis inhibition, independently of their effects on tumor growth, demonstrating the prostaglandins central role in gluconeogenesis inhibition on Walker-256 tumor-bearing rats.

Key words: Cancer. Cachexia. Prostaglandins. Non-steroidal anti-inflammatory. Metabolic changes. Liver perfusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Massa tumoral de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	35
Figura 2 –	Áreas de necrose do tumor e sinais de apoptose de células Walker-256 de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	36
Figura 3 –	Ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	38
Figura 4 –	Ganho de massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal, massa do músculo gastrocnêmio e massa do músculo EDL de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	39
Figura 5 –	Concentrações plasmáticas de triacilglicerol, uréia, lactato e glicose de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	41
Figura 6 –	Glicemia e constante de decaimento da glicose após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	43
Figura 7 –	Produção de piruvato e lactato, glicólise e as respectivas áreas sob as curvas em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	45
Figura 8 –	Número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	47

Figura 9 – Produção de glicose a partir da alanina e respectivas áreas sob as curvas em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	49
Figura 10 – Produção de piruvato, lactato e ureia a partir da alanina e as respectivas áreas sob as curvas em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	50
Figura 11 – Produção de glicose a partir do piruvato e respectivas áreas sob as curvas em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados	51
Figura 12 – Produção de glicose a partir do lactato e respectivas áreas sob as curvas em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	52
Figura 13 – Concentração de ATP em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe ou ibuprofeno durante 12 dias ou não tratados.....	53
Figura 14 – Neoglicogênese a partir da alanina, piruvato, lactato e glicerol, e as principais enzimas que regulam a via.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AKT ou PKB	Proteína cinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
COX	Cicloxygenase
CPT	Carnitina palmitoil transferase
EDL	Extensor digital longo
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HIF-1 α	Subunidade α do fator induzido por hipóxia 1
HIF-1 β	Subunidade β do fator induzido por hipóxia 1
IKK	Cinase da ikb
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
KHB	Krebs/Henseleit-bicarbonato
KITT	Constante de decaimento da glicose
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipase de lipoproteína
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
NF κ B	Fator nuclear kb
PBS	Tampão salina-fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PIF	Fator indutor de proteólise
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF α	Fator de necrose tumoral α
UCP	Proteína desacopladora
WK	Ratos portadores de tumor Walker-256

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	20
2.1. Gerais	20
2.2. Específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Drogas	22
3.2. Animais	22
3.3. Implantação do tumor Walker-256	23
3.4. Protocolo de tratamento	23
3.5. Avaliação do crescimento tumoral, necrose do tumor e apoptose de células Walker-256	24
3.6. Avaliação da anorexia, caquexia e de parâmetros metabólicos plasmáticos	25
3.7. Avaliação da resposta periférica a insulina	26
3.8. Avaliação da glicólise e neoglicogênese hepática	26
3.9. Avaliação no número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático	29
3.10. Avaliação da concentração hepática de ATP	29
3.11. Procedimentos analíticos	29
<i>3.11.1. Determinação da concentração do triacilglicerol</i>	29
<i>3.11.2. Determinação da concentração de ureia</i>	30
<i>3.11.3. Determinação da concentração de lactato</i>	30
<i>3.11.4. Determinação da concentração de glicose</i>	31
<i>3.11.5. Determinação da concentração de piruvato</i>	31
<i>3.11.6. Determinação da concentração de ATP</i>	31
3.12. Procedimentos estatísticos	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno no crescimento tumoral, necrose do tumor e apoptose de células Walker-256	34

4.2. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno nos parâmetros relacionados a anorexia e caquexia	37
4.3. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno nos parâmetros metabólicos plasmáticos.....	40
4.4. Efeito do celecoxibe ou do ibuprofeno na resposta periférica a insulina	42
4.5. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na glicólise hepática a partir da glicose exógena	44
4.6. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno no número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático.....	46
4.7. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na neoglicogênese hepática a partir da alanina, piruvato e lactato	48
4.8. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na concentração de ATP	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	68

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A incidência mundial de neoplasias vem crescendo ao longo dos anos. Em 2008, foram atribuídos quase 8 milhões de óbitos por câncer e estimativas da organização mundial da saúde (WHO, 2013) apontam que ocorrerão cerca de 13 milhões de mortes por câncer em 2030. Décadas atrás foi proposto que o crescimento tumoral não era o único responsável por estes óbitos (BRENNAN, 1981). Atualmente, cerca de 40% das mortes ocorridas em pacientes com câncer são atribuídas às complicações decorrentes da síndrome caquética (TISDALE, 2010).

A caquexia é definida como uma síndrome metabólica complexa associada a uma doença crônica e caracterizada por perda de massa muscular com ou sem perda de massa adiposa, frequentemente associada com anorexia, inflamação e resistência insulínica (EVANS *et al.*, 2008). Esta síndrome é caracterizada também por outras anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (TISDALE, 2009).

As alterações metabólicas observadas na caquexia associada ao câncer resultam de complexas interações entre o tumor e o hospedeiro (SKIPWORTH *et al.*, 2007). Fatores produzidos pelas células neoplásicas e células do hospedeiro, em resposta a presença do tumor, desempenham papel importante no desenvolvimento da caquexia e nas alterações metabólicas observadas nesta síndrome, e por essa razão são denominados de mediadores da caquexia (TISDALE, 2005).

Os mediadores da caquexia atuam em múltiplos alvos, como adipócitos, miócitos, hepatócitos, medula óssea, células endoteliais e neurônios, induzindo uma complexa cascata de respostas biológicas que culminam em progressiva perda de peso, anorexia, anemia, astenia, depleção de estoque de lipídeos, severa perda protéica do músculo esquelético, resistência à insulina e várias outras alterações metabólicas (TISDALE, 2009).

Dentre os mediadores da caquexia produzidos pelas células tumorais encontram-se o fator mobilizador de lipídeos (LMF), que estimula a lipólise e degrada diretamente o tecido adiposo, e o fator indutor de proteólise (PIF), que induz

a proteólise no músculo esquelético e reduz a síntese proteica muscular (TISDALE, 2010).

Outras moléculas consideradas mediadoras da caquexia, produzidas pelo tumor ou liberadas por células do sistema imune em resposta à presença do tumor, são as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (TISDALE, 2010). Estudos mostraram que a administração isolada ou combinada de TNF α , IL-6 e IL-1 reproduziram a síndrome anorexia-caquexia observada no câncer (INUI, 2002).

O TNF α é a principal citocina responsável pela depleção do tecido adiposo (WARNE, 2003) e parece estimular a proteólise do músculo esquelético (ARGILÉS *et al.*, 2006) e reduzir a ingestão de alimentos (ARRUDA *et al.*, 2010). Adicionalmente, por interferir diretamente na cascata de sinalização da insulina (KANETY *et al.*, 1995; WARNE, 2003), o TNF α reduz a transmissão do sinal insulínico (ZHANG *et al.*, 2007) e conseqüentemente os efeitos da insulina, podendo contribuir para a resistência insulínica e o aumento do catabolismo em portadores de câncer (HONORS & KINZIG, 2012). Já a IL-6 é apontada como a principal promotora do catabolismo muscular (BONETTO *et al.*, 2011; CARSON & BALTGALVIS, 2011) e esta citocina também está relacionada à redução da ingestão alimentar (Ramos *et al.*, 2004) e à resistência insulínica na caquexia do câncer (TISDALE, 2005). Da mesma forma que o TNF α e a IL-6, a IL-1 reduz a ingestão alimentar e parece ser a principal citocina relacionada ao desenvolvimento da anorexia associada ao câncer (PATRA & ARORA, 2012).

As citocinas também parecem estar envolvidas nas alterações metabólicas hepáticas em portadores de câncer. A administração isolada ou combinada de TNF- α e IL-1 β em baixas doses (10 μ g/Kg) inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006). Em concordância, um estudo de nosso laboratório mostrou que a administração de TNF α (10 μ g/Kg) inibiu a neoglicogênese a partir da alanina e do lactato, porém, não a partir da glutamina ou do glicerol (DA ROCHA *et al.*, 2013). Além disso, o TNF α , a IL-6 e IL-1 β parecem reduzir a atividade de enzimas chave da via neoglicogênica, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e piruvato carboxilase (QUAAS *et al.*, 2005; KELMER-BRACHT *et al.*, 2006; FEINGOLD *et al.*, 2012). Contudo, não há consenso na literatura sobre o efeito das citocinas na neoglicogênese nos

portadores de câncer, pois em altas doses o TNF- α (150 μ g/Kg) aumentou a neoglicogênese a partir da alanina (BLUMBERG *et al.*, 1996), e *in vitro* a IL-6 aumentou a neoglicogênese de maneira dose dependente (BLUMBERG *et al.*, 1995). Assim, esses relatos permitem inferir que o efeito das citocinas na neoglicogênese parece depender da sua concentração, a qual nos portadores de câncer pode variar com o estágio de desenvolvimento do tumor, tamanho e tipo de tumor.

Embora o LMF, PIF, TNF α , IL-1 e IL-6 parecem ser os principais mediadores dos distúrbios metabólicos em portadores de câncer, é possível que as prostaglandinas, principalmente a prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual está aumentada no plasma e tecido tumoral de ratos portadores de tumor Yoshida (TESSITORE *et al.*, 1993) e Walker-256 (SIDDIQUI & WILLIAMS, 1989), possam desempenhar algum papel no desenvolvimento das alterações metabólicas e da caquexia do câncer (SIDDIQUI & WILLIAMS, 1989; TESSITORE *et al.*, 1993; ROSS & FEARON, 2002; DAVIS *et al.*, 2004).

A biossíntese de prostaglandinas ocorre em diversos tecidos e se inicia quando a membrana celular é ativada, dentre outros, por estímulos inflamatórios e citocinas, ativando a enzima chave do processo, a cicloxigenase (COX), a qual possui duas isoformas: a cicloxigenase 1 (COX1) e a cicloxigenase 2 (COX2). A COX1 é uma enzima constitutiva, presente em praticamente todos os tipos celulares e responsável pela síntese basal de prostaglandina, enquanto a COX2 é a isoforma induzida pelo processo inflamatório, e por esta razão está diretamente relacionada à síntese de PGE₂, uma prostaglandina com caráter pró-inflamatório (FUNK, 2001).

A PGE₂ aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias mediadoras da caquexia (TNF α , IL-1 e IL-6) (ROSS & FEARON, 2002; WANG & DUBOIS, 2010; WANG *et al.*, 2011), estimula a lipólise (KOLDITZ & LANGIN, 2010) e a proteólise (ATTAIX *et al.*, 1999), degradando o tecido adiposo e muscular esquelético. A PGE₂ também reduz a ingestão alimentar (LEVINE & MORLEY, 1981) e diminui a liberação e a sinalização da insulina (ROBERTSON *et al.*, 1987; SEAQUIST *et al.*, 1989; LIU *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2011).

Além destes efeitos catabólicos, a PGE₂ favorece o desenvolvimento de tumores, pois ativa a via de sinalização proteína cinase B (Akt ou PKB)/fator nuclear kappa B (NF κ B), que estimula a proliferação e inibe a apoptose de células

tumorais (WANG & DUBOIS, 2010; WANG *et al.*, 2011), induz fatores angiogênicos (PAI *et al.*, 2001; CIANCHI *et al.*, 2004) e estimula a migração de células tumorais, contribuindo para o aparecimento de metástases (ATTIGA *et al.*, 2000; SHENG *et al.*, 2001).

Em concordância com estes efeitos da PGE₂, estudos mostraram que alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os quais diminuem a síntese de prostaglandinas por inibirem a COX1 e/ou COX2, reduziram o crescimento de vários tipos de tumores e amenizaram algumas alterações metabólicas da caquexia do câncer (HOMEM-DE-BITTENCOURT *et al.*, 1989; DAVIS *et al.*, 2004; ACCO *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2010).

O celecoxibe, por exemplo, um AINEs disponível em farmácias e amplamente utilizado, diminuiu o crescimento de vários tipos de tumores por inibir de modo altamente seletivo a COX-2 e a síntese de PGE₂ (DAVIS *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2010). Além disso, o celecoxibe reduziu o crescimento de outros tipos de tumores por ações pró-apoptóticas específicas, independente da inibição da via COX2/PGE₂ (KARDOSH *et al.*, 2005; GRÖSH *et al.*, 2006; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2010; BARLOW *et al.*, 2012).

Em contraste ao efeito antitumoral bem estabelecido do celecoxibe, o efeito do ibuprofeno, um AINEs inibidor da COX1 e COX2, no crescimento de tumores é controverso. Há estudos mostrando que o ibuprofeno diminuiu o crescimento de alguns tipos de tumores (ANDREWS *et al.*, 2002; QUANN *et al.*, 2007), porém não teve efeito sobre o crescimento de outros tipos de cânceres (McCARTHY, 1999; LI *et al.*, 2009).

Estudos do nosso laboratório mostraram que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam, além dos sinais característicos da síndrome da caquexia, como anorexia, perda de peso e redução da massa muscular e adiposa, uma série de alterações metabólicas, dentre as quais se encontram: redução da glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático; aumento do triacilglicerol, ácidos graxos livres, lactato e ureia plasmáticos; redução da glicólise e neoglicogênese hepática a partir da alanina, piruvato e lactato; diminuição da resposta hepática ao AMPc (adenosina monofosfato cíclico) no catabolismo do glicogênio e na glicólise e diminuição da resposta periférica à insulina, sugerindo resistência periférica a esse hormônio (CASSOLLA *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013).

Diante dos distúrbios metabólicos encontrados em ratos portadores de tumor Walker-256, do aumento da PGE₂ no câncer, dos efeitos catabólicos e tumorigênicos da PGE₂, e considerando que o efeito do ibuprofeno no crescimento tumoral é controverso e que os efeitos do celecoxibe e ibuprofeno em várias alterações metabólicas associadas à caquexia do câncer ainda não foram investigados seguem os objetivos do presente trabalho.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Avaliar o efeito do celecoxibe ou ibuprofeno no desenvolvimento tumoral e em vários parâmetros metabólicos afetados pelo tumor Walker-256 em ratos.

2.2. Específicos

Avaliar, em ratos portadores de tumor Walker-256, o efeito do celecoxibe ou ibuprofeno sobre:

- Crescimento tumoral, necrose do tumor e apoptose das células Walker-256;
- Parâmetros relacionados a anorexia (ingestão alimentar) e caquexia (massa corporal, adiposa e muscular);
- Parâmetros metabólicos plasmáticos (triacilglicerol, uréia, lactato e glicose);
- Resposta periférica a insulina;
- Glicólise hepática a partir da glicose exógena;
- Número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático;
- Neoglicogênese hepática a partir da alanina, piruvato e lactato;
- Concentração hepática de adenosina trifosfato (ATP).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Drogas

O celecoxibe (celebra®) foi adquirido da Pfizer (Guarulhos, Brasil) e o ibuprofeno da Medley (Campinas, Brasil). A insulina regular foi obtida da Eli Lilly (Rio de Janeiro, Brasil) e os sais do líquido de perfusão, os precursores neoglicogênicos e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Estados Unidos), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Reagen (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (220-230 g) alimentados com dieta padrão de laboratório (Nuvilab CR-1 Nuvital®, Colombo, Brasil). Os animais 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 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas. Para a análise de cada parâmetro foram utilizados de 5 a 30 animais por grupo, nos seguintes grupos:

- *Grupo saudável*: ratos saudáveis submetidos à administração oral diária de água por 12 dias.
- *Grupo Walker-256 (WK)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à administração oral diária de água por 12 dias.
- *Grupo Walker-256 tratado com celecoxibe (WK+celecoxibe)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à administração oral diária de celecoxibe por 12 dias.
- *Grupo Walker-256 tratado com ibuprofeno (WK+ibuprofeno)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à administração oral diária de ibuprofeno por 12 dias.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEA/UUEL), nº de registro 7801.

3.3. Implantação do tumor Walker-256

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma mamário de origem espontânea em ratas prenhes (AGOSTINO & CLIFFTON, 1967). Este tumor apresenta crescimento rápido e é capaz de se desenvolver na forma sólida ou ascítica (CALDAROLA *et al.*, 1968). A implantação do tumor Walker-256 é considerada um modelo adequado para estudar a síndrome anorexia/caquexia (GUAITANI *et al.*, 1982), já que em curto espaço de tempo verifica-se redução no peso do animal, anorexia e catabolismo acentuado de proteínas, lipídeos e carboidratos (CASSOLLA *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2012). Após 14 dias da implantação, a massa tumoral pode representar uma fração considerável da massa corporal do animal e sua morte ocorre após este período (VICENTINO *et al.*, 2002).

Neste trabalho, células Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0 \times 10^6$ células/animal. Após sete dias de crescimento ascítico, os animais, anestesiados com éter etílico, foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido a centrifugação diferencial a 4°C, para obtenção das células tumorais. As células tumorais foram ressuspensas em PBS (tampão fosfato 16,5 mM, conteúdo NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM), pH 7,4, e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer.

Os ratos portadores de tumor (grupos WK, WK+celecoxibe e WK+ibuprofeno) foram inoculados com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. No grupo saudável, foi inoculado PBS no mesmo local. Para este procedimento os animais foram previamente anestesiados com éter etílico.

3.4. Protocolo de tratamento

Ratos portadores de tumor Walker-256 foram tratados por via oral, uma vez ao dia (9:00 horas), durante 12 dias, iniciando no dia da inoculação das células tumorais, com 25 mg/Kg de celecoxibe ou 25 mg/Kg de ibuprofeno. O celecoxibe e ibuprofeno foram diariamente diluídos em água e os protocolos de tratamento, bem como as doses destes fármacos foram baseadas em estudos prévios (HOMEM-DE-BITTENCOURT *et al.*, 1989; ACCO *et al.*, 2007; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2010). Ratos controle portadores de tumor Walker-256 ou saudáveis (sem tumor) receberam água no lugar de celecoxibe ou ibuprofeno.

Em todos os experimentos, exceto naqueles onde a ingestão alimentar foi avaliada, os animais foram submetidos a 24 horas de privação alimentar, para prevenir a influência da anorexia e do menor conteúdo de glicogênio hepático presente nos ratos portadores de tumor, nos parâmetros avaliados.

Os experimentos foram realizados 12 dias após o início dos tratamentos, uma vez que ratos portadores de tumor Walker-256 sobrevivem em média 14 dias. Assim, após 12 dias de tratamento com água (grupo saudável e grupo WK), celecoxibe (grupo WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (grupo WK+ibuprofeno), os animais foram submetidos aos experimentos descritos a seguir.

3.5. Avaliação do crescimento tumoral, necrose do tumor e apoptose de células Walker-256

Para avaliação do crescimento tumoral, os tumores foram cuidadosamente retirados dos animais e pesados.

Para avaliação da área de necrose do tumor e apoptose das células tumorais foi realizada uma análise morfológica. Para esta avaliação os tumores foram retirados, lavados em PBS, seccionados por meio de cortes transversais de 5 mm de espessura e as fatias centrais foram fixadas em solução de Bouin aquoso (75 ml de solução aquosa de ácido pícrico, 25 mL de formol (40%) e 5 mL de ácido acético glacial), por 24 horas. Após este período, as fatias foram lavadas várias vezes em etanol 70% e armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, as fatias foram submetidas a sucessivos banhos em etanol 70%, 90%, 95%, até o etanol absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada banho, seguido por um banho em mistura homogênea de etanol e xilol por 30 minutos e três banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Por fim, as fatias foram impregnadas em paraplast (58°C, por 3 horas) e foram emblocadas. Os blocos foram submetidos à microtomia, com cortes consecutivos de 5,0 µm de espessura, e foram confeccionadas 5 lâminas de cada bloco, resultando em 20 a 30 lâminas por grupo de animais. As lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas com xilol, hidratadas em banhos decrescentes de etanol (100 a 70%) e água destilada, coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água corrente, e coradas com eosina durante 1 minuto (BEAUTLER *et al.*, 1995). Após a coloração, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%) e diafanizadas, primeiramente em álcool e xilol e posteriormente em xilol.

Ao final da preparação, foi feita a documentação fotográfica utilizando o sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao microscópio de luz. As imagens foram posteriormente analisadas no *software* Motic Image Plus 2.0 (Motic, Xiamen, China) no Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Londrina. Para cada lâmina foram capturadas 2 fotos, nas quais foram determinadas, por avaliação morfológica, a área de necrose (aumento de 100X) e a quantidade de sinais de apoptose, como fragmentação da heterocromatina, indefinição de contornos celulares e núcleos em processo de destruição (aumento de 400X).

3.6. Avaliação da anorexia, caquexia e de parâmetros metabólicos plasmáticos

Para a avaliação da ingestão alimentar, no 10º dia após a inoculação das células tumorais ou PBS (ratos saudáveis), os ratos foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas, contendo 30 g de ração e água à vontade. Após 24 horas (11º dia), a sobra da ração foi pesada e subtraída da quantidade ofertada inicialmente, para o cálculo da quantidade diária ingerida por 100 gramas de peso corporal (g%), de acordo com a equação a seguir, onde:

ia (g %) = ingestão alimentar em gramas por cento; ia (g) = ingestão alimentar em gramas; mc = massa corpórea do animal; mt = massa do tumor.

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

Em seguida, os animais foram submetidos à privação alimentar de 24 horas, e após este período, ou seja, no 12º dia, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação para coleta de amostras de sangue utilizadas na determinação de triacilglicerol, ureia, lactato e glicose plasmáticos. Posteriormente, o tumor, tecido adiposo retroperitoneal, músculo gastrocnêmio e músculo extensor digital longo (EDL) foram cuidadosamente retirados e pesados. O ganho de massa corporal foi calculado pela diferença entre a massa corporal final (dia 12) e inicial (dia 1), descontando a massa do tumor.

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 (g)= massa do tecido em gramas; mc= massa corpórea do animal; mt= massa do tumor.

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

3.7. Avaliação da resposta periférica a insulina

A resposta glicêmica para a insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT). Neste teste a insulina (0,25 U/Kg) foi administrada endovenosamente (veia cava inferior) nos ratos previamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg). Amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior nos tempos 0 (antes da injeção de insulina - basal), 5, 10, 15 e 30 minutos depois da injeção de insulina, para avaliação da glicemia. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (KITT), um indicador da resposta periférica a insulina, foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 5 a 15 minutos após a injeção de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA *et al.*, 1989; SERAPHIM *et al.*, 2001). A interpretação da KITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicemia, maior o valor do KITT, e portanto, maior é a resposta a insulina.

3.8. Avaliação da glicólise e neoglicogênese hepática

Para avaliar a glicólise e neoglicogênese hepática os ratos, após serem pesados, foram submetidos à técnica de perfusão de fígado *in situ*, introduzida no Brasil por Kelmer-Bracht e cols. (1984).

O sistema para a perfusão de fígado é basicamente composto por: reservatórios para o líquido de perfusão, bomba peristáltica e oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica (O₂/CO₂=95/5%). O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostaticada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água

aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O_2 e CO_2 , nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KHB: 115 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 5,8 mM KCl, 1,2 mM Na_2SO_4 , 1,18 mM $MgCl_2$, 1,2 mM NaH_2PO_4 e 2,5 mM $CaCl_2$.) modificado por Souza (1999). No sistema de perfusão esse líquido é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana e neste local se processam as trocas gasosas. O oxigênio (O_2) e o dióxido de carbono (CO_2) contidos na atmosfera carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 45 mL por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de aproximadamente 1 minuto, e a saturação, próxima a 99%. Desse modo, o líquido satura-se com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . A entrada de CO_2 no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. Sendo assim, o líquido de perfusão deixa o oxigenador, saturado de O_2 e CO_2 , aquecido a $37^\circ C$ e com pH 7,4, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

Para a perfusão de fígado, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, expondo o fígado e os demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta. Em seguida, a veia porta foi canulada sob baixo fluxo, aproximadamente 10 mL/minuto e, imediatamente após a canulação, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para o completo dessangramento do órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo de pressão no fígado. Logo após, elevou-se o fluxo para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto para exposição completa do fígado, e a veia cava inferior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática)

foi canulada para a coleta do líquido de perfusão efluente. O fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (aproximadamente $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado). Este fluxo está muito acima dos valores fisiológicos ($0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e visa compensar a ausência de eritrócitos no líquido de perfusão.

A perfusão foi, portanto, realizada em sistema aberto (não-recirculante), sendo o direcionamento do fluxo no sentido do hepatócito periportal para o hepatócito perivenoso (perfusão monovascular anterógrada). Após os 20 minutos iniciais de perfusão, para a estabilização do consumo de oxigênio, a perfusão do fígado foi realizada da seguinte forma:

- Para avaliação da glicólise, a partir da glicose exógena, os fígados foram perfundidos com KHB por 10 minutos e em seguida com KHB contendo glicose (20 mM) por 30 minutos.
- Para a avaliação da neoglicogênese os fígados foram perfundidos com KHB por 10 minutos e em seguida com KHB contendo alanina (2,5 mM), piruvato (5 mM) ou lactato (2 mM) por 30 minutos.

Durante este período, o líquido efluente do fígado, foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose, piruvato, lactato e ureia. Ao término dos experimentos, os fígados foram retirados e pesados para que a produção de glicose, piruvato, lactato e ureia por grama de fígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) pudesse ser calculada. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparações de experimentos nos quais foram empregados fígados com diferentes pesos.

A glicólise foi calculada como a soma da produção de lactato e piruvato. As áreas sob as curvas (AUCs) foram avaliadas no intervalo de tempo onde o fígado foi submetido à perfusão com glicose ou com os precursores neoglicogênicos, ou seja, entre 10 a 40 minutos, utilizando o programa GraphPad Prism 5.

3.9. Avaliação no número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático

Para avaliação do infiltrado leucocitário no fígado, lâminas de fígado foram confeccionadas utilizando os mesmos procedimentos já descritos para a preparação de lâminas do tumor. A avaliação foi também realizada por meio da análise morfométrica, utilizando o sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao microscópio de luz e o *software* Motic Image Plus 2.0 (Motic, Xiamen, China) do Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Londrina. Em cada lâmina histológica de fígado foram capturadas 5 fotos dos espaços porta (aumento de 200X), nas quais foram quantificados o número de leucócitos aderidos a veia porta ou presentes em 2 campos de 100 μm^2 , selecionados aleatoriamente, fora da região do espaço porta.

3.10. Avaliação da concentração hepática de ATP

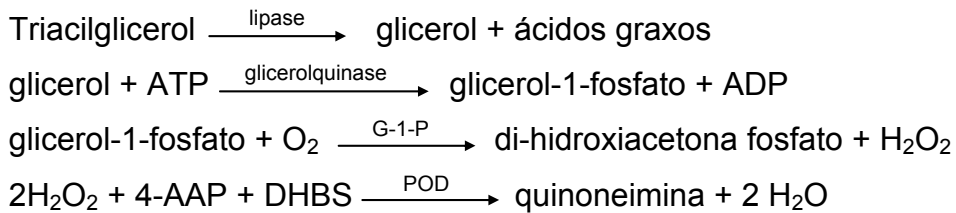
Para avaliação da concentração de ATP no fígado, amostras de fígado dos ratos, previamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg), foram retiradas pela técnica de “freeze-clamp” e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, para rápido congelamento, para evitar o estabelecimento de condições anaeróbicas que promovem hidrólise do ATP. Em seguida, as amostras de fígado foram armazenadas em “freezer” – 80° C. Para as dosagens, as amostras congeladas de fígado foram trituradas em nitrogênio líquido, usando gral e pistilo, pesadas rapidamente, e para cada grama de amostra foi adicionado 3,25 mL de ácido perclórico gelado. Em seguida, esta mistura foi centrifugada (10 min, 500 g, 2°C) e o sobrenadante foi neutralizado (pH 7,4) com carbonato de potássio. Após alguns minutos em gelo, o perclorato de potássio, formado na reação, precipitou e o sobrenadante foi utilizado nas dosagens de ATP.

3.11. Procedimentos analíticos

3.11.1. Determinação da concentração do triacilglicerol

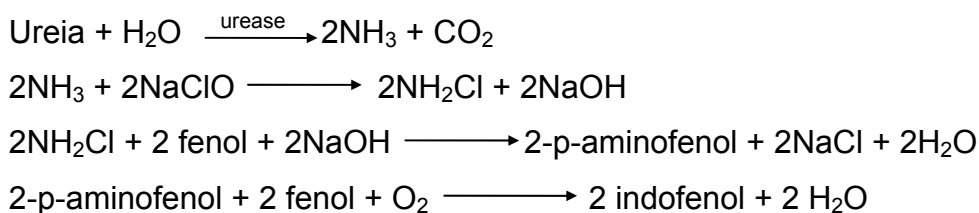
A concentração de triacilglicerol no plasma foi determinada por método enzimático baseado na reação de Trinder (1969). Neste método, como esquematizado adiante, os triacilgliceróis são convertidos pela lipase a glicerol e ácidos graxos, o glicerol a glicerol-1-fosfato pela glicerolquinase e o glicerol-1-fosfato

resultante é oxidado enzimaticamente pela glicerol-1-fosfato oxidase (G-1-P) a peróxido de hidrogênio e di-hidroxiacetona fosfato. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato (DHBS) com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e dá origem a um cromógeno (quinoneimina) com o máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



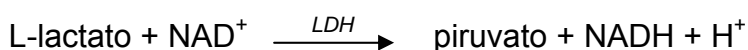
3.11.2. Determinação da concentração de ureia

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



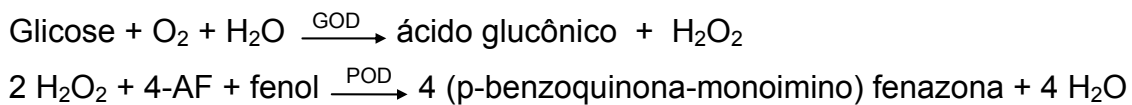
3.11.3. Determinação da concentração de lactato

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



3.11.4. Determinação da concentração de glicose

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



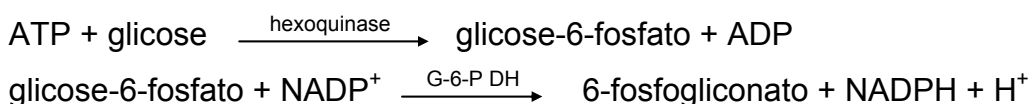
3.11.5. Determinação da concentração de piruvato

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



3.11.6. Determinação da concentração de ATP

As concentrações de ATP no fígado foram determinadas segundo o método enzimático descrito por Lamprecht & Trautshold (1974). Neste método a glicose, em presença de ATP, é fosforilada à glicose-6-fosfato em uma reação catalisada pela hexoquinase. A glicose-6-fosfato em presença de NADP⁺ é convertida em 6-fosfogliconato, NADPH e H⁺, pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), conforme esquematizado a seguir. A formação de NADPH é proporcional à concentração de ATP presente na amostra e medida espectrofotometricamente a 340 nm, tais reações são esquematizadas a seguir:



3.12. Procedimentos estatísticos

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

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno no crescimento tumoral, necrose do tumor e apoptose de células Walker-256

Como observado na figura 1, o tratamento com celecoxibe, mas não com ibuprofeno, reduziu o crescimento do tumor Walker-256. Enquanto a massa tumoral dos ratos portadores de tumor Walker-256 (grupo WK) foi de aproximadamente 22 g, a dos animais tratados com celecoxibe (grupo WK+celecoxibe) por 12 dias foi de apenas 10 g, o que representa uma redução de aproximadamente 55% no crescimento tumoral. Entretanto, a massa tumoral dos ratos tratados com ibuprofeno (grupo WK+ibuprofeno) após 12 dias foi semelhante a do grupo WK.

A análise histológica do tumor Walker-256 revelou várias áreas de necrose, áreas de coloração rósea que se destacam pela ausência de núcleos celulares, as quais podem ser observadas nas figuras 2A, 2B e 2C. Além disso, a análise morfométrica do tumor Walker-256 revelou que o tratamento com celecoxibe, mas não com ibuprofeno, aumentou a área de necrose no tecido tumoral de ratos WK (figura 2D).

Nas regiões próximas a periferia das áreas necróticas diversas células Walker-256 apresentaram sinais de apoptose, como fragmentação da heterocromatina, indefinição de contornos celulares e núcleos em processo de destruição (figuras 2E, 2F, 2G). Entretanto, segundo a análise morfométrica, somente o tratamento com celecoxibe aumentou o número destes sinais de apoptose em ratos portadores de tumor (figura 2H).

Figura 1. Massa tumoral de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Dados são a média \pm EPM de 22 a 28 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. ### $p < 0,001$ versus ratos WK.

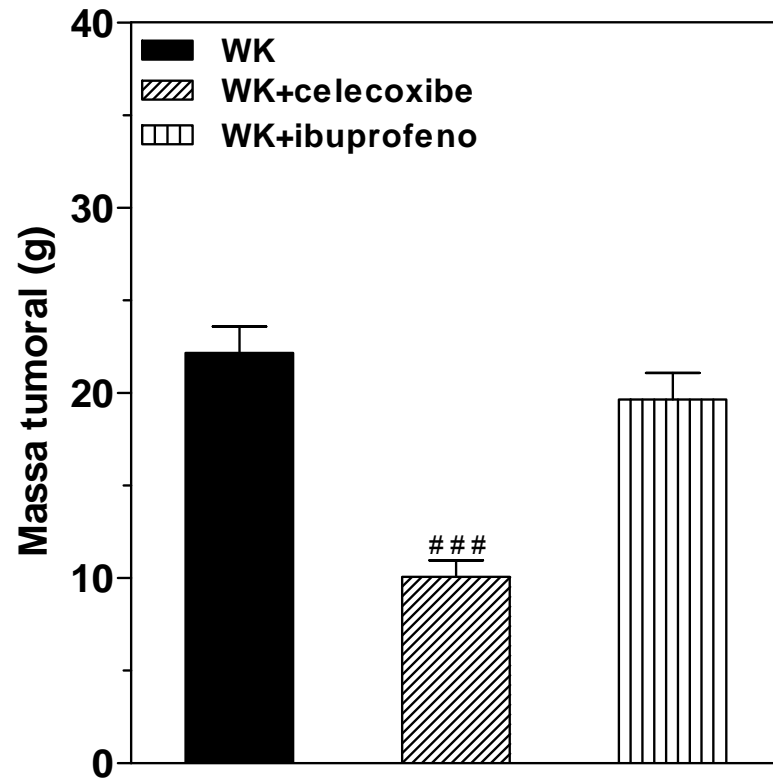
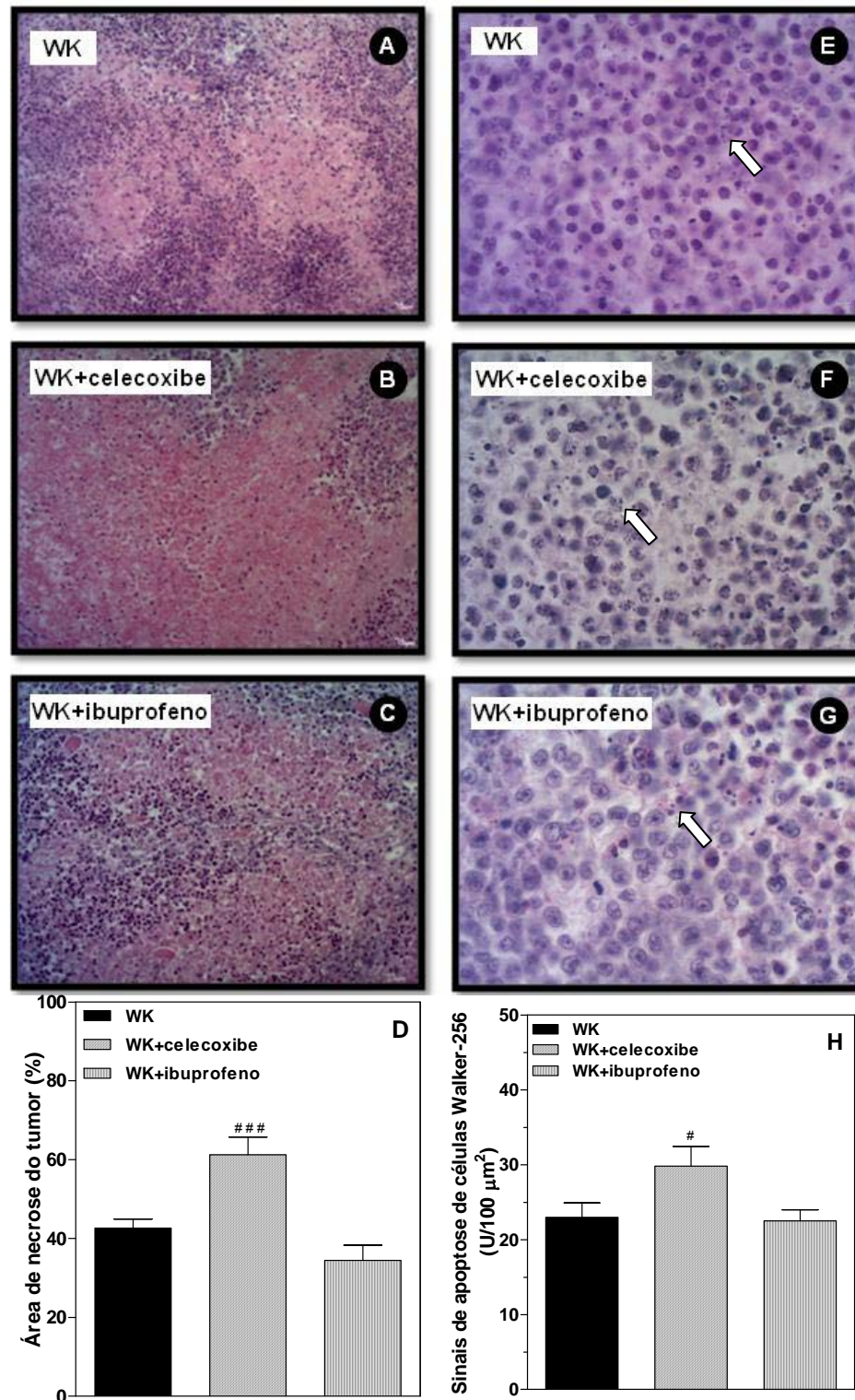


Figura 2. Áreas de necrose do tumor (A, B, C, D) e sinais de apoptose de células Walker-256 (E, F, G, H) de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Nas imagens, obtidas por microscopia óptica, coloração hematoxilina e eosina, as regiões róseas com ausências de núcleos em A, B e C (aumento de 100X) correspondem a áreas necróticas e as setas brancas em E, F e G (aumento de 400X) apontam núcleos em processo apoptótico. As áreas de necrose do tumor (D) e os sinais de apoptose das células Walker-256 (H) foram obtidos por avaliação morfométrica. Dados são a média \pm EPM de 4 a 6 experimento. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus ratos WK.



4.2. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno nos parâmetros relacionados a anorexia e caquexia

Animais do grupo WK apresentaram redução da ingestão de alimentos em relação ao grupo saudável e os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno não melhoraram a anorexia destes animais (figura 3).

Com relação à caquexia, os animais do grupo WK apresentaram menor ganho de massa corporal em relação aos saudáveis. Enquanto os ratos saudáveis ganharam aproximadamente 50 g de massa corporal em 12 dias, os ratos portadores de tumor ganharam cerca de 6 g. Contudo, o tratamento com celecoxibe aumentou em aproximadamente 80% o ganho de peso dos ratos portadores de tumor, enquanto o tratamento com ibuprofeno não teve efeito sobre a massa corpórea (figura 4A).

Animais do grupo WK também apresentaram perda acentuada de tecido adiposo retroperitoneal (figura 4B), músculo gastrocnêmio (figura 4C) e músculo extensor digital longo (EDL) (figura 4D) em relação ao grupo saudável. Tais perdas foram prevenidas pelo tratamento com celecoxibe. Ratos tratados com celecoxibe apresentaram massa de tecido adiposo retroperitoneal, músculo gastrocnêmio e EDL semelhante a dos grupos saudáveis. Em contraste, o tratamento com ibuprofeno não alterou a perda de tecido adiposo retroperitoneal, músculo gastrocnêmio e EDL de ratos WK.

Figura 3. Ingestão alimentar de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Dados são a média \pm EPM de 20 a 36 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,05$ e * $p < 0,01$ versus ratos saudáveis.

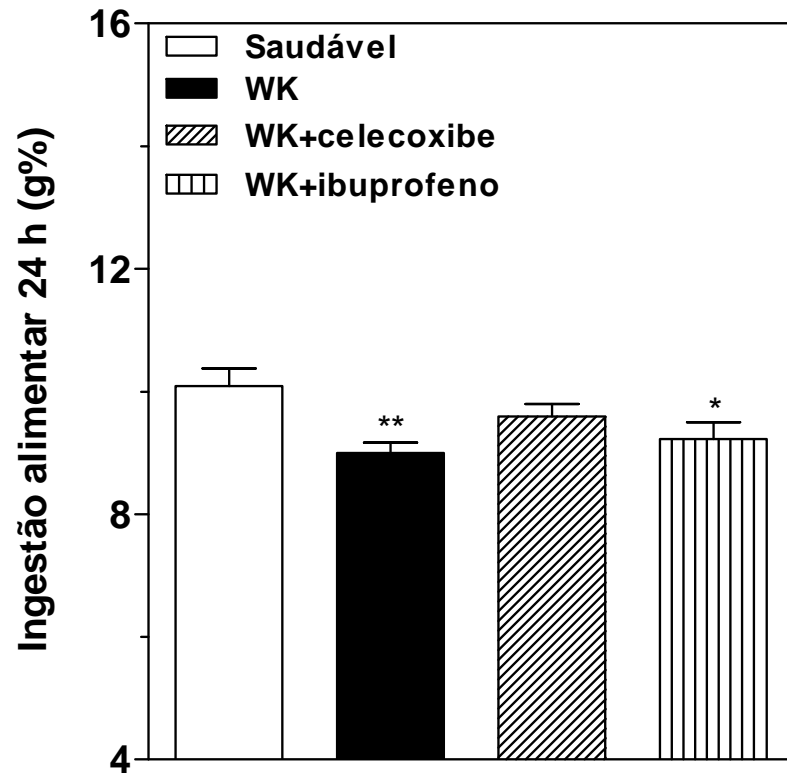
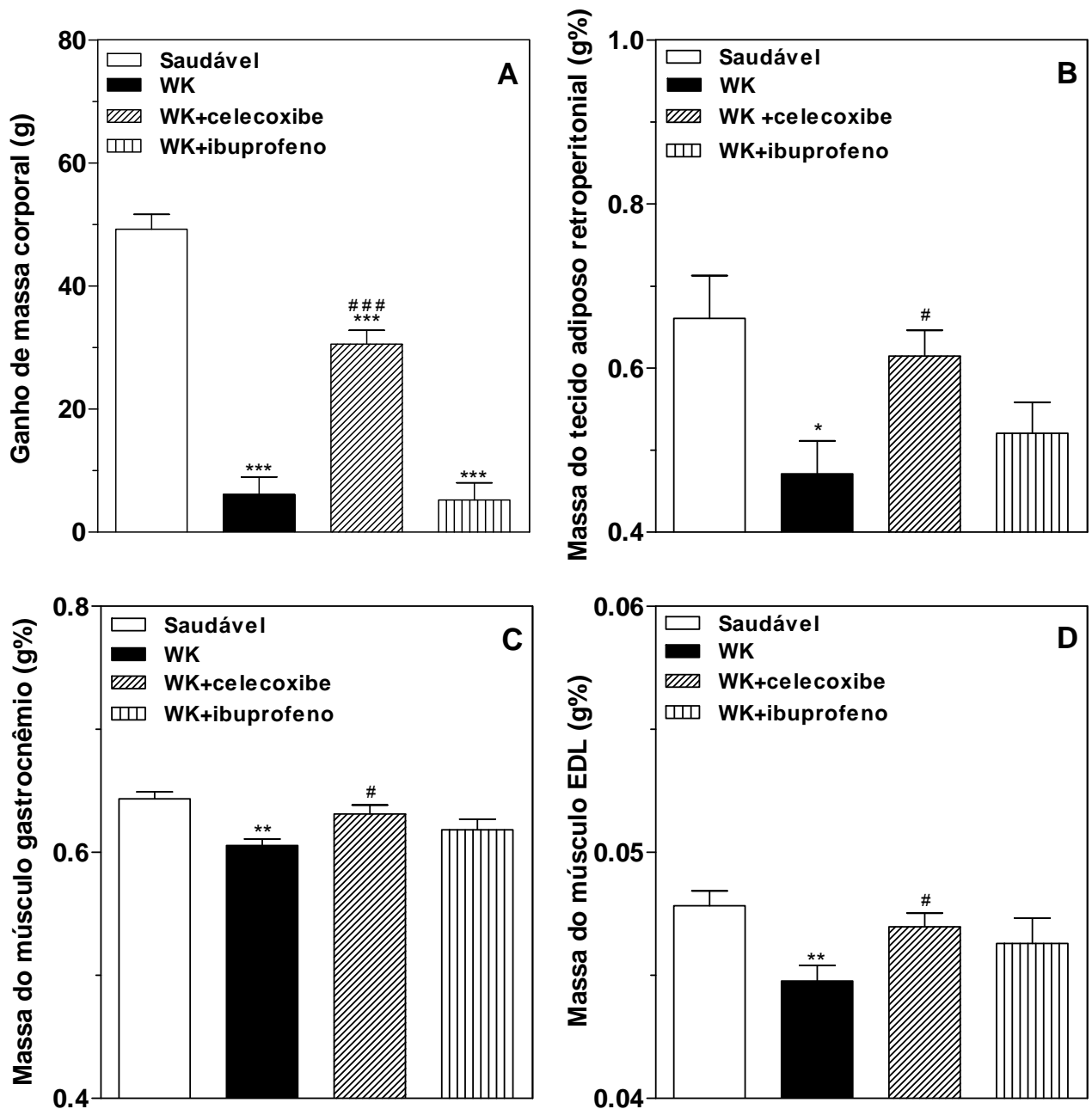


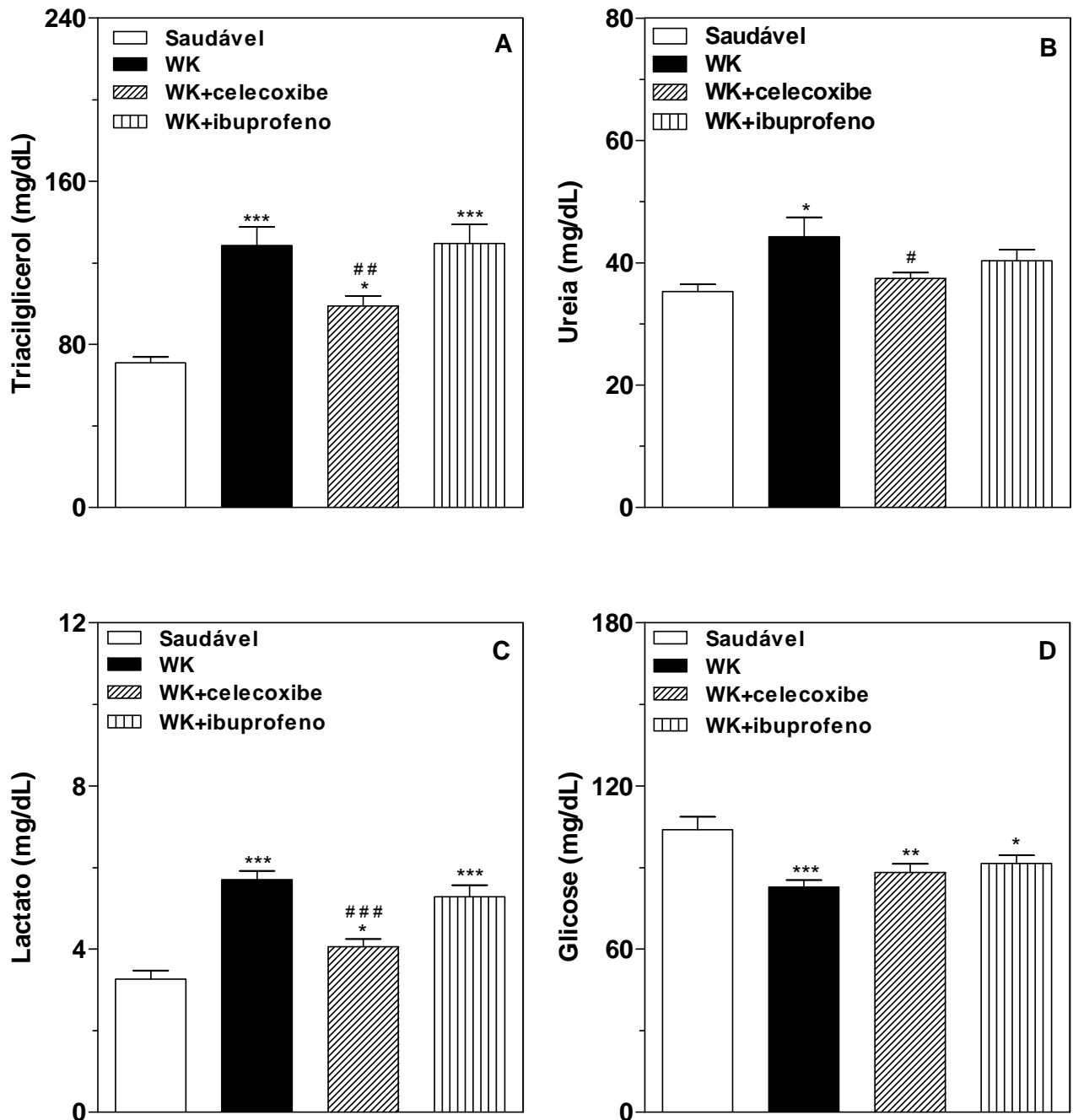
Figura 4. Ganho de massa corporal (A), massa do tecido adiposo retroperitoneal (B), massa do músculo gastrocnêmio (C) e massa do músculo extensor digital longo (EDL) (D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Dados são a média \pm EPM de 13 a 30 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls (A, B e C), ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn para múltiplas comparações (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ versus ratos WK.



4.3. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno nos parâmetros metabólicos plasmáticos

Os ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram concentrações elevadas de triacilglicerol (figura 5A), ureia (figura 5B) e lactato (figura 5C) e concentração diminuída de glicose (figura 5D) no plasma, quando comparados aos ratos saudáveis. O tratamento com celecoxibe reduziu os níveis plasmáticos elevados de triacilglicerol em 25%, de ureia em 20% e de lactato em 35%, aproximadamente, mas não preveniu a redução da glicemia dos ratos portadores de tumor. Em relação ao tratamento com ibuprofeno, este não alterou as concentrações plasmáticas de triacilglicerol, ureia, lactato e glicose dos ratos WK.

Figura 5. Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (A), uréia (B), lactato (C) e glicose (D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Os ratos foram submetidos a 24 horas de privação alimentar. Dados são a média \pm EPM de 15 a 23 experimentos. Resultados analisados por ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$, # # $p < 0,01$ e # # # $p < 0,001$ versus ratos WK.

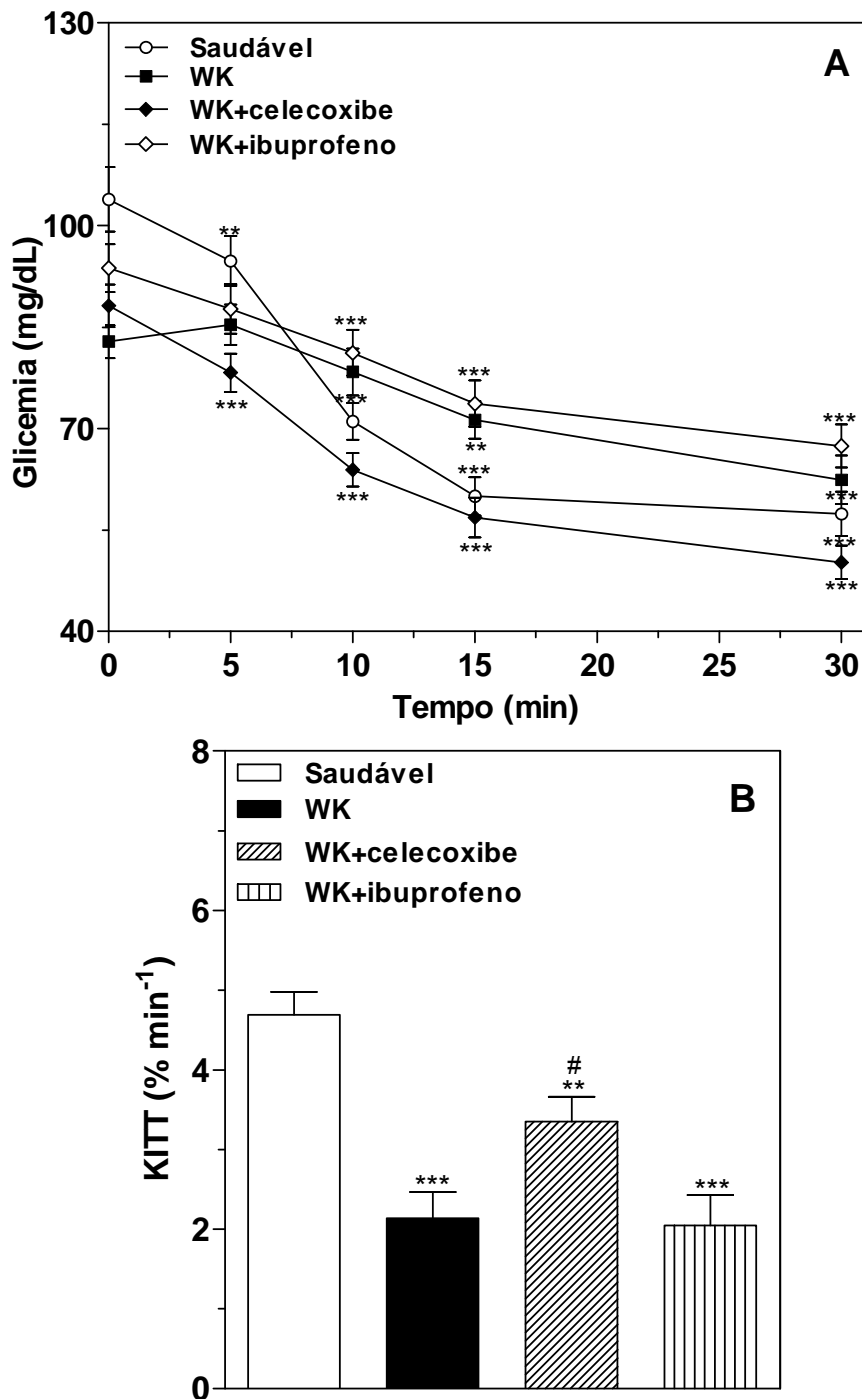


4.4. Efeito do celecoxibe ou do ibuprofeno na resposta periférica a insulina

No teste de tolerância a insulina (ITT), a administração de insulina diminuiu a glicemia ao longo do tempo em todos os grupos, sendo a redução mais acentuada aos 30 minutos (figura 6A). Porém, a redução da glicemia foi menor nos ratos WK, como demonstrado pela menor KITT, do que nos ratos saudáveis (figura 6B).

O tratamento com celecoxibe reverteu parcialmente a diminuição da resposta periférica a insulina de ratos WK, como demonstrado pelo aumento da KITT em aproximadamente 45%. No entanto, não houve diferença entre a KITT de ratos WK e WK+ibuprofeno (figura 6B).

Figura 6. Glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (KITT) (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Os ratos foram submetidos a 24 horas de privação alimentar. A glicemia foi avaliada 0 (basal), 5, 10, 15 e 30 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Dados são a média \pm EPM de 15 a 23 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A) em relação ao basal (0 minuto) foram avaliadas por ANOVA mensurações repetidas seguido de Newman-Keuls; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Diferenças entre as KITTs (B) foram analisadas por ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ versus ratos WK.

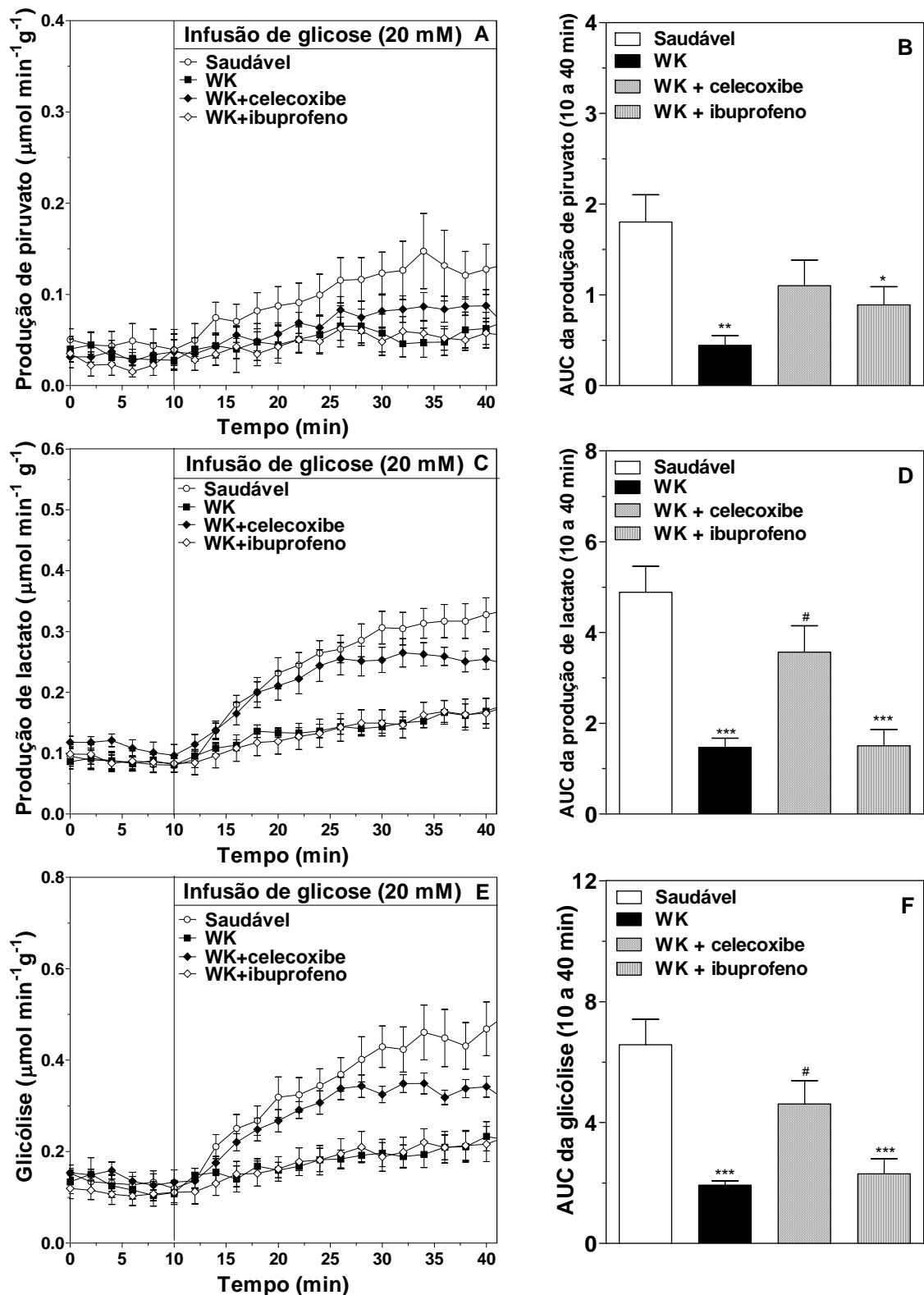


4.5. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na glicólise hepática a partir da glicose exógena

A infusão de glicose (20 mM) no fígado, aos 10 minutos do período de perfusão, aumentou a produção de piruvato (figura 7A), lactato (figura 7C) e conseqüentemente a glicólise (figura 7E) em todos os grupos. Porém, esse aumento foi menor nos ratos WK do que saudáveis, como demonstrado pelas AUCs (figuras 7B, 7D, 7F).

O tratamento com celecoxibe não alterou a inibição da produção de piruvato (figura 7B), mas reduziu a inibição da produção de lactato (figura 7D) e conseqüentemente melhorou a inibição da glicólise (figura 7F) dos ratos portadores de tumor, em aproximadamente 58%, como demonstrado pelas AUCs. Contudo, o tratamento com ibuprofeno não teve efeito sobre a inibição da produção de piruvato (figuras 7A, 7B), lactato (figuras 7C, 7D) e glicólise (figuras 7E, 7F) dos ratos WK.

Figura 7. Produção de piruvato (A) lactato (C), glicólise (E) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D e F) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígados de ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida entre 10 e 40 minutos. Dados são a média \pm EPM de 5 a 7 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ versus ratos WK.

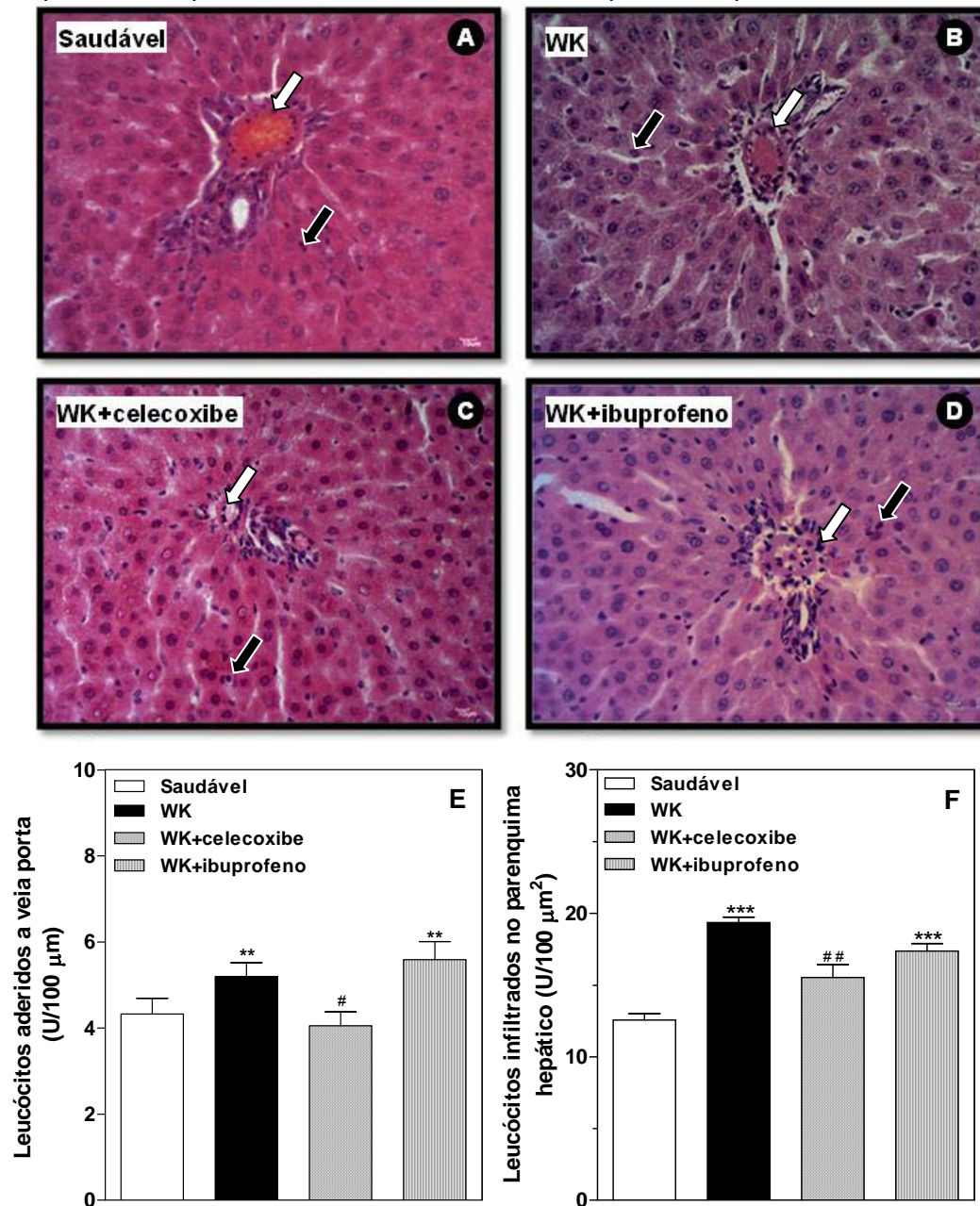


4.6. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno no número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático

Não foram observadas alterações morfológicas significativas, como desorganização lobular, acúmulo de lipídio nos hepatócitos ou fibrose hepática em ratos portadores de tumor Walker-256 não tratados (figura 8B), tratados com celecoxibe (figura 8C) ou com ibuprofeno (figura 8D), em relação aos ratos saudáveis (figura 8A).

Entretanto, segundo a análise morfométrica, os ratos do grupo WK apresentaram maior número de leucócitos aderidos a veia porta (figura 8E) ou infiltrados no parênquima hepático (figura 8F). Diferentemente do tratamento com celecoxibe, o qual diminuiu a quantidade de leucócitos aderidos à veia porta e o infiltrado leucocitário no parênquima hepático, o tratamento com ibuprofeno não alterou estes parâmetros em ratos WK (figuras 8E, 8F).

Figura 8. Número de leucócitos aderidos a veia porta (E) ou infiltrados no parênquima hepático (F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias não tratados (WK). Nas imagens A, B, C e D, obtidas por microscopia óptica, coloração hematoxilina e eosina, aumento de 200X, as setas pretas mostram os leucócitos infiltrados no parênquima hepático e as setas brancas apontam os leucócitos aderidos à veia porta. Dados das figuras E e F foram obtidos por avaliação morfométrica e representam a média \pm EPM de 4 a 6 experimentos. Diferenças foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ versus ratos WK.



4.7. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na neoglicogênese hepática a partir da alanina, piruvato e lactato

A neoglicogênese foi avaliada em fígados submetidos à perfusão com os seguintes substratos neoglicogênicos: alanina 2,5 mM, piruvato 5 mM e lactato 2 mM. Nos experimentos de perfusão com alanina, foram também analisadas as produções hepáticas de uréia, piruvato e lactato.

Os valores basais da produção de glicose obtidos nos primeiros 10 minutos de perfusão, os quais correspondem a liberação de glicose proveniente do glicogênio residual, foram baixos devido a depleção do glicogênio hepático em função das 24 horas de privação alimentar dos animais, e semelhantes entre todos os grupos (figura 9A, 11A e 12A).

A infusão de alanina (2,5 mM) no fígado, aos 10 minutos da perfusão, promoveu rápido aumento na produção de glicose (figura 9A), piruvato (figura 10A), lactato (figura 10B) e ureia (figura 10C) em todos os grupos. Entretanto, a produção de glicose a partir da alanina foi 50% menor nos ratos WK do que saudáveis e os tratamentos com celecoxibe e ibuprofeno reverteram esta inibição da neoglicogênese, como evidenciado pelas AUCs (figura 9B).

Os ratos portadores de tumor também apresentaram inibição de aproximadamente 50% na produção de piruvato, 45% na produção de lactato e 75% na produção de ureia em relação aos animais saudáveis, como demonstrado pelas AUCs (figura 10D). O tratamento dos ratos WK com celecoxibe ou ibuprofeno reverteu completamente a inibição da produção de lactato, piruvato e ureia (figura 10D).

A infusão de piruvato (5 mM) no fígado também aumentou a produção de glicose (figura 11A) em todos os grupos, porém a produção de glicose dos ratos WK foi 50% menor que dos ratos saudáveis e os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno reverteram esta inibição da neoglicogênese a partir do piruvato dos ratos portadores de tumor, conforme revelado pelas AUCs (figura 11B).

A infusão de lactato (5 mM) no fígado aumentou rapidamente a produção de glicose em todos os grupos (figura 12A). No entanto, em ratos WK a produção de glicose foi 30% menor que nos ratos saudáveis e o tratamento com celecoxibe ou ibuprofeno reverteu a inibição da neoglicogênese a partir do lactato dos ratos portadores de tumor, conforme ilustrado pelas AUCs (figura 12B).

Figura 9. Produção de glicose a partir da alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígado de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Dados são a média \pm EPM de 7 a 9 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas por ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ versus ratos WK.

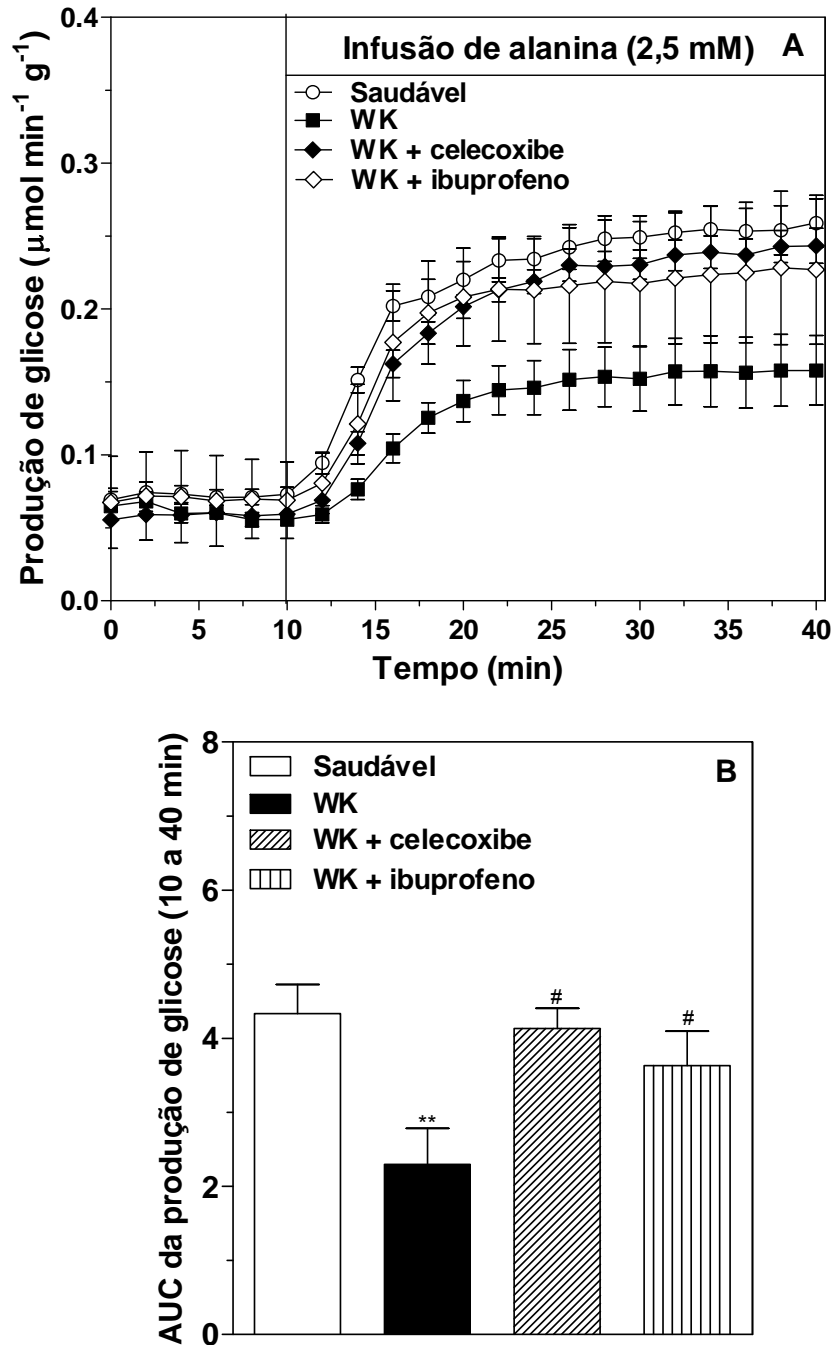


Figura 10. Produção de piruvato (A), lactato (B) e ureia (C) a partir da alanina e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Alanina (2,5 mM) foi infundida no intervalo entre 10 e 40 minutos. Dados são a média \pm EPM de 7 a 9 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus ratos WK.

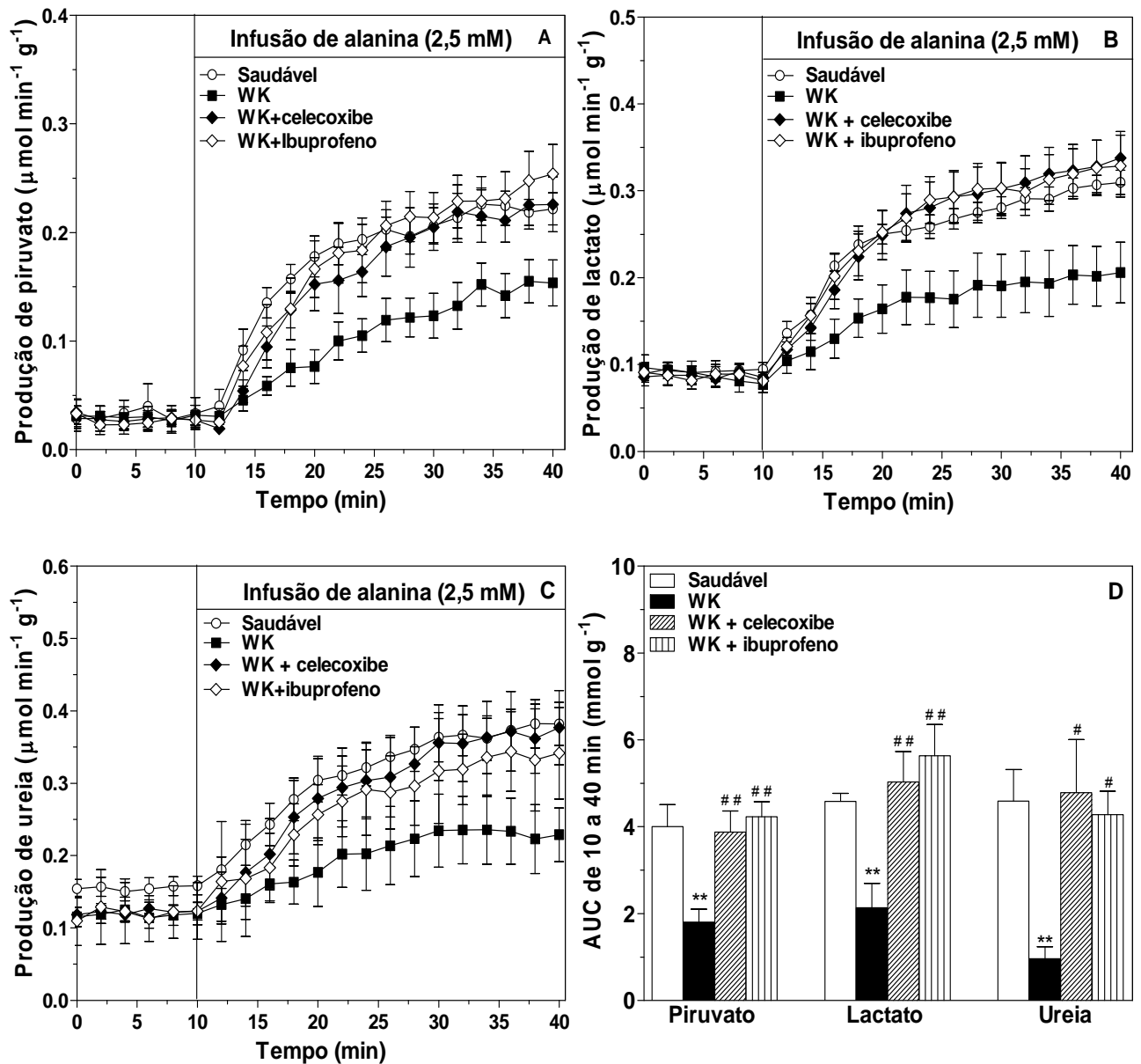


Figura 11. Produção de glicose a partir do piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Piruvato (5 mM) foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Dados são a média \pm EPM de 4 a 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus ratos WK.

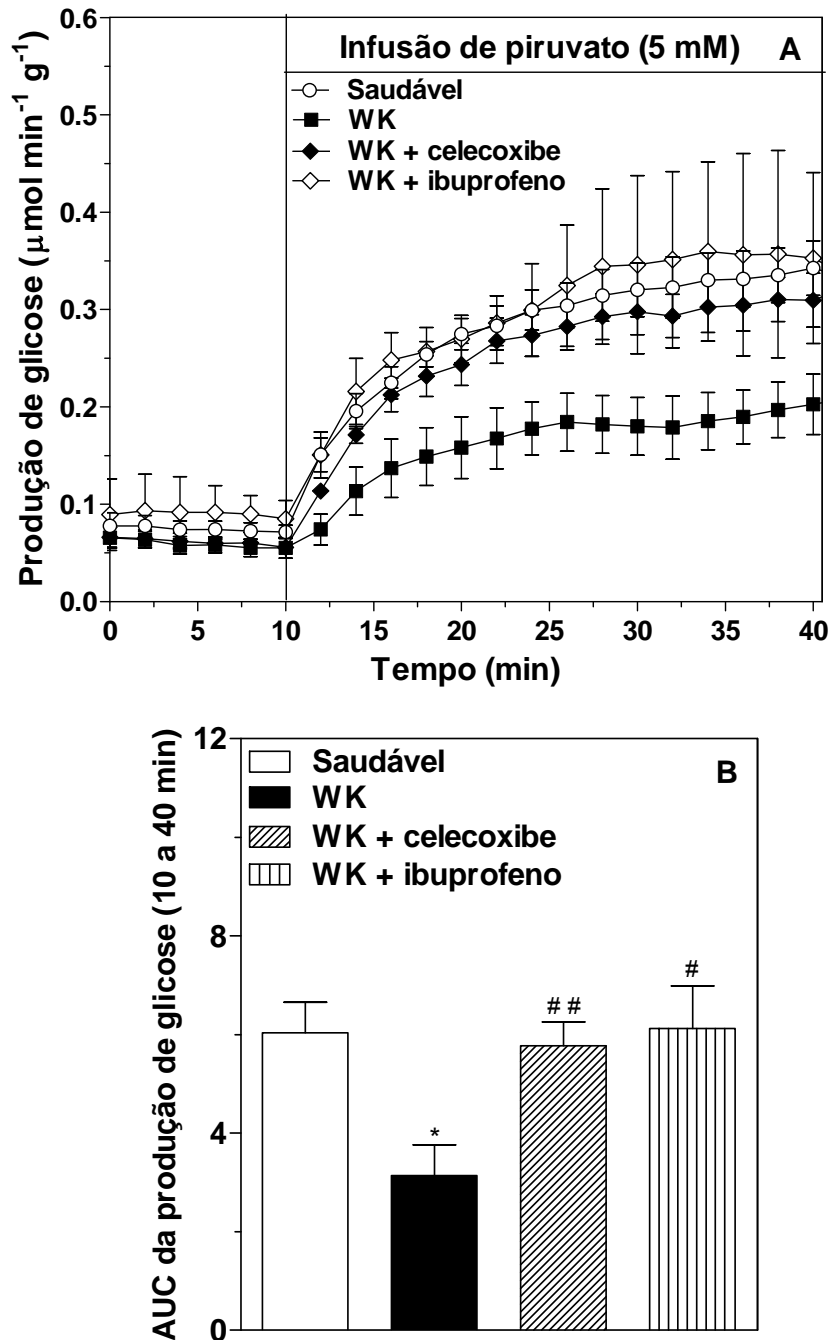
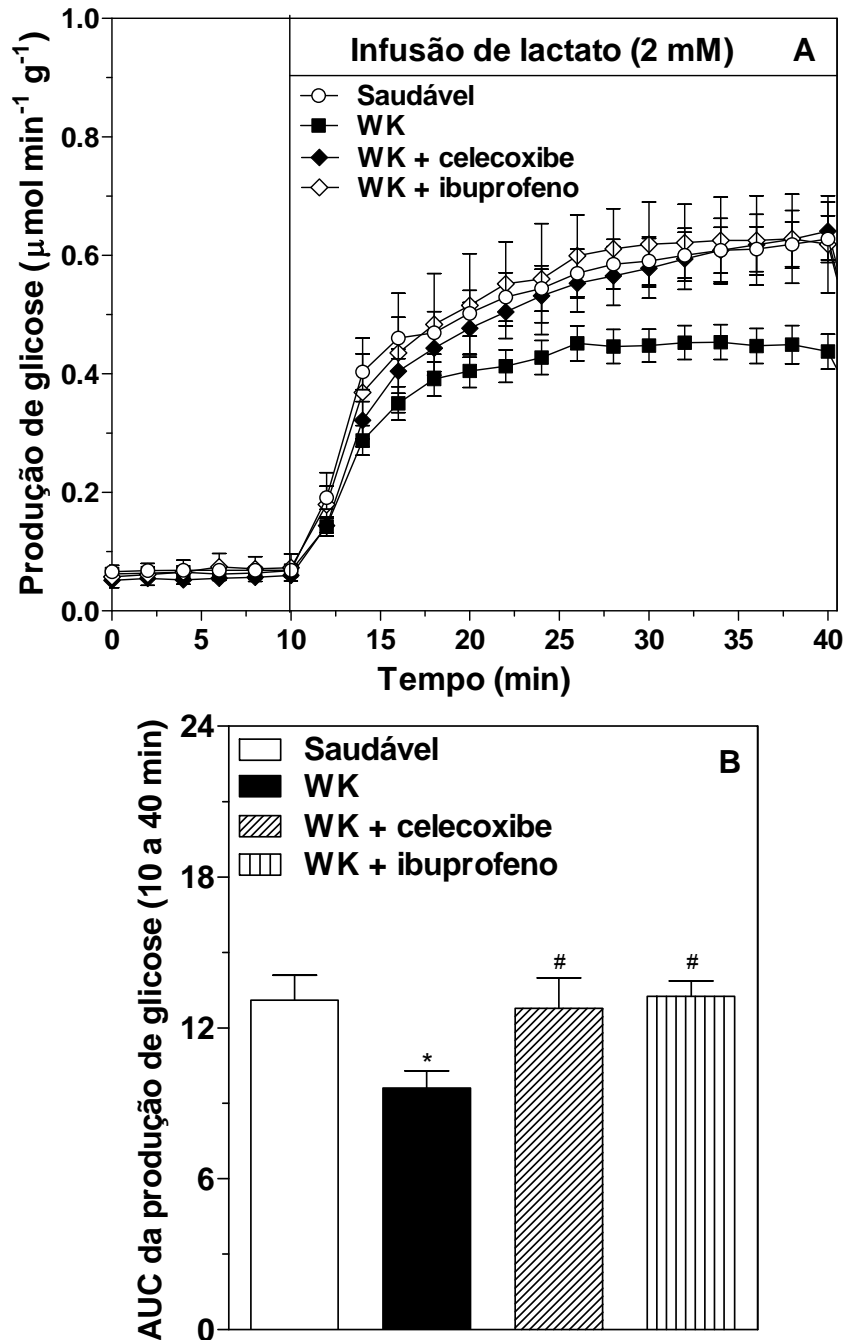


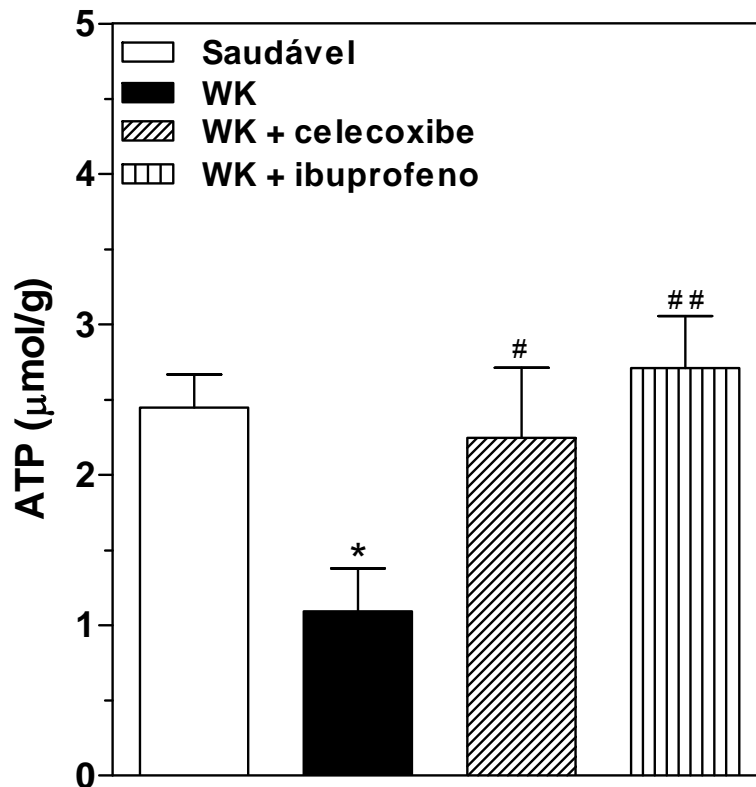
Figura 12. Produção de glicose a partir do lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Lactato (2 mM) foi infundido no intervalo entre 10 e 40 minutos. Dados são a média \pm EPM de 7 a 21 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ versus ratos WK.



4.8. Efeito do celecoxibe ou ibuprofeno na concentração de ATP

Conforme demonstra a figura 13, os ratos WK apresentaram menor concentração de adenosina trifosfato (ATP) no fígado em relação ao grupo saudável, a qual foi revertida pelo tratamento com celecoxibe ou ibuprofeno.

Figura 13. Concentração de adenosina trifosfato (ATP) em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe (WK+celecoxibe) ou ibuprofeno (WK+ibuprofeno) durante 12 dias ou não tratados (WK). Fígado de ratos com 24 horas de privação alimentar. Dados representam a média \pm EPM de 6 a 7 experimentos. Diferenças foram analisadas por ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ versus ratos saudáveis; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus ratos WK



Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho o modelo experimental de caquexia induzida por tumor Walker-256 foi utilizado para avaliar o efeito dos AINEs, celecoxibe e ibuprofeno, no desenvolvimento tumoral e nas alterações metabólicas associadas à caquexia do câncer.

O tratamento com celecoxibe durante 12 dias diminuiu acentuadamente o crescimento do tumor Walker-256 (figura 1), provavelmente por promover apoptose das células tumorais, como indicado pelo aumento dos sinais apoptóticos, tais como fragmentação da heterocromatina, indefinição de contornos celulares e núcleos em processo de destruição (figura 2H), aumentando a área de necrose do tumor (figura 2D).

Em concordância, há relatos que o celecoxibe diminuiu o crescimento de diversos tipos de tumores. Em alguns estudos, o celecoxibe reduziu o crescimento tumoral por mecanismos que envolveram inibição da via COX2/PGE₂ (DAVIS *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2010). A superexpressão da COX-2 parece estar intimamente relacionada com o processo tumorigênico em diversos tipos de câncer (OSHIMA *et al.*, 1996; TSUJII *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2012). A PGE₂, um dos principais metabólitos da COX-2, promove a carcinogênese por ativar a via de sinalização Akt ou PKB/NFκB, que aumenta a proliferação e reduz a apoptose celular (MÉRIC *et al.*, 2006; REBECA *et al.*, 2008), e também por favorecer os processos de invasão, metástase e angiogênese tumoral (MÉRIC *et al.*, 2006).

Contudo, em outros estudos com vários tipos de cânceres, o efeito antitumoral do celecoxibe parece envolver mecanismos independentes da inibição da via COX2/PGE₂ (KARDOSH *et al.*, 2005; GRÖSH *et al.*, 2006; BASTOS-PEREIRA *et al.*, 2010; BARLOW *et al.*, 2012). Foi observado que o dimetil celecoxibe, um composto sintético similar ao celecoxibe que não inibe a COX2, reduziu o crescimento do linfoma de Burkitt (KARDOSH *et al.*, 2005). Além disso, o celecoxibe bloqueou o ciclo celular e induziu a apoptose de células tumorais que não expressavam a COX-2, tanto *in vitro* como *in vivo* (GRÖSCH *et al.*, 2001). Também foi verificado recentemente, em um modelo de sarcoma *in vitro*, que o celecoxibe possui efeitos antitumorais mesmo na presença de PGE₂ (BARLOW *et al.*, 2012).

Estes efeitos antitumorais do celecoxibe, independentes da inibição da via COX2/PGE₂, pode ser resultante de ações específicas do fármaco, o qual foi

descrito recentemente como capaz de diminuir a expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 e survivinas), aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bcl-x) e ativar a via das caspases e a apoptose de células tumorais (GONG *et al.*, 2012).

Diferentemente do celecoxibe, o tratamento com ibuprofeno por 12 dias não diminuiu o crescimento do tumor Walker-256 (figura 1), nem aumentou a área de necrose do tumor (figura 2D) e a apoptose das células tumorais (figura 2H), apesar de um estudo demonstrar que este fármaco inibiu COX1 e COX2 em cerca de 90% e 75% respectivamente (KEROLA *et al.*, 2009), enquanto outro trabalho verificou que assim como o celecoxibe, o tratamento com ibuprofeno foi capaz de reduzir a produção de PGE₂ em aproximadamente 90% (McADAM *et al.*, 1999).

Em concordância com nossos resultados, o ibuprofeno não diminuiu o crescimento do hepatoma de Morris (McCARTHY, 1999) e do tumor de ovário SKOV3 (LI *et al.*, 2009), embora tenha reduzido o crescimento de diversas linhagens de câncer de próstata (ANDREWS *et al.*, 2002; QUANN *et al.*, 2007).

Assim, nosso achado de que o ibuprofeno não teve efeito sobre o crescimento do tumor Walker-256, sugere que o efeito antitumoral do celecoxibe ocorreu por mecanismos independentes da inibição de COX2/PGE₂. Corroborando esta sugestão, Bastos-Pereira e *cols.* (2010) observaram que o tratamento com celecoxibe em animais portadores de tumor Walker-256, reduziu a massa tumoral por diminuir a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-xL, sem promover alteração na expressão e atividade da COX2.

Embora a anorexia no câncer pareça ser resultante do efeito de TNF α , IL-1, IL-6 e PGE₂ no sistema nervoso central (LEVINE & MORLEY, 1981; ARRUDA *et al.*, 2010; PATRA & ARORA, 2012), o tratamento com celecoxibe, assim como com o ibuprofeno, não alterou a redução da ingestão alimentar de ratos portadores de tumor (figura 3). As citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-6) induzem a anorexia por estimular a liberação de fatores anorexigênicos, como o fator liberador de corticotrofina (CRF) no núcleo paraventricular do hipotálamo (Arruda *et al.*, 2010; Patra & Arora, 2012). Além disso, a IL-1 tem sido associada à anorexia por reduzir a liberação de neuropeptídeo Y no núcleo paraventricular, um neurotransmissor orexigênico (PATRA & ARORA, 2012).

A administração central de PGE₂, assim como as citocinas, também promoveu efeitos anorexigênicos, reduzindo a ingestão alimentar de ratos saudáveis

(LEVINE & MORLEY, 1981). No entanto, a ausência de efeito do celecoxibe e do ibuprofeno sobre a ingestão alimentar de ratos portadores de tumor (figura 3), sugere que as prostaglandinas não são os principais mediadores envolvidos na anorexia associada ao tumor Walker-256. Corroborando com estes resultados, o tratamento com diversos AINES reduziu o crescimento tumoral, mas não aumentou a ingestão alimentar de ratos portadores de tumor Walker-256 (HOMEM-DE-BITTENCOURT *et al.*, 1989; McCARTHY, 1999).

Além de reduzir o crescimento tumoral, o tratamento com celecoxibe reduziu a perda de peso corporal (figura 4A), tecido adiposo retroperitoneal (figura 4B) e massa dos músculos gastrocnêmio (figuras 4C, 4D) (figura 4C) e EDL (figura 4D) dos ratos portadores de tumor Walker-256. A perda de peso na caquexia do câncer se deve, em grande parte, à depleção de tecido adiposo e massa muscular, causada principalmente pelo LMF, PIF, TNF α , IL-1 e IL-6, os quais estimulam a lipólise e/ou proteólise (CAMPS *et al.*, 2006; BING & TRAYHURN, 2009; CHEN *et al.*, 2009; TISDALE, 2010).

Os efeitos lipolíticos do LMF e TNF α são mediados pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc nos adipócitos, o qual promove a ativação da proteína quinase A, que fosforila e ativa a lipase hormônio sensível, enzima degradante do triacilglicerol (ZANG *et al.*, 2002; BING & TRAYHURN, 2009; TISDALE, 2010). O LMF parece aumentar o AMPc pela ativação de receptores β 3-adrenérgicos (BING & TRAYHURN, 2009), enquanto o TNF α aumenta o AMPc por inibição da fosfodiesterase 3B (PDE3B) (ZANG *et al.*, 2002). O TNF α também promove depleção de tecido adiposo por inibir a lipase de lipoproteína (LPL), enzima degradante dos triacilgliceróis circulantes, reduzindo a captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e conseqüentemente a lipogênese (CHEN *et al.*, 2009) e por promover a apoptose de adipócitos e pré adipócitos (BING & TRAYHURN, 2009).

Com relação à proteólise do músculo esquelético, o PIF estimula o fator de transcrição NF- κ B, que ativa genes relacionados a via de degradação proteica ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (TISDALE, 2009), enquanto o TNF α estimula a via ubiquitina-proteossoma e promove apoptose no músculo esquelético (ARGILÉS *et al.*, 2006) e a IL-6 parece ativar vias proteolíticas lisossomais (catepsinas) e não-lisossomais (sistema ubiquitina-proteassoma) (GOODMAN, 1994; EBISUI *et al.*, 1995).

Além destes mediadores da caquexia, a PGE₂, por estimular a proteólise (ATTAIX *et al.*, 1999) e a lipólise (KOLDITZ & LANGIN, 2010) e por aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ROSS & FEARON, 2002; WANG & DUBOIS, 2010; WANG *et al.*, 2011) também poderia contribuir para a perda de peso na caquexia do câncer. No entanto, em nossos estudos, o tratamento com ibuprofeno, diferentemente do tratamento com celecoxibe, não teve efeito na perda de peso corporal (figura 4A), nem preveniu a perda de tecido adiposo (figura 4B) e muscular (figura 4C, 4D) dos ratos portadores de tumor, indicando que os efeitos benéficos do celecoxibe nestes parâmetros provavelmente não ocorreram por inibição da via COX2/PGE₂, mas por redução da síntese de mediadores catabólicos, como o LMF, PIF, TNF α , IL-1 e IL-6, em função da diminuição da massa tumoral.

Adicionalmente, o tratamento com celecoxibe diminuiu os níveis aumentados de triacilglicerol no plasma de ratos portadores de tumor Walker-256 (figura 5A). O aumento de triacilglicerol no câncer tem sido relacionado a inibição da LPL pelo TNF α (CHEN *et al.*, 2009; NOTARNICOLA *et al.*, 2012), IL-6 (BING & TRAYHURN, 2009) e ácidos graxos livres (DELARUE & MAGNAN, 2007). Embora em ratos obesos, por diminuir os níveis de prostaglandinas, o celecoxibe reduziu a lipólise e os níveis de triacilglicerol no plasma (HSIEH *et al.*, 2009), a falta de efeito do ibuprofeno na triacilglicerolemia (figura 5A) sugere que o efeito do celecoxibe no triacilglicerol de ratos portadores de tumor não foi mediado pela diminuição da síntese de prostaglandinas, mas provavelmente por redução do crescimento tumoral e da liberação de mediadores da caquexia, tais como o TNF α e a IL-6.

O tratamento com celecoxibe também reduziu os níveis plasmáticos aumentados de ureia (figura 5B) e lactato (figura 5C), apesar de não ter alterado a redução da glicemia (figura 5D) de ratos portadores de tumor. O aumento da uremia nos ratos portadores de tumor parece ser resultante do metabolismo das células tumorais (CASSOLLA *et al.*, 2011). Células Walker-256 apresentaram aumento na atividade da arginase, enzima conversora da L-arginina em ornitina e uréia, e da produção de uréia, ao longo do desenvolvimento tumoral (REBECA *et al.*, 2008). O aumento da lactatemia (figura 5C) e a redução da glicemia (figura 5D) nos ratos portadores de tumor parecem também ser decorrentes do crescimento tumoral (CASSOLLA *et al.*, 2011). A hipóxia presente em tumores de crescimento rápido como o Walker-256, ativa o fator de transcrição induzido por hipóxia 1 (HIF-1)

(MAXWELL, 2005), o qual desvia o fluxo metabólico das células tumorais para a via glicolítica anaeróbica, aumentando o consumo de glicose e a produção de lactato pelo tumor (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007; MARÍN-HERNANDEZ *et al.*, 2009). O HIF-1 é um heterodímero formado por duas subunidades: a subunidade β (HIF-1 β), que é constitutível, e a subunidade α (HIF-1 α), a qual é induzível e sensível à concentração de oxigênio. Em altas concentrações de oxigênio, o HIF-1 α é degradado, porém quando a concentração é baixa, essa subunidade torna-se estável e se liga a HIF-1 β formando o complexo HIF-1, que promove a transcrição de genes relacionados com o transporte de glicose, via glicolítica, angiogênese, entre outros (WENGER, 2002).

Portanto, é provável que a redução da uremia (figura 5B) e lactatemia (figura 5C) pelo tratamento com celecoxibe foi decorrente de seu efeito na redução do crescimento tumoral, e não na redução da síntese de prostaglandinas, uma vez que o ibuprofeno não alterou os níveis plasmáticos aumentados de ureia (figura 5B) e lactato (figura 5C) dos ratos portadores de tumor. Similarmente, pela redução do crescimento tumoral, seria esperado que o tratamento com celecoxibe, mas não com ibuprofeno, também diminuísse a redução da glicemia dos ratos portadores de tumor, porém isso não ocorreu (figura 5D). A ausência deste efeito do celecoxibe foi provavelmente causada pela melhora da resposta periférica a insulina (Figura 6B), o que pode ter aumentado a captação de glicose pelos tecidos.

Realmente, o tratamento com celecoxibe melhorou a diminuição da resposta periférica à insulina dos ratos portadores de tumor Walker-256 (Figura 6B). A resistência à insulina no câncer, a qual pode contribuir para a patogênese da caquexia (ASP *et al.*, 2010; HONORS & KINZIG, 2012), parece ser mediada por ácidos graxos livres, TNF- α e IL-6 (RUAN & LODISH, 2003; CAPURSO & CAPURSO, 2012). Espécies reativas de oxigênio (EROs) e intermediários provenientes do metabolismo dos ácidos graxos livres, assim como o TNF- α e a IL-6, interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina (RUAN & LODISH, 2003; CAPURSO & CAPURSO, 2012), diminuindo a captação de glicose pelo tecido adiposo e muscular. Atualmente, sugere-se que a inflamação mediada pela ativação de COX-2 e por níveis elevados de PGE₂, pode reduzir a sensibilidade à insulina através da geração de EROs. De fato, estudos mostraram que a redução da expressão de COX2 e a inibição da síntese de PGE₂ pelo celecoxibe, diminuiu a produção de EROs e a resistência à insulina e aumentou a captação de glicose no

músculo (LIU *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2011). Entretanto, a ausência de efeito do ibuprofeno na resposta periférica a insulina dos ratos portadores de tumor Walker-256 (Figura 6B) indica que o celecoxibe melhorou a resposta a insulina pela redução do crescimento tumoral e não pela redução da síntese de prostaglandinas. A melhora da resposta insulínica pelo celecoxibe pode ter contribuído para a redução de algumas alterações metabólicas dos ratos portadores de tumor Walker-256, tais como a perda de tecido adiposo e massa muscular.

Corroborando outros estudos (ACCO *et al.*, 2007) o celecoxibe também reduziu a inibição da glicólise hepática dos ratos portadores de tumor Walker-256 (Figura 7F). A inibição da glicólise nestes animais, a partir da glicose exógena (VICENTINO *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2012), pode estar relacionada à resistência a insulina no fígado e aos baixos níveis de insulina no sangue dos ratos portadores de tumor Walker-256 (FERNANDES *et al.*, 1990). A insulina aumenta a atividade da glicoquinase, enzima que favorece a captação de glicose pelo hepatócito (IYNEDJIAN, 2009), e ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram redução da atividade da glicoquinase (VICENTINO *et al.*, 2002).

Além de estar envolvida na diminuição da resposta a insulina (LIU *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2011), estudos mostraram que a PGE₂ inibiu a secreção de insulina estimulada por glicose em células β pancreáticas (ROBERTSON *et al.*, 1987; SEAQUIST *et al.*, 1989), enquanto o tratamento com inibidor seletivo de COX2 aumentou a secreção de insulina tanto *in vitro* (LUO *et al.*, 2002), como *in vivo* (FUJITA *et al.*, 2007). Contudo, a falta de efeito do ibuprofeno na glicólise hepática de ratos portadores de tumor (Figura 7B) sugere que a melhora da inibição da glicólise pelo celecoxibe não foi mediada pela redução da síntese de prostaglandinas, mas pela diminuição dos mediadores da caquexia devido à redução do crescimento tumoral.

Corroborando esta sugestão, o tratamento com celecoxibe, mas não com ibuprofeno, reduziu o aumento do número de leucócitos aderidos a veia porta (figura 8E) ou infiltrados no parênquima hepático (figura 8F) dos ratos portadores de tumor. O aumento da migração de leucócitos (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) da circulação para o parênquima hepático indica inflamação local, aumento da resposta imunológica e conseqüentemente maior liberação de citocinas (OO *et al.*, 2010). Portanto, a redução do infiltrado inflamatório no fígado de ratos portadores de tumor tratados com celecoxibe sugere uma menor liberação de citocinas, o que pode ter

contribuído para a melhora da atividade glicolítica hepática destes animais, visto que citocinas como TNF- α e IL-6 promovem resistência hepática à insulina, um hormônio estimulador da glicólise.

Diferentemente dos resultados anteriores, onde o ibuprofeno não teve efeito sobre nenhum dos parâmetros afetados pelo tumor Walker-256, tanto o tratamento com celecoxibe quanto com ibuprofeno foram capazes de reverter a inibição da neoglicogênese hepática a partir da alanina (figura 9B), piruvato (figura 11B) e lactato (figura 12B) nos ratos portadores de tumor.

A inibição da neoglicogênese a partir da alanina nos ratos portadores de tumor provavelmente envolveu inibição da alanina aminotransferase, como indicado pela menor produção hepática de piruvato, lactato e ureia (figura 10D), confirmando resultados do laboratório (MOREIRA *et al.*, 2013). A alanina aminotransferase é uma enzima que converte a alanina em piruvato, com liberação de amônia, a qual é utilizada na síntese de ureia. O piruvato resultante é convertido em lactato, pela lactato desidrogenase, ou em glicose, por uma série de reações catalisadas enzimaticamente (figura 14). Em concordância com nossa sugestão, diminuição na atividade da alanina aminotransferase (ROSEN *et al.*, 1961; HERZFELD & GREENGARD, 1972) e maior concentração hepática de alanina (GOODLAD *et al.*, 1990), sugerindo redução do catabolismo da alanina, foram encontradas em fígados de ratos portadores de tumor Walker-256.

Os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno reverteram a inibição da produção de piruvato, lactato e uréia a partir da alanina em ratos portadores de tumor (figura 10D) possivelmente por melhorarem a atividade da alanina aminotransferase. Estes efeitos do celecoxibe e ibuprofeno parecem ser mediados pela redução da síntese prostaglandinas, e não pela redução do crescimento tumoral, uma vez que o tratamento com ibuprofeno não diminuiu o crescimento do tumor Walker-256.

A inibição da neoglicogênese a partir do piruvato (figura 11B) ou lactato (figura 12B) indica que a menor neoglicogênese a partir da alanina em ratos portadores de tumor provavelmente envolveu alterações em outras etapas da via neoglicogênica, além da catalisada pela alanina aminotransferase. De fato, a menor neoglicogênese a partir do piruvato pode decorrer da inibição de outras enzimas chave da via como a piruvato carboxilase, PEPCK, frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase (figura 14). No entanto, resultados de nosso laboratório demonstraram

que ratos portadores de tumor Walker-256 não apresentam inibição da neoglicogênese a partir do glicerol (MOREIRA *et al.*, 2013), descartando a possibilidade de inibição da frutose 1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase, as quais catalisam reações após a entrada do glicerol na via neoglicogênica (figura 14).

Portanto, a inibição da neoglicogênese nos ratos portadores de tumor pode ter sido decorrente da redução da conversão do piruvato para oxaloacetato, etapa catalisada pela piruvato carboxilase, e/ou da redução da conversão do oxaloacetato para fosfoenolpiruvato, etapa catalisada pela PEPCK.

A piruvato carboxilase e PEPCK são estimuladas por acetil-coA e as etapas catalisadas por estas enzimas requerem a presença de NADH e ATP (DELARUE & MAGNAN, 2007). Considerando que a acetil-coA, o NADH e ATP são gerados na oxidação de ácidos graxos (DELARUE & MAGNAN, 2007), uma menor oxidação de ácidos graxos poderia ser responsável pela inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e lactato nos ratos portadores de tumor.

Para serem oxidados, os ácidos graxos do citoplasma precisam atravessar as membranas externa e interna da mitocôndria. Ainda no citoplasma, os ácidos graxos são ativados, tornando-se acil-CoA, a qual atravessa a membrana mitocondrial interna por meio de um processo dependente de carnitina e das enzimas carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), localizada na face externa da membrana mitocondrial, carnitina palmitoil transferase 2 (CPT2), localizada na face interna e carnitina-acilcarnitina translocase, que atua entre as duas faces da membrana interna (FOSTER *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram que a atividade das CPTs está reduzida no fígado de ratos portadores de tumor Walker-256 (SEELAENDER *et al.*, 1998; VICENTINO *et al.*, 2002; LIRA *et al.*, 2010). Seelaender e *cols.* (1998) mostraram inibição da CPT2, enquanto Vicentino e *cols.* (2002) observaram redução de aproximadamente 50% na atividade da CPT1, o que acarretou em diminuição da cetogênese a partir de ácidos graxos nos fígados de ratos portadores de tumor Walker-256. A menor atividade das CPTs resulta em redução da oxidação de ácidos graxos nos hepatócitos e conseqüentemente em menor produção de acetil-coA, NADH e ATP, fatores estimuladores da neoglicogênese.

De fato, no presente estudo os fígados de ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram concentração reduzida de ATP (figura 13), corroborando outros estudos (CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004). Além disso, os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno aumentaram os níveis reduzidos de ATP e reverteram a inibição da neoglicogênese nos ratos portadores de tumor. Como nos estudos os animais foram submetidos a 24 horas de privação alimentar, para depleção do glicogênio hepático, a maior parte do ATP do fígado provavelmente se originou da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e não da glicólise.

O controle da expressão da CPT2 em fígado de ratos portadores de tumor parece ser modulado, dentre outros fatores, pela PGE2. Seelaender e *cols.* (1998) mostraram que o tratamento com indometacina, um AINEs, aumentou a atividade da CPT2 no fígado de ratos portadores de tumor Walker-256. Assim, o celecoxibe ou ibuprofeno também podem ter aumentado a atividade das CPTs, aumentando a oxidação de ácidos graxos e conseqüentemente a geração de acetil-coA, NADH e ATP, revertendo a inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e lactato no fígado de ratos portadores de tumor.

Uma redução da concentração de ATP, promovida pelo TNF α , poderia também contribuir para a inibição da neoglicogênese nos ratos portadores de tumor. Foi verificado que a administração de TNF α em ratos inibiu a neoglicogênese hepática a partir da alanina e do lactato (KELMER-BRACHT *et al.*, 2006; DA ROCHA *et al.*, 2013) e que o TNF α aumentou os níveis de RNAm de proteínas desacopladoras (UCP2 e UCP3) (BUSQUETS *et al.*, 1998) e induziu o desacoplamento da respiração mitocondrial (BUSQUETS *et al.*, 2003), um efeito que reduz a síntese de ATP. Contudo, estudos do nosso laboratório mostraram que o tratamento com um anticorpo inibidor de TNF α (infiximabe), não teve efeito na inibição da neoglicogênese a partir da alanina em ratos portadores de tumor Walker-256 (MIKSZA, 2011), demonstrando que o TNF α não é um mediador importante da inibição da neoglicogênese induzida pelo tumor Walker-256.

Nossos achados de que tanto o celecoxibe quanto o ibuprofeno reverteram a inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e lactato, independente do efeito destes fármacos sobre o crescimento tumoral, demonstram o papel central das prostaglandinas na inibição da neoglicogênese em ratos portadores de tumor Walker-256.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- O tratamento de ratos portadores de tumor Walker-256 com celecoxibe, porém não com ibuprofeno, reduziu o crescimento tumoral e aumentou as áreas de necrose e sinais de apoptose no tumor, provavelmente por mecanismos independentes da inibição da COX2/PGE₂.
- O tratamento com celecoxibe, mas não com ibuprofeno, reduziu a perda de massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal, massa dos músculos gastrocnêmio e EDL, os níveis plasmáticos elevados de triacilglicerol, ureia e lactato, a inibição da resposta periférica a insulina e da glicólise hepática em ratos portadores de tumor Walker, provavelmente por redução da massa tumoral e não por diminuir a síntese de prostaglandinas.
- Os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno não alteraram a menor ingestão alimentar de ratos portadores de tumor Walker-256, sugerindo que as prostaglandinas não são os principais mediadores envolvidos na anorexia associada ao tumor Walker-256. Os tratamentos com celecoxibe ou ibuprofeno também não alteraram a redução da glicemia de ratos portadores de tumor, provavelmente devido a uma melhora na resposta periférica a insulina.
- Ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com celecoxibe, mas não com ibuprofeno apresentaram redução do número de leucócitos aderidos a veia porta ou infiltrados no parênquima hepático, sugerindo uma menor liberação de citocinas no fígado, o que pode ter contribuído para a melhora da inibição da glicólise nos ratos portadores de tumor.
- Tanto o tratamento com celecoxibe quanto com ibuprofeno reverteram a inibição da neoglicogênese hepática a partir da alanina, lactato e piruvato, a inibição da produção de ureia, lactato e piruvato a partir da alanina e a redução da concentração hepática de ATP dos ratos portadores de tumor Walker-256, sugerindo um efeito importante das prostaglandinas na inibição da neoglicogênese hepática.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACCO, A.; SILVA, M. H. R. A.; BATISTA, M. R.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. Action of celecoxib on hepatic metabolic changes induced by the Walker-256 tumour in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 101, n. 5, p. 294-300, 2007.
- AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E. E. Circulating Walker 256 carcinoma cells in the spleen. *Archives of Surgery*, v. 94, n. 3, p.313-315, 1967.
- ALMEIDA, P. R.; FERREIRA, F. V.; SANTOS, C. C.; ROCHA-FILHO, F. D.; FEITOSA, R. R.; FALCÃO, E. A.; CAVADA, B. K.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; RIBEIRO, R. A. Immunoexpression of cyclooxygenase-2 in primary gastric carcinomas and lymph node metastases. *World Journal of Gastroenterology*, v. 18, n. 8, p. 778-84, 2012.
- ANDREWS, J.; DJAKIEW, D.; KRYGIER, S.; ANDREWS, P. Superior effectiveness of ibuprofen compared with other nsoids for reducing the survival of human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacology*, v. 50, p. 277-84, 2002.
- ARGILÉS, J. M ; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. *Cancer Treatment and Research*, v. 130, p. 199-217, 2006.
- ARRUDA, A. P.; MILANSKI, M.; ROMANATTO, T.; SOLON, C.; COOPE, A.; ALBERICI, L. C.; FESTUCCIA, W. T.; HIRABARA, S. M.; ROPELLE, E.; CURI, R.; CARVALHEIRA, J. B.; VERCESI, A. E.; VELLOSO, L. A. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology*, v.151, n.2, p.683-694, 2010.
- 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.
- ATTAIX, D.; COMBARET, L.; TILIGNAC, T.; TAILLANDIER, D. Adaptation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in cancer cachexia. *Molecular Biology Reports*, v.26, p.77-82, 1999.
- ATTIGA, F.A.; FERNANDEZ, P.M.; WEERARATNA, A.T.; MANYAK, M.J.; PATIERNO, S.R. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Research*, v. 60, n. 16, p. 4629-37, 2000.
- BARLOW, M.; EDELMAN, M.; GLICK, R. D.; STEINBERG, B. M.; SOFFER, S. Z. Celecoxib inhibits invasion and metastasis via a cyclooxygenase 2-independent mechanism in an in vitro model of Ewing sarcoma. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 47, n. 6, p. 1223-1227, 2012.
- BASTOS-PEREIRA, A. L.; LUGARINI, D.; OLIVEIRA-CHRISTOFF, A.; ÁVILA, T. V.; TEIXEIRA, S.; PIRES, A. R. A.; MUSCARÁ, M. N.; CADENA, S. M. S. C.; DONATTI, L.; ASSIS, H. C. S.; ACCO, A. Celecoxib prevents tumor growth in an animal model by a COX-2 independent mechanism. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 65, n. 2, p. 267-276, 2010.
- BEAUTLER, E. *Williams Hematology*, McGraw Hill, New York, 1995

- BERGMAYER, H. U. & BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, v. 2, p. 1205-1215, 1974.
- BING, C. & TRAYHURN, P. New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 68, n. 4, p. 385-392, 2009.
- BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BURT, M.; DONNER, D.; BRENNAN, M. F. Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine in vivo. *Journal of Surgical Oncology*, v. 59, n. 4, p. 220-224, 1996.
- BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BRENNAN, M. F.; BURT, M. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism*, v. 44, n. 2, p.145-156, 1995.
- BONETTO, A.; AYDOGDU, T.; KUNZEVITZKY, N.; GUTTRIDGE, D. C.; KHURI, S.; KONIARIS, L. G.; ZIMMERS, T. A. STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PloS One*, v. 6, n. 7, p. e22538, 2011.
- 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.
- BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 19, n. 2, p. 223-239, 2007.
- BRENNAN, M. F. Total parenteral nutrition in the cancer patient. *The New England Journal of Medicine*, v. 305, n. 7, p. 375-382, 1981.
- BUSQUETS, S.; ARANDA, X.; RIBAS-CARBÓ, M.; AZCON-BIETO, J.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. Tumour necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria. *Cytokine*, v. 22, n. 1-2, p.1-4, 2003.
- BUSQUETS, S.; SANCHÍS, D.; ALVAREZ, B.; RICQUIER, D.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M. In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS Letters*, v. 440, n. 3, p. 348-350, 1998.
- CALDAROLA, L.; DEI POLI, G.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. *Panminerva Medica*, v. 10, n.6, p.246-249, 1968.
- CAMPS, C.; IRANZO, V.; BREMNES, R. M.; SIRERA, R. Anorexia-cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway. *Supportative Care in Cancer*, v. 14, p. 1173-1183, 2006.
- 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.
- CARSON, J. A. & BALTGALVIS, K. A. Interleukin-6 a key regulator of muscle mass durin cachexia. *Muscle Biology*, v. 38, n. 4, p. 168-176, 2010.

- CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C. L.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T. B. V.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, H. M. Changes in blood metabolic parameters during the development of walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, p. 265-270, 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.
- CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIÈ, O.; MESSERINI, L.; SARDI, I.; LASAGNA, N.; PERNA, F.; FABBIONI, V.; DI FELICE, A.; PERIGLI, G.; MAZZANTI, R.; MASINI, E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 8, p. 2694-2704, 2004.
- CORBELLO PEREIRA, S. R.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; DA SILVA, M. H.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1688, n. 3, p.187-196, 2004.
- CZOK, R. & LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York, p. 1446-1448, 1974.
- DA ROCHA, A. F.; LIBONI, T. F.; MOREIRA, C. C.; MIKSZA, D. R.; DE SOUZA, C. O.; DE FATIMA SILVA, F.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Inhibitory effect of tumor necrosis factor α on gluconeogenesis in perfused rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 375, n. 1-2, p. 89-96, 2013.
- DA SILVA, M. A.; BERSANI-AMADO, C. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; BRACHT, L.; CAPARROZ-ASSEF, S. M. Protective effects of indomethacin and cyclophosphamide but not of infliximab on liver metabolic changes caused by adjuvant-induced arthritis. *Inflammation*, v. 34, n. 6, p.519-530, 2011.
- DAVIS, T. W.; ZWEIFEL, B. S.; O'NEAL, J. M.; HEUVELMAN, D. M.; ABEGG, A. L.; HENDRICH, T. O.; MASFERRER, J. L. Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 308, n. 3, p. 929-934, 2004.
- DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care*, v. 10, p.142-148, 2007.
- EBISUI, C.; TSUJINAKA, T.; MORIMOTO, T.; KAN, K.; IJIMA, S.; YANO, M.; KOMINAMI, E.; TANAKA, K.; MONDEN, M. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clinical Science (London)*, v. 89, n. 4, p. 431-439, 1995.
- EVANS, W. J.; MORLEY, J. E.; ARGILES, J.; BALES, C.; BARACOS, V.; GUTTRIDGE, D.; JATOI, A.; KALANTAR-ZADEH, K.; LOCHS, H.; MANTOVANI, G.; MARKS, D.; MITCH, W. E.; MUSCARITOLI, M.; NAJAND, A.; PONIKOWSKI, P.; ROSSIFANELLI, F.; SCHAMBELAN, M.; SCHOLS, A.; SCHUSTER, M.; THOMAS, D.; WOLFE, R.; ANKER, S. D. Cachexia: a new definition. *Clinical Nutrition*, v. 27, n. 6, p. 793-799, 2008.
- FEINGOLD, K. R.; MOSER, A.; SHIGENAGA, J. K.; GRUNFELD, C. Inflammation inhibits the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and adipose tissue. *Innate Immunity*, v. 18, n. 2, p.231-240, 2012.

- FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 258, n. 6, p. E1033-E1036, 1990.
- FOSTER, D. W. The role of the carnitine system in human metabolism. *Annals of New York Academy of Sciences*, v. 1033, p.1-16, 2004.
- FUJITA, H.; KAKEI, M.; FUJISHIMA, H.; MORII, T.; YAMADA, Y.; QI, Z.; BREYER, M. D. Effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor treatment on glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6 mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 363, n. 1, p. 37-43, 2007.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.
- GAO, J.; JIA, W. D.; LI, J. S.; WANG, W.; XU, G. L.; MA, J. L.; GE, W. S.; YU, J. H.; REN, W. H.; LIU, W. B.; ZHANG, C. H. Combined inhibitory effects of celecoxib and fluvastatin on the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *The Journal of International Medical Research*, v. 38, p. 1413-1427, 2010.
- GONG, L.; THORN, C. F.; BERTAGNOLLI, M. M.; GROSSER, T.; ALTMAN, R. B.; KLEIN, T. E. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, v. 22, n. 4, p. 310-30, 2012.
- GOODLAD, G. A.; JAFFRAY, E.; LOUDON, K.; CLARK, C. M. Increased liver alanine in the tumour-bearing host. Altered levels of some enzymes involved in alanine metabolism. *Biochemistry International*, v. 21, n. 2, p. 279-287, 1990.
- GOODMAN, M. N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 205, n. 2, p. 182-185, 1994.
- GRÖSCH, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *The FASEB Journal*, v. 15, n. 14, p. 2742-2744 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, n. 3, p. 173-178, 1982.
- GUTMANN, I. & BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York, p. 1790-1798, 1974.
- GUTMANN, I. & WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York, p. 1464-1472, 1974.
- HERZFELD, A.; GREENGARD, O. The dedifferentiated pattern of enzymes in livers of tumor-bearing rats. *Cancer Res*, v. 32, n. 9, p. 1826-1832, 1972.
- HOMEM-DE-BITTENCOURT JR, P. I.; POTIERI, V.; CURI, R.; LOPES, O. U. Effects of aspirin-like drugs on Walker-256 tumor growth and cachexia in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 22, n. 8, p. 1039-1042, 1989.

- HONORS, M. A. & KINZIG, K. P. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 3, n. 1, p. 5-11, 2012.
- HSIEH, P. S.; JIN, J. S.; CHIANG, C. F.; CHAN, P. C.; CHEN, C. H.; SHIH, K. C. Cox-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring)*, v. 17, p. 1150-1157, 2009.
- INUI, A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 52, n. 2, p. 72-91, 2002.
- IYNEDJIAN, P. B. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 66, n. 1, p. 27-42, 2009.
- KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M. Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, 1995.
- KARDOSH, A.; WANG, W.; UDDIN, J.; PETASIS, N. A.; HOFMAN, F. M.; CHEN, T. C.; SCHÖNTHAL, A. H. Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapie*, v. 4, p. 571-582, 2005.
- KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V. M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.
- KELMER-BRACHT, A. M.; BROETTO-BIAZON, A. C.; DE SÁ-NAKANISHI, A. B.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; BRACHT, A. Low doses of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta diminish hepatic gluconeogenesis from alanine in vivo. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 99, n. 5, p.335-339, 2006.
- Kerola, M.; Vuolteenaho, K.; Kosonen, O.; Kankaanranta, H.; Sarna, S.; Moilanen, E. Effects of nimesulide, acetylsalicylic acid, ibuprofen and nabumetone on cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-mediated prostanoid production in healthy volunteers ex vivo. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 104, n. 1, p. 17-21, 2009.
- KOLDITZ, C. L.; LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis. *Current Opinion Clinical and Nutrition Metabolism Care*, v. 13, p. 377-381, 2010.
- LAMPRECHT, W.; TRAUTSCHOLD, I. Enzymatic determination of adenine triphosphate (ATP) with hexokinase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York, p. 1464-1472, 1974.
- LEVINE, A. S.; MORLEY, J. E. The effect of prostaglandins (PGE₂ and PGF₂ alpha) on food intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 15, p. 735-738, 1981.
- LI, W.; XU, R.; LIN, Z.; ZHUO, G.; ZHANG, H. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Medical Oncology*, v. 26, p.170-177, 2009.

- LIRA, F. S.; YAMASHITA, A.; CARNEVALI, L. C. JR.; GONÇALVES, D. C.; LIMA, W. P.; ROSA, J. C.; CAPERUTO, E. C.; ROSA, L. F.; SEELAENDER, M. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumor-bearing rats. *Hormone Metabolism Research*, v. 42, n. 13, p. 944-949, 2010.
- LIU, T. T.; SHIH, K. C.; KAO, C. C.; CHENG, W. T.; HSIEH, P. S. Importance of cyclooxygenase 2-mediated low-grade inflammation in the development of fructose-induced insulin resistance in rats. *The Chinese Journal of Physiology*, v. 52, n. 2, p. 65-71, 2009.
- LUO, C.; KALLAJOKI, M.; GROSS, R.; MULARI, M.; TEROS, T.; YLINEN, L.; MÄKINEN, M.; LAINE, J.; SIMELL, O. Cellular distribution and contribution of cyclooxygenase (COX) -2 to diabetogenesis in NOD mouse. *Cell and Tissue Research*, v. 310, n. 2, p. 169-175, 2002.
- 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, n. 9, p. 1084-101, 2009.
- MAXWELL, P. H. The hif pathway in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 16, p. 523-530, 2005.
- McADAM, B. F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I. A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 96, n. 1, p.272-277, 1999.
- McCARTHY, D. O. Inhibitors of prostaglandin synthesis do not improve food intake or body weight of tumor-bearing rats. *Research in Nursing & Health*, v. 22, p. 380-387, 1999.
- MÉRIC, J. B.; ROTTEY, S.; OLAUSSEN, K.; SORIA, J. C.; KHAYAT, D.; RIXE, O.; SPANO, J. P. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, v. 59, n. 1, p. 51-64, 2006.
- MIKSZA, D. R. Efeito do inliximab (anti-TNF α) em alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- MORAIS, H.; CASSOLA, P.; MOREIRA, C. C. L.; VILAS-BÔAS, S. K. F.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, H. M. Decreased response to camp in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of walker-256 tumor-bearing rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 368, p. 9-16, 2012.
- MOREIRA, C. C.; CASSOLA, 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.
- NOTARNICOLA, M.; MICCOLIS, A.; TUTINO, V.; LORUSSO, D.; CARUSO, M. G. Low levels of lipogenic enzymes in peritumoral adipose tissue of colorectal cancer patients. *Lipids*, v. 47, p. 59-63, 2012.
- OO, Y. H.; SHETTY, S.; ADAMS, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Digestives Diseases*, v. 28, n. 1, p.31-44, 2010.

- OSHIMA, M.; DINCHUK, J. E.; KARGMAN, S. L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J. M.; EVANS, J. F.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, v. 87, n. 5, p. 803-809, 1996.
- PAI, R.; SZABO, I.L.; SOREGHAN, B.A.; ATAY, S.; KAWANAKA, H.; TARNAWSKI, A.S. PGE2 stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 286, n. 5, p. 923-8, 2001.
- PATRA, S. K. & ARORA, S. Integrative role of neuropeptides and cytokines in cancer anorexia-cachexia syndrome. *Clinica Chimica Acta*, v. 13, n. 13-14, p. 1025-1034, 2012.
- QUANN, E. J.; KHWAJA, F.; ZAVITZ, K. H.; DJAKIEW, D. The aryl propionic acid R-flurbiprofen selectively induces p75NTR-dependent decreased survival of prostate tumor cells. *Cancer Research*, v. 67, p. 3254-3262, 2007.
- QUAAS, M.; STÜMPEL, F.; CHRIST, B. Glucagon-stimulated but not isoproterenol-stimulated glucose formation inhibition by interleukin-6 in primary cultured rat hepatocytes. *Hormone and Metabolism Research*, v. 37, n. 11, p.666-671, 2005.
- RAMOS, E. J.; SUZUKI, S.; MARKS, D.; INUI, A.; ASAKAWA, A.; MEGUID, M. M. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolism Care*, v. 7, n. 4, p. 427-434, 2004.
- REBECA, R.; BRACHT, L.; NOLETO, G. R.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ROCHA, M. E. M.; DE OLIVEIRA, M. B. M. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochemistry and Function*, v. 26, n. 6, p. 731-738, 2008.
- ROBERTSON, R. P.; TSAI, P.; LITTLE, S. A.; ZHANG, H. J.; WALSETH, T. F. Receptor-mediated adenylate cyclase-coupled mechanism for PGE2 inhibition of insulin secretion in HIT cells. *Diabetes*, v. 36, n. 9, p. 1047-1053, 1987.
- ROSEN, F.; BUDNICK, L. E.; SOLOMON, D. K.; NICHOL, C. A. Corticosteroids and transaminase activity. III. A relationship between changes in alanine transaminase activity and the growth of Walker carcinosarcoma 256. *Cancer Research*, v. 21, p. 620-626, 1961.
- ROSS, J. A.; FEARON, K. C. H. Eicosanoid-dependent cancer cachexia and wasting. *Current Opinion in Clinical and Nutrition Metabolism Care*, v. 5, p. 241-248, 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, p. 447-455, 2003.
- SEAQUIST, E. R.; WALSETH, T. F.; NELSON, D. M.; ROBERTSON, R. P. Pertussis toxin-sensitive G protein mediation of PGE2 inhibition of cAMP metabolism and phasic glucose-induced insulin secretion in HIT cells. *Diabetes*, v. 38, n. 11, p. 1439-1445, 1989.
- SEELAENDER, M. C.; CURI, R.; COLQUHOUN, A.; WILLIAMS, J. F.; ZAMMITT, V. A. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 44, n. 1, p. 185-193, 1998.

- 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.
- SHENG, H.; SHAO, J.; WASHINGTON, M.K.; DuBOIS, R.N. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 21, p. 18075-81, 2001.
- SIDDIQUI, R. A. & WILLIAMS, J. F. The regulation of fatty acid and branched-chain amino acid oxidation in cancer cachectic rats: A proposed role for a cytokine, eicosanoid, and hormone trilogy anterior lobe. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, v. 42, n. 1, p. 71-86, 1989.
- 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. 74, n. 26, p. 3211-3222, 2007.
- TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. *British Journal of Cancer*, v. 67, n. 1, p. 15-23, 1993.
- TIAN, Y.F.; HSIA, T.L.; HSIEH, C.H.; HUANG, D.W.; CHEN, C.H.; HSIEH, P.S. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life Sciences*, v. 89, n. 3-4, p. 107-114, 2011.
- TISDALE, M. J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? *Future Oncology*, v. 6, p. 503-513, 2010.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological Reviews*, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.
- TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology*, v. 20, n. 5, p. 340-348, 2005.
- TRINDER, P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, v.22, n. 2, p. 158-161, 1969.
- TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 7, p. 3336-3340, 1997.
- VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Liver*, v. 22, n. 4, p. 342-50, 2002.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 181-193, 2010.
- WANG, X.; BAEK, S. J.; ELING, T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Review*, v. 30, p. 641-657, 2011.
- 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.
- WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*, v. 16, n. 10, p. 1151-1162, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer mortality and morbidity. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html>. Acesso em: 2 jan 2013.

ZHANG, D.; ZHENG, H.; ZHOU, Y.; TANG, X.; YU, B.; LI, J. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer*, v. 7, p. 1-7, 2007.

ZHANG, H. H.; HALBLEIB, M.; AHMAD, F.; MANGANIELLO, V. C.; GREENBERG, A. S. Tumor necrosis factor-stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*, v. 51, n. 10, p. 2929–2935, 2002.