



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA LUIZA QUINTILHANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIXISENATIDA SOBRE O
CRESCIMENTO TUMORAL E AS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256
EM RATOS**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

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

DÉBORA LUIZA QUINTILHANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIXISENATIDA SOBRE O
CRESCIMENTO TUMORAL E AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS
INDUZIDAS PELO TUMOR WALKER-256 EM RATOS**

Londrina - Paraná
2018

DÉBORA LUIZA QUINTILHANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIXISENATIDA SOBRE O
CRESCIMENTO TUMORAL E AS 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 Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Lopes Bertolini.

Londrina
2018

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

Quintilhano, Débora Luiza.

Avaliação do efeito da lixisenatida sobre o crescimento tumoral e as alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos / Débora Luiza Quintilhano. - Londrina, 2018.

58 f. : il.

Orientador: Gisele Lopes Bertolini.

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

Inclui bibliografia.

1. Caquexia do câncer - Tese. 2. Agonistas de GLP-1 - Tese. 3. Hipoinsulinemia - Tese. 4. Alterações metabólicas - Tese. I. Bertolini, Gisele Lopes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

DÉBORA LUIZA QUINTILHANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIXISENATIDA SOBRE O
CRESCIMENTO TUMORAL E AS 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 Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

Dedicatória

A Deus que nos criou e foi feliz nesta tarefa.
Aos meus pais, meus exemplos de humildade e perseverança.
Ao meu marido, por todo apoio e incentivo nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia e que jamais me abandonou em nenhum momento.

Aos meus pais, Gerônimo e Maria, que desde sempre, me incentivaram a estudar e estão sempre torcendo pelo meu sucesso, foram, são e serão sempre exemplos de humildade, perseverança e muita fé.

Ao meu marido Renan, que desde o início do nosso relacionamento sempre me deu total apoio. Obrigada por estar sempre ao meu lado, inclusive pela ajuda nas avaliações de ingestão alimentar.

À minha orientadora prof^a Dr^a Gisele Lopes Bertolini, a qual me faltam palavras para agradecer, primeiramente por acreditar que eu seria capaz e me acolher como sua orientanda, por ser extremamente compreensiva e humana e por me ensinar cada passo da pesquisa com muita dedicação e sabedoria. Agradeço de todo o coração por tudo que fez por mim, tudo que aprendi e evolui devo a você.

À prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza, chefe do nosso laboratório e exemplo de pesquisadora, por me acolher, mesmo sabendo de minha inexperiência. Obrigada pelas orientações e por tudo que me ensinou.

Às meninas do laboratório, Daniele, Giuliana e Isabele, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, risadas e por tornarem nosso trabalho mais animado e agradável.

À prof^a Dr^a Maria Fernanda Rodrigues Graciano, que participou ativamente deste trabalho e me ensinou muito.

Aos colegas de mestrado, aos professores, funcionários e alunos do departamento de Ciências Fisiológicas.

À Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco, pela doação das amostras de lixisenatida, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que me auxiliaram, direta ou indiretamente a realizar este projeto e concluir o mestrado. Agradeço pelas palavras positivas de muitos amigos, parentes e colegas, estas palavras e apoio sempre nos dão forças para buscar e vencer os obstáculos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

QUINTILHANO, Débora Luiza. **Avaliação do efeito da lixisenatida sobre o crescimento tumoral e as alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos.** 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Hipoinsulinemia e resistência insulínica têm sido observadas na caquexia do câncer. Entretanto, poucos estudos têm avaliado o efeito de agentes secretagogos e sensibilizadores da insulina, como os agonistas de receptores do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), na prevenção da caquexia do câncer. O presente estudo investigou os efeitos da lixisenatida, um agonista de receptores de GLP-1, sobre o crescimento tumoral e parâmetros relacionados à caquexia-anorexia em ratos portadores de tumor Walker-256. Para tanto, os animais foram divididos nos seguintes grupos: ratos saudáveis tratados com solução salina, ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida. A lixisenatida ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$), ou salina, foi administrada subcutaneamente, uma vez ao dia, por 6 dias, iniciando no mesmo dia da inoculação das células tumorais. No 3º, 4º e 5º dias após a inoculação das células tumorais avaliou-se a ingestão alimentar. No 6º dia de desenvolvimento tumoral foram avaliadas as massas corporal, tumoral, dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal e dos músculos gastrocnêmio e extensor digital longo (EDL), a secreção de insulina, a resposta periférica à insulina e as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, triacilgliceróis, lactato e ureia. O tratamento com lixisenatida não alterou o crescimento tumoral e a ingestão alimentar e acentuou a perda de massa corporal em ratos portadores de tumor Walker-256. A redução da massa corporal encontrada nos ratos portadores de tumor deveu-se à perda de tecido adiposo. O tratamento com lixisenatida também não foi capaz de melhorar a secreção de insulina e a resposta periférica à insulina e de prevenir o aumento das concentrações plasmáticas de triacilglicerol e lactato e a redução da glicemia e insulinemia dos ratos portadores de tumor. Portanto, o tratamento com lixisenatida, além de não atenuar a caquexia, ainda promoveu perda de massa corporal nos ratos portadores de tumor Walker-256.

Palavras-chave: Câncer. Caquexia. Alterações metabólicas. Hipoinsulinemia. Lixisenatida. Agonista de receptores do peptídeo semelhante ao glucagon-1.

QUINTILHANO, Débora Luiza. **Evaluation of the effect of lixisenatide on tumor growth and metabolic changes induced by Walker-256 tumor in rats.** 2018. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Hypoinsulinemia and insulin resistance have been observed in cancer cachexia. However, few studies have evaluated the effect of insulin secretagogues and sensitizers, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, in preventing cancer cachexia. The present study investigated the effects of lixisenatide, a GLP-1 receptor agonist, on tumor growth and cachexia-anorexia related parameters in Walker-256 tumor-bearing rats. For this, the animals were divided into the following groups: healthy rats treated with saline, Walker-256 tumor-bearing rats treated with saline and Walker-256 tumor-bearing rats treated with lixisenatide. Lixisenatide (50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), or saline, was administered subcutaneously once daily for 6 days starting the same day of tumor cell inoculation. At the 3rd, 4th and 5th days after inoculation of the tumor cells, the alimentary ingestion was evaluated. On the 6th day of tumor development, the masses of the body, tumor, retroperitoneal and epididymal adipose tissues and gastrocnemius and long digital extensor (EDL) muscles, insulin secretion, peripheral insulin response and plasma concentrations of glucose, insulin, triacylglycerols, lactate and urea were evaluated. Treatment with lixisenatide did not alter tumor growth and food intake and accentuated the loss of body mass in Walker-256 tumor-bearing rats. The reduction in body mass found in tumor-bearing rats was due to the loss of adipose tissue. Treatment with lixisenatide was also not able to improve insulin secretion and peripheral response to insulin and to prevent the increase of plasma concentrations of triacylglycerol and lactate and the reduction of glycemia and insulinemia of the tumor-bearing rats. Therefore, treatment with lixisenatide, in addition to not attenuating cachexia, also promoted loss of body mass in Walker-256 tumor-bearing rats.

Keywords: Cancer. Cachexia. Metabolic changes. Hypoinsulinemia. Lixisenatide. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Massa tumoral total de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) ou com lixisenatida (TL), durante 6 dias..... 32
- Figura 2. Ingestão alimentar (A), alteração de massa corporal (B), massa do tecido adiposo retroperitoneal (C), massa do tecido adiposo epididimal (D), massa do músculo gastrocnêmio (E) e massa do músculo extensor digital longo (EDL)(F) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias.. 33
- Figura 3. Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (A), lactato (B) e ureia (C) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias..... 34
- Figura 4. Glicemia (A) e insulinemia (B) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias..... 35
- Figura 5. Secreção estática de insulina estimulada por glicose (5.6 e 16.7 mM) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias.. 35
- Figura 6. Conteúdo intracelular de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias..... 36
- Figura 7. Glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (kITT) (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias.. 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AAP	4-aminoantipirina
4-AF	4-aminofenazona
AGLs	Ácidos graxos livres
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
CRH	Fator liberador de corticotrofina
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil-peptidase-4
EDL	Extensor digital longo
Epac2	Proteína trocadora diretamente ativada por AMPc
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GLP-1R	Receptores de peptídeo semelhante ao glucagon-1
GOD	Glicose oxidase
G-1-P	Glicerol-1-fosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF	Fator induzido por hipóxia
INF α	Interferon α
INF γ	Interferon γ
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1
ITT	Teste de tolerância à insulina
kITT	Constante de decaimento da glicose no plasma
LDH	Lactato-desidrogenase
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipoproteína lipase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NPY	Neuropeptídeo Y
PCL	Fosfolipase C

PI3K	Proteína quinase 3
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKB/AKT	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PIF	Fator indutor de proteólise
POD	Peroxidase
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Drogas	23
3.2	Animais	23
3.3	Implantação do tumor Walker-256 e protocolo de tratamento	23
3.4	Avaliação de crescimento tumoral, parâmetros relacionados à anorexia-caquexia e parâmetros metabólicos plasmáticos	25
3.5	Isolamento das ilhotas pancreáticas	25
3.6	Secreção estática de insulina	26
3.7	Avaliação da resposta periférica à insulina	27
3.8	Procedimentos analíticos	27
3.8.1	<i>Determinação da concentração de glicose</i>	27
3.8.2	<i>Determinação da concentração de triacilglicerol</i>	28
3.8.3	<i>Determinação da concentração de lactato</i>	28
3.8.4	<i>Determinação da concentração de ureia</i>	28
3.9	Procedimentos estatísticos	29
4.	RESULTADOS	31
5.	DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, é responsável por aproximadamente 1 em cada 6 mortes em todo o mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer a cada ano, e este número deverá aumentar para mais de 21 milhões até 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Destas mortes, aproximadamente 50% está relacionada com uma síndrome complexa, a caquexia do câncer (TISDALE, 2009).

A caquexia do câncer é caracterizada por perda progressiva de peso corpóreo, ocasionada por um desequilíbrio metabólico, onde ocorre predomínio do catabolismo e anorexia (TISDALE, 2005; BENNANNI-BAITI; WALSH, 2009). Neste quadro há alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, bem como hipoinsulinemia (FERNANDES et al., 1990; CONLON et al., 1993; COSTELLI et al., 1999; MASTROCOLA et al., 2008), baixa razão insulina:glucagon (INCULET et al., 1987; KNAPP et al., 1991; TESSITORE; COSTELLI; BACCINO, 1993; BARTLETT; CHARLAND; TOROSIAN, 1994; BARTLETT; CHARLAND; TOROSIAN, 1995) e resistência à insulina, com intensa perda de massa muscular, acompanhada ou não de perda de massa adiposa (ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2005; GORDON; GRENN; GOGGIN, 2005; EVANS et al., 2008; TISDALE, 2010; WAGNER; PETRUZZELLI, 2015).

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

Considerando que a hipoinsulinemia e a baixa razão insulina:glucagon estão associadas ao hipercatabolismo, é possível que a melhora da secreção de insulina, por agentes farmacológicos, amenize a perda de massa corporal e outras alterações metabólicas associadas ao câncer. É também possível que o aumento da razão insulina:glucagon reduza a oferta de nutrientes para as células tumorais e desfavoreça o desenvolvimento tumoral.

Há relato de que o tratamento crônico com exendine-4, um agonista de receptores do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), obtido inicialmente da glândula salivar do lagarto *Heloderma suspectum*, preveniu a hipoinsulinemia em ratos portadores de sarcoma de Yoshida. Também reduziu o crescimento do tumor, preveniu a perda de peso corporal e o desenvolvimento de parâmetros de caquexia do câncer em ratos com menor crescimento tumoral (HONORS; KINZIG, 2014).

O GLP-1 é uma incretina secretada pelas células L do trato gastrointestinal em resposta a uma refeição. O GLP-1 diminui a glicemia por aumentar a secreção de insulina e diminuir a secreção de glucagon. Efeitos adicionais de GLP-1 incluem o retardo do esvaziamento gástrico, a supressão do apetite e, potencialmente, a inibição da apoptose de células β (MADSBAD et al., 2011; FINEMAN et al., 2012; MEIER, 2012; PETERSEN; CHRISTENSEN, 2013; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014; WERNER, 2014; LINDAMOOD; TAYLOR, 2015).

O GLP-1 aumenta a secreção de insulina pelas células β pancreáticas de forma dependente da concentração de glicose e melhora todos os passos da biossíntese de insulina, bem como de sua transcrição gênica. O efeito de potenciação da secreção de insulina está ausente em concentrações de glicose plasmática inferiores a 4 mM, resultando em um baixo risco de hipoglicemia (FINEMAN et al., 2012; PETERSEN; CHRISTENSEN, 2013).

Em roedores, o GLP-1 tem efeitos tróficos nas células β pancreáticas e, em ilhotas pancreáticas isoladas de humanos, o GLP-1 tem demonstrado inibir a apoptose de células β . A secreção de glucagon e, assim, a produção hepática de glicose é inibida pelo GLP-1. Equivalente ao efeito sobre a secreção de insulina, a supressão da secreção de glucagon é dependente da concentração de glicose e, desta forma, o GLP-1 não tem qualquer efeito inibitório sobre a secreção de glucagon quando as concentrações de glicose no plasma estão baixas ($\leq 3,7$ mM). Portanto, a resposta contrarreguladora do glucagon está preservada para hipoglicemia (FINEMAN et al., 2012; PETERSEN; CHRISTENSEN, 2013).

Além disso, estudos em modelos animais diabéticos resistentes à insulina e em pacientes diabéticos tipo 2 sugerem que agonistas de receptores de GLP-1 reduzem a resistência à insulina. Porém, não está claro se este efeito sensibilizador da insulina ocorre em virtude da perda de peso promovida por estes fármacos ou por mecanismo independente (FINEMAN et al., 2012).

O GLP-1 parece modular uma ampla gama de efeitos fisiológicos, além da regulação da glicemia e controle do metabolismo. Receptores de GLP-1 (GLP-1Rs) foram identificados nas células α , β e δ pancreáticas, no trato gastrointestinal, bem como em várias regiões do sistema nervoso central, coração, pulmões, musculatura lisa vascular, células endoteliais e macrófagos (BAGGIO; DRUCKER, 2007; FORST; PFÜTZNER, 2013; HOLSCHER, 2014).

O GLP-1 promove seus efeitos biológicos através da ativação de seus receptores presentes na membrana plasmática de suas células alvo. Os GLP-1Rs pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G. O sítio de ligação do GLP-1 encontra-se na região extracelular N-terminal, enquanto domínios intracelulares distintos são essenciais para o acoplamento do receptor às proteínas G específicas como Gs, Gq, Gi e G0, conduzindo diferentes vias de transdução de sinal, como ativação ou inibição da adenilatociclase, ativação da fosfolipase C, proteína quinase dependente de AMPc (PKA), proteína quinase C (PKC), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína trocadora diretamente ativada por AMPc (Epac2) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Os GLP-1Rs apresentam diversas ações no pâncreas. Nas células β pancreáticas, estimulam a adenilatociclase, o que resulta no aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e conseqüente indução da secreção de insulina (THORENS, 1992; MONTROSE-RAFIZADEH et al., 1999; BAGGIO; DRUCKER, 2007; SLOOP et al., 2010).

Como o GLP-1 é rapidamente degradado pela dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4), tendo meia-vida plasmática de 2 a 3 minutos, agonistas de GLP-1R, versões sintéticas de exendina-4, têm sido desenvolvidos para proporcionar ação mais prolongada *in vivo* (FINEMAN et al., 2012; MEIER, 2012; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014).

Agonistas de GLP-1R diferem em relação às suas estruturas moleculares e aos seus perfis farmacocinéticos. Exenatida e lixisenatida, agonistas de GLP-1Rs de curta ação derivados da exendina-4, possuem meia-vida plasmática de

aproximadamente 2 a 4 horas, enquanto liraglutide, um agonista de GLP-1Rs de longa ação, possui meia-vida plasmática de aproximadamente 11 a 15 horas. Agonistas de GLP1-Rs de liberação prolongada, como albiglutida, dulaglutida, semaglutida e exenatida de liberação prolongada, apresentam meia-vida plasmática que varia de 4 a 8 dias (MEIER, 2012; MARATHE et al., 2013; LORENZ et al., 2013; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014).

A lixisenatida, disponível comercialmente como Lyxumia®, é uma versão sintética de curta ação de exendina-4, desenvolvido recentemente para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (BARNETT, 2011; MADSBAD et al., 2011; FINEMAN et al., 2012; MEIER, 2012; HOROWITZ; RAYNER; JONES, 2013; BROWN; BUTLER; EVANS, 2014; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014; ROSENSTOCK et al., 2014; SCHMIDT et al., 2014).

Lixisenatida é um peptídeo sintético contendo 44 aminoácidos, cuja estrutura química foi baseada na de exendina-4; a diferença entre ambos consiste na deleção de um resíduo de prolina e na adição de seis resíduos de lisina na terminação carboxílica. Além disso, a lixisenatida está protegida contra a clivagem por DPP-4 devido a uma substituição de aminoácidos na segunda posição N-terminal (MEIER, 2012). Essas alterações resultam em meia-vida plasmática de 2 a 4 h após injeção subcutânea. Sua meia-vida plasmática relativamente curta sugeriria a administração de duas doses diárias. Porém, por possuir afinidade e seletividade aproximadamente quatro vezes maior do que o GLP-1 pelo receptor, a lixisenatida é administrada somente uma vez ao dia (MADSBAD et al., 2011; FINEMAN et al., 2012; FORST; PFÜTZNER, 2013; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014; McCLEAN; HOLSCHER, 2014).

Em estudos com ilhotas pancreáticas, a lixisenatida foi capaz de manter a função e a massa de células β pancreáticas por estimular a proliferação e a neogênese e por inibir a apoptose destas células (WERNER et al., 2010; BARNETT, 2011; BOLLI; OWENS, 2014). Administração de lixisenatida ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, 6 semanas) em ratos Zucker diabéticos e obesos preservou a primeira e a segunda fases de secreção de insulina estimulada por glicose e a secreção total de insulina, enquanto que ratos não tratados apresentaram redução progressiva da secreção de insulina e perda do padrão bifásico de secreção durante o desenvolvimento do DM2. Os ratos tratados com lixisenatida também apresentaram supressão da secreção de glucagon em resposta a altas concentrações de glicose (WERNER et al., 2010; BARNETT, 2011). Em pacientes diabéticos, a lixisenatida também restaurou a

primeira e a segunda fase de secreção de insulina estimulada por glicose para padrões observados em pacientes saudáveis e manteve a resposta contrarreguladora glicêmica do glucagon à hipoglicemia, apesar de inibir a secreção de glucagon em resposta ao aumento da glicemia (WERNER et al., 2010; FORST; PFÜTZNER, 2013; BOLLI; OWENS, 2014).

Em estudos realizados em pacientes com DM2, lixisenatida promoveu redução da glicemia de jejum e, principalmente, redução da glicemia pós-prandial (FINEMAN et al., 2012; LORENZ et al., 2013; HOROWITZ; RAYNER; JONES, 2013; BOLLI; OWENS, 2014; McCLEAN; HOLSCHER, 2014). A redução da glicemia pós-prandial é promovida principalmente pelo retardo do esvaziamento gástrico, o que promove redução do pico glicêmico e, portanto, menor secreção de insulina pelas células β pancreáticas (MEIER, 2012; ROSENSTOCK et al., 2014). Além disso, como a lixisenatida promove supressão da secreção de glucagon pelas células α pancreáticas em resposta ao aumento da glicemia, isto também contribuiria para a redução da glicemia pós-prandial (SLOOP et al., 2010; KAPITZA et al., 2013; LORENZ et al., 2013; FORST; PFÜTZNER, 2013).

Além de facilitar a liberação de insulina e inibir a secreção de glucagon pelo pâncreas, agonistas de GLP-1Rs têm apresentado efeitos anti-inflamatórios em animais e humanos (MARATHE et al., 2013; SEUFERT; GALLWITZ, 2013; HOLSCHER, 2014; LENNOX; FLATT; GAULT, 2014; McCLEAN; HOLSCHER, 2014), os quais também podem ser benéficos em algumas alterações metabólicas associadas ao câncer, uma doença inflamatória.

Agonistas de GLP-1Rs, como a lixisenatida, são particularmente benéficos no tratamento de pacientes com DM2 obesos, para quem o ganho de peso é um risco clínico relevante, em especial naqueles com risco de hipoglicemia e com comorbidades, tais como doenças cardiovasculares, por impedirem o ganho de peso ou promoverem redução do peso corporal ((WERNER et al., 2010; BARNETT, 2011; MEIER, 2012; FORST; PFÜTZNER, 2013; HOROWITZ; RAYNER; JONES, 2013; BOLLI; OWENS, 2014; LUND; KNOP; VILSBØLL, 2014; ROSENSTOCK et al., 2014; SCHMIDT et al., 2014).

Como a caquexia do câncer é caracterizada por perda progressiva de peso corpóreo (TISDALE, 2005; BENNANNI-BAITI; WALSH, 2009), o efeito de agonistas de GLP-1Rs sobre o peso corporal poderia ser um fator limitante para seu emprego no tratamento da caquexia. Entretanto, Honors e Kinzig (2014) demonstraram que o

tratamento crônico com exendine-4 de ratos portadores de sarcoma de Yoshida preveniu a perda de peso corporal e o desenvolvimento de parâmetros de caquexia do câncer em ratos com menor crescimento tumoral.

Como a lixisenatida é um peptídeo sintético cuja estrutura química foi baseada na de exendine-4, torna-se relevante investigar seus efeitos sobre o crescimento tumoral e as alterações metabólicas induzidas pela caquexia do câncer.

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

Considerando que portadores de câncer frequentemente apresentam hipoinsulinemia, baixa razão insulina:glucagon e resistência à insulina, alterações que podem contribuir para as desordens metabólicas associadas à caquexia neoplásica, o presente estudo foi realizado para avaliar o efeito da lixisenatida, agonista de GLP-1R conhecido por aumentar a secreção de insulina e reduzir a de glucagon, sobre vários distúrbios metabólicos induzidos pelo tumor Walker-256 em ratos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito da lixisenatida sobre o crescimento tumoral, a secreção de insulina, a resistência à insulina, a caquexia e outras alterações metabólicas induzidas pelo tumor Walker-256 em ratos.

2.2 Específicos

Avaliar, em ratos portadores de tumor Walker-256, o efeito da administração de lixisenatida sobre:

- Crescimento tumoral;
- Ingestão alimentar;
- Parâmetros relacionados à caquexia (massas corpórea, muscular e adiposa);
- Parâmetros metabólicos plasmáticos (glicose, insulina, triacilglicerol, lactato e ureia);
- Secreção de insulina;
- Resposta periférica à insulina.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas

A lixisenatida (Lyxumia[®]) foi adquirida da Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil) e a insulina regular (Humalog[®]) da Eli Lilly do Brasil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Merck & Co (Darmstad, Germany) ou Laborclin (Pinhais/PR, Brasil).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 220-230 g, com livre acesso à água e alimentados à vontade com dieta padrão para roedores (Nuvilab[®]). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas, a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, nº de registro 09600).

3.3 Implantação do tumor Walker-256 e protocolo de tratamento

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de origem espontânea de glândula mamária de rata prenhe (EARLE, 1935). Este tumor apresenta um rápido crescimento e pode se desenvolver de forma sólida e também ascítica (AGOSTINO; CLIFFTON, 1965; CALDAROLA et al., 1968). O modelo de estudo da síndrome da caquexia/anorexia por meio da implantação do tumor Walker-256 em ratos é considerado adequado (GUAITANI et al., 1982), pois em curto espaço de tempo após a inoculação, pode-se verificar uma considerável redução no peso do animal, catabolismo acentuado de proteínas, lipídeos e carboidratos, além da redução na ingestão alimentar (anorexia). Decorridos 14 dias após a implantação do tumor, a

massa tumoral geralmente representa uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO et al., 2002).

No presente estudo, células Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de $1,0 \times 10^6$ células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais, anestesiados com tiopental sódico (50 mg.kg^{-1} IP), foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial a 4°C , 2500 rpm, durante 15 minutos, para obtenção das células tumorais. As células foram ressuspensas em tampão salina fosfato (PBS: fosfato 16,5 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4) e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer.

Em um grupo de ratos, posteriormente denominados de grupo tumor, foram inoculadas com $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Em outro grupo de ratos, posteriormente denominados de grupo saudável, foi inoculado PBS no mesmo local. Para este procedimento, os animais foram previamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg.kg^{-1} IP).

Em seguida, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- ▶▶ *Grupo saudável tratado com salina (SS)*: ratos sem tumor, submetidos à administração subcutânea de salina uma vez ao dia, por 6 dias.
- ▶▶ *Grupo tumor tratado com salina (TS)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à administração subcutânea de salina uma vez ao dia, por 6 dias.
- ▶▶ *Grupo tumor tratado com lixisenatida (TL)*: ratos portadores de tumor Walker-256, submetidos à administração subcutânea de lixisenatida, $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, por 6 dias.

Os tratamentos foram iniciados no mesmo dia da inoculação das células tumorais. A dose de lixisenatida utilizada, $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, foi baseada em estudos prévios (WERNER et al., 2010; HOLSCHER, 2014; WERNER, 2014). Os experimentos foram realizados 6 dias após o tratamento com lixisenatida ou salina. Para avaliação de parâmetros metabólicos plasmáticos, os animais foram submetidos a jejum de 24 horas, para retirar a influência da anorexia e do menor conteúdo de glicogênio hepático dos ratos portadores de tumor Walker-256.

3.4 Avaliação de crescimento tumoral, parâmetros relacionados à anorexia-caquexia e parâmetros metabólicos plasmáticos

Nestes experimentos, logo após a inoculação do tumor, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas individuais para a análise da ingestão alimentar, a qual foi avaliada pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a sobra da ração em um período de 24 horas, no 3º, 4º e 5º dias de tratamento. Para calcular a quantidade diária ingerida por 100 gramas de peso corporal (g%), foi utilizada a seguinte equação, onde: **ia**= ingestão alimentar em gramas; **mc**= massa corpórea do animal; **mt**= massa do tumor.

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

Posteriormente (6º dia de tratamento), os animais foram pesados, anestesiados com tiopental sódico (50 mg.kg⁻¹ IP) e laparotomizados para coleta de amostras de sangue da veia cava inferior para avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, triacilglicerol, lactato e ureia. Em seguida, os ratos foram eutanasiados por dessangramento e o tumor, tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal e os músculos gastrocnêmio e extensor digital longo (EDL) foram cuidadosamente dissecados e pesados e o tecido pancreático foi coletado para o isolamento das ilhotas pancreáticas. As massas dos tecidos foram expressas por 100 gramas de peso corporal (g%), de acordo com a equação a seguir, onde: **m**= massa do tecido; **mc**= massa corpórea; **mt**= massa do tumor.

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

3.5 Isolamento das ilhotas pancreáticas

A obtenção das ilhotas pancreáticas foi realizada pelo método da digestão do pâncreas exócrino pela colagenase, de acordo com técnicas já estabelecidas (CURI et al., 1990; FERNANDES et al., 1996). Foi realizada a laparotomia mediana e a exposição do ducto biliar comum que foi clampeado na sua extremidade distal e

dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetados, por via retrógrada, cerca de 20 mL de solução de colagenase a 0,7mg/mL (Collagenase Type V – Sigma Chemical Co.) em Hanks. A solução de Hanks contém NaCl 8,00 g/L, KCl 0,40 g/L, CaCl₂ 0,14 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,20 g/L, NaH₂PO₄ 0,48 g/L, KH₂PO₄ 0,06 g/L, NaHCO₃ 0,35 g/L, H₂O (qsp): 1,00 L.

A solução flui através dos ductos pancreáticos, provocando a divulsão do tecido acinar. O pâncreas foi então retirado e colocado em placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, tecido adiposo e vasos sanguíneos e fragmentado em pedaços e depositado em tubo de ensaio de 9,5 x 5 cm. O tubo foi colocado em banho a 37 °C durante 25 minutos. A seguir, foi agitado manualmente a 37 °C por 1 minuto para a digestão da porção exócrina do pâncreas. O conteúdo foi transferido para um becker com solução de Hanks e lavado 4 vezes. Em placa de Petri foi feita a coleta das ilhotas pancreáticas com o emprego de micropipeta e microscópio, as quais foram utilizadas nos ensaios de secreção estática de insulina.

3.6 Secreção estática de insulina

Grupos de 5 ilhotas em triplicata de cada animal em experimento foram adicionados em tubos eppendorf contendo 0,5 ml de Krebs-Henseleit, suplementado com albumina bovina (0,1%). As ilhotas foram pré-incubadas durante 30 minutos em Krebs-Henseleit contendo 5,6 mM glicose em banho-maria a 37°C e incubadas durante 1h em 5,6 ou 16,7 mM glicose. Terminada a incubação, os tubos foram mantidos em banho de gelo onde o sobrenadante foi removido e estocado a –20°C para posterior dosagem de insulina por raioimunoensaio. As ilhotas foram posteriormente ressuspensas em 450 µL de solução de álcool ácido (52 etanol: 17 água: 1 ácido clorídrico) e rapidamente sonicadas, provocando o rompimento das células para dosagem do conteúdo intracelular de insulina. Os dados foram expressos através da normalização da secreção pelo conteúdo de insulina.

A quantidade de insulina secretada no meio de incubação, presente intracelularmente ou oriunda da amostra de soro do animal foi determinada por radioimunoensaio, por meio de quantidades conhecidas de anticorpo e do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ¹²⁵I, Genese) e uma quantidade desconhecida de hormônio não-radioativo (amostra). As duas formas do

hormônio, radioativos e não-radioativos, competem por um mesmo número de locais de ligação ao anticorpo. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo foi plotada como função da concentração do hormônio não-radioativo. A seguir, a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

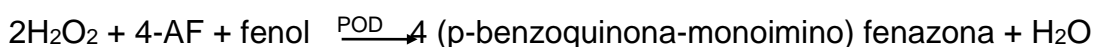
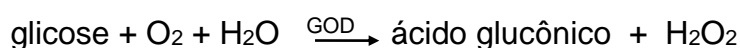
3.7 Avaliação da resposta periférica à insulina

A resposta glicêmica para insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância a insulina (ITT) em ratos alimentados. Para tanto, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg.kg^{-1} IP) e laparotomizados, e a insulina regular ($0,25 \text{ U/kg}$) foi administrada endovenosamente (veia cava inferior). Amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior no tempo 0 (basal - antes da injeção de insulina) e nos tempos 5, 10 e 15 minutos após a injeção de insulina para avaliação da glicemia. A constante de decaimento da glicose no plasma (kITT), um indicador da resposta periférica à insulina, foi calculada a partir da regressão linear dos valores de glicemia obtidos no ITT, entre 5 e 15 minutos após a administração de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA et al., 1989; SERAPHIM; NUNES; MACHADO, 2001).

3.8 Procedimentos analíticos

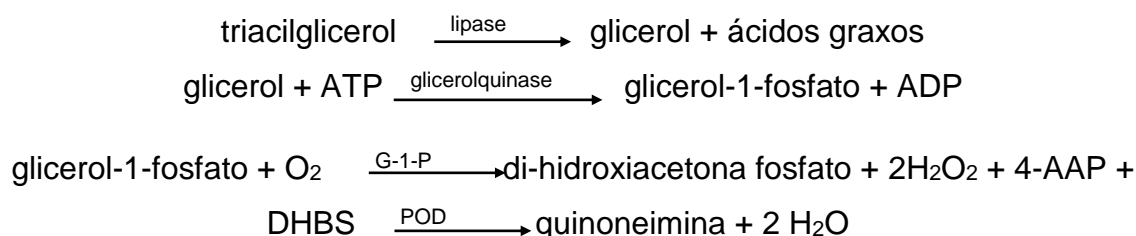
3.8.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose no plasma foi medida pelo método da glicose-oxidase (Bergmeyer e Bernt, 1974). Neste método, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda. O esquema a seguir resume estas reações:



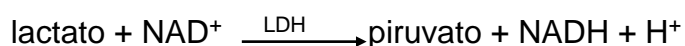
3.8.2 Determinação da concentração de triacilglicerol

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



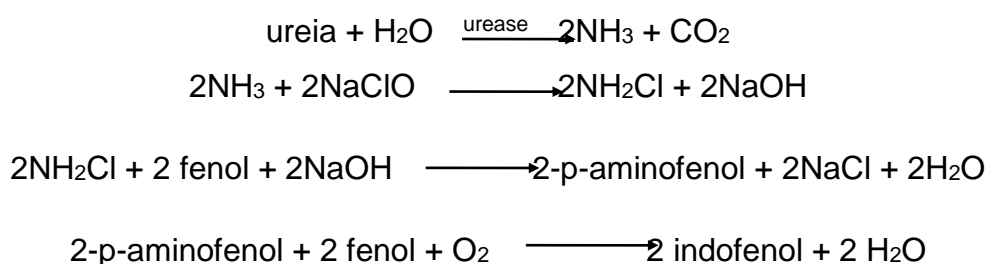
3.8.3 Determinação da concentração de lactato

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



3.8.4 Determinação da concentração de ureia

A concentração de ureia no plasma foi determinada por método enzimático, de acordo com a técnica de Gutmann e 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.



3.9 Procedimentos

3.9.1 estatísticos

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

Resultados

4. RESULTADOS

A massa tumoral dos animais portadores de tumor Walker-256, 6 dias após a inoculação, foi de aproximadamente 9 g. O tratamento com lixisenatida não alterou o crescimento tumoral (Figura 1).

A ingestão alimentar dos animais portadores de tumor Walker-256 tratados com salina (TS) e tratados com lixisenatida (TL) foi semelhante à dos animais saudáveis tratados com salina (SS) (Figura 2A).

Como esperado, o grupo SS apresentou ganho de peso após 6 dias, sendo este ganho de aproximadamente 19g. Em contrapartida, os animais portadores de tumor Walker-256 apresentaram perda de massa corporal 6 dias após a implantação do tumor, sendo esta perda mais acentuada no grupo TL do que no grupo TS. O grupo TS perdeu aproximadamente 7g, enquanto que o grupo TL perdeu cerca de 18 g. A perda foi 61,2% maior no grupo TL em comparação ao grupo TS (Figura 2B).

Houve redução do peso do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 2C) e do tecido adiposo epididimal (Figura 2D) nos grupos TS e TL, quando comparados ao grupo SS. Entretanto, não houve diferenças no peso destes tecidos adiposos entre os grupos TS e TL (Figuras 2C e 2D).

Não houve diferenças no peso dos músculos gastrocnêmio (Figura 2E) e extensor digital longo (EDL) (Figura 2F) entre os grupos analisados.

Com relação aos parâmetros plasmáticos, as concentrações plasmáticas de triacilglicerol (Figura 3A) e de lactato (Figura 3B) foram maiores nos animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) do que no grupo SS. Entretanto, não houve diferenças nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol e lactato entre os grupos TS e TL (Figuras 3A e 3B).

Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de ureia entre os grupos analisados (Figura 3C).

A glicemia (Figura 4A) e a insulinemia (Figura 4B) dos animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) foram menores do que as do grupo SS. Não houve diferenças na glicemia e na insulinemia entre os grupos TS e TL (Figuras 4A e 4B).

Tendo em vista a reduzida insulinemia apresentada pelos animais portadores de tumor Walker-256, foi realizada a análise da secreção estática de insulina e conteúdo intracelular de insulina.

Através da análise da secreção estática de insulina a partir das ilhotas pancreáticas isoladas e expostas a diferentes concentrações de glicose (5,6 mM e 16,7 mM), observou-se que os animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) apresentaram redução da secreção de insulina em relação ao grupo SS quando as ilhotas pancreáticas foram expostas a glicose 16,7 mM (Figura 5). Entretanto, não houve diferenças na secreção de insulina entre os grupos TS e TL (Figura 5). Também não houve diferenças no conteúdo intracelular de insulina entre os grupos analisados (Figura 6).

No teste de tolerância à insulina, a administração endovenosa de insulina promoveu gradativa diminuição da glicemia no grupo SS, sendo mais pronunciada aos 15 minutos. Entretanto, os animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) não apresentaram alteração da glicemia em resposta à administração de insulina no decorrer dos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos (Figura 7A), como evidenciado pela menor kITT em comparação com o grupo SS (Figura 7B). Não houve diferenças na resposta periférica à insulina entre os grupos TS e TL (Figuras 7A e 7B).

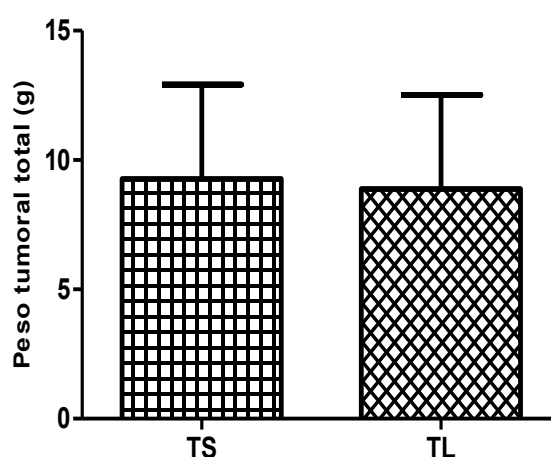


Figura 1. Massa tumoral total de ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) ou com lixisenatida (TL), durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 22 animais. Resultados analisados por test t Student não-pareado.

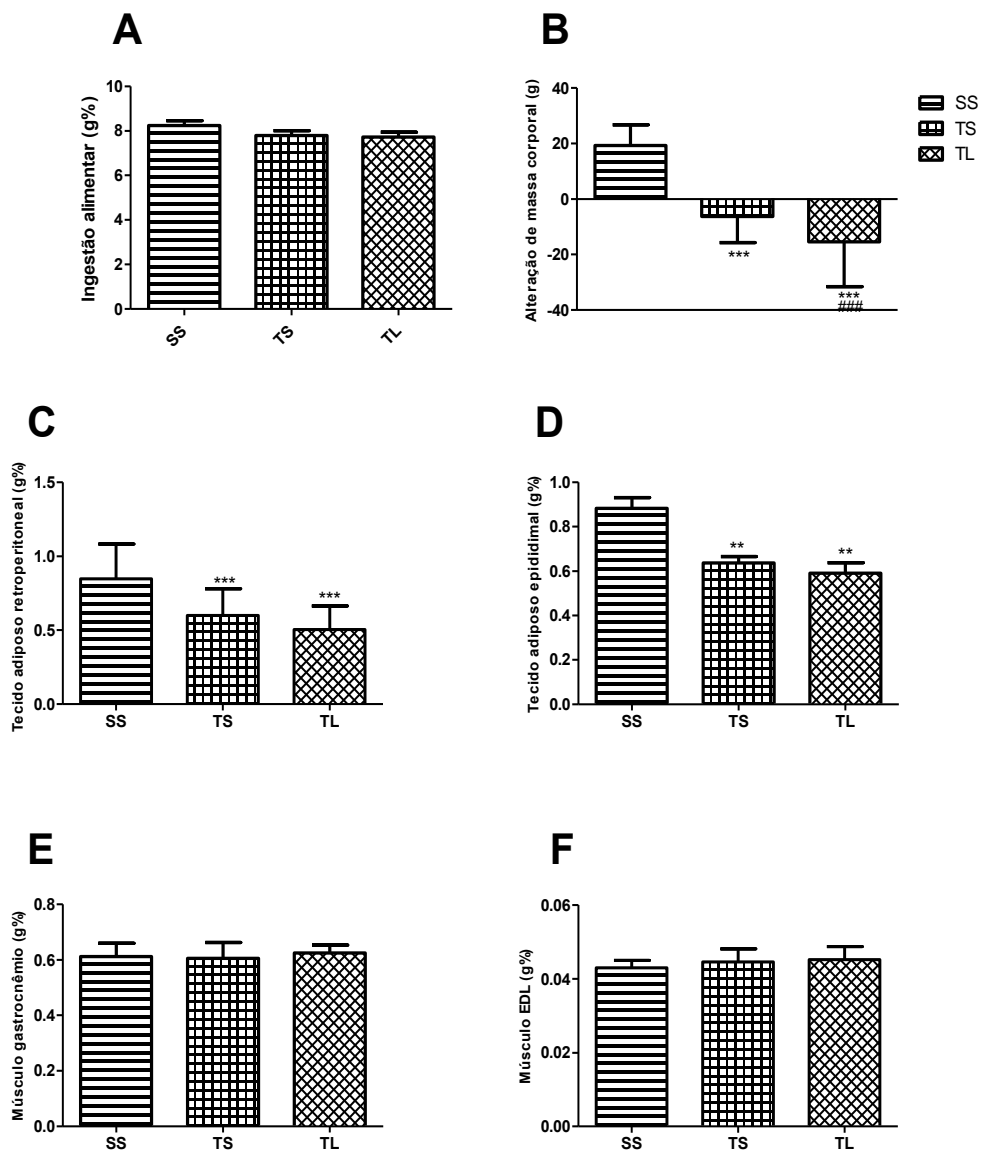


Figura 2. Ingestão alimentar (A), alteração de massa corporal (B), massa do tecido adiposo retroperitoneal (C), massa do tecido adiposo epididimal (D), massa do músculo gastrocnêmio (E) e massa do músculo extensor digital longo (EDL)(F) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 10 a 20 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: **p < 0,01 e ***p < 0,001 versus saudável tratado com salina e ###p < 0,001 versus tumor tratado com salina.

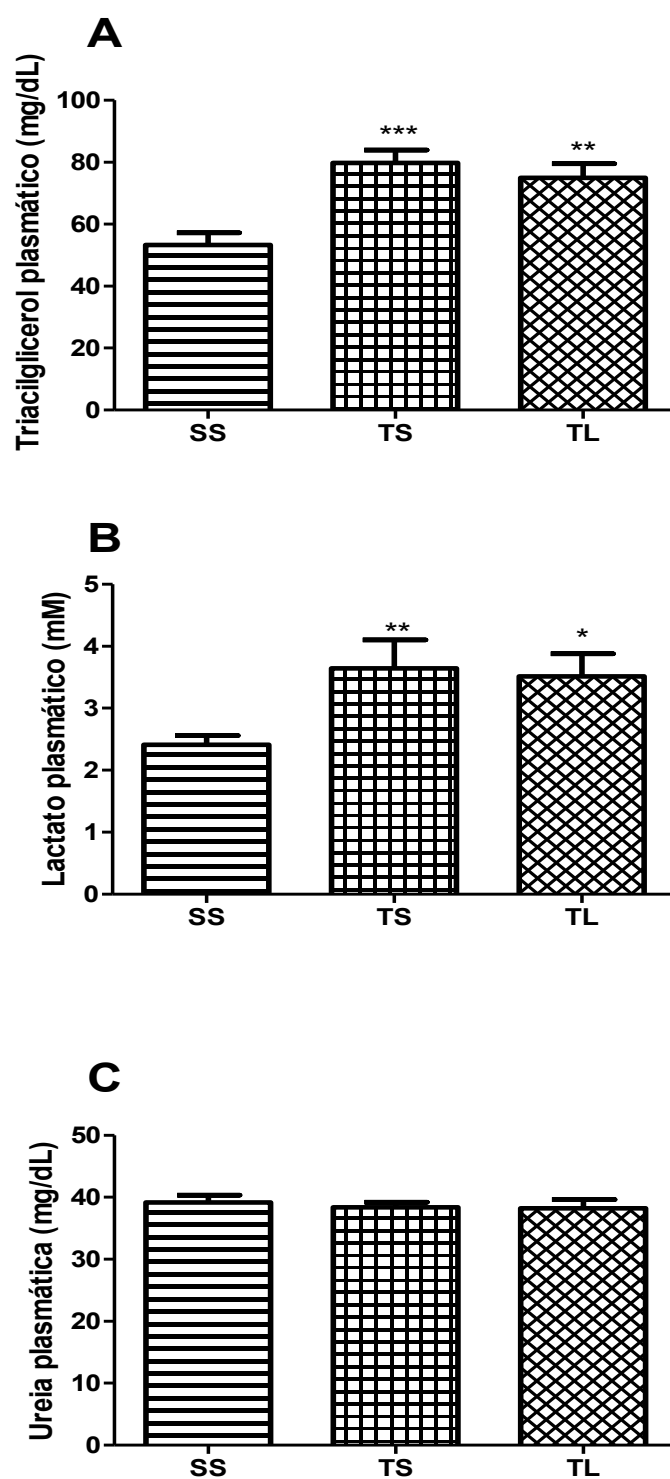


Figura 3. Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (A), lactato (B) e ureia (C) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 10 a 20 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável tratado com salina.

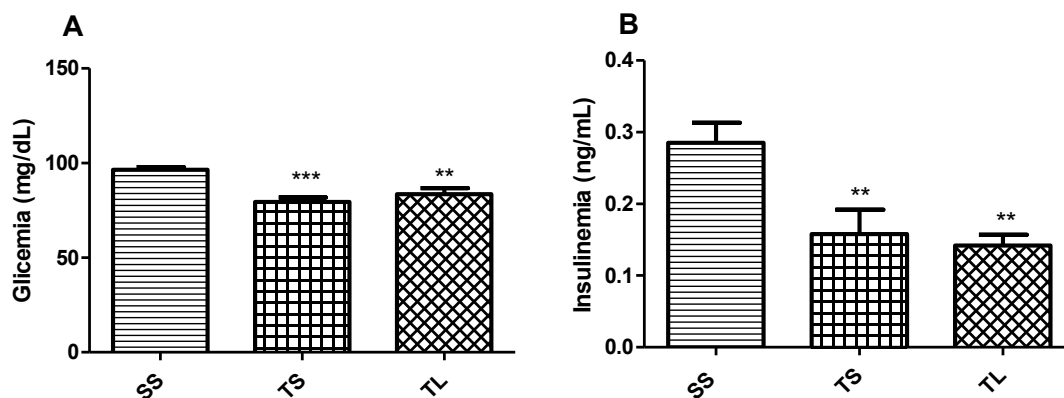


Figura 4. Glicemia (A) e insulinemia (B) de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 07 a 12 animais. Resultados analisados por ANOVA One-Way seguido de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus saudável tratado com salina.

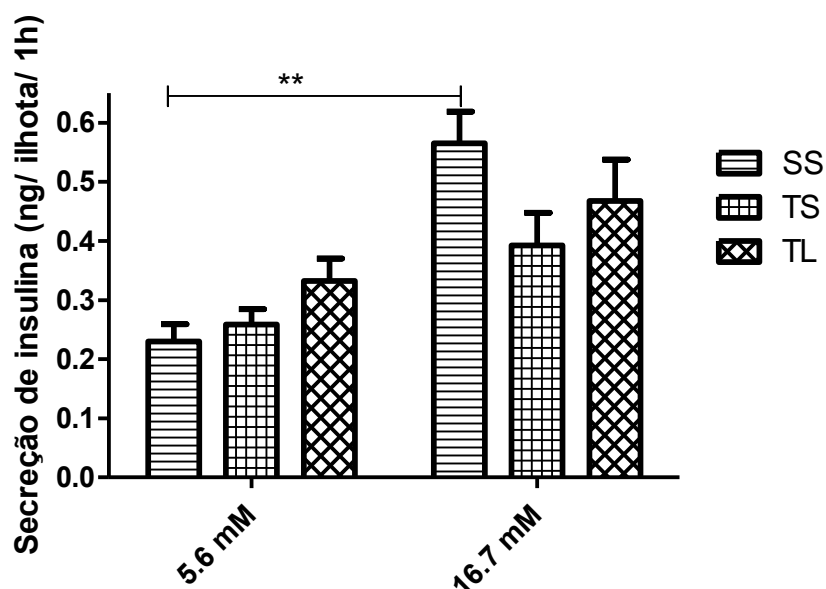


Figura 5. Secreção estática de insulina estimulada por glicose (5.6 e 16.7 mM) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 06 a 10 animais. Resultados analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste Bonferroni. ** $p < 0,01$ versus glicose 5.6 mM.

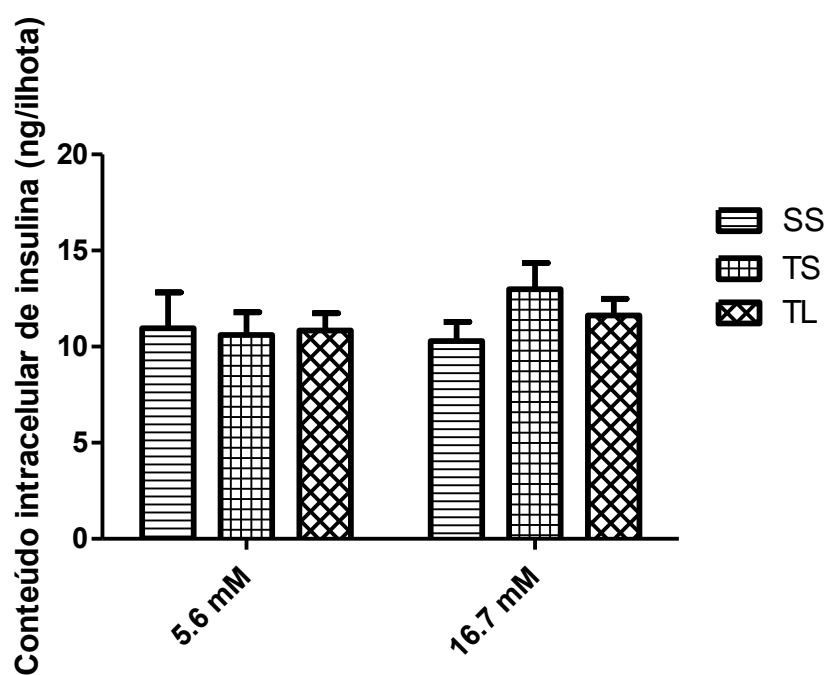


Figura 6. Conteúdo intracelular de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. Dados representam a média \pm EPM de 06 a 10 animais. Resultados analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste Bonferroni.

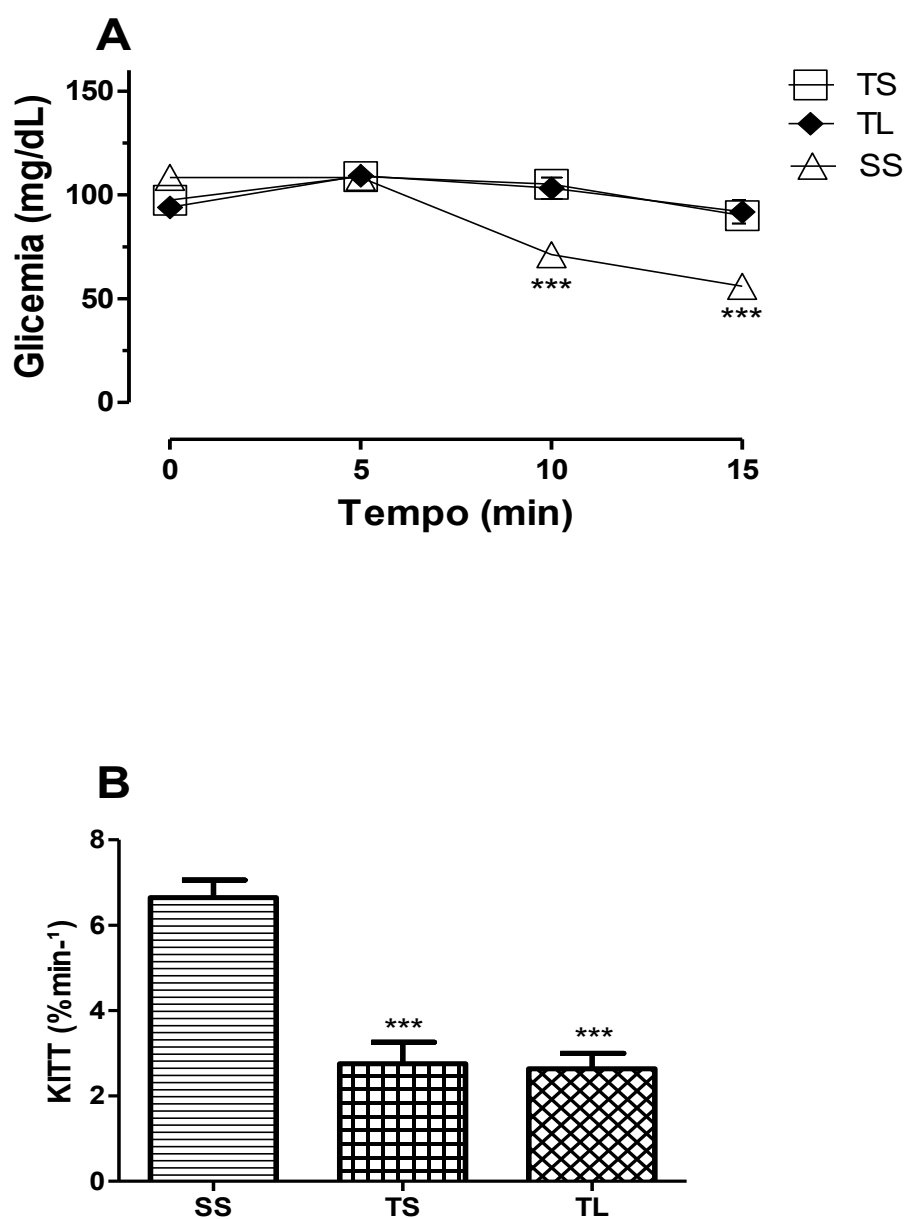


Figura 7. Glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (KITT) (B) após a administração de insulina em ratos saudáveis tratados com solução salina (SS), ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com solução salina (TS) e ratos portadores de tumor Walker-256 tratados com lixisenatida (TL) durante 6 dias. A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10 e 15 minutos após a administração endovenosa (veia cava inferior) de insulina (0,25 U/Kg). Os dados representam a média \pm EPM de 9 a 11 animais. Diferenças dentro do mesmo grupo (A) em relação ao basal foram avaliadas por ANOVA para mensurações repetidas *** $p < 0,001$ versus glicemia basal. Diferenças entre as KITTs (B) foram analisadas por ANOVA One-Way seguido de Tukey: *** $p < 0,001$ versus saudável tratado com salina.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Considerando que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam resistência à insulina (MIKSZA et al., 2013; DE SOUZA et al., 2015) e hipoinsulinemia (FERNANDES et al., 1990), fatores que podem estar relacionados ao desenvolvimento de caquexia nestes animais, os efeitos da lixisenatida, um agonista de GLP-1Rs que apresenta efeitos insulínótropicos (GEDULIN et al., 2005; WERNER et al., 2010; BOLLI; OWENS, 2014), sobre a secreção de insulina, resistência à insulina, caquexia e outras anormalidades metabólicas relacionadas foram investigados neste modelo experimental de câncer. Considerando também que o efeito da lixisenatida sobre o crescimento do tumor Walker-256 não está estabelecido, o efeito deste fármaco no desenvolvimento tumoral também foi avaliado.

No presente estudo, o tratamento com lixisenatida por seis dias, a partir do início da inoculação das células tumorais, não alterou o crescimento do tumor Walker-256 (Figura 1) e acentuou a perda de massa corporal (Figura 2B).

Entretanto, o tratamento crônico com exendine-4 por 23 dias (agonista de GLP-1Rs) reduziu o crescimento do tumor em ratos portadores de sarcoma de Yoshida. Porém, este efeito foi observado somente em animais com tumores menores. Em animais com tumores maiores, o tratamento com exendine-4 não reduziu o crescimento tumoral (HONORS; KINZIG, 2014).

É possível que a falta de efeito da lixisenatida sobre o crescimento tumoral deva-se ao fato do tumor Walker-256 apresentar evolução mais rápida (VICENTINO et al., 2002) do que o sarcoma de Yoshida. Ademais, trata-se de outro modelo experimental utilizado para estudar a síndrome da caquexia no câncer.

A perda de peso observada em portadores de câncer é, em parte, decorrente da anorexia, que parece estar relacionada ao efeito de citocinas (TNF α e IL6) que estimulam a liberação de fatores anorexigênicos, como o fator liberador de corticotrofina, e reduzem a liberação de neuropeptídeo Y, um neurotransmissor orexigênico, no núcleo paraventricular do hipotálamo (MARTIGNONI; KUNZE; FRIESS, 2003; ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2005; PATRA; ARORA, 2012).

Entretanto, nos animais portadores de tumor Walker-256, tanto do grupo TS quanto do grupo TL, a ingestão alimentar foi semelhante à do grupo saudável tratado com salina (Figura 2A), o que indica que a perda de peso destes animais não se deveu à redução da ingestão alimentar. Neste modelo experimental, a ingestão alimentar não está alterada seis dias após a inoculação do tumor. A redução da ingestão alimentar ocorre somente onze dias após a inoculação do tumor (CASSOLA et al., 2012; MIKSZA et al., 2013; SILVA, 2015). Além disso, o tratamento com lixisenatida não alterou a ingestão alimentar.

Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos com ratos portadores de sarcoma de Yoshida tratados com exendine-4. Neste estudo, o tratamento crônico com exendine-4 não promoveu alteração da ingestão alimentar (HONORS; KINZIG, 2014).

No que se refere à avaliação dos parâmetros associados à caquexia, o tratamento com lixisenatida promoveu perda de massa corporal no grupo portador de tumor (Figura 2B). A perda de peso foi 61% maior no grupo TL do que no grupo TS. A redução da massa corporal encontrada nos animais portadores de tumor Walker-256 deveu-se à perda de tecido adiposo, uma vez que a massa dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 2C) e epididimal (Figura 2D) foi menor nos grupos TS e TL. Entretanto, a perda mais acentuada de massa corporal observada nos ratos portadores de tumor tratados com lixisenatida não se deveu à redução da massa dos tecidos adiposos avaliados, uma vez que não houve diferenças entre os grupos TS e TL. A perda adicional de massa corporal pode ter ocorrido em virtude do retardo do esvaziamento gástrico promovido pela droga, o que pode ter acarretado a perda de massa de outros tecidos adiposos não avaliados (DRUCKER, 1998; MADSBAD et al., 2011; FINEMAN et al., 2012; MEIER, 2012; KNOP; VILSBØLL, 2014; WERNER, 2014; LINDAMOOD; TAYLOR, 2015).

Com relação à massa muscular, não houve diferenças na massa dos músculos gastrocnêmio (Figura 2E) e EDL (Figura 2F) entre os grupos analisados e o tratamento com lixisenatida não promoveu alteração do peso dos músculos avaliados.

Diferentes resultados foram obtidos em experimentos com ratos portadores de sarcoma de Yoshida tratados com exendine-4. Neste estudo, o tratamento crônico com exendine-4 preveniu a perda de peso corporal em animais com tumores menores e a perda de massa adiposa. Porém, não foi capaz de prevenir a perda de

massa muscular, avaliada pelo diâmetro das patas traseiras. No entanto, em animais com tumores menores, o tratamento com exendine-4 reduziu a expressão do RNAm de atrogina-1, um marcador de proteólise muscular (HONORS; KINZIG, 2014).

Embora em alguns estudos realizados em animais portadores de tumor ocorra queda precoce do conteúdo proteico e das concentrações plasmáticas de proteína (TESSITORE; COSTELLI, P.; BACCINO, 1993; MASTROCOLA et al., 2008), em animais portadores de tumor Walker-256 não ocorre perda de massa muscular seis dias após a inoculação do tumor. A perda de massa muscular é observada somente onze dias após sua inoculação, demonstrando que, embora haja depleção proteica desde a fase inicial, a perda de massa muscular torna-se evidente mais tardiamente (CASSOLA et al., 2012; MIKSZA et al., 2013; SILVA, 2015).

A perda de peso na caquexia do câncer está geralmente associada tanto ao hipermetabolismo proteico como lipídico, que resultam de acentuadas alterações hormonais e da ação de fatores produzidos pelo tumor, como o PIF e LMF, além da ação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1, IL-6, interferons INF α e INF γ (TESSITORE et al., 1987; TESSITORE; COSTELLI, P.; BACCINO, 1993; TISDALE, 1999; 2005; MANTOVANI et al., 2000; DELARUE; MAGNAN, 2007). O TNF α induz a perda de massa adiposa por estimular a lipólise, inibir a lipogênese e adipogênese, além de contribuir para o aumento da apoptose dos adipócitos. Juntamente com a IL-6, estimula a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRH), um fator anorexigênico. Além disso, a IL-1 bloqueia a liberação de um fator orexigênico, o neuropeptídeo Y (NPY) (MARTIGNONI; KUNZE; FRIESS, 2003; WARNE, 2003; ARGILÉS; BUSQUETS; LÓPEZ-SORIANO, 2005; ARRUDA et al., 2010).

Com relação aos parâmetros plasmáticos, as concentrações plasmáticas de triacilglicerol (Figura 3A) e de lactato (Figura 3B) foram maiores nos animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) do que nos animais do grupo SS, enquanto que a glicemia (Figura 4A) dos animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) foi menor do que a dos animais do grupo SS.

Nos animais portadores de tumor Walker-256, as concentrações plasmáticas de triacilglicerol e de lactato aumentam progressivamente ao longo do desenvolvimento do tumor, atingindo valores máximos no 14^o dia. O contrário é observado para a glicemia, que cai progressivamente ao longo do desenvolvimento tumoral, estando menor do que a dos animais saudáveis a partir do 5^o dia (CASSOLA et al., 2012).

Portadores de tumor apresentam diminuição do anabolismo de lipídeos e colesterol, com redução na massa adiposa, elevação das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGLs) e triglicerídeos, em contraste a reduzidas concentrações de colesterol e HDL. A lipoproteína lipase (LPL) é a enzima responsável pela hidrólise de triacilgliceróis e armazenamento de lipídeos. Em portadores de tumor, a atividade da LPL encontra-se inibida, o que está relacionado com as citocinas pró-inflamatórias e aumento dos AGLs no sangue (TESSITORE; COSTELLI, P.; BACCINO, 1993; CARBÓ et al., 1994; KERN, 1998; TISDALE, 1999; YU; GINSBERG, 2005; DELARUE; MAGNAN, 2007; COSTELLI et al., 1993). Animais portadores de tumor de Yoshida AH-130 apresentaram aumento constante de triglicerídeos, que foi consistente com a elevação de TNF α (TESSITORE; COSTELLI, P.; BACCINO, 1993).

A redução da glicemia em animais portadores de tumor Walker-256 é decorrente da alta captação de glicose pelo tumor, principalmente os de crescimento rápido, como o Walker-256 (TISDALE, 2002; PIFFAR et al., 2003). Estes tumores, devido à sua rápida expansão e desorganizada angiogênese, possuem baixo aporte de sanguíneo, o que os torna hipóxicos. A hipóxia ocorre devido à incapacidade de fornecimento adequado de oxigênio para a massa tumoral em crescimento. As baixas concentrações de O₂ levam à estimulação da divisão celular, migração e diversas mudanças morfológicas, o que pode tornar o tumor mais agressivo e capaz de formar metástases (ACHISON; HUPP, 2003; BRAHIMI-HORN; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2007). Além disso, a baixa oxigenação favorece a utilização da via glicolítica anaeróbica, por meio da ativação do fator induzido por hipóxia (HIF), fazendo com que as células tumorais capturem mais glicose e excretem altas concentrações de lactato, visto que este é o produto final da via glicolítica anaeróbica. Esta alta taxa de utilização de glicose pelas células tumorais, associada à anorexia, resulta em hipoglicemia (BRAHIMI-HORN; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2007; GATENBY; GILLIES, 2007; MARÍN-HERNANDEZ et al., 2009; STUBBS; GRIFFITHS, 2010; CASSOLA et al., 2012; MIKZA et al., 2013).

O desvio do fluxo metabólico da célula tumoral para a via glicolítica anaeróbica pelo HIF aumenta, portanto, o consumo de glicose por esta célula e consequentemente a produção de lactato, produto final desta via (TISDALE, 2002).

Outro parâmetro metabólico plasmático avaliado no presente trabalho foi a ureia. Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de ureia entre os animais

portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) e os animais do grupo SS (Figura 3C), o que corrobora com resultados anteriores, um vez que ratos portadores do tumor Walker-256 apresentam aumento na concentração plasmática de ureia somente a partir do 8º dia do desenvolvimento tumoral (CASSOLA et al., 2012).

Quanto à insulinemia (Figura 4B) e à secreção estática de insulina (Figura 5), nossos resultados confirmam que animais portadores de tumor Walker-256 apresentam hipoinsulinemia e redução da secreção de insulina estimulada pela glicose (FERNANDES et al., 1990).

Após exposição a altas concentrações de glicose, ilhotas pancreáticas isoladas de ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram menor secreção de insulina em comparação aos controles (FERNANDES et al., 1990; NETO et al., 1996; LIMIERE, 2009). A redução da secreção de insulina pode estar envolvida com a redução da concentração de fosfolipase C (PCL) nas células β pancreáticas, evidenciada pela redução na quantidade produzida de metabólitos (NETO et al., 1996). A PCL hidrolisa o fosfatidilinositol na membrana das células β , gerando inositol 1-fosfato, inositol 1,4-bifosfato e inositol 1,4,5-trifosfato, sendo que o inositol 1,4,5-trifosfato está relacionado ao processo de mobilização intracelular de cálcio (FERNANDES et al., 1990; NETO et al., 1996).

O conteúdo intracelular de insulina das ilhotas pancreáticas dos ratos portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) não foi diferente do observado no grupo SS após 6 dias da inoculação tumoral (Figura 6). Porém, após 12 dias da inoculação tumoral, o conteúdo intracelular de insulina das ilhotas pancreáticas dos ratos portadores de tumor Walker-256 apresentou-se reduzido (GALIA, 2017).

Por sua vez, o tratamento com lixisenatida não promoveu alterações nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol (Figura 3A), lactato (Figura 3B), ureia (Figura 3C), glicose (Figura 4A) e insulina (Figura 4B) nos animais portadores de tumor Walker-256.

Em concordância com os resultados da insulinemia (Figura 4B), o tratamento com lixisenatide não alterou a secreção estática de insulina (Figura 5) e o conteúdo intracelular de insulina (Figura 6) das ilhotas pancreáticas dos ratos portadores de tumor Walker-256.

Em contrapartida, em ratos portadores de sarcoma de Yoshida, o tratamento crônico com exendine-4 preveniu a hipoinsulinemia, mas não alterou as concentrações plasmáticas de glicose (HONORS; KINZIG, 2014).

O tratamento com lixisenatida também não foi capaz de melhorar a resposta periférica à insulina dos animais portadores de tumor. Os animais portadores de tumor Walker-256 (TS e TL) não apresentaram alteração da glicemia em resposta à administração de insulina (Figura 7A), como evidenciado pela menor KITT em comparação com o grupo SS (Figura 7B).

Estudos anteriores apontam menor fosforilação da PKB/AKT nos tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal em animais portadores de tumor Walker-256, o que sugere redução da resposta à insulina nestes tecidos e condiz com resistência periférica à insulina (SILVA, 2015). Em pesquisas anteriores deste laboratório, o tratamento de animais portadores de tumor Walker-256 com metformina, um fármaco antidiabético que reduz a resistência à insulina, isolada ou combinada com insulina, também não resultou em melhora da resistência periférica à insulina (SILVA, 2015).

Resistência insulínica em tecidos periféricos é comum em pacientes e animais com câncer (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; FEARON et al., 2011; MIKSZA et al., 2013; FERNANDES et al., 1996). Fator contribuinte para a caquexia, a resistência periférica à insulina está associada ao aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, que resultam da intensa lipólise (SHULMAN, 2000; SCHINNER et al., 2005; CASSOLA et al., 2012), e da ação de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6) produzidas pelo sistema imune (ROFE et al., 1987; YOSHIKAWA; NOGUCHI; SATOH, 1999; MOLLER, 2000). Estes fatores interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina. O TNF α aumenta a fosforilação em resíduos de serina e reduz a fosforilação em tirosina do IRS-1; também é capaz de diminuir a fosforilação de PKB/AKT, que resulta em diminuição da captação de glicose. A IL-6, por sua vez, pode reduzir a associação do IRS-1 com a PI3K, passos essenciais na transdução de sinal e transporte de glicose mediado por insulina (KIM et al., 2004; DELARUE; MAGNAN, 2007; PLOMGAARD et al., 2007).

A falta de efeitos da lixisenatida em ratos portadores de tumor Walker-256, no crescimento tumoral, na indução de secreção de insulina e na caquexia pode ser devida ao fato deste modelo experimental apresentar um crescimento tumoral mais rápido do que outros modelos experimentais de câncer, como o sarcoma de Yoshida. A maior presença de fatores circulantes como o LMF, PIF, TNF α , IL1, IL6 (CAMPS et al., 2006; CHEN et al., 2009; TISDALE, 2010), estresse oxidativo

(GUARNIER et al., 2010), corticosterona (MAZZUCO et al., 2012), ácidos graxos livres (CASSOLLA et al., 2012), entre outros, os quais aumentam proporcionalmente com a progressão do tumor, podem ter prejudicado ou mesmo anulado os efeitos terapêuticos benéficos do tratamento.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

O tratamento com lixisenatida não atenuou a caquexia induzida pelo tumor Walker-256, possivelmente por não prevenir a hipoinsulinemia, amenizar a resistência à insulina e não reduzir o crescimento tumoral. Além disso, o tratamento com lixisenatida promoveu perda de massa corporal nos animais portadores de tumor, o que sugere falta de benefícios clínicos no tratamento da caquexia do câncer.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHISON, M.; HUPP, T. R. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. *Oncogene*, v. 22, p. 3431-3440, 2003.
- AGOSTINO, D.; CLIFTON, E.E. Trauma as a cause of localization of blood-borne metastases: Preventive effect of heparin and fibrinolysis. *Annals of Surgery*, v. 161, p. 97-102, 1965.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.37, p. 2036-2046, 2005.
- ARRUDA, A. P.; MILANSKI, M.; ROMANATTO, T.; COOPE, A.; LBERICI, 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 α provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology*, v.151, p. 683–694, 2010.
- BAGGIO L. L.; DRUCKER D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, v. 132, p. 2131-2157, 2007.
- BARNETT, A. H. Lixisenatide: evidence for its potential use in the treatment of type 2 diabetes. *Core Evidence*, v. 6, p. 67–79, 2011.
- BARTLETT, D. L.; CHARLAND, S.; TOROSIAN, M. H. Growth hormone, insulin, and somatostatin therapy of cancer cachexia. *Cancer*, v. 73, n. 5, p. 1499-1504, 1994.
- BARTLETT, D. L.; CHARLAND, S.; TOROSIAN, M. H. Reversal of tumor-associated hyperglucagonemia as treatment for cancer cachexia. *Surgery*, v. 118, n. 1, p. 87-97, 1995.
- 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.
- BENNANI-BAITI, N.; WALSH, D. What is cancer anorexia-cachexia syndrome? A historical perspective. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, v. 39, n. 3, p. 257-262, 2009.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, v. 2, p. 1205-1215, 1974.

- BOLLI, G. B.; OWENS, D. R. Lixisenatide, a novel GLP-1 receptor agonist: efficacy, safety and clinical implications for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 16, p. 588–601, 2014.
- BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology*, v.19, p. 223-229, 2007.
- 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.
- BROWN, D. X.; BUTLER, E. L.; EVANS, M. Lixisenatide as add-on therapy to basal insulin. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 25–38, 2014.
- CALDAROLA, L.; DEI POLI, H.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Sul tumore Walker: trapiantabilità e metastasi. Nota riassuntiva. *Minerva Chirurgica*, v.23, p. 74-77, 1968.
- CAMPS, C.; IRANZO, V.; BREMNES, R. M.; SIRERA, R. Anorexia–cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin–proteasome pathway. *Supportive Care in Cancer*, v. 14, n. 12, p. 1173–1183, 2006.
- CARBÓ, N.; COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BAGBY, G. J.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BACCINO, F. M.; ARGILÉS, J. M. Anti-tumour necrosis factor- α treatment interferes with changes in lipid metabolism in a cachectic tumour model. *Clinical Science*, v. 87, p.349–355, 1994.
- CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C. L.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T. B. V.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, p. 265–270, 2012.
- 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.
- CONLON, K. C.; BADING, J. R.; MCDERMOTT, E. W. M.; CORBALLY, M. T.; TOLVO, A. J.; BRENNAN, M. F. Extremity metabolism in the cachectic, VX2 carcinoma-bearing rabbit. *Journal of Surgical Research*, v. 55, p. 330-337, 1993.
- COSTELLI, P.; TESSITORE, T.; BATETTA, B.; MULAS, M. F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F. M.; DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 700–706, 1999.
- CURI, R.; ROCHA, M. S.; VECCHIA, M. G.; CARPINELLI, A. R. Inhibition of insulin secretion by rat mesenteric lymphocytes in incubated pancreatic islet cells. *Hormone and Metabolic Research*, v. 22, n. 6, p. 356-357, 1990.

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

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

DRUCKER, D. J. Glucagon- like peptides. *Diabetes*, v. 47, p.159-169, 1998.

EARLE W. W. A study of the Walker rat mammary Carcinoma 256, in vivo and in vitro. *American Journal Cancer*, v. 24, p. 566-612, 1935.

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.

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

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.

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

FINEMAN, M. S.; CIRINCIONE, B. B.; MAGGS, D.; DIAMANT, M. GLP-1 based therapies: differential effects on fasting and postprandial glucose. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, p. 675–688, 2012.

FORST, T.; PFÜTZNER, A. Pharmacological profile, efficacy and safety of lixisenatide in type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 14, n. 16, p. 2281-2296, 2013.

GALIA, W. B. S. Avaliação dos efeitos da pioglitazona na função das ilhotas pancreáticas de ratos portadores de tumor Walker-256. 2017. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GATENBY R. A.; GILLIES R. J. Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 1358-1366, 2007.

GEDULIN, B. R.; NIKOULINA, S. E.; SMITH, P. A.; GEDULIN, G.; NIELSEN, L. L.; BARON, A. D.; PARKES, D. G.; YOUNG, A. A. Exenatide (Exendin-4) improves insulin sensitivity and β -Cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology*, v. 146, p. 2069-2076, 2005.

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

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

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

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: Bergmeyer, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. Academic press, 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, p. 1464-1472, 1974.

HOLSCHER, C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *Journal of Endocrinology*, v. 221, p. T31–T41, 2014.

HONORS, M. A.; KINZIG, K. P. Chronic Exendin-4 treatment prevents the development of cancer cachexia symptoms in male rats bearing the Yoshida. *Hormones and Cancer*, v. 5, n. 1, p. 33-41, 2014.

HOROWITZ, M.; RAYNER, C. K.; JONES, K. L. Mechanisms and clinical efficacy of lixisenatide for the management of type 2 diabetes. *Advances in Therapy*, v. 30, n. 2, p. 81–101, 2013.

INCULET, R. I.; PEACOCK, J. L.; GORSCHBOTH, C. M.; NORTON, J. A. Gluconeogenesis in the tumor-influenced rat hepatocyte: importance of tumor burden, lactate, insulin, and glucagon. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 79, n. 5, p. 1039-1046, 1987.

KAPITZA, C.; FORST, T.; COESTER, H. V.; POITIERS, F.; RUUS, P.; HINCELIN-MERY, A. Pharmacodynamic characteristics of lixisenatide once daily versus lira-

glutide once daily in patients with type 2 diabetes insufficiently controlled on metformin. *Diabetes Obesity and Metabolism*, v. 15, p. 642–649, 2013.

KERN, P. A. Recombinant human tumor necrosis factor does not inhibit lipoprotein lipase in primary cultures of isolated human adipocytes. *Journal of Lipid Reseach*, v. 29, p. 909–914, 1988.

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

KNAPP, M. L.; AL-SHEIBANI, S.; RICHES, P. G.; HANHAM, I. W.; PHILLIPS, R. H. Hormonal factors associated with weight loss in patients with advanced breast cancer. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 28, n. 5, p. 480-486, 1991.

LENNOX, R.; FLATT, P. R.; GAULT, V. A. Lixisenatide improves recognition memory and exerts neuroprotective actions in high-fat fed mice. *Peptides*, v. 61, p. 38–47, 2014.

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

LINDAMOOD, C. A.; TAYLOR, J. R. Emerging new therapies for the treatment of type 2 diabetes mellitus: glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Clinical Therapeutics*, v. 37, n. 3, p. 483-493, 2015.

LORENZ, M.; PFEIFFER, C.; STEINSTRABER, A.; BECKER, R. H. A.; RUTTEN, H.; RUUS, P.; HOROWITZ, M. Efects of lixisenatide once daily on gastric emptying in type 2 diabetes — Relationship to postprandial glycemia. *Regulatory Peptides*, v. 185, p. 1–8, 2013.

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

LUND, A.; KNOP, F. K.; VILSBØLL, T. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: Differences and similarities. *European Journal of Internal Medicine*, v. 25, p. 407-414, 2014.

MADSBAD, S.; KIELGAST, U.; ASMAR, M.; DEACON, C. F.; TOREKOV, S. S.; HOLST, J. J. An overview of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists - available efficacy and safety data and perspectives for the future. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 13, p. 394–407, 2011.

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

MARATHE, C. S.; RAYNERA, C. K.; JONESA, K. L.; HOROWITZA, M. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: *A review Peptides*, v. 44, p. 75–86, 2013.

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

MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. *Molecular Cancer*, v. 36, p.1-3, 2003.

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

MASTROCOLA, R.; REFFO, P.; PENNA, F.; TOMASINELLI, C. E.; BOCCUZZI, G.; BACCINO, F. M.; ARAGNO, M.; COSTELLI, P. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: Role of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 44, p. 584–593, 2008.

MCCLEAN, P. L.; HOLSCHER, C. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, v. 86, p. 241-258, 2014.

MEIER, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, p. 728–742, 2012.

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

MONTROSE-RAFIZADEH, C.; AVDONIN, P.; GARANT, M. J.; RODGERS, B. D.; KOLE, S.; YANG, H.; LEVINE, M. A.; SCHWINDINGER, W.; BERNIER, M. Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, v. 140, p. 1132–1140. 1999.

MOLLER, D. E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 11, p. 212-217, 2000.

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.; CASSOLLA, P.; DORNELLAS, A. P.; DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. O.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in liver gluconeogenesis during the development of Walker-256 tumor in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 94, n. 1, p. 47-55, 2013.

NETO, S. R.; ZORN, T. M.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker-256 tumor-bearing rats. *American Journal Physiology-Cell Physiology*, v. 271, p.804-809, 1996.

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.

PETERSEN, A. B.; CHRISTENSEN, M. Clinical potential of lixisenatide once daily treatment for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, v. 6, p. 217–231, 2013.

PIFFAR, P. M.; FERNANDEZ, R.; TCHAIKOVSKI Jr., O.; HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; PINTO, G. J.; JAKOBI, S.; GOBBO-BORDON, D.; ROHN, T. V.; FABRÍCIO, V. E. B.; MORETTO, K. D.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cancer Letters*, v. 201, p. 139-148, 2003.

PLOMGAARD, P.; NIELSEN, A. R.; FISCHER, C. P.; MORTENSEN, O. H.; BROHOLM, C.; PENKOWA, M.; KROGH-MADSEN, R.; ERIKSTRUP, C.; LINDEGAARD, B.; PETERSEN, A. M.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K. Associations between insulin resistance and TNF-alpha in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*, v. 50, p. 2562-2571, 2007.

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

ROSENSTOCK, J.; HANEFELD, M.; SHAMANNA, P.; MIN, K. W.; BOKA, G.; MIOSSEC, P.; ZHOU, T.; MUEHLEN-BARTMER, I.; RATNER, R. E. Beneficial effects of once-daily lixisenatide on overall and postprandial glycemic levels without significant excess of hypoglycemia in Type 2 diabetes inadequately controlled on a sulfonylurea with or without metformin (GetGoal-S). *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 28, p. 386–392, 2014.

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

SCHMIDT, L. J.; HABACHER, W.; AUGUSTIN, T.; KRAHULEC, E.; SEMLITSCH, T. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of lixisenatide in the treatment of patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 16, p. 769–779, 2014.

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

SEUFERT, J.; GALLWITZ, B. The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 16, p. 673–688, 2014.

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

SILVA, F. F. Efeitos da metformina e pioglitazone, isoladas ou associadas com insulín, sobre a resistência insulínica e anormalidades metabólicas relacionadas à caquexia induzida pelo tumor walker-256 em ratos. 2015. 65 p. Dissertação – Programa Multicêntrico de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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.

SLOOP, K. W.; WILLARD, F. S.; BRENNER, M. B.; FICORILLI, J.; VALASEK, K.; SHOWALTER, A. D.; FARB, T. B.; CAO, A. L.; MICHAEL, M. D.; SANFELICIANO, S. M. G.; TEBBE, M. J.; COGHLAN, M. J. Novel small molecule Glucagon-Like peptide-1 receptor agonist stimulates insulin secretion in rodents and from human islets. *Diabetes*, v. 59, p. 3099-3107, 2010.

STUBBS M.; GRIFFITHS J. R. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 50, p. 44-55, 2010.

TESITORE, L.; BONELLI, G.; CECCHINI, G.; AMENTA, J. S.; BACCINO, F. M. Regulation of protein turnover versus growth state: ascites hepatoma as a model for studies both in the animal and in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 255, p. 372-384, 1987.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. *British Journal of Cancer*, v. 67, p. 15-23, 1993.

- THORENS, B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucocretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 89, p. 8641–8645. 1992.
- TISDALE, M. J. Wasting in cancer. *American Society for Nutrition*, v. 129, p. 213-216, 1999
- TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition*, v. 17, n. 5, p. 438-442, 2001.
- TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, v.2, p. 862-871, 2002.
- TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology*, v. 20, p. 340-348, 2005.
- TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological Reviews*, v. 89, n. 2, p. 381-410, 2009.
- TISDALE, M.J. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? *Future Oncology*, v. 6, n. 4, p. 503-513, 2010.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with on alternative oxygen receptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. v. 6, p. 24-27, 1969.
- 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 International*, v. 22, n. 4, p. 342-350, 2002.
- WAGNER, E. F.; PETRUZZELLI, M. A waste of insulin interference. *Nature*, v. 251, n. 7553, p. 430-431, 2015.
- 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.
- WERNER, U. Effects of the GLP-1 receptor agonist lixisenatide on postprandial glucose and gastric emptying – preclinical evidence. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 28, p. 110–114, 2014.
- WERNER, U.; HASCHKE, G.; HERLING, A. W.; KRAMER, W. Pharmacological profile of lixisenatide: A new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Regulatory Peptides*, v. 164, p. 58–64, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs: news release. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>> Acesso em: 05 nov 2017.

YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; SATOH, S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of GLUT4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 256, p. 678-681, 1999.

YU, Y-H.; GINSBERG, H. N. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. Sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research*, v.96, p.1042-1052, 2005.