



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ISABELE GONÇALVES FRASSON

**INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE  
LACTATO NA NEOGLICOGÊNESE EM PERFUSÃO DE  
FÍGADO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-**

**256**



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

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

**ISABELE GONÇALVES FRASSON**

**INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE LACTATO NA  
NEOGLICOGÊNESE EM PERFUSÃO DE FÍGADO DE RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

---

Londrina - Paraná  
2018

ISABELE GONÇALVES FRASSON

**INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE  
LACTATO NA NEOGLICOGÊNESE EM PERFUSÃO DE  
FÍGADO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-  
256**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenir Medri de Souza

Londrina  
2018

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F843i Frasson, Isabele Gonçalves.  
Influência de concentrações circulantes de lactato na neoglicogênese em perfusão de fígado de ratos portadores de tumor Walker-256 / Isabele Gonçalves Frasson. - Londrina, 2016.  
47 f.: il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2018.  
Inclui bibliografia.

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

CDU 612.015.3

ISABELE GONÇALVES FRASSON

**INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE LACTATO  
NA NEOGLICOGÊNESE EM PERFUSÃO DE FÍGADO DE RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helenir Medri de Souza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

Londrina, 15 de junho de 2018.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que iluminou meu caminho durante esta caminhada, ao meu esposo Paulo Enrique sempre presente, me incentivando e apoiando e ao maior presente da minha vida, minha filha Marina.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus acima de tudo.

À minha família, especialmente ao meu esposo, Paulo Enrique, por estar sempre presente, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis. A minha filha Marina, que trouxe luz a minha vida.

Aos meus pais, Luiz e Carolina, por sempre me apoiarem.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Helenir Medri de Souza, pela oportunidade e por acreditar que eu seria capaz. Um exemplo de profissional e pessoa com um coração que transborda humildade. Não tenho palavras para agradecer toda a atenção, paciência, dedicação e disposição para ensinar.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gisele Bertolini, que por muitas vezes me ajudou e me orientou neste percurso acadêmico, e por compartilhar importantes conhecimentos comigo.

Às "meninas da fisiologia", Giuliana Biazi e Daniele Miksza, amigas e companheiras de laboratório, que por muitas vezes me incentivaram e mostraram que eu seria capaz. Também agradeço às meninas da iniciação científica, Laura, Brenda, Winny e Mahira, que cuidaram e ainda cuidam dos nossos animais.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro.

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

"Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente".

**Eleanor Roosevelt**

Frasson, Isabele Gonçalves. **Influência de concentrações circulantes de lactato na neoglicogênese em perfusão de fígado de ratos portadores de tumor Walker-256**. 2018. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

## RESUMO

Portadores de câncer frequentemente apresentam severa perda de massa muscular e adiposa e de peso corpóreo (caquexia). A caquexia do câncer é causada por diversos fatores proteolíticos e lipolíticos produzidos pelo tumor e sistema imune. Contudo, é sugerido que o aumento do gasto de energia causado pela atividade aumentada do ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori), um ciclo fútil que converte o lactato gerado no tumor em glicose no fígado, também contribua para a caquexia. Pacientes com caquexia do câncer apresentam hiperlactatemia e maior conversão de lactato em glicose no fígado. Entretanto, ratos caquéticos portadores de tumor Walker-256 apresentaram menor conversão de lactato em glicose em perfusão de fígado. É possível que estas diferenças na neoglicogênese entre pacientes (aumentada) e animais (reduzida) com câncer sejam porque nos estudos de perfusão de fígado a neoglicogênese foi avaliada a partir de concentração de lactato similar à de ratos saudáveis (2 mM), a qual não reflete a hiperlactatemia (3, 5,5 e 8 mM, respectivamente nos dias 5, 8 e 12 de tumor) dos ratos portadores de tumor Walker-256. Diante disto, o objetivo desse estudo foi investigar em ratos portadores de tumor Walker-256, a influência de concentrações circulantes de lactato na neoglicogênese hepática e avaliar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos. Para esse propósito, células Walker-256 (ratos portadores de tumor) ou PBS (ratos saudáveis controle) foram inoculadas (SC) no flanco direito traseiro de ratos. A neoglicogênese, a partir de vários precursores de glicose (lactato, piruvato e glutamina), associados ou não ao NADH, foi avaliada em perfusão de fígado *in situ*, nos dias 5, 8 e/ou 12 de tumor. A neoglicogênese também foi avaliada *in vivo*, por meio da administração intraperitoneal de piruvato ou glutamina, no dia 12 de tumor. Nos estudos de perfusão de fígado, ratos com 5, 8 e 12 dias de tumor apresentaram menor produção de glicose a partir do lactato 2 mM, em comparação aos ratos saudáveis. Entretanto, a produção de glicose a partir do lactato 3, 5,5 e 8 mM, respectivamente dos ratos com 5, 8 e 12 dias de tumor, foi semelhante à dos saudáveis. A produção de glicose a partir do lactato 2 mM, associado com NADH 50 ou 75  $\mu$ M, mas não com NADH 25  $\mu$ M, foi maior nos ratos com 12 dias de tumor do que nos saudáveis. Ratos com 12 dias de tumor também apresentaram menor produção de glicose a partir do piruvato 2, 5 e 8 mM, em comparação aos saudáveis. No entanto, a produção de glicose a partir do piruvato 2 mM, associado com NADH 50 ou 75  $\mu$ M, mas não com NADH 25  $\mu$ M, nos ratos com 12 dias de tumor, foi restaurada para valores similares a dos ratos saudáveis. Ratos com 12 dias de tumor apresentaram menor produção de glicose a partir da glutamina 1 mM, mas não a partir da glutamina 2,5 mM ou da glutamina 1 mM associada ao NADH 50  $\mu$ M, em comparação aos saudáveis. Nos estudos *in vivo*, a administração intraperitoneal de piruvato (1,0 mg/kg) e glutamina (0,5 mg/kg) aumentou a glicemia dos ratos portadores de tumor (dia 12) e saudáveis de modo similar. Pode ser concluído que concentrações circulantes de lactato (3, 5,5 e 8 mM) restabeleceram a inibição da neoglicogênese observada a partir de baixas concentrações de lactato (2

mM) em perfusão de fígado de ratos com 5, 8 e 12 dias de tumor, por mecanismo que provavelmente envolveu aumento do baixo potencial redox (razão NADH/NAD<sup>+</sup>).

**Palavras-chave:** Lactato. Produção de glicose. Câncer. Caquexia. Metabolismo hepático.

Frasson, Isabele Gonçalves. **Influence of lactate circulating concentrations on gluconeogenesis in liver perfusion of Walker-256 tumor-bearing rats.** Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Cancer carriers often show severe loss of muscle mass and fat and body weight (cachexia). Cancer cachexia is caused by various proteolytic and lipolytic factors produced by the tumor and immune system. However, it is suggested that increased energy expenditure caused by increased activity of the lactate-glucose cycle (Cori cycle), a futile cycle that converts the lactate generated in the tumor to glucose in the liver, also contributes to cachexia. Patients with cancer cachexia present hyperlactatemia and greater conversion of lactate to glucose in the liver. However, cachectic rats with Walker-256 tumor showed lower conversion of lactate to glucose in liver perfusion. It is possible that these differences in gluconeogenesis between patients (increased) and animals (reduced) with cancer are because, in liver perfusion studies, gluconeogenesis was evaluated from lactate concentration similar to that of healthy rats (2 mM), which does not reflect the hyperlactatemia (3, 5.5 and 8 mM, respectively on days 5, 8 and 12 of tumor) of the Walker-256 tumor-bearing rats. The aim of this study was to investigate the influence of circulating lactate concentrations on hepatic gluconeogenesis in rats with Walker-256 tumor and to evaluate possible mechanisms involved in the effects. For this purpose, Walker-256 cells (tumor bearing rats) or PBS (healthy control rats) were inoculated (sc) into the right flank of rats. Gluconeogenesis, from various glucose precursors (lactate, pyruvate and glutamine), associated or not to NADH, was evaluated in liver perfusion in situ on days 5, 8 and / or 12 of tumor. Gluconeogenesis was also evaluated in vivo by intraperitoneal administration of pyruvate or glutamine at day 12 of tumor. In liver perfusion studies, rats at 5, 8 and 12 days of tumor had lower glucose production from 2 mM lactate compared to healthy rats. However, glucose production from lactate 3, 5.5 and 8 mM, respectively of rats at 5, 8 and 12 days of tumor, was similar to that of healthy rats. The production of glucose from 2 mM lactate, associated with NADH 50 or 75  $\mu$ M, but not with 25  $\mu$ M NADH, was higher in rats with 12 days of tumor than in healthy ones. Rats with 12 days of tumor also had lower glucose production from pyruvate 2, 5 and 8 mM, compared to healthy ones. However, glucose production from 2 mM pyruvate, associated with NADH 50 or 75  $\mu$ M, but not with 25  $\mu$ M NADH, in rats with 12 days of tumor, was restored to values similar to healthy rats. Rats with 12 days of tumor had lower glucose production from 1 mM glutamine, but not from 2.5 mM glutamine or from 1 mM glutamine associated with 50  $\mu$ M NADH compared to healthy ones. In the in vivo studies, intraperitoneal administration of pyruvate (1.0 mg / kg) and glutamine (0.5 mg/kg) increased the glycemia of tumor-bearing (day 12) and healthy rats in a similar manner. It can be concluded that circulating concentrations of lactate (3, 5, 5 and 8 mM) reestablished the inhibition of gluconeogenesis observed from low lactate concentrations (2 mM) in liver perfusion of rats with 5, 8 and 12 days of tumor, by mechanism that probably involved restoration of the reduced redox potential (NADH/ NAD<sup>+</sup> ratio).

**Keywords:** Lactate. Glucose production. Cancer. Cachexia. Hepatic metabolism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Neoglicogênese hepática e ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori).....	11
<b>Figura 2.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F) durante a infusão de lactato 2 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, com 5, 8 e 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	22
<b>Figura 3.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F) durante a infusão de lactato 3, 5,5 ou 8 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 5, 8 e 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	23
<b>Figura 4.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de lactato 2 mM e NADH 25, 50 ou 75 µM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	24
<b>Figura 5.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de piruvato 2, 5 e 8 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	25
<b>Figura 6.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de piruvato 2 mM e NADH 25, 50 ou 75 µM, em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	26
<b>Figura 7.</b> Neoglicogênese in situ (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de glutamina 1 e 2,5 mM ou 1 mM e NADH 50 µM, em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	27
<b>Figura 8.</b> Neoglicogênese in vivo durante a administração de piruvato (A) ou glutamina (B) e as respectivas % de aumento da glicemia (C e D) em ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácido graxo livre
Akt (PKB)	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
CPT2	Carnitina palmitoil transferase2
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
GLUT1	Transportador de glicose
HIF	Fator induzido por hipóxia
HSL	Lipase hormônio sensível
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
PBS	Tampão salina fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PKA	Proteína quinase A
PIF	Fator indutor de proteólise
REE	Gasto de energia em repouso
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Animais</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Implantação do tumor Walker-256</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Experimentos de perfusão de fígado in situ para avaliação da neoglicogênese</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Teste neoglicogênico para avaliação da neoglicogênese in vivo</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Determinação da concentração de glicose</b> .....	<b>24</b>
<b>3.7</b>	<b>Procedimento estatístico</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação da neoglicogênese em perfusão de fígado in situ</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da neoglicogênese in vivo</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A caquexia do câncer é uma síndrome complexa e multifatorial, não completamente entendida, que afeta aproximadamente 60 a 80% dos pacientes com câncer avançado e que leva à severa perda de peso, decorrente principalmente da acentuada perda de músculo esquelético e de tecido adiposo (AOYAGI e *et al.*, 2015; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; MENDES *et al.*, 2015; MUELLER *et al.*, 2016; PORPORATO, 2016). A caquexia pode representar até 20% das mortes por câncer, sendo a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer avançado (ARGILÉS *et al.*, 2014).

Apesar dos esforços científicos na busca por fatores causadores da caquexia, a etiologia da caquexia do câncer não é totalmente conhecida. Entre os mediadores que possuem papel chave no estabelecimento da síndrome caquética estão o fator indutor de proteólise (PIF) e o fator mobilizador de lipídeos (LMF), produzidos pelo tumor, e as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e as interleucinas 1 (IL1) e 6 (IL6), produzidas pelo sistema imune em resposta a presença do tumor (ARGILÉS *et al.*, 2014; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; MUELLER *et al.*, 2016; PORPORATO, 2016; TISDALE, 2009). Em conjunto, estes fatores estimulam vias proteolíticas e lipolíticas e inibem vias de síntese de proteínas e lipídeos promovendo severa perda de massa muscular e adiposa (ARGILÉS *et al.*, 2014; FEARON; GLASS; GUTTRIDGE, 2012; MUELLER *et al.*, 2016; PORPORATO, 2016; TISDALE, 2009).

Além destes mediadores clássicos da caquexia, sugere-se que processos consumidores de energia, que aumentam o gasto de energia em repouso (REE), também contribuam para a caquexia do câncer (BONGAERTS *et al.*, 2006; MANTOVANI; MADEDDU, 2010; TISDALE, 2005).

Portadores de câncer apresentam intenso gasto de energia basal (REE) o qual é em parte decorrente da atividade aumentada de ciclos fúteis como o ciclo lactato-glicose, também conhecido como ciclo de Cori (EDEN; EDSTROM; BENNEGARD, 1984; HOLROYDE *et al.*, 1975; MANTOVANI; MADEDDU, 2010; TISDALE, 2005).

Os tumores, por serem hipóxicos, consomem grandes quantidades de glicose pela via glicolítica anaeróbica e produzem grandes quantidades de lactato, efeitos que são mediados pelo fator induzido por hipóxia (HIF) (BRAHIMI-HORN; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2007) (Figura 1).

O HIF, sintetizado em resposta à hipóxia, aumenta a expressão de transportadores de glicose GLUT1 e de enzimas glicolíticas e conseqüentemente a taxa

de captação e utilização de glicose pelas células tumorais. O HIF também diminui a expressão do complexo piruvato desidrogenase, direcionando o fluxo do piruvato para a síntese de lactato. Além disso, o HIF aumenta a expressão de proteínas que transportam o lactato para o meio extracelular, o que impede a redução acentuada do pH das células tumorais e aumenta a concentração de lactato no sangue (BRAHIMI-HORN; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2007) (Figura 1).

O lactato liberado pelo tumor é transportado pelo sangue até o fígado, onde é convertido em glicose pela neoglicogênese. A glicose produzida no fígado é liberada e transportada até o tumor onde é oxidada até lactato (glicólise anaeróbica), o qual retorna para o fígado para a produção de nova glicose pela neoglicogênese, gerando o ciclo fútil lactato-glicose (ciclo de Cori) consumidor de energia (BONGAERTS *et al.*, 2006; FRIESEN; BARACOS; TISDALE, 2005) (Figura 1).

O ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori) é responsável por 20 % da reciclagem de glicose em humanos saudáveis. Contudo, a reciclagem de glicose aumentou para 50 % em pacientes com caquexia do câncer (TISDALE, 2005). A conversão de lactato em glicose no fígado (neoglicogênese) usa 6 moléculas de ATP e a oxidação anaeróbica da glicose no tumor (glicólise) gera apenas 2 ATPs, resultando em cada ciclo lactato-glicose um saldo negativo de 4 ATPs (BONGAERTS *et al.*, 2006) (Figura 1). Portanto, a atividade aumentada do ciclo lactato-glicose deve contribuir para o aumento do gasto energético basal e conseqüentemente para a caquexia do câncer, visto que a energia para a manutenção deste ciclo é retirada dos estoques de lipídeos e proteínas (BONGAERTS *et al.*, 2006; FRIESEN; BARACOS; TISDALE, 2005) (Figura 1).

A atividade aumentada do ciclo lactato-glicose na caquexia do câncer parece ser decorrente da maior concentração de lactato no sangue, proveniente do metabolismo tumoral, e também da maior capacidade do fígado em converter o lactato em glicose (maior atividade neoglicogênica) (BONGAERTS *et al.*, 2006).

Aumento da atividade neoglicogênese hepática, observada pela conversão aumentada de [U-<sup>14</sup>C]alanina ou [U-<sup>14</sup>C]glicerol em glicose, foi encontrada em pacientes com caquexia do câncer (LUNDHOLM *et al.*, 1982; WATERHOUSE; JEANPRETRE; KEILSON, 1979). A atividade neoglicogênica aumentada em pacientes com câncer pode ser causada por fatores circulantes alterados nesta doença, como o aumento de ácidos graxos livres (AGLs), resultante da intensa lipólise promovida pelo LMF e pelas citocinas TNF $\alpha$  e IL6.

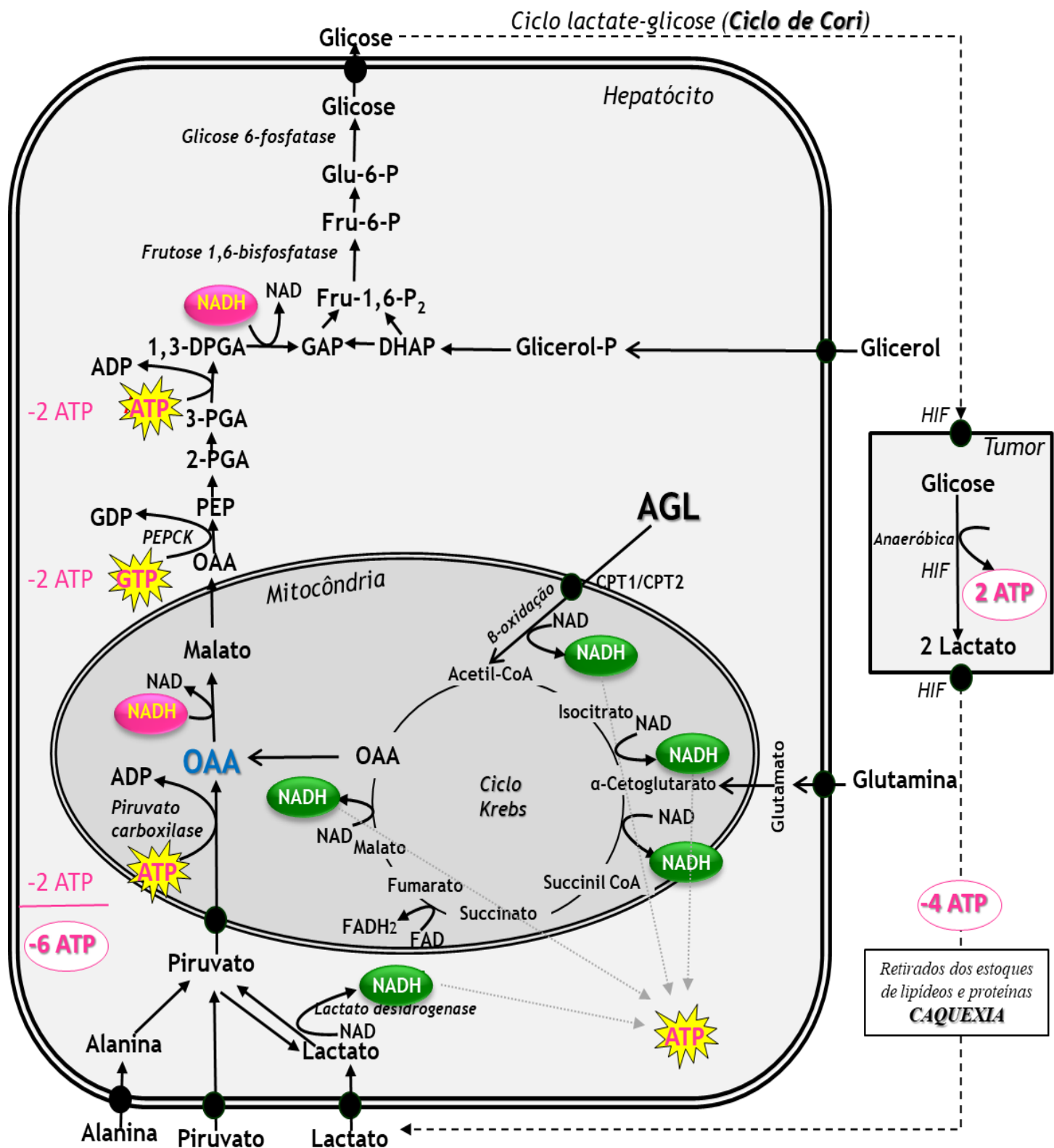


Figura 1. **Neoglicogênese hepática e ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori)**. ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; CPT1 e CPT2, carnitina palmitoil transferases 1 e 2; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Fru-6-P, frutose 6-fosfato; Fru-1,6-P<sub>2</sub>, frutose 1,6-bisfosfato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; Gli-6-P, glicose 6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; NAD<sup>+</sup>, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma reduzida; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; OAA, oxalacetato, HIF, fator induzido por hipóxia.

O LMF, TNF $\alpha$  e a IL6 aumentam a lipólise por ativarem a lipase hormônio sensível (HSL), enzima que estimula a hidrólise dos triacilgliceróis, liberando AGLs e glicerol do tecido adiposo (ARNER, 1995, TISDALE, 2003, 2004). Os efeitos do LMF e TNF $\alpha$  são mediados por aumento intracelular de AMPc/ativação da proteína quinase A (PKA) (TISDALE, 1997, 2004; ZHANG *et al.*, 2002) e consequente fosforilação/ativação da HSL.

Os AGLs estimulam a neoglicogênese principalmente por aumentarem a geração de acetil-CoA, a razão NADH/NAD<sup>+</sup> (potencial redox) e a produção de ATP. A acetil-CoA, estimula enzimas-chave da neoglicogênese (piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase - PEPCK) e o NADH e ATP são usados na via (DELARUE; MAGNAN, 2007) (Figura 1).

A atividade neoglicogênica hepática aumentada em pacientes com câncer também pode ser devida à resistência à insulina frequentemente observada nestes pacientes (ARGILÉS; LOPEZ-SORIANO, 2001; HONORS; KINZIG, 2012; LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; ROFE *et al.*, 1994; TAYEK, 1992; YOSHIKAWA *et al.*, 2001). A resistência à insulina no câncer é associada às citocinas TNF $\alpha$  e IL6 e ao aumento de AGLs no sangue. Estes fatores interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina, diminuindo a transmissão do sinal insulínico (DELARUE & MAGNAN, 2007; NOGUCHI *et al.*, 1998). A resistência insulínica diminui o efeito inibitório da insulina em enzimas-chave da neoglicogênese, aumentando a atividade neoglicogênica e assim a liberação hepática de glicose (PILKIS e GRANNER, 1992). Foi mostrado que a liberação hepática de glicose está aumentada em até 40% em indivíduos com câncer (TAYEK, 1992), o que pode ser explicado pela elevada neoglicogênese.

Ratos portadores de tumor Walker-256, um modelo experimental de câncer, também apresentam caquexia, caracterizada por acentuada perda de massa muscular e adiposa, e várias anormalidades metabólicas semelhantes às encontradas em pacientes com câncer, tais como aumento de AGLs e lactato no sangue (CASSOLLA *et al.*, 2012; DE FATIMA SILVA, 2017), resistência periférica à insulina (DE FATIMA SILVA, 2017; DE MORAIS *et al.*, 2012) e hipoinsulinemia associada à menor secreção pancreática de insulina (DE FATIMA SILVA, 2017; FERNANDES *et al.*, 1990), fatores que aumentam a neoglicogênese.

Entretanto, em contraste à atividade neoglicogênica aumentada em pacientes com câncer, ratos portadores de tumor Walker-256 mostraram inibição da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e lactato, mas não a partir do glicerol, em estudos de perfusão de fígado *in situ* do nosso laboratório (DE SOUZA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2013).

Outros estudos de perfusão de fígado também mostraram inibição da

neoglicogênese a partir da alanina, do lactato/piruvato, mas não a partir da glutamina, neste mesmo modelo experimental de câncer (ACCO *et al.*, 2007; CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004; DA VEIGA *et al.*, 2008). Contudo, vale ressaltar que nos estudos de perfusão, o fígado é isolado da circulação. Desse modo, fatores alterados no sangue pela presença do tumor, que afetam a neoglicogênese, como o aumento de lactato e AGLs e a redução da insulina, não chegam até o fígado. Nesse caso, os resultados dos estudos de perfusão de fígado podem não refletir a condição *in vivo*, exceto se as alterações presentes no sangue dos ratos com tumor forem simuladas nos estudos de perfusão, o que não foi feito nos estudos anteriores (ACCO *et al.*, 2007; CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004; DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015).

Nos estudos de perfusão de fígado com lactato, por exemplo, a concentração de lactato usada para avaliação da neoglicogênese foi de 2 mM (DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015), ou seja, semelhante a encontrada no sangue de ratos saudáveis. Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam alta lactatemia, respectivamente de 3, 5,5 e 8 mM nos dias 5, 8 e 12 de tumor, como previamente mostrado em estudos do nosso laboratório (CASSOLLA *et al.*, 2012).

Portanto, é possível que as discrepâncias observadas na neoglicogênese entre pacientes com câncer (atividade neoglicogênica aumentada *in vivo*) e ratos portadores de tumor Walker-256 (atividade neoglicogênica reduzida em perfusão de fígado *in situ*) sejam devidas ao fato que nos estudos de perfusão de fígado as condições *in vivo* não foram simuladas.

Diante desta possibilidade e considerando que a hiperlactatemia dos ratos portadores de tumor Walker-256 não foi simulada nos estudos de perfusão de fígado, seguem os objetivos do presente estudo:

## *Objetivos*

---

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar, em ratos portadores de tumor Walker-256, a influência de concentrações circulantes de lactato na neoglicogênese hepática e avaliar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos, por meio de estudos com outros precursores neoglicogênicos associados ou não ao NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma reduzida).

### Objetivos específicos

Avaliar em ratos portadores de tumor Walker-256 com 5, 8 e/ou 12 dias de tumor:

1. A neoglicogênese, em perfusão de fígado *in situ*, a partir de concentrações de lactato similares à lactatemia de ratos saudáveis (2 mM) e com 5 (3 mM), 8 (5,5 mM) e 12 (8 mM) dias de tumor, bem como o efeito do NADH (25, 50 e 75  $\mu$ M) sobre a neoglicogênese a partir do lactato 2 mM.
2. A neoglicogênese, em perfusão de fígado *in situ*, a partir do piruvato 2, 5 e 8 mM, bem como o efeito do NADH (25, 50 e 75  $\mu$ M) sobre a neoglicogênese a partir do piruvato 2 mM.
3. A neoglicogênese, em perfusão de fígado *in situ*, a partir da glutamina 1 e 2 mM, bem como o efeito do NADH (50  $\mu$ M) sobre a neoglicogênese a partir da glutamina 1 mM.
4. A neoglicogênese *in vivo*, por meio da análise do efeito da administração intraperitoneal de piruvato (1,0 mg/kg) ou glutamina (0,5 mg/kg) sobre a glicemia (teste neoglicogênico *in vivo*).

## *Material e métodos*

---

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Reagentes

Os sais do líquido de perfusão foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, Brazil), Cinética (Campinas, Brasil), Synth (São Paulo, Brasil), Dinâmica (Diadema, Brasil), Biotec (São Paulo, Brasil) ou Neon (Suzano, Brasil). Os precursores neoglicogênicos e o NADH foram adquiridos da Sigma (St Louis, EUA).

### 3.2 Animais

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 220-230 g, com livre acesso à água e alimento (ração 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 (período vespertino), para minimizar variações circadianas. Todos os animais foram submetidos a 24 horas de privação alimentar para retirar a influência do glicogênio hepático na neoglicogênese. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais UEL (CEUA/UEL) protocolo nº 16907.2016.97 (ANEXO).

### 3.3 Implantação do tumor Walker-256

O tumor Walker-256 é um carcinossarcoma de crescimento rápido e sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia (GUAITANI *et al.*, 1982), visto que induz anormalidades semelhantes às encontradas em vários outros tipos de câncer (CRUZ *et al.*, 2017). Em curto espaço de tempo após sua implantação verifica-se redução no peso do animal (caquexia), anorexia, diminuição da síntese proteica e acentuado catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, resistência à insulina e várias alterações metabólicas plasmáticas e hepáticas (BELUZI *et al.*, 2015; CASSOLLA *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2017; DE MORAIS *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2013.). Aos 14 dias após o seu implante, a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (CASSOLLA *et al.*, 2012; VICENTINO *et al.*, 2002).

Células Walker-256 foram mantidas através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de  $0,1$  a  $1,0 \times 10^6$  células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais anestesiados com tiopental (50 mg/Kg,i.p.) foram eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial a  $4^\circ\text{C}$  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, anestesiados com tiopental (50 mg/Kg,i.p.) foram inoculados com  $8,0 \times 10^7$  células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Ratos saudáveis foram inoculados com tampão salina fosfato (PBS) no mesmo local.

### **3.4 Experimentos de perfusão de fígado *in situ* para avaliação da neoglicogênese**

Nos dias 5, 8 e/ou 12 após a inoculação das células tumorais (grupo tumor) ou PBS (grupo saudável), os ratos foram pesados e submetidos à técnica de perfusão de fígado *in situ*, introduzida no Brasil por KELMER-BRACHT e colaboradores (1984).

O sistema para a perfusão de fígado é composto por reservatórios para o líquido de perfusão, bomba peristáltica e oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e a um cilindro com mistura carbogênica ( $\text{O}_2/\text{CO}_2=95/5\%$ ). O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada 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  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ , 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 (KH) modificado, sem albumina na composição. No sistema de perfusão o líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana. Neste local se processam as trocas gasosas. O  $\text{O}_2$  e o  $\text{CO}_2$  contidos na atmosfera carbogênica, 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 a sua grande extensão favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 45 mL por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de

aproximadamente 1 minuto, e a saturação, próxima a 99%. Desse modo, o líquido saturado de ar (21% de O<sub>2</sub>, 78% de N<sub>2</sub> além de outros), por troca passiva, satura-se com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. A entrada de CO<sub>2</sub> no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. O líquido de perfusão deixa o oxigenador, saturado de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, aquecido a 37 °C e com pH 7,4, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

Para a perfusão do fígado, os animais saudáveis e portadores do tumor foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental (50 mg/Kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta. Em seguida a veia porta foi canulada sob baixo fluxo, aproximadamente 10 mL/minuto e, imediatamente após a canulação, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para que houvesse o completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo de pressão no fígado. Logo após o fluxo foi elevado para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto para exposição completa do fígado, e a veia cava caudal, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido, que deixa o fígado através da veia hepática, para a veia cava inferior, abaixo do fígado. Posteriormente, a veia cava caudal (porção infra-hepática) foi canulada.

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

A perfusão do fígado 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, o líquido efluente do fígado foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose. Durante este período, a perfusão do fígado dos ratos saudáveis e portadores de tumor (nos dias 5, 8 e/ou 12 de tumor) foi realizada por um dos seguintes modos:

0-10 min	10-40 min	40-60 min
KH*	KH + lactato 2, 3, 5,5 ou 8 mM KH + lactato 2 mM + NADH 25, 50 ou 75 $\mu$ M KH + piruvato 2, 5 ou 8 mM, KH + piruvato 2 mM + NADH 25, 50 ou 75 $\mu$ M	KH

\*KH= Krebs-Henseleit

0-10 min	10-60 min
KH*	KH + glutamina 1 mM ou 2,5 mM KH + glutamina 1 mM + NADH 50 $\mu$ M

\*KH= Krebs-Henseleit

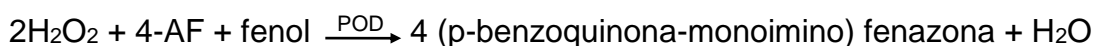
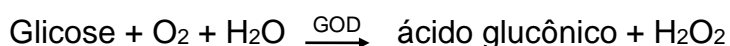
Ao término do experimento, o fígado foi retirado e pesado para que a produção de glicose por grama de fígado ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) pudesse ser quantificada. A expressão dos resultados em relação ao peso do órgão permite comparações de experimentos nos quais são utilizados fígados com diferentes pesos.

### 3.5 Avaliação da neoglicogênese *in vivo*

Neste teste, os substratos neoglicogênicos piruvato (1 mg/Kg) ou glutamina (0,5 mg/Kg) foram administrados intraperitonealmente em ratos anestesiados com tiopental (50 mg/Kg), no dia 12 após a inoculação das células tumorais (grupo tumor) ou PBS (grupo saudável). Amostras de sangue foram coletadas por gotejamento, após corte da ponta da calda, nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após a injeção dos substratos. As amostras foram mantidas em banho de gelo até o momento da centrifugação. Os plasmas obtidos foram utilizados para determinação da glicemia.

### 3.6 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose no perfusado e plasma 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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:



### **3.7 Procedimento estatístico**

A distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown Forsythe) foram testadas e o teste t de student não pareado foi empregado para análise dos resultados. A áreas sob as curvas (AUCs) foram calculadas no intervalo entre 10-40 min (lactato e piruvato) e 10 a 100 min (glutamina), tomando como valores basais os dois últimos pontos antes da infusão dos precursores neoglicogênico, as diferenças entre as mesmas foram realizadas pelo programa GRAPHPAD PRISM-5.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi adotado.

## *Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da neoglicogênese em perfusão de fígado *in situ*

A neoglicogênese dos ratos nos dias 5, 8 e/ou 12 de desenvolvimento do tumor Walker-256 e dos controles saudáveis correspondentes foi avaliada em fígados submetidos à perfusão *in situ* com várias concentrações de precursores neoglicogênicos (lactato, piruvato e/ou glutamina), associados ou não a várias concentrações de NADH.

Em todos os experimentos, a produção hepática de glicose nos primeiros 10 minutos de perfusão, antes da infusão dos precursores neoglicogênicos, a qual corresponde à liberação de glicose proveniente do glicogênio hepático residual, após 24 horas de privação alimentar, foi baixa e semelhante entre os ratos portadores de tumor e os seus respectivos controles saudáveis (Figuras 2 a 7).

A infusão dos precursores neoglicogênicos (lactato, piruvato e/ou glutamina) no fígado no 10º minuto do período de perfusão aumentou a produção de glicose dos ratos saudáveis e portadores de tumor, a qual retornou aos valores basais após a retirada dos precursores (Figuras 2 a 7).

Entretanto, o aumento da produção de glicose a partir do lactato 2 mM foi menor nos ratos portadores de tumor com 5 (Figura 2A), 8 (Figura 2B) e 12 (Figura 2C) dias de desenvolvimento tumoral em comparação aos saudáveis, como mostrado pelas respectivas AUCs (Figuras 2D, 2E, 2F).

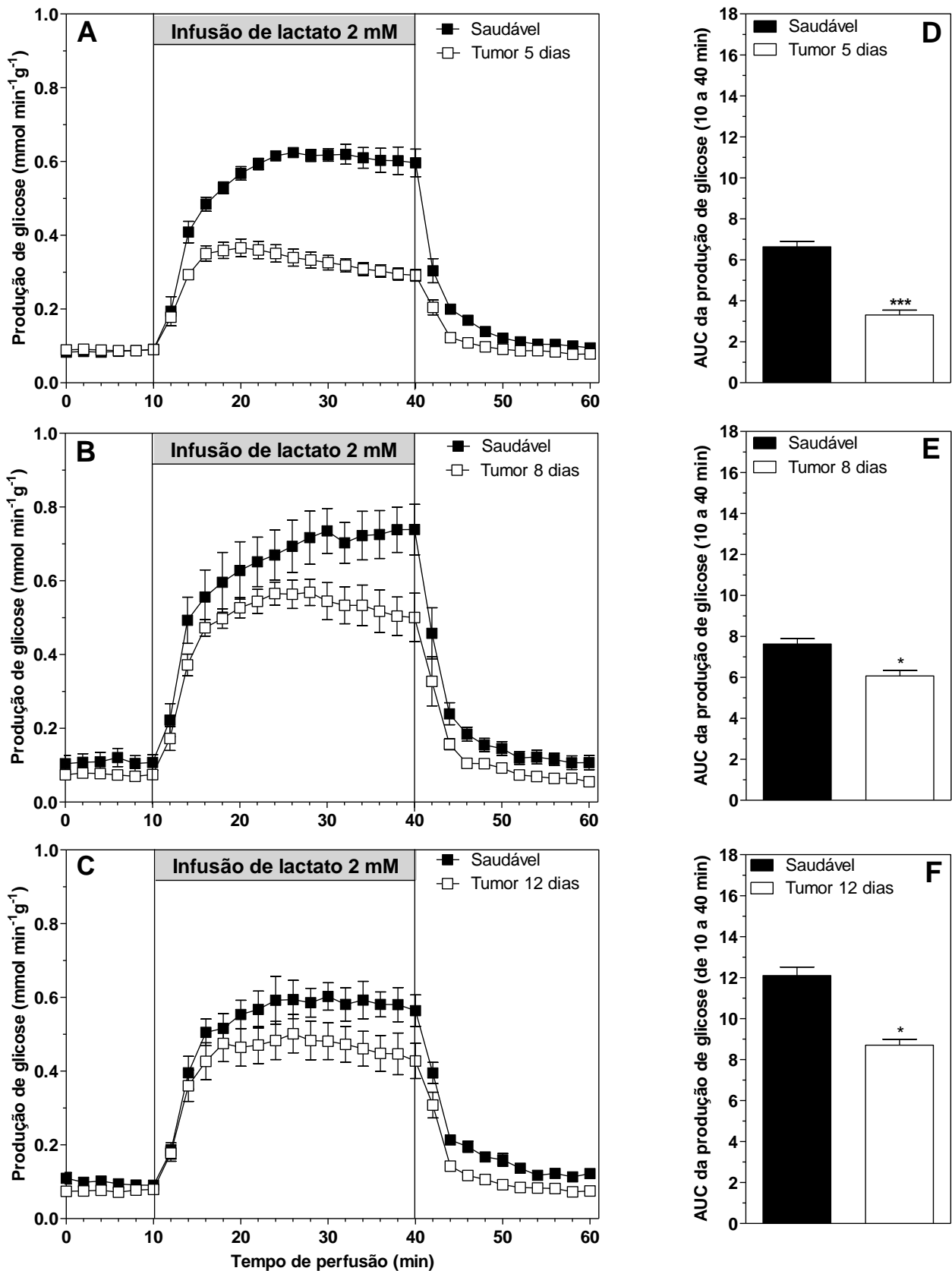
Diferentemente do lactato 2 mM, a infusão de lactato 3, 5,5 e 8 mM, respectivamente nos fígados dos ratos com 5 (Figura 3A), 8 (Figura 3B) e 12 (Figura 3C) dias de desenvolvimento tumoral, aumentou de modo semelhante à produção hepática de glicose dos ratos portadores de tumor e saudáveis, como mostrado pelas AUCs correspondentes (Figuras 3D, 3E, 3F). Vale ressaltar que estas concentrações de lactato, de 3, 5,5 e 8 mM, são semelhantes às encontradas respectivamente nos dias 5, 8 e 12 de desenvolvimento do tumor Walker-256 (CASSOLLA et al., 2012).

De modo similar à infusão isolada de lactato 2 mM, a infusão de lactato 2 mM associada ao NADH 25 µM promoveu menor aumento na produção de glicose dos ratos portadores de tumor, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, em comparação aos saudáveis (Figura 4A), como evidenciado pela AUC (Figura 4D). Porém, a infusão de lactato 2mM associada ao NADH 50 µM (Figura 4B) e 75 µM (Figura 4C) promoveu maior produção de glicose em fígados de ratos portadores de tumor quando comparada aos ratos saudáveis, como mostrado nas respectivas AUCs (Figuras 4E e 4F).

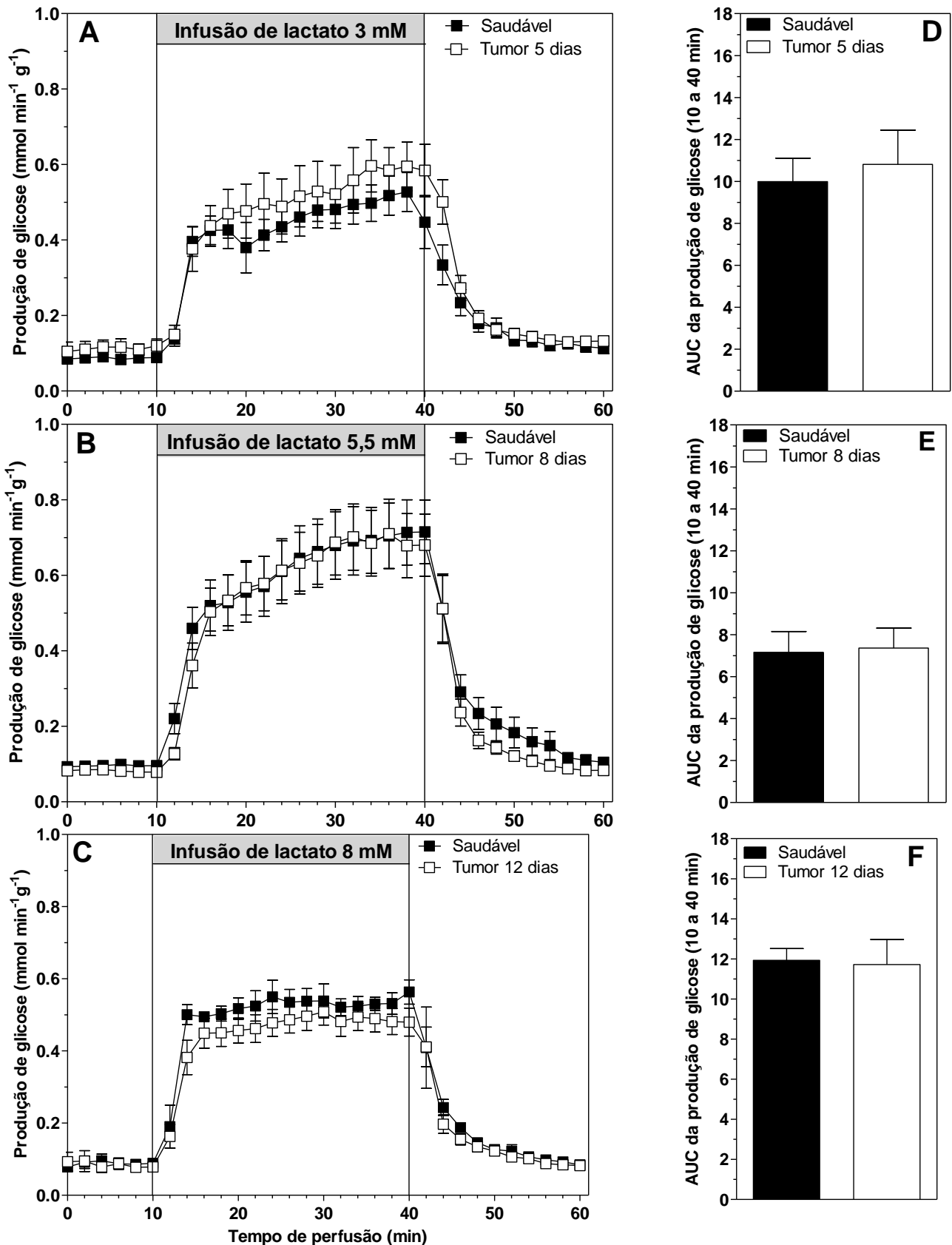
A infusão hepática do piruvato 2 mM (Figura 5A), 5 mM (Figura 5B) e 8 mM (Figura 5C) elevou menos a produção de glicose nos ratos portadores de tumor, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, do que nos saudáveis, como pode visto pelas AUCs correspondentes (Figuras 5D, 5E, 5F).

A infusão hepática do piruvato 2 mM associada ao NADH 25  $\mu$ M (Figura 6A) também causou menor aumento na produção de glicose nos ratos portadores de tumor, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, do que nos saudáveis, como ilustrado pelas AUCs (Figura 6D). No entanto, a infusão hepática do piruvato 2mM associada ao NADH 50  $\mu$ M (Figura 6B) e 75  $\mu$ M (Figura 6C) elevou a produção de glicose nos ratos com 12 dias de desenvolvimento tumoral para valores superiores (50  $\mu$ M) ou similares (75  $\mu$ M) a dos ratos saudáveis, como observado pelas AUCs correspondentes (Figuras 6E e 6F).

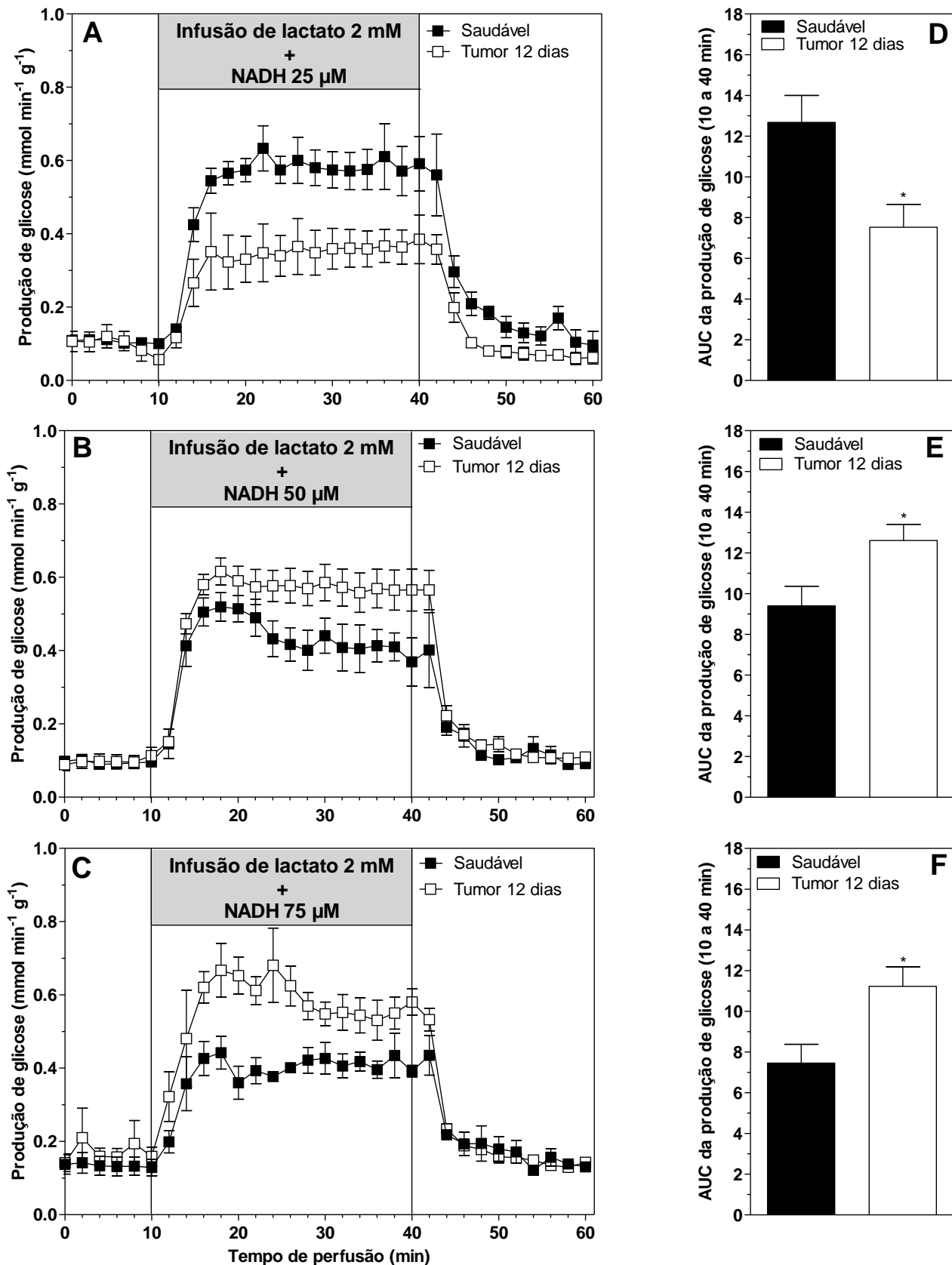
Finalmente, a infusão hepática de glutamina 1 mM promoveu menor aumento na produção de glicose nos ratos com 12 dias de desenvolvimento tumoral do que nos saudáveis (Figura 7A), como evidenciado pelas AUCs (Figura 7D). Porém, a infusão de glutamina 2,5 mM (Figura 7B) e de glutamina 1 mM associada ao NADH 50  $\mu$ M (Figura 7C) aumentou de forma similar a produção de glicose dos ratos com 12 dias de tumor e dos saudáveis, como mostrado pelas AUCs correspondentes (Figuras 7E e 7F).



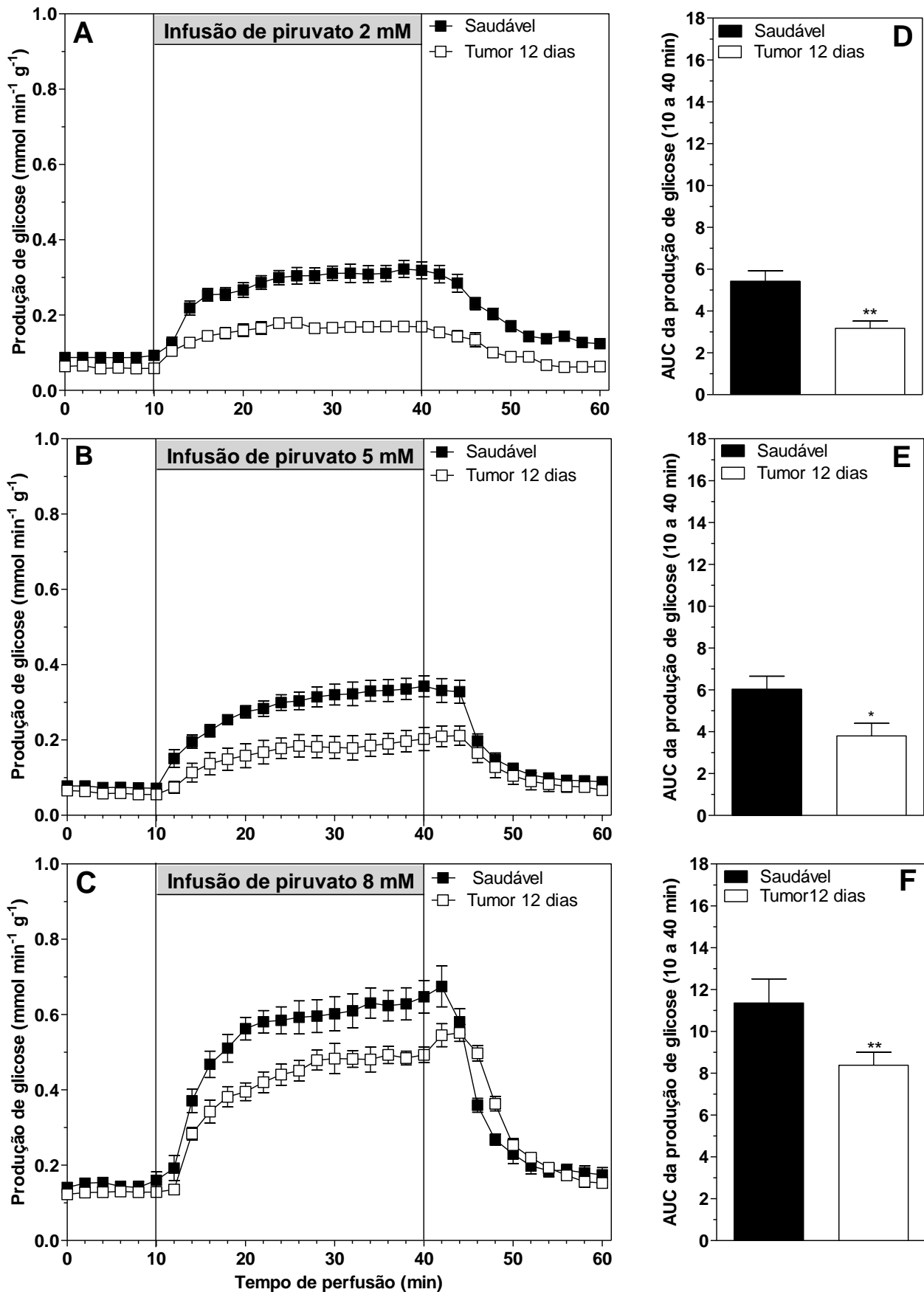
**Figura 2. Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F) durante a infusão de lactato 2 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256, com 5, 8 e 12 dias de desenvolvimento tumoral.** Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Lactato foi infundido no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 8 ratos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus saudável.



**Figura 3. Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F) durante a infusão de lactato 3, 5,5 ou 8 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 5, 8 e 12 dias de desenvolvimento tumoral. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Lactato foi infundido no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 10 ratos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado.**



**Figura 4.** Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de lactato 2 mM e NADH 25, 50 ou 75 μM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Lactato e NADH foram infundidos no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média ± erro padrão da média de 5 a 10 ratos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. \*p<0,05 versus saudável.



**Figura 5. Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de piruvato 2, 5 e 8 mM em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Piruvato foi infundido no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 a 10 ratos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  versus saudável.**

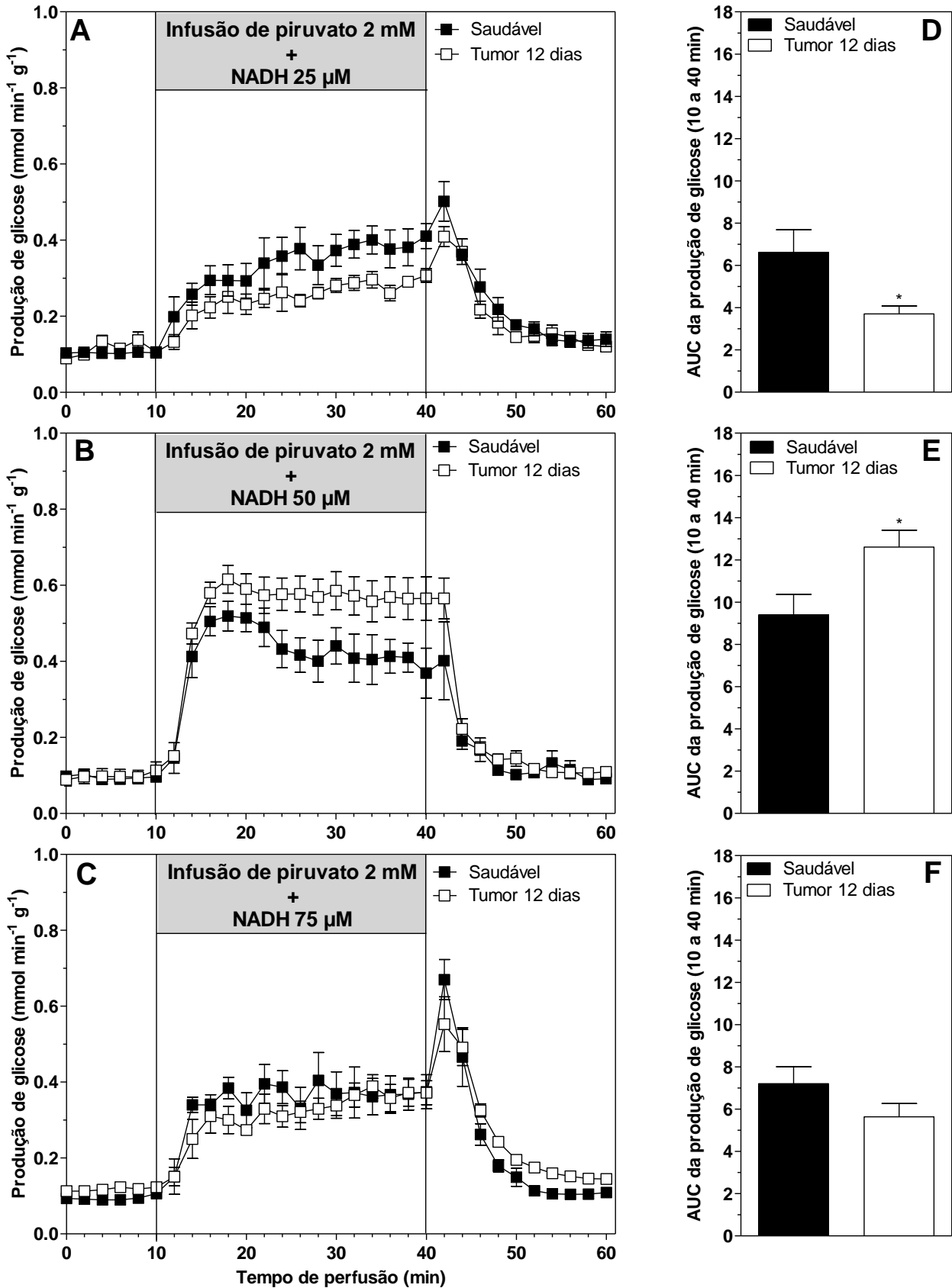
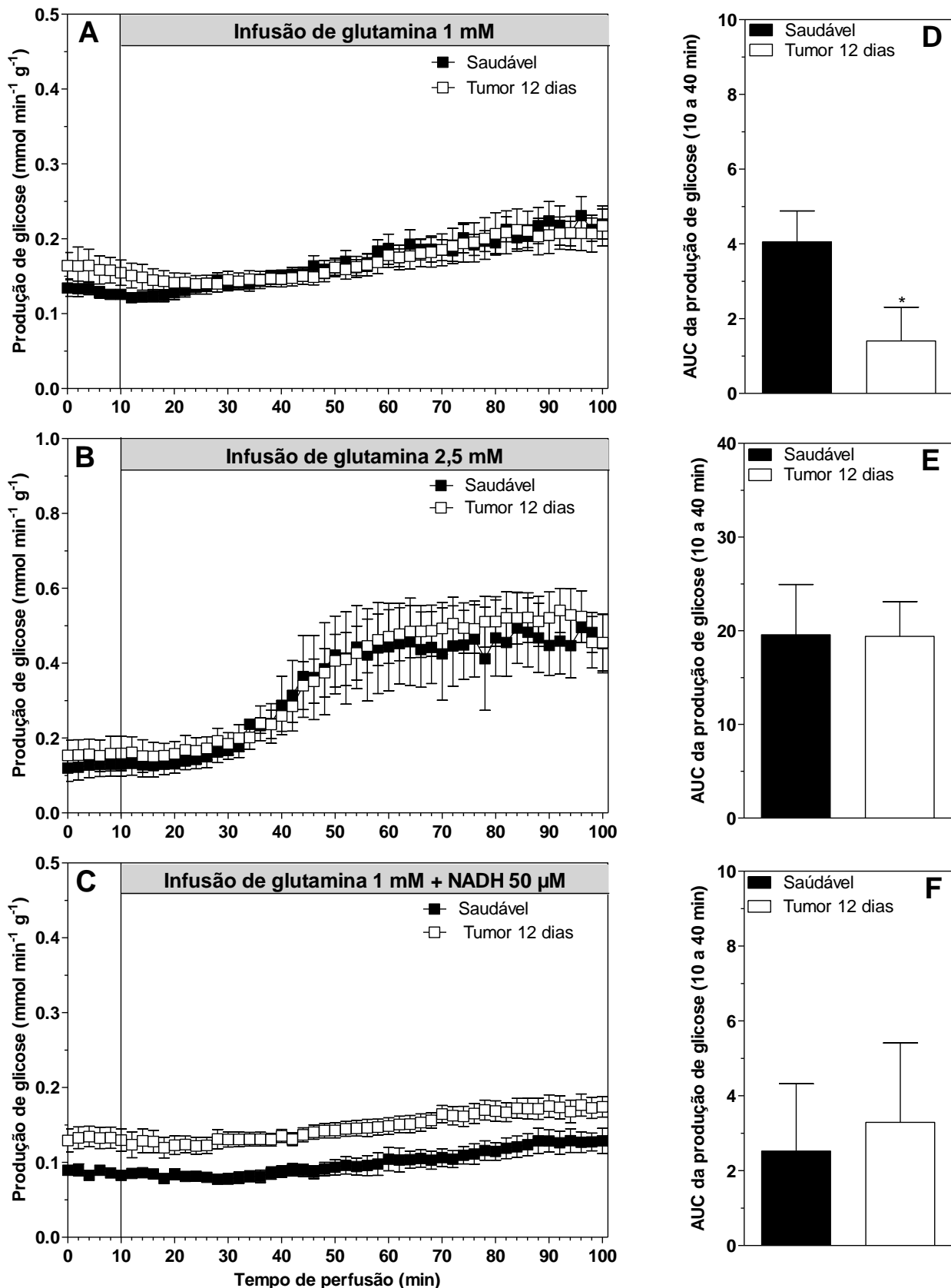


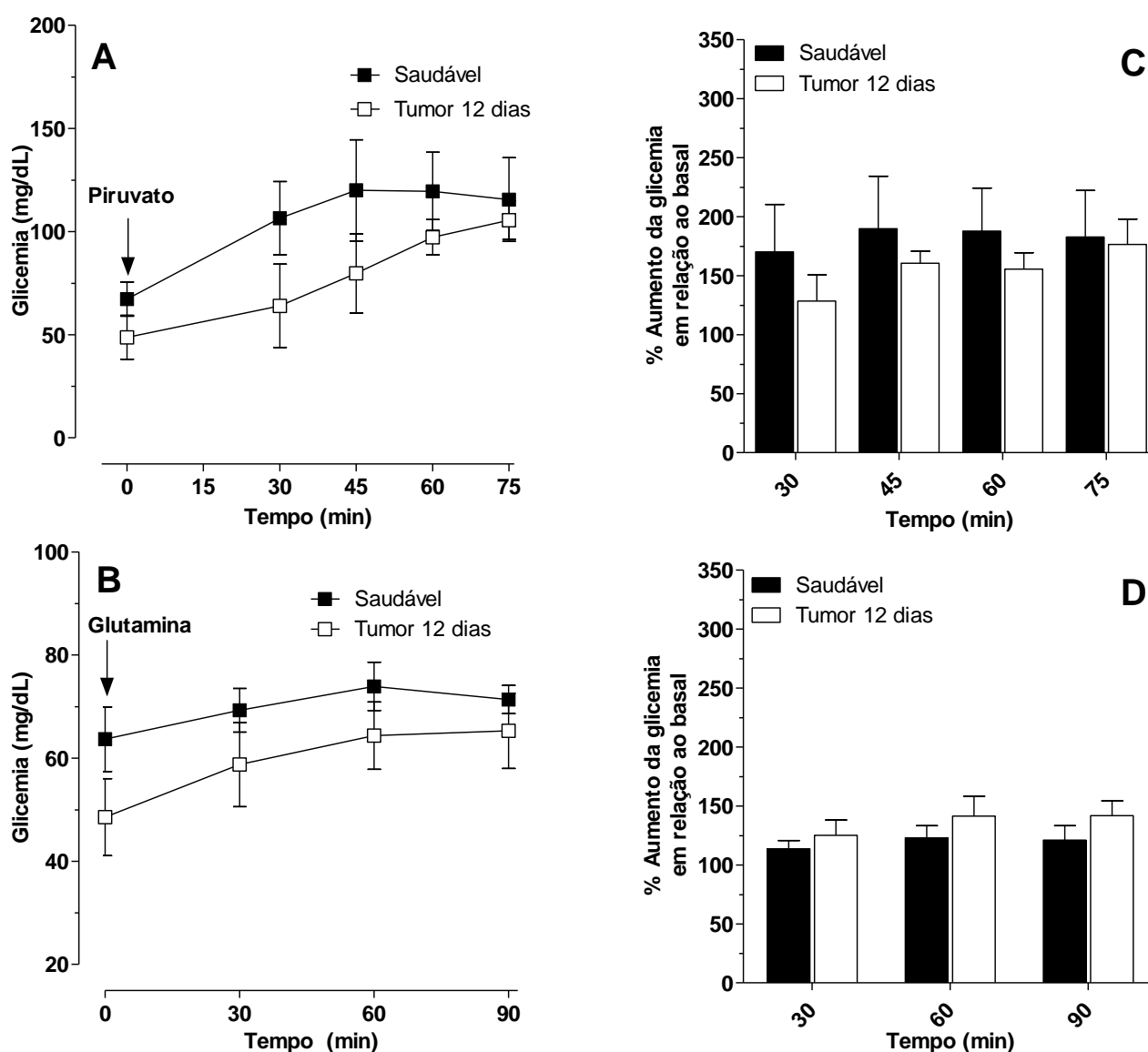
Figura 6. Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de piruvato 2 mM e NADH 25, 50 ou 75 μM, em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Piruvato e NADH foram infundidos no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média ± erro padrão da média de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado, \**p*<0,05 versus saudável.



**Figura 7. Neoglicogênese *in situ* (A, B e C) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (D, E e F), durante a infusão de glutamina 1 e 2,5 mM ou 1 mM +NADH 50 μM, em fígados de ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão como descrito em Material e Métodos. Glutamina foi infundida no intervalo entre 10 e 40 min. Dados representam a média ± erro padrão da média de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado. \*p < 0,05 versus saudável.**

## 4.2 Avaliação da neoglicogênese *in vivo*

Ratos portadores de tumor, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, apresentaram menor glicemia basal (0 min) do que os ratos saudáveis (Figuras 7A e 7B). A administração intraperitoneal dos precursores neoglicogênicos piruvato (1,0 mg/kg) (Figura 7A) e glutamina (0,5 mg/kg) (Figura 7B) aumentou a glicemia dos ratos portadores de tumor e saudáveis de modo similar, como mostrado pela % de aumento da glicemia em relação aos respectivos valores basais (Figuras 7C e 7D).



**Figura 8. Neoglicogênese *in vivo* durante a administração de piruvato (A) ou glutamina (B) e as respectivas % de aumento da glicemia (C e D) em ratos saudáveis e portadores do tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral.** Ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à administração intraperitoneal de piruvato (1,0 mg/kg) e glutamina (0,5 mg/kg) no tempo 0 min, como descrito em Material e Métodos. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 19 ratos. As % de aumento da glicemia em relação ao basal foram analisadas pelo teste t de Student não-pareado.

## *Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

É sugerido que processos desperdiçadores de energia, como a maior atividade do ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori), contribua para a caquexia do câncer, uma vez que energia extra para a manutenção deste ciclo é retirada dos estoques de lipídeos e proteínas (BONGAERTS *et al.*, 2006; FRIESEN; BARACOS; TISDALE, 2005).

Pacientes com caquexia do câncer apresentam maior atividade do ciclo lactato-glicose (BONGAERTS *et al.*, 2006; FRIESEN; BARACOS; TISDALE, 2005), a qual é atribuída à alta lactatemia e a maior capacidade do fígado em converter o lactato em glicose (maior atividade neoglicogênica) (LUNDHOLM *et al.*, 1982; WATERHOUSE; JEANPRETRE; KEILSON, 1979).

Ratos com caquexia induzida por tumor Walker-256 também apresentam várias anormalidades metabólicas, semelhantes as encontradas em pacientes com caquexia do câncer, incluindo hiperlactatemia (CASSOLLA *et al.*, 2012). Porém, diferente dos pacientes com câncer, estes animais mostraram inibição da neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose (ACCO *et al.*, 2007; CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2013), incluindo o lactato 2 mM (DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015), em estudos de perfusão de fígado.

Estendendo estes achados (DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015), o presente estudo mostrou menor inibição da neoglicogênese a partir do lactato 2 mM nas fases precoce (dia 5), intermediária (dia 8) e avançada (dia 12) do desenvolvimento tumoral, como constatado pela menor produção hepática de glicose nos ratos portadores de tumor Walker-256 em comparação aos ratos saudáveis (Figura 2).

É possível que a menor inibição da neoglicogênese observada nos dias 5, 8 e 12 de tumor (Figura 2), assim como nos demais estudos de perfusão de fígado (ACCO *et al.*, 2007; CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004; DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2013) seja porque fatores alterados no sangue dos ratos portadores de tumor que aumentam a neoglicogênese, como o aumento de AGLs, a hiperlactatemia (CASSOLLA *et al.*, 2012) e a hipoinsulinemia (DE FATIMA SILVA, 2017; FERNANDES *et al.*, 1990), não foram simulados nos estudos de perfusão.

Considerando que no presente estudo (Figura 2), assim como nos outros estudos de perfusão (DA VEIGA *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015), foi usada uma concentração de lactato similar a lactatemia dos ratos saudáveis (2 mM), a qual não

reflete a hiperlactatemia dos ratos portadores de tumor, o efeito de concentrações circulantes de lactato na neoglicogênese foi avaliado (Figura 3).

Os resultados mostraram que concentrações de lactato simulando a lactatemia encontrada nos dias 5 (3 mM), 8 (5,5 mM) e 12 (8 mM) de tumor (CASSOLLA *et al.*, 2012) restauraram a inibição da neoglicogênese observada a partir do lactato 2 mM, como evidenciado pela similaridade na produção de glicose entre ratos portadores de tumor e saudáveis (Figura 3).

Estes resultados evidenciam que as divergências relatadas na neoglicogênese entre ratos portadores de tumor Walker-256 (neoglicogênese reduzida) e pacientes com câncer (neoglicogênese aumentada) se deve, em parte, a falta de simulação da hiperlactatemia nos estudos de perfusão de fígado.

No fígado, o lactato é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase em uma reação que gera NADH. O NADH é usado na neoglicogênese, sendo essencial para o funcionamento da via (Figura 1). Deste modo, é possível que maiores concentrações de lactato restauraram a inibição da neoglicogênese por aumentarem a razão NADH/NAD<sup>+</sup> (potencial redox), a qual está reduzida no fígado dos ratos portadores de tumor. Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam baixa razão NADH/NAD<sup>+</sup> hepática, tanto na mitocôndria (DA VEIGA *et al.*, 2008; VICENTINO *et al.*, 2002a) como no citosol (ARGILÉS e LÓPES-SORIANO, 1991). Esta menor razão NADH/NAD<sup>+</sup> parece ser devida à menor oxidação de AGLs, causada pela redução de atividade das carnitina palmitoil transferases 1 (CPT1) e 2 (CPT2), enzimas envolvidas no transporte de AGLs do citosol para a mitocôndria (DA VEIGA *et al.*, 2008; SEELAENDER *et al.*, 1998; VICENTINO *et al.*, 2002a) (Figura 1). A baixa razão NADH/NAD<sup>+</sup> no fígado também pode ser devida à menor taxa de captação e oxidação de glicose, decorrente da menor atividade da glicoquinase (VICENTINO *et al.*, 2002b), a enzima que fosforila a glicose que entra no hepatócito facilitando sua captação.

Diante da hipótese de que maiores concentrações de lactato podem restaurar a inibição da neoglicogênese por aumentarem a razão NADH/NAD<sup>+</sup>, nós avaliamos a neoglicogênese a partir do lactato 2 mM, associado a várias concentrações de NADH (Figura 4).

Diferentemente da infusão isolada do lactato 2 mM, a produção hepática de glicose a partir do lactato 2 mM associado ao NADH 50 ou 75 μM, mas não ao NADH 25 μM, aumentou a produção de glicose nos fígados dos ratos com 12 dias de tumor, para valores superiores ao dos ratos saudáveis (Figura 4). Estes resultados corroboram nossa hipótesede que a inibição da neoglicogênese a partir de baixa concentração de lactato (2

mM) provavelmente foi restaurada pelo aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> no fígado dos ratos portadores de tumor. O NADH na concentração de 25 µM não deve ter sido suficiente para a normalização do potencial redox no fígado dos ratos portadores de tumor e conseqüentemente para a restauração da inibição da neoglicogênese (Figura 4).

Como o piruvato não gera NADH (Figura 1) nós avaliamos a neoglicogênese a partir do piruvato 2, 5 e 8 mM, concentrações similares as usadas com o lactato (Figura 5). Ratos com 12 dias de tumor apresentaram menor produção hepática de glicose a partir do piruvato 2 mM, em comparação aos saudáveis, como ocorreu para o lactato 2 mM. Entretanto, a infusão de altas concentrações de piruvato (5 e 8 mM), diferentemente da infusão de altas concentrações de lactato (3, 5,5 e 8 mM), não restabeleceu a inibição da neoglicogênese a partir do piruvato 2 mM (Figura 5), provavelmente porque o piruvato, por não gerar NADH, não restaurou o reduzido potencial redox.

Em consistência, a menor inibição da produção hepática de glicose a partir do piruvato 2 mM associado ao NADH 50 ou 75 µM, mas não ao NADH 25 µM, foi restaurada nos ratos com 12 dias de tumor (Figura 6), como ocorreu para a associação lactato 2 mM + NADH, corroborando nossa proposição que a inibição da neoglicogênese a partir do piruvato 2 mM foi restaurada pelo aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>.

A falta de efeito do NADH 25 µM na restauração da neoglicogênese a partir do piruvato 2 mM está em acordo com os resultados obtidos com a associação NADH 25 µM + lactato 2 mM (Figura 4) e também pode ser justificada pela insuficiência desta concentração (25 µM) na normalização do potencial redox.

Como a glutamina também é um precursor neoglicogênico gerador de NADH, a neoglicogênese a partir da glutamina 1 e 2,5 mM foi avaliada (Figura 7). Ratos com 12 dias de tumor apresentaram menor produção hepática de glicose a partir da glutamina 1 mM, mas não a partir da glutamina 2,5 mM (Figura 7), corroborando estudos anteriores que também não encontraram inibição da neoglicogênese a partir da glutamina 2,5 mM em perfusão de fígado de ratos portadores de tumor Walker-256 (CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004). Estes resultados evidenciam que maior concentração de glutamina (2,5 mM) restaura a inibição da neoglicogênese observada a partir de baixa concentração de glutamina (1,0 mM) provavelmente porque gera mais NADH, restabelecendo o reduzido potencial redox no fígado. Vale observar que a glutamina gera mais NADH que o lactato (Figura 1). Em consistência com estes resultados, estudos de perfusão de fígado mostraram inibição da neoglicogênese a partir da alanina 0,7 mM (DA VEIGA *et al.*, 2008) e 2,5 mM (DE SOUZA *et al.*, 2015) neste mesmo modelo experimental de câncer, indicando que maior concentração de alanina (2,5 mM), diferentemente da glutamina (2,5

mM), não restaura a inibição da neoglicogênese porque a alanina não gera NADH (Figura 1) e portanto não restaura o baixo potencial redox do fígado.

A infusão de glutamina 1 mM, associada ao NADH 50  $\mu$ M, aumentou a produção hepática de glicose dos ratos com 12 dias de tumor para valores similares ao dos ratos saudáveis (Figura 7), corroborando também a hipótese que o aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> restaura a inibição da neoglicogênese em perfusão de fígado de ratos portadores de tumor.

Considerando que o aumento de NADH aumenta o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna, o qual é necessário para a síntese de ATP pelo complexo ATP sintetase, é plausível sugerir que parte dos efeitos do aumento do NADH na restauração da inibição da neoglicogênese foi mediada pelo aumento do ATP. De fato, o ATP, assim como o NADH, é essencial para a neoglicogênese e seu conteúdo está diminuído no fígado dos ratos portadores de tumor Walker-256 (CORBELLO PEREIRA *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2015). O baixo conteúdo hepático de ATP nestes animais, como já descrito para a baixa razão NADH/NAD<sup>+</sup>, parece ser devido à redução da oxidação de AGLs, decorrente da menor atividade ou expressão da CPT1 e CPT2 (DE SOUZA *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 2010; SEELAENDER *et al.*, 1998; VICENTINO *et al.*, 2002a), e à redução da captação/oxidação de glicose decorrente da inibição da glicoquinase (VICENTINO *et al.*, 2002a). Além disso, o baixo conteúdo hepático de ATP nos ratos Walker-256 pode ser decorrento aumento de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs). As UCPs transportam H<sup>+</sup> (prótons) através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente eletroquímico de prótons necessário para a síntese de ATP (TISDALE, 2005). O LMF e o TNF $\alpha$  parecem aumentar a expressão de UCPs em vários tecidos, incluindo o hepático (MARTIGNONI; KUNZE; FRIESS, 2003).

Foi observado que alta concentração de AGLs (oleato), simulando a concentração circulante usualmente encontrada em ratos portadores de tumor Walker-256, restaurou a inibição da neoglicogênese a partir do lactato/piruvato (2,0/0,2 mM) em perfusão de fígado (DA VEIGA *et al.*, 2008). Alta concentração de AGLs pode aumentar o reduzido potencial redox (razão NADH/NAD<sup>+</sup>) e o estado energético (ATP) do fígado, duas condições necessárias para a restauração da inibição da neoglicogênese nos ratos portadores de tumor.

Estudos do nosso laboratório (DE SOUZA *et al.*, 2015) mostraram que o tratamento com ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroideal (AINES), inibidor da síntese de prostaglandinas, restaurou a redução do conteúdo de ATP e a inibição da

neoglicogênese a partir do lactato (2 mM), piruvato (5 mM) e da alanina (2,5 mM) em perfusão de fígado de ratos portadores de tumor Walker-256. Estes efeitos do ibuprofeno foram associados ao aumento da expressão gênica de CPT1, a qual está diminuída no fígado dos ratos portadores de tumor (DE SOUZA *et al.*, 2015). O aumento da expressão de CPT1 pode aumentar o transporte de AGLs do citosol para a mitocôndria e conseqüentemente a sua oxidação, geração de NADH e síntese de ATP, restaurando a inibição da neoglicogênese.

Finalmente, o efeito da administração intraperitoneal de piruvato (1,0 mg/kg) ou glutamina (0,5 mg/kg) sobre a glicemia (teste neoglicogênico *in vivo*) foi avaliado.

Como previamente observado, ratos portadores de tumor Walker-256, com 12 dias de desenvolvimento tumoral, apresentaram menor glicemia basal (0 min), antes da administração dos precursores neoglicogênicos, do que os ratos saudáveis, um resultado compatível com a alta taxa de captação e utilização de glicose pelas células tumorais, (CASSOLLA *et al.*, 2012) (Figura 8). A administração dos precursores neoglicogênicos (piruvato ou glutamina) aumentou a glicemia dos ratos portadores de tumor e saudáveis de modo similar (Figura 8), evidenciando que de fato a neoglicogênese não está inibida na condição *in vivo* nos ratos portadores de tumor Walker-256.

É possível que na condição *in vivo* a neoglicogênese hepática dos ratos portadores de tumor Walker-256 esteja inclusive aumentada, visto que estes animais apresentam além de hiperlactatemia, aumento acentuado de AGLs no sangue e hipoinsulinemia, fatores que possuem potentes efeitos estimulatórios na neoglicogênese.

Assim, os resultados do presente estudo corroboram com a maior atividade neoglicogênica relatada em pacientes com câncer e conseqüentemente com a maior atividade do ciclo lactato-glicose (ciclo de Cori), um possível contribuidor da caquexia do câncer.

## *Conclusão*

---

## 6. CONCLUSÃO

Pode ser concluído que altas concentrações de lactato, similares à lactatemia dos ratos portadores de tumor Walker-256 (3, 5,5 e 8 mM) restabeleceram a inibição da neoglicogênese hepática observada a partir de baixas concentrações de lactato (2 mM) em perfusão de fígado de ratos com 5, 8 e 12 dias de desenvolvimento do tumor Walker-256, por mecanismo que provavelmente envolveu aumento do baixo potencial redox (NADH).

## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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 and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 101, n. 5, p. 294–300, 2007.
2. AOYAGI, T.; TERRACINA, K. P.; RAZA, A.; MATSUBARA, H.; TAKABE, K. L. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World Journal of Gastrointestinal oncology**, v. 7, n. 4, p. 17–29, 2015.
3. ARGILÉS, J. M; BUSQUETS, S.; STEMMLER, B.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 754–762, 2014.
4. ARGILÉS, J. M.; LOPEZ-SORIANO, F. J. The energy state of tumor-bearing rats. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 5, p. 2978–2982, 1991.
5. ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 435-438, 1995.
6. BELUZI, M.; PERES, S. B.; HENRIQUES, F. S.; SERTIÉ, R. A. L.; FRANCO, F. O.; SANTOS, K. B.; KNOBL, P.; ANDREOTTI, S.; SHIDA, C. S.; NEVES, R. X.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M.; LIMA, F. B.; BATISTA JR., M. L. Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing animals: possible anti-cachectic effect. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.
7. BERGMAYER, H.U.; BERNT, E. **Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase**. In: BERGMAYER, H.U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, New York: Academic Press, 1974. p. 1205-1215.
8. BONGAERTS, G. P. A.; VAN HALTEREN, H. K.; VERHAGEN, C. A.; WAGENER, D. J. Cancercachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 5, p. 1213–1222, 2006.
9. BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 223-229, 2007.
10. CASSOLLA, P; MOREIRA, C.C.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, n. 4, p. 265–270, 2012.
11. CORBELLO PEREIRA, S. R.; DARRONQUI, E.; CONSTATIN, J.; SILVA, M. H. R. A.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1688, n. 3, p. 187–196, 2004.
12. CRUZ, B; OLIVEIRA, A; GOMES-MARCONDES, M. C. C.L-leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 96, p. 253-260, 2017).
13. DA VEIGA, R. P.; VEIGA, R. P.; SILVA, M. H. R. A.; TEODORO, G. R.; YAMAMOTO, N. S.; CONSTATIN, J.; BRACHT, A. Metabolic fluxes in the liver of rats bearing the Walker-256 tumour: Influence of the circulating levels of substrates and fatty acids. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 1, p. 51–63, 2008.
14. DE FATIMA-SILVA, F.; ORTIZ-SILVA, M.; DE SOUZA-GALIA, W.B.; CASSOLLA, P.; GRACIANO, M.F.; ZAIA, C.T.; ZAIA, D.; CARPINELLI, Â.R.; DA SILVA, F.G.; DE SOUZA, H.M. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. **Life Sciences**, v. 171, n. 1, p. 68-74, 2017.
15. DE MORAIS, H.; CASSOLA, P.; MOREIRA, C. C.; BÔAS, S. K.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H.M. Decreased response to c AMP in the glucose and

- glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, n. 1-2, p. 9–16, 2012.
16. DE SOUZA, C. O.; KURAUTI, M. A.; SILVA, F. D. E. 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.
  17. DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 2, p. 142–148, 2007.
  18. EDEN, E.; EDSTROM, S.; BENNEGARD, K. Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. **Cancer Research**, v. 44, n. 4, p. 1718–1724, 1984.
  19. FEARON, K. C. H.; GLASS, D. J.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 153-166, 2012.
  20. FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 258, n. 6, p. 1033-1036, 1990.
  21. FRIESEN, D. E.; BARACOS, V. E.; TUSZYNSKI, J. A. Modeling the energetic cost of cancer as a result of altered energy metabolism: implications for cachexia. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2015.
  22. 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 1982. **Oncology**, v. 39, n. 3, p. 173–178, 1982.
  23. HOLROYDE, C. P.; GABUZDA, T.G.; PUTNAM, R.C.; PAUL, P.; REICHARD, G. A. Altered Glucose Metabolism in Metastatic Carcinoma Altered Glucose Metabolism in Metastatic Carcinoma. **Cancer Research**, v. 35, p. 3710–3714, 1975.
  24. 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.
  25. 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: 419-438, 1984.
  26. LIRA, F.S.; YAMASHITA, A.; CARNEVALI, L.C.; 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 and Metabolic Research**, v.42, n.1, p. 944-949, 2010.
  27. LUNDHOLM, K., EDSTROM, S.; KARLBERG, I.; EKMAN, L.; SCHERSTEN, T. Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer**, v. 50, n. 6, p. 1142–1150, 1982.
  28. LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTÉN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, v. 38, n. 12, p. 4665-4670, 1978.
  29. MANTOVANI, G.; MADEDDU, C. Cancer cachexia: Medical management. **Supportive Care in Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2010.
  30. MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer**, v. 36, n. 2, p. 146–151, 2003.
  31. MENDES, M. C. S.; PIMENTEL, G. D.; COSTA, F. O.; CARVALHEIRA, J. B. Molecular and neuroendocrine mechanisms of cancer cachexia. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 3, p. R29-R43, 2015.
  32. MOREIRA, C. C. L.; CASSOLLA, P.; DORNELLAS, A. P.; DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. O.; BORBA-MURAD, G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in liver

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

33. MUELLER, T. C.; BACHMANN, J.; PROKOPCHUK, O.; FRIESS, H.; MARTIGNONI, M. E. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia - can findings from animal models be translated to humans? **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 75, 2016.
34. NOGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; MARAT, D.; DOI, C.; MAKINO, T.; FUKUZAWA, K.; TSUBURAYA, A.; SATOH, S.; ITO, T.; MITSUSE, S. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 887–892, 1998.
35. PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual review of physiology**, v. 54, p. 885–909, 1992.
36. PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, p. e200, 2016.
37. 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.
38. TAYEK, J. A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 445–456, 1992.
39. TISDALE, M. J. Pathogenesis of cancer cachexia. **The Journal of Supportive Oncology**, v. 1, n. 3, p. 159-68, 2003.
40. TISDALE, M. J. Tumor-host interactions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93, n. 5, p. 871-7, 2004.
41. TISDALE, M. J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, v. 20, n. 5, p. 340–348, 2005.
42. TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.
43. VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, v. 22, n. 4, p. 341–349, 2002a.
44. VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; STECANELLA, L. A.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology**, 8: 175-182, 2002b.
45. 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, 1 out. 2002.
46. WATERHOUSE, C.; JEANPRETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Research**, v. 39, n. 6 I, p. 1968–1972, 1979.
47. YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; DOI, C.; MAKINO, T.; NOMURA, K. Insulin resistance in patients with cancer: Relationships with tumor site, tumor stage, body-weight loss, acute-phase response, and energy expenditure. **Nutrition**, v. 17, n. 01, p. 590–593, 2001.