



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

HELY DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À INSULINA E AO AMP<sub>c</sub> EM  
RATOS COM TUMOR WALKER-256**

---

Londrina  
2011

HELY DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À INSULINA E AO AMP<sub>c</sub> EM  
RATOS COM TUMOR WALKER-256**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da 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  
2011

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

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

M827a Morais, Hely de.  
Avaliação da resposta à insulina e ao AMPc em ratos com tumor Walker-256 / Hely  
de Morais. – Londrina, 2011.  
88 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Câncer – Teses. 2. Caquexia– Teses. 3. Walker-256 – Teor proteico – Teses. 4.  
Resistência à insulina – Teses. 5. Glicogenólise hepática – Teses. 6. Glicólise hepática –  
Teses. 7. Adenosina monofosfato cíclica (AMPc) – Teses. I. Souza, Helenir Medri de.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612.018

HELY DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À INSULINA E AO AMPc EM  
RATOS COM TUMOR WALKER-256**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenir Medri de Souza  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Rui Curi  
USP – São Paulo - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2011.

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus pais Jair e Helena, por todo esforço que realizaram para que eu chegasse até aqui, me dando força nos momentos de desânimo, e à minha irmã Helen, pela confiança e amparo. Vocês são o meu porto seguro.

Ao meu namorado, Gabriel, por aturar meu mau humor nos dias difíceis e por nunca deixar de acreditar em mim. E a sua família, que já é um pouco minha devido ao tempo de convívio, pela torcida e incentivo durante todo o mestrado.

Ao Pipoca, por estar sempre ao meu lado desde os estudos para a prova de mestrado até a elaboração deste trabalho.

Aos meus cunhados Carlos Eduardo e Natália, pela paciência em me ouvir falar deste trabalho durante horas e horas.

Aos meus verdadeiros amigos que perto ou longe estiveram sempre prontos a me escutar e animar.

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

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Regina Borba Murad, pelo carinho e por estar sempre disposta a ajudar em todos os momentos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cássia Thaís B. V. Zaia, por me iniciar no mundo científico e me ensinar as técnicas e procedimentos básicos, os quais foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Ponzoni, pela sinceridade, auxílio e pelas conversas durante o horário de almoço.

Às meninas do laboratório Aline, Camila, Daniele, Kelly, Mirian e Thaís, pela ajuda, apoio, simpatia e momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas de trabalho. E principalmente a Suéllen (Suka), por ter sido meu braço direito durante o primeiro ano de execução deste trabalho.

Aos amigos de departamento e de mestrado, pelo apoio e parceria em todas as horas.

À Priscila Cassolla, por todos os ensinamentos, amizade e por me acolher em sua casa em Ribeirão Preto.

Ao Dr. Hamilton e Dona Guacira, por me acolherem em sua casa durante minha estadia em Porto Alegre.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas.

À secretária do programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências fisiológicas, Daniela G. Borin, pela eficiência em desempenhar seu trabalho.

A Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

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

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

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

David Cronenberg

MORAIS, HELY. **Avaliação da resposta à insulina e ao AMPc em ratos com tumor Walker-256**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

O câncer é considerado o maior problema de saúde pública em diversos países e a manifestação mais comum do avanço maligno da doença é a caquexia. A caquexia no câncer é caracterizada por acentuada perda de peso, decorrente do predomínio do catabolismo e anorexia, e por várias anormalidades metabólicas como a resistência à insulina. A resistência insulínica em pacientes com câncer poderia contribuir para a exacerbação dos processos catabólicos no tecido muscular, adiposo e hepático e conseqüentemente para o desenvolvimento da caquexia. Considerando que não há informações sobre a resistência à insulina em ratos com caquexia induzida por tumor Walker-256, particularmente ao longo do desenvolvimento tumoral, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a resposta periférica e hepática a este hormônio. A resposta hepática a adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e ao N<sup>6</sup>-monobutiril-AMPc (N<sup>6</sup>-MB-AMPc) também foi avaliada. Nos experimentos foram usados ratos Wistar portadores (WK) ou não (controle e controle *pair fed*) de tumor Walker-256. Para a implantação do tumor,  $8 \times 10^7$  células Walker-256 foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito traseiro dos animais. Ratos controles (alimentação à vontade) e controles *pair fed* (alimentação reduzida, semelhante a dos animais com tumor portadores de anorexia) foram inoculados com PBS (salina tamponada com fosfato) no mesmo local. A resposta periférica à insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância à insulina em ratos no 2<sup>o</sup> (WK 2<sup>o</sup>), 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>), 8<sup>o</sup> (WK 8<sup>o</sup>) e 12<sup>o</sup> (WK 12<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento tumoral e nos respectivos controles. Para tanto, foi feita a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg), em ratos com 24 horas de privação alimentar, e avaliação da glicemia nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de insulina. A resposta hepática à insulina, ao AMPc e N<sup>6</sup>-MB-AMPc foi avaliada em perfusão de fígado *in situ*. A resposta hepática à insulina, no catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc, foi avaliada no 2<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia de tumor e nos controles *pair fed* correspondentes. Nestes estudos os fígados foram submetidos à perfusão com AMPc (3  $\mu$ M), na ausência ou presença de insulina (500  $\mu$ U/mL). A resposta hepática ao AMPc (3  $\mu$ M ou 9  $\mu$ M) no catabolismo do glicogênio, foi avaliada em ratos no 5<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dia de tumor, nos controles *pair fed* correspondentes e nos controles. A resposta hepática ao AMPc e ao N<sup>6</sup>-MB-AMPc no catabolismo da glicose, foi avaliada no 5<sup>o</sup> e/ou 12<sup>o</sup> dia de tumor e nos controles. Nestes experimentos fígados de animais, com 24 horas de privação alimentar, foram submetidos à perfusão com glicose (20 mM), na ausência ou presença de AMPc (6  $\mu$ M) ou N<sup>6</sup>-MB-AMPc (1  $\mu$ M). Em todos os experimentos de perfusão amostras do perfusado efluente do fígado foram coletadas para determinação da produção hepática de glicose, lactato e piruvato e das taxas de glicogenólise ou glicólise. Os resultados demonstraram menor ( $p < 0,05$ ) resposta periférica à insulina nos grupos WK 5<sup>o</sup>, WK 8<sup>o</sup> e WK 12<sup>o</sup>, mas não no WK 2<sup>o</sup>, em relação aos controles, sugerindo resistência periférica à insulina já no 5<sup>o</sup> dia de tumor. Quanto a resposta hepática à insulina no catabolismo do glicogênio, a insulina reduziu ( $p < 0,05$ ) a produção de glicose e glicogenólise estimulada pelo AMPc de modo similar nos animais

portadores de tumor (WK 2° e WK 5°) e nos controles *pair fed*, sugerindo ausência de resistência hepática à insulina nestes estágios de desenvolvimento tumoral. Com relação a resposta hepática ao AMPc, no catabolismo do glicogênio, animais WK 5° e WK 8° apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) resposta ao AMPc (3  $\mu\text{M}$  e 9  $\mu\text{M}$ ) na estimulação da produção de glicose e glicogenólise em relação aos controles *pair fed* e controles. Os animais portadores de tumor também apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) resposta ao AMPc (6  $\mu\text{M}$ ) (grupos WK 5° e WK 12°) e ao N<sup>6</sup>-MB-AMPc (1 $\mu\text{M}$ ) (grupo WK 5°) na inibição do catabolismo da glicose (glicólise) em comparação aos controles. A diminuição da resposta ao AMPc no catabolismo do glicogênio provavelmente não foi decorrente do menor conteúdo de glicogênio hepático, visto que também houve menor resposta ao AMPc no catabolismo da glicose quando os estoques de glicogênio do fígado foram depletados e nem do aumento da atuação da fosfodiesterase 3B (PDE3B), visto que o N<sup>6</sup>-MB-AMPc, um análogo do AMPc não degradado pela PDE3B, não teve efeito no catabolismo da glicose (glicólise). Em síntese, os resultados indicam que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentam diminuição da resposta periférica, mas não hepática, à insulina e diminuição da resposta hepática ao AMPc já no 5° dia de desenvolvimento tumoral.

**Palavras-chave:** Câncer. Caquexia Walker-256. Resistência à insulina. Glicogenólise hepática. Glicólise hepática. Adenosina monofosfato cíclica. (AMPc).

MORAIS, HELY. **Evaluation of response to insulin and cAMP in rats with Walker-256 tumor.** 2011. 88 p. Dissertation submitted to the Multicenter Program of pós-graduate in Physiological Sciences of Universidade Estadual de Londrina as partial requirement for obtaining the title of Master in Physiological Sciences.

## ABSTRACT

Cancer is considered the largest public health problem in many countries and the most common manifestation of the progress of malignant disease is cachexia. Cachexia in cancer is characterized by severe weight loss, due to the predominance of catabolism and anorexia, and several metabolic abnormalities like insulin resistance. Insulin resistance in cancer patients could contribute to the exacerbation of catabolic processes in muscle, adipose and hepatic tissue and thus for the development of cachexia. Considering that no information on insulin resistance in mice with Walker-256 tumor-induced cachexia, particularly along the tumor development, the main goal of this study was to evaluate the peripheral and hepatic response to this hormone. The hepatic response to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and N<sup>6</sup>-monobutiril-cAMP (N<sup>6</sup>-MB-cAMP) was also evaluated. In experiments were used Wistar rats bearing (WK) or not (control and control pair fed) Walker-256 tumor. For tumor implantation,  $8 \times 10^7$  Walker-256 cells were subcutaneously inoculated in the right rear flank of the animals. Control rats (fed *ad libitum*) and pair fed controls (reduced fed, similar to tumor-bearing animals with anorexia) were inoculated with PBS (phosphate buffered saline) in the same place. The peripheral insulin response was evaluated using the insulin tolerance test in mice at 2<sup>th</sup> (WK 2<sup>th</sup>), 5<sup>th</sup> (WK 5<sup>th</sup>), 8<sup>th</sup> (WK 8<sup>th</sup>) and 12<sup>th</sup> (WK 12<sup>th</sup>) days of tumor development and in their controls. For this, was made intravenous administration of insulin (0.25 U/kg) in rats with 24 hours of food deprivation, and evaluation of blood glucose at 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 and 90 minutes after insulin injection. The hepatic response to insulin, cAMP and N<sup>6</sup>-MB-cAMP was evaluated in liver perfusion *in situ*. The hepatic response to insulin, in glycogen catabolism stimulated by cAMP, was evaluated at 2<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> days of tumor and corresponding pair fed controls. In these studies, the livers were submitted to perfusion with cAMP (3  $\mu$ M) in the absence or presence of insulin (500  $\mu$ U/mL). The hepatic response to cAMP (3  $\mu$ M or 9  $\mu$ M) on glycogen catabolism, was evaluated in rats at 5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> days of tumor, at the corresponding pair fed controls and the controls. The hepatic response to cAMP and N<sup>6</sup>-MB-cAMP in glucose catabolism, was assessed at 5<sup>th</sup> and/or 12<sup>th</sup> days of tumor and controls. In these experiments livers of animals, with 24 hours of food deprivation, were submitted to perfusion with glucose (20 mM), in the absence or presence of cAMP (6  $\mu$ M) or N<sup>6</sup>-MB-cAMP (1  $\mu$ M). In all perfusion experiments samples of effluent perfusate of liver were collected to determine hepatic production of glucose, lactate and pyruvate and the rate of glycogenolysis or glycolysis. Results showed lower ( $p < 0.05$ ) peripheral insulin response in groups WK 5<sup>th</sup>, WK 8<sup>th</sup> and WK 12<sup>th</sup>, but not in the WK 2<sup>th</sup>, compared to controls, suggesting peripheral insulin resistance already in the 5<sup>th</sup> day of tumor. Concerning hepatic response to insulin in glycogen catabolism, insulin decreased ( $p < 0.05$ ) glucose production and glycogenolysis promoted by cAMP similarly in tumor-bearing animals (WK 2<sup>th</sup> and WK 5<sup>th</sup>) and pair fed controls, suggesting the absence of hepatic insulin resistance in these stages of tumor development. In relation the hepatic response to cAMP, on glycogen catabolism,

animal WK 5<sup>th</sup> and WK 8<sup>th</sup> had lower ( $p < 0.05$ ) response to cAMP (3  $\mu$ M and 9  $\mu$ M) in the stimulation of glucose production and glycogenolysis compared to pair fed control and controls. Animals bearing tumors also had lower ( $p < 0.05$ ) response to cAMP (6  $\mu$ M) (groups WK 5<sup>th</sup> and WK 12<sup>th</sup>) and N<sup>6</sup>-MB-cAMP (1  $\mu$ M) (group WK 5<sup>th</sup>) on inhibition of glucose catabolism (glycolysis) compared to controls. The decrease in cAMP response to glycogen catabolism was probably not due to lower hepatic glycogen content, whereas also had lower cAMP response to glucose catabolism when liver glycogen stores were depleted, nor the increased activity of phosphodiesterase 3B (PDE3B), whereas the N<sup>6</sup>-MB-CAMP, a cAMP analogue not degraded by PDE3B, had no effect on glucose catabolism (glycolysis). In summary, the results indicate that rats with Walker-256 tumor have reduced peripheral, but not hepatic, insulin response and decreased hepatic response to cAMP already on the 5<sup>th</sup> day of tumor development.

**Keywords:** Cancer. Cachexia. Walker-256. Insulin resistance. Hepatic glycogenolysis. Hepatic glycolysis. Cyclic adenosine monophosphate. (cAMP).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Massa tumoral e porcentagem de perda de massa corpórea de ratos portadores de tumor Walker-256 no 2° (WK 2°), 5° (WK 5°), 8° (WK 8°) e 12° (WK 12°) dia após inoculação das células tumorais.....	39
---	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Glicemia, constante de decaimento da glicose (KITT) e porcentagem de redução da glicemia após administração de insulina em ratos controles e no 2º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 2º), submetidos a 24 horas de privação alimentar .....42
- Figura 2** - Glicemia, constante de decaimento da glicose (KITT) e porcentagem de redução da glicemia após administração de insulina em ratos controles e no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º), submetidos a 24 horas de privação alimentar .....43
- Figura 3** - Glicemia, constante de decaimento da glicose (KITT) e porcentagem de redução da glicemia após administração de insulina em ratos controles e no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º), submetidos a 24 horas de privação alimentar .....44
- Figura 4** - Glicemia, constante de decaimento da glicose (KITT) e porcentagem de redução da glicemia após administração de insulina em ratos controles e no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 12º), submetidos a 24 horas de privação alimentar.....45
- Figura 5** - Glicemia de ratos controles e portadores de tumor Walker-256 no 2º, 5º, 8º e 12º dia de desenvolvimento tumoral, submetidos a 24 horas de privação alimentar.....46
- Figura 6** - Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) e *pair fed* correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....48
- Figura 7** - Efeito da insulina sobre a produção de L-lactato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) e *pair fed* correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....49
- Figura 8** - Efeito da insulina sobre a produção de piruvato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) e *pair fed* correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....50
- Figura 9** - Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) e *pair fed* correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs).....51

<b>Figura 10</b> - Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) e <i>pair fed</i> correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....	52
<b>Figura 11</b> - Efeito da insulina sobre a produção de L-lactato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) e <i>pair fed</i> correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....	53
<b>Figura 12</b> - Efeito da insulina sobre a produção de piruvato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) e <i>pair fed</i> correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) .....	54
<b>Figura 13</b> - Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) e <i>pair fed</i> correspondente, e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs).....	55
<b>Figura 14</b> - Efeito do AMPc 3 µM e 9 µM sobre a produção de glicose e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos controles, controles <i>pair fed</i> e no 5º (WK 5º) e 8º (WK 8º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.....	57
<b>Figura 15</b> - Efeito do AMPc 3 µM e 9 µM sobre a produção de L-lactato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos controles, controles <i>pair fed</i> e no 5º (WK 5º) e 8º (WK 8º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 .....	58
<b>Figura 16</b> - Efeito do AMPc 3 µM e 9 µM sobre a produção de piruvato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos controles, controles <i>pair fed</i> e no 5º (WK 5º) e 8º (WK 8º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.....	59
<b>Figura 17</b> - Efeito do AMPc 3 µM e 9 µM sobre a glicogenólise e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) em fígados de ratos controles, controles <i>pair fed</i> e no 5º (WK 5º) e 8º (WK 8º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.....	60
<b>Figura 18</b> - Efeito do AMPc sobre a produção de L-lactato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 .....	62
<b>Figura 19</b> - Efeito do AMPc sobre a produção de piruvato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 .....	63

<b>Figura 20</b> - Efeito do AMPc sobre a glicólise e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.....	64
<b>Figura 21</b> - Efeito do N <sup>6</sup> -MB-AMPc sobre a produção de L-lactato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 .....	66
<b>Figura 22</b> - Efeito do N <sup>6</sup> -MB-AMPc sobre a produção de piruvato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 .....	67
<b>Figura 23</b> - Efeito do N <sup>6</sup> -MB-AMPc sobre a glicólise e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos e de 40 a 60 minutos, em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.....	68
<b>Figura 24</b> - Vias de sinalização da insulina, LMF, glucagon e AMPc.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>4-AF</b>	4-aminofenazona
<b>nM</b>	10 <sup>-9</sup> molar
<b>μM</b>	10 <sup>-6</sup> molar
<b>nm</b>	10 <sup>-9</sup> metro
<b>μU</b>	10 <sup>-6</sup> unidade
<b>akt</b>	Proteína quinase B
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclica
<b>ANOVA</b>	Análise de variância unidimensional
<b>Anti-TNF-α</b>	Anticorpo anti-fator de necrose tumoral-α
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>dL</b>	10 <sup>-1</sup> litro
<b>g</b>	Gramma
<b>GLUT-1</b>	Transportador de glicose-1
<b>GLUT-3</b>	Transportador de glicose-3
<b>GLUT-4</b>	Transportador de glicose-4
<b>gmc</b>	Ganho de massa corpórea do grupo controle
<b>GOD</b>	Enzima glicose-oxidase
<b>H<sup>+</sup></b>	Íon hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HIF</b>	Fator induzido por hipóxia
<b>HSL</b>	Lipase hormônio-sensível
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>INF</b>	Interferon
<b>IFN-α</b>	Interferon-α
<b>IFN-γ</b>	Interferon-γ
<b>IR</b>	Receptor de insulina

<b>IRS</b>	Substrato do receptor de insulina
<b>IRS-1</b>	Substrato do receptor de insulina 1
<b>ITT</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>Kg</b>	10 <sup>3</sup> gramas
<b>KH</b>	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
<b>KITT</b>	Constante de decaimento da glicose no plasma
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LMF</b>	Fator mobilizador de lipídeos
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipase
<b>MAC26</b>	Adenocarcinoma de cólon-26
<b>MCA</b>	Methylcholanthrene-induced sarcoma
<b>mfe</b>	Massa corpórea final do animal com tumor
<b>mg</b>	10 <sup>-3</sup> gramas
<b>mie</b>	Massa corpórea inicial do animal com tumor
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	10 <sup>-3</sup> litros
<b>mM</b>	10 <sup>-3</sup> molar
<b>mt</b>	Massa do tumor
<b>n</b>	Número amostral
<b>N<sup>6</sup>-MB-AMPC</b>	N <sup>6</sup> -monobutiril-AMPC
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PDE3B</b>	Fosfodiesterase 3B
<b>PDK-1</b>	Proteína quinase dependente de fosfoinositídeo-1
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PIF</b>	Fator indutor de proteólise
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinase A dependente de AMPC
<b>POD</b>	Peroxidase

<b>PP1</b>	Proteína fosfatase 1
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SOCS-3</b>	Proteína supressora da sinalização de citocinas-3
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>U</b>	Unidade
<b>WK</b>	Walker-256

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	GERAL.....	30
2.2	ESPECÍFICOS .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	REAGENTES.....	31
3.2	ANIMAIS.....	31
3.3	IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256 .....	32
3.4	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA.....	32
3.5	PERFUSÃO DE FÍGADO IN SITU .....	33
3.5.1	Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática à Insulina no Catabolismo do Glicogênio Estimulado Pelo AMPc .....	35
3.5.2	Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao AMPc no Catabolismo do Glicogênio.....	35
3.5.3	Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao AMPc no Catabolismo da Glicose.....	35
3.5.4	Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao N6-MB-AMPc no Catabolismo da Glicose .....	35
3.6	CONFIRMAÇÃO DA PERDA DE MASSA CORPÓREA (CAQUEXIA) EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256.....	36
3.7	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	36
3.7.1	Determinação da Concentração de Glicose .....	36
3.7.2	Determinação da Concentração de Lactato.....	37
3.7.3	Determinação da Concentração de Piruvato .....	37
3.7.4	Determinação da Taxa de Glicogenólise .....	37
3.7.5	Determinação da Taxa de Glicólise .....	37
3.8	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
4.1	Confirmação da Caquexia em Ratos Portadores de Tumor Walker-256 .....	39

4.2	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA.....	39
4.3	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA À INSULINA NO CATABOLISMO DO GLICOGÊNIO ESTIMULADO PELO AMPc .....	46
4.4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO AMPc NO CATABOLISMO DO GLICOGÊNIO .....	56
4.5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO AMPc NO CATABOLISMO DA GLICOSE.....	61
4.6	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO N6-MB-AMPc NO CATABOLISMO DA GLICOSE.....	65
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado o maior problema de saúde pública em diversos países, sendo a segunda maior causa de morte na Europa, nos Estados Unidos (ARGILÉS, 2005a) e também no Brasil (INCA, 2009).

Em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o que representou 13% de todas as mortes. Estima-se que, em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2007).

Pacientes com câncer freqüentemente apresentam caquexia a qual é caracterizada pela diminuição involuntária do peso corpóreo decorrente da redução da ingestão de alimentos (anorexia) e principalmente da depleção do tecido adiposo e da massa muscular, conseqüente ao aumento do catabolismo (TISDALE, 1997a, 1999, 2000, 2002, 2004; INUI, 1999; VICENTINO *et al.*, 2002a). A perda maciça de massa muscular é responsável pela maior parte da perda de peso total e pode ocorrer independentemente da diminuição da ingestão alimentar ou da má absorção de nutrientes. Embora a caquexia sempre inclua um componente de redução na ingestão de alimentos, a anorexia é insuficiente para justificar a perda excessiva de massa corporal. Na caquexia há maciça depleção do músculo esquelético, ausente na anorexia. Além disso, a suplementação alimentar não é capaz de reverter o quadro caquético e a caquexia pode ocorrer na ausência de anorexia (TISDALE, 2001; LOBERG *et al.*, 2007).

O grau de desenvolvimento da caquexia está diretamente relacionado à redução da sobrevida (KAZANTZIS & SEELANDER, 2005; LELBACH *et al.*, 2007). Aproximadamente 30% das mortes por câncer são atribuídas à caquexia e as suas conseqüências (BARTON, 2001), com a morte ocorrendo tipicamente quando a perda de peso é de cerca de 30% (LOBERG *et al.*, 2007). É mais comum em crianças e idosos e se torna mais pronunciada com o evoluir da neoplasia. Em geral, pacientes com tumores sólidos apresentam maior freqüência de caquexia (BRUERA, 1997).

Sugere-se que fatores produzidos pelo tumor e pelo tecido do hospedeiro, na presença de certos tumores, desempenham papel importante na redução da massa tecidual e, por esta razão, são chamados de mediadores da

caquexia. Dentre os mediadores da caquexia encontram-se citocinas, fator mobilizador de lipídeos (LMF), fator indutor de proteólise (PIF), hormônios catabólicos, neuropeptídeos, neurotransmissores e toxormônios (TISDALE, 1999, 2003; RUBIN, 2003; LOBERG *et al.*, 2007). Estes mediadores atuam em múltiplos alvos como adipócitos, miócitos, hepatócitos, medula óssea, células endoteliais e neurônios (TISDALE, 1999, 2003; RUBIN, 2003; LOBERG *et al.*, 2007), induzindo uma complexa cascata de respostas biológicas que culminam em progressiva perda de peso, anorexia, anemia, astenia, depleção de estoque de lipídeos, severa perda protéica do músculo esquelético (LOBERG *et al.*, 2007) e várias outras alterações no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos.

O LMF produzido e liberado pelo tumor ou pelas metástases atua de maneira similar à dos hormônios lipolíticos (TISDALE, 2000), sendo um dos responsáveis pela perda de massa adiposa no processo de caquexia no câncer por manter a taxa de degradação de triacilgliceróis maior do que a de síntese (TISDALE, 2003, 2004) liberando ácidos graxos livres e glicerol na circulação (TISDALE, 1997a). Esta proteína interage com receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos promovendo aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), em resposta à ativação da adenilato ciclase, levando a ativação da lipase hormônio-sensível (HSL) (TISDALE & BECK, 1991), a qual estimula a hidrólise dos triacilgliceróis nos adipócitos (ARNER, 1995). Nos hepatócitos, o aumento de AMPc induzido pelo LMF estimula a glicogenólise (HIRAI *et al.*, 1997), aumentando a liberação hepática de glicose.

O PIF é uma glicoproteína produzida pelas células tumorais (TODOROV *et al.*, 1996, 1997) capaz de induzir a proteólise no músculo esquelético por ativar a via ubiquitina-proteassoma dependente de ATP e reduzir a síntese protéica muscular (TISDALE, 2000, 2001). O PIF foi encontrado na urina de pacientes portadores de caquexia induzida pelo câncer, porém, estava ausente em indivíduos com câncer não caquéticos (TODOROV *et al.*, 1996). A sua administração em camundongos não portadores de tumor produziu um estado de caquexia, com rápida perda de peso, devido à depleção seletiva de massa magra (TISDALE, 1999, 2000).

As citocinas são peptídeos produzidos principalmente por macrófagos e linfócitos, mas também por outros leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras. Funcionam principalmente como reguladores das reações

inflamatórias e imunes e não são produzidas constitucionalmente, mas são sintetizadas quando há ativação celular (RANG *et al.*, 2004). Dentre as citocinas envolvidas no desenvolvimento da caquexia estão o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e os interferons (INF).

Altas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 têm sido encontradas em alguns pacientes com câncer e os níveis circulantes destas citocinas parecem correlacionar com a progressão do tumor (FEARON *et al.*, 1991; MOLDAWER *et al.*, 1992; YANAGAWA *et al.*, 1995; NOGUCHI *et al.*, 1996; MATTHYS & BILLIAU, 1997; MANTOVANI *et al.*, 2000). Níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  foram encontrados em ratos portadores de tumores sólidos com 7 dias de desenvolvimento em relação aos animais saudáveis (WAKI *et al.*, 1999). Níveis séricos elevados de IL-6 também foram encontrados em animais portadores de tumor Walker-256 (SHAO *et al.*, 2006). A administração isolada ou combinada de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 é capaz de reduzir a entrada de alimento e aumentar a perda de peso corpóreo, reproduzindo a síndrome anorexia-caquexia observada no câncer (GELIN *et al.*, 1991; MOLDAWER *et al.*, 1992; NOGUCHI *et al.*, 1996; MATTHYS & BILLIAU, 1997; TISDALE, 1997a; INUI, 1999). É possível, no entanto, que as concentrações circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6 não precisem estar elevadas para o desenvolvimento da caquexia. Postula-se que o TNF- $\alpha$  e a IL-6 possam atuar como mediadores autócrino/parácrino ao invés de serem mensageiros circulantes na caquexia (TISDALE, 1997b).

O TNF- $\alpha$  tem sido a citocina mais estudada e pode ser considerado o mediador mais importante no estabelecimento da caquexia do câncer, embora sua atividade possa estar associada a outras citocinas tais como a IL-6 (VOORZANGER *et al.*, 1996; ALVAREZ *et al.*, 2002). Acredita-se que o TNF- $\alpha$  atue como um segundo estimulador das demais citocinas, como no caso da IL-1 que tem sua secreção induzida pelo TNF- $\alpha$ , e ambas estimulam outras citocinas como a IL-6 (TISDALE, 2001) e os interferons (RANG *et al.*, 2004). A IL-6, por sua vez, inibe a expressão do gene do TNF- $\alpha$  (LANGSTEIN & NORTON, 1991).

O TNF- $\alpha$  é responsável pela diminuição da massa adiposa provavelmente por inibir a lipogênese e adipogênese e por estimular a lipólise e a apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (WARNE, 2003). O TNF- $\alpha$  e também as citocinas IL-6, IL-1 $\alpha$  e INF- $\gamma$  são capazes de inibir a enzima lipoproteína lipase endotelial (LPL) (BERG *et al.*, 1994), reduzindo a captação de ácidos graxos do

plasma e a adipogênese pelos adipócitos, e de ativar a HSL, estimulando a lipólise nos adipócitos (ARNER, 1995), o que resulta no aumento da concentração de ácidos graxos e triacilgliceróis na circulação (TREDGET *et al.*, 1988; TISDALE, 1999).

Tem sido sugerido que as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 (KOTLER, 2000; TISDALE, 2003) e INF- $\gamma$  (TISDALE, 2003; ACHARYYA *et al.*, 2004) também podem estar associadas à proteólise e apoptose no músculo esquelético (ARGILÉS *et al.*, 2005b). A administração *in vivo* de TNF- $\alpha$  aumentou a expressão do gene (via fator de transcrição NF- $\kappa$ B) e a concentração de ubiquitina em músculo esquelético de ratos (ARGILÉS *et al.*, 2003; SAINI *et al.*, 2006). As proteínas marcadas com várias moléculas de ubiquitina são direcionadas para a degradação em um processo dependente de ATP (HASSELGREN *et al.*, 2002).

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$  podem estar envolvidas também com a anorexia relacionada ao câncer, pois, podem atravessar a barreira hemato-encefálica (INUI, 1999) atuando diretamente em neurônios envolvidos no controle da ingestão alimentar (PLATA-SALAMÁN, 2000).

As citocinas, de modo geral, estimulam os processos catabólicos e inibem os processos anabólicos, sendo em parte responsáveis pelas alterações metabólicas e caquexia presentes no câncer.

Além dos mediadores da caquexia descritos anteriormente, outros fatores também contribuem para as alterações metabólicas e desenvolvimento da caquexia como, por exemplo, a atividade metabólica do próprio tumor (TISDALE, 2001).

O crescimento de um tumor demanda nutrientes que são supridos através da corrente sanguínea do hospedeiro. As células tumorais podem utilizar qualquer substrato como glicose, lipídios ou aminoácidos para suprir suas necessidades energéticas, cuja importância relativa varia de acordo com o tipo e estágio de desenvolvimento do tumor (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988). Grandes tumores sólidos, como o Walker-256, um carcinossarcoma de crescimento rápido e de pouca vascularização, apresentam pobre suprimento sanguíneo. Consequentemente muitas regiões tumorais tornam-se hipóxicas e utilizam, preferencialmente, a via glicolítica anaeróbica para a produção de energia (VICENTINO *et al.*, 2002b). Uma vez que a glicólise anaeróbica é uma via menos eficiente de produção de energia quando comparada à oxidação completa da glicose (fosforilação oxidativa) grandes quantidades de glicose, cerca de quatro a cinco

vezes à das células normais (TIJERINA, 2004), são consumidas pelo tumor. A grande taxa de utilização de glicose pela via glicolítica anaeróbica resulta em aumento de produção e liberação de lactato pelas células tumorais e conseqüentemente em elevação da concentração de lactato sanguíneo, o qual é convertido novamente à glicose no fígado pela via da neoglicogênese, estabelecendo entre o tumor e o fígado um ciclo fútil, como o ciclo de Cori (PIFFAR *et al.*, 2003; BONGAERTS *et al.*, 2006). A reciclagem da glicose por este ciclo fútil aumenta de 20%, em indivíduos normais, para 50%, em indivíduos com caquexia neoplásica, sendo responsável pela eliminação de 60% do lactato produzido pelo tumor (TISDALE, 2000). A atividade aumentada deste ciclo contribui para o aumento do gasto energético na caquexia, visto que a neoglicogênese hepática a partir do lactato utiliza seis moléculas de ATP para cada conversão de lactato a glicose, e a oxidação anaeróbica de glicose pelas células tumorais produz dois ATPs, sendo então parte da energia dissipada em forma de calor (TISDALE, 2002; BONGAERTS *et al.*, 2006; MORLEY *et al.*, 2006).

Para suprir o requerimento de energia do tumor, ou seja, a alta demanda de glicose, e também do hospedeiro portador do tumor, é necessário o aumento da liberação hepática de glicose (HIRAI *et al.*, 1997), a qual está aumentada em até 40% em indivíduos com câncer (TAYEK, 1992), em decorrência da ativação da glicogenólise e da neoglicogênese.

Outro fator que pode também contribuir para o desenvolvimento da caquexia e das alterações metabólicas relacionadas ao câncer é a resistência insulínica.

Pacientes caquéticos portadores de câncer apresentam resistência à insulina e intolerância à glicose (LUNDHOLM *et al.*, 1978; COPELAND *et al.*, 1987; TAYEK, 1992; ROFE *et al.*, 1994). A intolerância à glicose está presente em aproximadamente 37% dos pacientes com câncer (GLICKSMAN & RAWSON, 1956).

Em face da resistência insulínica a glicose não utilizada pelas células do hospedeiro será redirecionada para servir de fonte de energia ao tumor (ROSSI-FANELLI *et al.*, 1991).

A insulina é o principal hormônio anabólico cuja função é regular o armazenamento de substratos energéticos como a glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Esse hormônio é sintetizado e liberado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e

aminoácidos após as refeições (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). A insulina regula a homeostase da glicose no sangue por estimular a sua captação periférica, por reduzir a sua liberação hepática, diminuindo a neoglicogênese e glicogenólise e por aumentar a sua captação e armazenamento na forma de glicogênio no fígado. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação de proteínas (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; BERNE *et al.*, 2004; WILCOX, 2005).

A insulina exerce estes efeitos anabólicos e anti-catabólicos através da ligação ao seu receptor. De forma similar a outros fatores de crescimento, a insulina utiliza a fosforilação e interações proteína-proteína como ferramentas essenciais para transmitir o sinal do receptor em direção ao efeito celular final (KHOLODENKO, 2006). O receptor de insulina (IR) pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina quinase intrínseca.

Após a ligação da insulina na subunidade  $\alpha$ , a subunidade  $\beta$  do receptor sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina, resultando na ativação da quinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS), entre eles o IRS-1 (PATTI & KAHN, 1998; WHITE, 1998; CARVALHEIRA *et al.*, 2002). A fosforilação em tirosina do IRS-1 possibilita a sua associação com a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) a qual é ativada e promove a conversão do fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) (LIETZKE *et al.*, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2002), o qual ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositideo-1 (PDK-1), que por sua vez promove a fosforilação e ativação da proteína quinase B (PKB ou AKT) (ALESSI *et al.*, 1997) (vide figura 24).

Nos tecidos adiposo e muscular a AKT estimula a translocação de transportadores de glicose GLUT-4 dos estoques intracelulares para a membrana plasmática, aumentando a captação periférica de glicose (SALTIEL & KHAN, 2001).

No fígado a AKT ativa a fosfodiesterase 3B (PDE3B), enzima responsável pela hidrólise e consequente inativação do AMPc intracelular (PILKIS & GRANNER, 1992). Assim, por meio desta cascata de reações enzimáticas a insulina diminui a concentração intracelular de AMPc nos hepatócitos (vide figura 24).

O AMPc, 2º mensageiro do glucagon e adrenalina (GOLDBERG *et al.*, 1969), ativa a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) (SUDILOVSKY,

1974; KEPPENS & WULF, 1975), a qual dispara uma cascata de eventos que culminam com a fosforilação e ativação da glicogênio fosforilase, enzima chave que estimula a glicogenólise (KREBS *et al.*, 1966; KEPPENS & WULF, 1975) (vide figura 24).

Portanto, a insulina promove inibição da glicogenólise, em parte, por reduzir o AMPc intracelular. A insulina também ativa a proteína fosfatase 1 (PP1), por um mecanismo dependente da PI3K, que desfosforila a glicogênio fosforilase (SALTIEL, 1996; BRADY *et al.*, 1997), inibindo-a, e desse modo contribuindo para o efeito inibitório da insulina sobre a glicogenólise (PILKIS & GRANNER, 1992).

Por meio destes mecanismos, diminuindo o AMPc e ativando a PP1, a insulina também induz a defosforilação e consequente ativação da glicogênio sintase, enzima chave que estimula a síntese de glicogênio (PILKIS & GRANNER, 1992; CROSS *et al.*, 1995; SALTIEL, 1996; BRADY *et al.*, 1997)

Inicialmente foi considerado que a resistência à insulina era resultado de má nutrição, entretanto, foi encontrada significativa diminuição da captação e metabolização de glicose tanto em pacientes com sarcoma precoce (BURT *et al.*, 1983) como em pacientes portadores de câncer, com ou sem perda de peso corpóreo. Esta diminuição foi revertida após completa remoção das células tumorais, sugerindo que a resistência à insulina é uma alteração metabólica induzida pela presença do tumor (YOSHIKAWA *et al.*, 1994).

Os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de resistência à insulina na caquexia associada ao câncer ainda não estão bem esclarecidos. Uma possibilidade é a diminuição do RNAm e síntese de IR ou diminuição da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática como sugerido para pacientes diabéticos (OJAMAA *et al.*, 1988). Outra possibilidade é a diminuição da afinidade do IR e diminuição da autofosforilação da subunidade  $\beta$  tirosina quinase, as quais foram observadas em linhagem de melanoma (HARING *et al.*, 1984).

Estudos com ratos portadores de tumor hepático indicaram que eventos pós-receptor são mais importantes no desencadeamento da resistência à insulina, devido ao número de IR necessário para sua sinalização ser menor que 5% do total de receptores (KRETT *et al.*, 1983).

Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias têm sido propostas como mediadores de resistência à insulina. Estudos têm reportado que o TNF- $\alpha$  possui função chave no desenvolvimento de resistência à insulina nos portadores de

diabetes mellitus tipo 2, tanto em hepatócitos (HOTAMISLIGIL, 1999; TORISU *et al.*, 2007), células adiposas (HOTAMISLIGIL, 1999; YOSHIKAWA *et al.*, 1999; PATIAG *et al.*, 2000; WARNE, 2003; MLINAR *et al.*, 2007) como no músculo esquelético (PLOMGAARD *et al.*, 2005). A administração desta citocina causou resistência à insulina em pacientes, a qual foi correlacionada com a concentração de TNF- $\alpha$  no soro de pacientes com câncer gastrointestinal (MCCALL *et al.*, 1992).

Entretanto, a função do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento de resistência à insulina tem sido controversa. Enquanto alguns estudos mostraram que a infusão de TNF- $\alpha$  prejudicou a captação de glicose no músculo esquelético humano através de alteração na transdução de sinal da insulina (RASK-MADSEN *et al.*, 2003; PLOMGAARD *et al.*, 2005), outros estudos mostraram falha na melhora da sensibilidade à insulina após administração de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  em pacientes portadores de diabetes tipo 2 (OFEI *et al.*, 1996; PAQUOT *et al.*, 2000). Contudo, foi observado que a neutralização do TNF- $\alpha$  aumentou em 42% e 28%, respectivamente, a autofosforilação do IR e a fosforilação do IRS-1 no tecido adiposo. No tecido muscular esse aumento foi de 55% e 49%, respectivamente, embora nenhuma alteração tenha sido encontrada na sinalização de insulina no fígado com a neutralização do TNF- $\alpha$  (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994).

Além do TNF- $\alpha$ , a IL-6 também parece ter relação com a resistência à insulina. Em estudos *in vivo* a infusão de IL-6 em ratos promoveu indução de resistência à insulina hepática e muscular esquelética (KIM *et al.*, 2004) e em estudos *in vitro* a IL-6 diminuiu a sinalização da insulina em hepatócitos (SENN *et al.*, 2002). Assim como a IL-6, o TNF- $\alpha$  promove resistência à insulina por interferir negativamente na cascata de sinalização da insulina (MOLLER, 2000; SENN *et al.*, 2002; WARNE, 2003; KIM *et al.*, 2004).

Outro fator que interfere negativamente na sinalização da insulina, promovendo resistência insulínica hepática e periférica, é o elevado nível de ácidos graxos circulantes como resultado do intenso processo de lipólise na caquexia (BODEN *et al.*, 2005; MLINAR *et al.*, 2007).

O aumento na disponibilidade e oxidação dos ácidos graxos pode iniciar uma cascata de reações que vão resultar em inibição da piruvato desidrogenase (via aumento de acetil-coA), da fosfofrutoquinase (via aumento de citrato) e da hexoquinase (via aumento de glicose-6-fosfato) levando ao aumento

intracelular de glicose, diminuindo a sua captação e oxidação pelas células musculares (RANDLE *et al.*, 1963; RANDLE, 1998; DELARUE & MAGNAN, 2007).

Porém, alguns estudos demonstram que a diminuição na captação de glicose observada durante o aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres não foi devida ao aumento da oxidação dos ácidos graxos, mas sim de um defeito primário na captação de glicose, que resulta em um defeito secundário na oxidação desta (WOLFE, 1998; SHULMAN, 2000; RODEN, 2004).

Foi sugerido que o aumento intracelular de metabólitos dos ácidos graxos como o acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas são responsáveis por ativar várias enzimas com atividade serina/treonina quinase, capazes de fosforilar o IR e o IRS-1 em resíduos de serina e treonina, o que diminui a fosforilação em tirosina, interferindo assim na cascata de sinalização da insulina (SHULMAN, 2000; SCHINNER *et al.*, 2005; PETERSEN & SHULMAN, 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido ao acúmulo intramiocelular de metabólitos dos ácidos graxos, também pode interferir na cascata de sinalização da insulina via ativação de serina/treonina quinases (BODEN, 2002; DELARUE & MAGNAN, 2007) contribuindo para a redução na captação e oxidação da glicose estimulada pela insulina.

Em conjunto, os efeitos da resistência insulínica e dos mediadores da caquexia no câncer podem promover aumento acentuado do catabolismo em vários tecidos. No fígado, há aumento da neoglicogênese e da taxa de glicogenólise, depletando os estoques de glicogênio, e diminuição da glicólise e lipogênese hepática (GLICKSMAN & RAWSON, 1956). Nos tecidos periféricos, adipócitos e músculos, há respectivamente aumento da lipólise e proteólise, degradando as reservas energéticas e aumentando a oxidação de ácidos graxos livres para a produção de energia.

Apesar dos vários estudos relacionando a resistência insulínica aos portadores de câncer, muitas informações não são disponíveis ou não são claras. Deste modo, são necessários maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos nas alterações metabólicas associadas à síndrome caquética induzida pelo tumor. Particularmente elucidações sobre os efeitos da insulina são extremamente importantes por se tratar de um hormônio anabólico e anti-catabólico e a síndrome caquexia-anorexia apresentar predomínio do catabolismo.

Considerando que a resistência insulínica tem sido observada em alguns modelos animais experimentais de câncer, mas que não há informações disponíveis sobre a resposta periférica e hepática a insulina e também sobre a resposta hepática ao AMPc no modelo animal de caquexia induzida por tumor Walker-256, particularmente ao longo do desenvolvimento tumoral, seguem-se os objetivos do presente trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Investigar em ratos portadores de tumor Walker-256, ao longo do desenvolvimento tumoral, a resposta periférica e hepática à insulina e a resposta hepática ao AMPc.

### 2.2 ESPECÍFICO

Avaliar em ratos com tumor Walker-256, em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral:

- ✓ A resposta periférica à insulina, por intermédio do teste de tolerância a insulina (ITT).
- ✓ A resposta hepática à insulina no catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc, em perfusão de fígado *in situ*.
- ✓ A resposta hepática ao AMPc no catabolismo do glicogênio, em perfusão de fígado *in situ*.
- ✓ A resposta hepática ao AMPc e ao N<sup>6</sup>-monobutiril-AMPc (N<sup>6</sup>-MB-AMPc) no catabolismo da glicose, em perfusão de fígado *in situ*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Os sais do líquido de perfusão e os demais reagentes foram adquiridos da Merck, Reagen, J.T. Backer ou CAQ – Casa Química. A insulina regular foi obtida da Eli Lilly do Brasil, o AMPc da Sigma e o N<sup>6</sup>-MB-AMPc da Biolog.

#### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 220 e 230 g, alimentados à vontade com ração Nuvilab® para roedores, com livre acesso à água. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola), a uma temperatura de 23±2°C e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram sempre iniciados no mesmo horário para minimizar variações circadianas. Os protocolos dos experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (cadastro nº 05919). Nos experimentos foram utilizados de 3 a 20 animais por grupo nos seguintes grupos:

- *Grupos Walker-256*: ratos portadores de tumor Walker-256 no 2º (WK 2º), 5º (WK 5º), 8º (WK 8º) e 12º (WK 12º) dia após a inoculação das células tumorais, alimentados à vontade ou submetidos a 24 horas de privação alimentar;
- *Grupos controles pair fed*: ratos sem tumor no 2º, 5º e 8º dia após a inoculação de PBS (salina tamponada com fosfato), que receberam diariamente a mesma quantidade de ração (alimentação reduzida) que ingerem os animais do grupo tumor, ou seja, respectivamente 22 g/dia, 19 g/dia e 13 g/dia;
- *Grupos controles*: ratos sem tumor (inoculação de PBS), alimentados à vontade ou submetidos a 24 horas de privação alimentar.

### 3.3 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR WALKER-256

O tumor Walker-256, identificado pela primeira vez em 1928 por George Walker, como sendo um carcinossarcoma de origem espontâneo de glândula mamária de rata preña (EARLE, 1935), apresenta crescimento rápido e é capaz de se desenvolver tanto na forma sólida como na forma ascítica (AGOSTINO & CLIFFTON, 1967; CALDAROLA *et al.*, 1968). Sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia, pois é uma neoplasia bem caracterizada, facilmente mantida em laboratório, que raramente apresenta regressões e com eficiência comprovada em testes terapêuticos (MORAES *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Células tumorais Walker-256 foram mantidas no Laboratório de Fisiologia Metabólica da Universidade Estadual de Londrina através de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de  $1,0 \times 10^6$  células/animal. Após 7 dias de crescimento ascítico, os animais foram anestesiados com éter etílico, eutanasiados por deslocamento cervical e o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial, por 13 minutos, a 2500 rpm e 4°C para a obtenção das células tumorais. As células tumorais foram ressuspensas em PBS (tampão fosfato 16,5 mM, contendo NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4) e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan em câmara de Neubauer.

Para a implantação do tumor, os ratos foram anestesiados com éter etílico e inoculados com  $8,0 \times 10^7$  células tumorais viáveis/animal, subcutaneamente, no flanco direito traseiro. Os ratos dos grupos controle e controle *pair fed* foram inoculados com PBS no mesmo local.

### 3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA

Nestes experimentos a resposta glicêmica para insulina foi avaliada em ratos controles e portadores do tumor Walker-256 no 2º, 5º, 8º e 12º dia de desenvolvimento tumoral, submetidos a 24 horas de privação alimentar. A insulina (0,25 U/kg) foi administrada endovenosamente (veia cava inferior) nos ratos previamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg). Amostras de

sangue foram coletadas da veia cava inferior no tempo 0 (basal - antes da injeção de insulina) e nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 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, durante o tempo 5 até 15 minutos após a administração de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA, 1989; SERAPHIM *et al*, 2001). A interpretação do KITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicemia (maior KITT), maior é a sensibilidade à insulina.

### 3.5 PERFUSÃO DE FÍGADO *IN SITU*

A técnica de perfusão de fígado *in situ*, introduzida no Brasil por Kerlmer-Bracht e colaboradores (1984), foi utilizada para avaliar a resposta hepática à insulina, ao AMPc e N<sup>o</sup>-MB-AMPc.

O sistema para a perfusão de fígado é basicamente composto por reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica e um oxigenador de membrana, acoplados a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>=95/5%). O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha silicone de parede fina (0,25 mm), com diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostaticada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

No sistema de perfusão o líquido de perfusão, tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) (KREBS & HENSELEIT, 1932 *apud* KELMER-BRACHT, 1993), é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana. Neste local se processam as trocas gasosas. O O<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub> contidos na atmosfera carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), por troca passiva, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de borracha silicone. A fina

espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversa) favorecem as trocas. Com os fluxos normalmente utilizados (nunca acima de 45 mL/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 inserida na veia porta.

Para a perfusão do fígado os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, para exposição do fígado. 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 completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo da pressão, o que causaria inchamento do 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 inferior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido para a veia cava inferior infra-hepática, a qual 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 estabilização do consumo de oxigênio, o líquido efluente do fígado foi coletado em intervalos de 2 minutos para determinação da concentração de glicose, lactato e piruvato. Ao final do experimento o fígado foi retirado e pesado para que as produções de glicose,

lactato e piruvato por grama de fígado ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fossem quantificadas e utilizadas para calcular as taxas de glicogenólise e glicólise.

### 3.5.1 Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática à Insulina no Catabolismo do Glicogênio Estimulado pelo AMPc

Nestes experimentos fígados de animais dos grupos Walker-256 (WK 2º e WK 5º) e controles *pair fed* correspondentes, alimentados, foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão: 10 minutos iniciais com KH, dos 10 aos 24 minutos com KH contendo AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) e dos 26 aos 50 minutos com KH contendo AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) na ausência ou presença de insulina (500  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ).

### 3.5.2 Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao AMPc no Catabolismo do Glicogênio

Nestes experimentos fígados de animais dos grupos Walker-256 (WK 5º e WK 8º), controles *pair fed* correspondentes e controles, alimentados, foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão: 10 minutos iniciais com KH, dos 10 aos 24 minutos com KH contendo AMPc (3 Mm ou 9 Mm).

### 3.5.3 Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao AMPc no Catabolismo da Glicose

Nestes experimentos fígados de animais dos grupos Walker-256 (WK 5º e WK 12º) e controles, com 24 horas de privação alimentar, foram submetidos ao seguinte protocolo de perfusão: 10 minutos iniciais com KH, dos 10 aos 40 minutos com KH contendo glicose (20 mM) e dos 40 aos 60 minutos com KH contendo glicose (20 mM) e AMPc (6  $\mu\text{M}$ ).

### 3.5.4 Perfusão de Fígado In Situ Para Avaliação da Resposta Hepática ao N<sup>6</sup>-MB-AMPc no Catabolismo da Glicose

Nestes experimentos fígados de animais dos grupos Walker-256 (WK 5º) e controle, após 24 horas de privação alimentar, foram submetidos ao

seguinte protocolo de perfusão: 10 minutos iniciais com KH, dos 10 aos 40 minutos com KH contendo glicose (20 mM) e dos 40 aos 60 minutos com KH contendo glicose (20 mM) e N<sup>6</sup>-MB-AMPC (1 µM).

### 3.6 CONFIRMAÇÃO DA PERDA DE MASSA CORPÓREA (CAQUEXIA) EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256

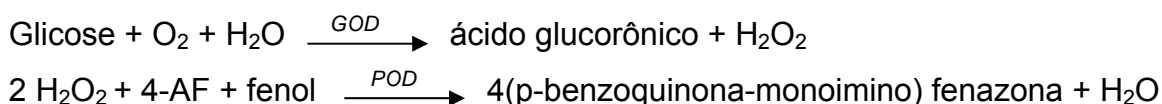
Após todos os experimentos, os animais passaram pelo procedimento de retirada da massa tumoral, a qual foi pesada para o cálculo da % de perda de massa corpórea, de acordo com a equação adiante, onde: **mie**= massa corpórea inicial do animal com tumor; **mfe**= massa corpórea final do animal com tumor; **mt**= massa do tumor; **gmc**= ganho de massa do grupo controle.

$$\% \text{ Perda de massa corpórea} = \frac{[mie - mfe + (mt) + gmc]}{(mie + gmc)} \times 100$$

### 3.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

#### 3.7.1 Determinação da Concentração de Glicose

As concentrações de glicose no plasma e perfusado foram quantificadas pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER & BERNET, 1974). Nesse método, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucorônico e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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:



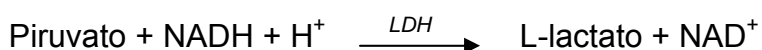
### 3.7.2 Determinação da Concentração de Lactato

As concentrações de L-lactato no perfusado foram quantificadas por método enzimático, segundo a técnica de Gutmann & Wahlefeld (1974). Nesse método, o L-lactato é oxidado a piruvato pelo  $\text{NAD}^+$  em uma reação catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH) (reação adiante). A formação de NADH é proporcional à concentração de L-lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



### 3.7.3 Determinação da Concentração de Piruvato

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



### 3.7.4 Determinação da Taxa de Glicogenólise

A taxa de glicogenólise hepática foi calculada a partir da soma da produção hepática de glicose +  $\frac{1}{2}$  da soma da produção hepática de piruvato + L-lactato liberados no perfusado.

### 3.7.5 Determinação da Taxa de Glicólise

A taxa de glicólise hepática foi calculada a partir da soma da produção hepática de piruvato + L-lactato liberados no perfusado.

### 3.8 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados foram testados quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe) e à distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors), utilizando-se o programa STATISTICA 6.0.

Nos conjuntos de dados em que foram observadas homogeneidade das variâncias e distribuição normal, a comparação das médias foi realizada através de testes estatísticos paramétricos (t de Student para comparação de 2 amostras dependentes ou independentes e ANOVA One Way seguido por teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações entre amostras independentes). Nos conjuntos de dados onde não foram satisfeitas as condições de homogeneidade das variâncias e distribuição normal, testes não paramétricos foram utilizados (teste de Wilcoxon para amostras dependentes, teste de Mann-Whitey para amostras independentes e teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn para múltiplas comparações entre as amostras independentes).

As áreas sob as curvas (AUCs) foram calculadas nos intervalos de tempo indicados nas figuras. Os cálculos das AUCs e os testes paramétricos e não paramétricos foram realizados no programa GRAPHPAD PRISM 5.0. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), adotando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONFIRMAÇÃO DA CAQUEXIA EM RATOS PORTADORES DE TUMOR WALKER-256

A tabela 1 ilustra os valores das massas tumorais no 2º, 5º, 8º e 12º dia após a inoculação das células Walker-256. Como pode ser observado, houve aumento progressivo da massa tumoral que alcançou valor próximo a 39 g no 12º dia.

Os animais portadores de tumor apresentaram perda progressiva de massa corpórea ao longo do desenvolvimento tumoral, que pode ser correlacionada com o crescimento da massa tumoral (tabela 1). Nos animais no 2º dia de tumor a perda de massa corpórea foi de aproximadamente 6 %, demonstrando que a redução de massa corpórea ocorre logo nos primeiros dias após a inoculação das células tumorais. No 12º dia, a perda de massa corpórea foi cerca de 33 %, um valor que caracteriza a presença de caquexia acentuada e demonstra o alto grau de malignidade do tumor Walker-256.

**Tabela 1 –** Massa tumoral e porcentagem de perda de massa corpórea de ratos portadores de tumor Walker-256 no 2º (WK 2º), 5º (WK 5º), 8º (WK 8º) e 12º (WK 12º) dia após inoculação das células tumorais

	WK 2º	WK 5º	WK 8º	WK 12º
<b>Massa tumoral (g)</b>	0,90 ± 0,10 (n= 8)	6,19 ± 0,58 (n= 12)	16,57 ± 1,62 (n= 8)	39,49 ± 4,77 (n= 8)
<b>Perda de massa corpórea (%)</b>	5,87 ± 1,92 (n= 8)	13,76 ± 1,27 (n= 12)	20,56 ± 2,44 (n= 8)	32,75 ± 2,10 (n= 8)

Valores representam a média ± EPM.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PERIFÉRICA À INSULINA

A resposta glicêmica à insulina, avaliada por intermédio do ITT, em ratos controles e com tumor Walker-256 no 2º (WK 2º), 5º (WK 5º), 8º (WK 8º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento tumoral encontra-se ilustrada nas figuras 1 a 4.

A administração de insulina promoveu diminuição gradativa da glicemia nos animais controle e WK 2º, sendo mais acentuada aos 30 minutos e

tendendo ao retorno dos valores basais nos tempos subsequentes (figura 1A). A redução da glicemia promovida pela insulina no grupo WK 2º foi similar a do grupo controle, como demonstrado pela constante de decaimento da glicose (KITT) (figura 1B), a qual representa o desaparecimento da glicose no sangue entre os tempos 5 e 15 minutos após a administração de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia. A figura 1C ilustra os resultados como porcentagem de redução da glicemia em relação ao valor basal (tempo 0 minuto - antes da administração de insulina) e mostra que a resposta glicêmica à insulina dos animais WK 2º não foi diferente da observada nos animais controles para todos os tempos analisados.

A administração de insulina também reduziu a glicemia no grupo WK 5º (figura 2A), porém, esta redução foi menor que a dos animais controles como demonstrado pelos dados do KITT (figura 2B) e de porcentagem de redução da glicemia onde os valores aos 10, 15 e 30 minutos após a administração de insulina, foram menores no grupo WK 5º em relação ao controle (figura 2C). Após os 30 minutos, a glicemia foi recuperada gradativamente, tendendo ao retorno dos valores basais em ambos os grupos (figura 2A).

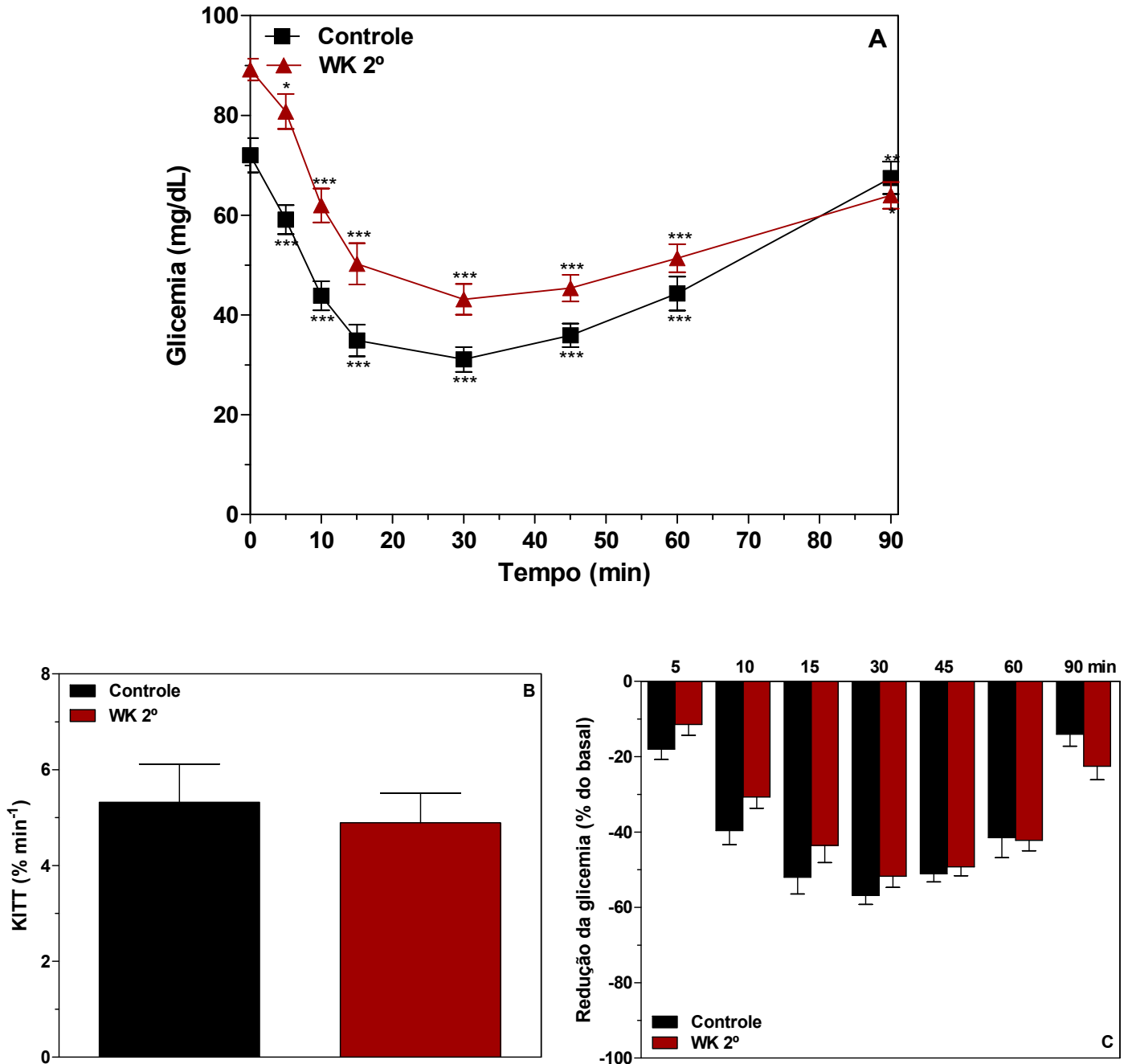
Assim como no 5º dia de tumor, a insulina também diminuiu a glicemia no 8º dia de desenvolvimento tumoral (figura 3A), sendo esta redução menor que a do controle, como evidenciado pelo KITT (figura 3B). A porcentagem de redução da glicemia nos tempos 15 e 30 minutos após a injeção de insulina foi menor no grupo WK 8º em comparação ao controle (figura 3C). Em ambos os grupos, após os 30 minutos a glicemia apresentou aumento gradual, tendendo ao retorno dos valores basais (figura 3A).

Em concordância com o 5º e 8º dia de tumor, porém de forma mais acentuada, os animais no 12º dia de desenvolvimento tumoral apresentaram menor resposta à insulina (figura 4A) em relação ao controle, como evidenciado pelo KITT (figura 4B). A porcentagem de redução da glicemia nos tempos 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção de insulina foi menor no grupo WK 12º em comparação ao controle (figura 4C). Após os 30 minutos a glicemia apresentou aumento gradual, tendendo ao retorno dos valores basais (figura 4A).

Na figura 5 estão representados os valores de glicemia correspondentes ao tempo 0 minuto (basal), ou seja, antes da administração de insulina. Os animais no 2º dia de tumor apresentaram glicemia aumentada em relação ao grupo controle, enquanto que no 5º e 8º dia de tumor a glicemia foi similar

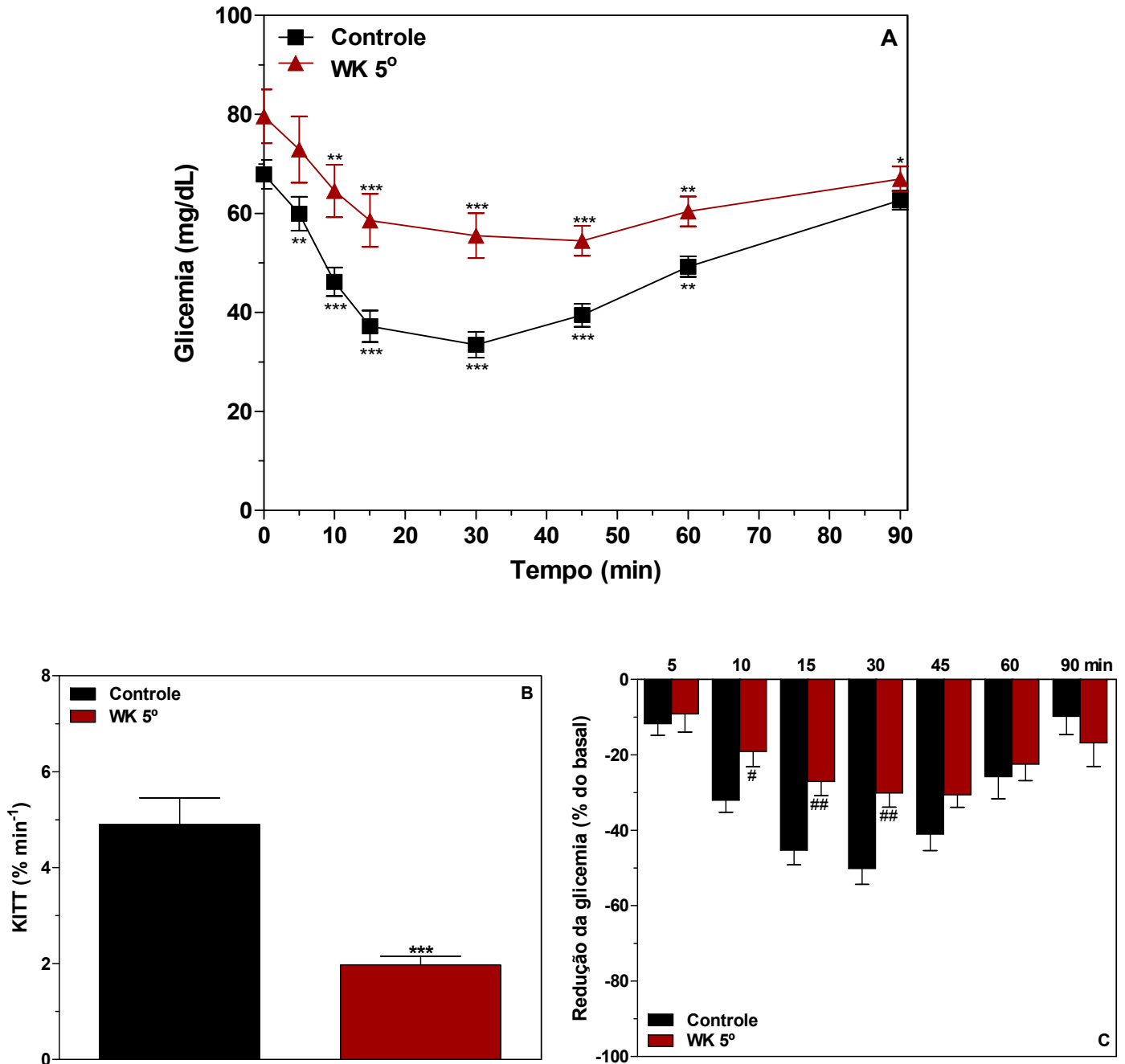
à encontrada nos controles correspondentes. Entretanto, no 12º dia de tumor a glicemia foi menor quando comparada ao controle e também aos grupos Walker-256 no 2º, 5º e 8º dia de tumor.

**Figura 1 –** Glicemia (A), constante de decaimento da glicose (KITT) (B) e porcentagem de redução da glicemia (C) após administração de insulina em ratos controles e no 2º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 2º), submetidos a 24 horas de privação alimentar



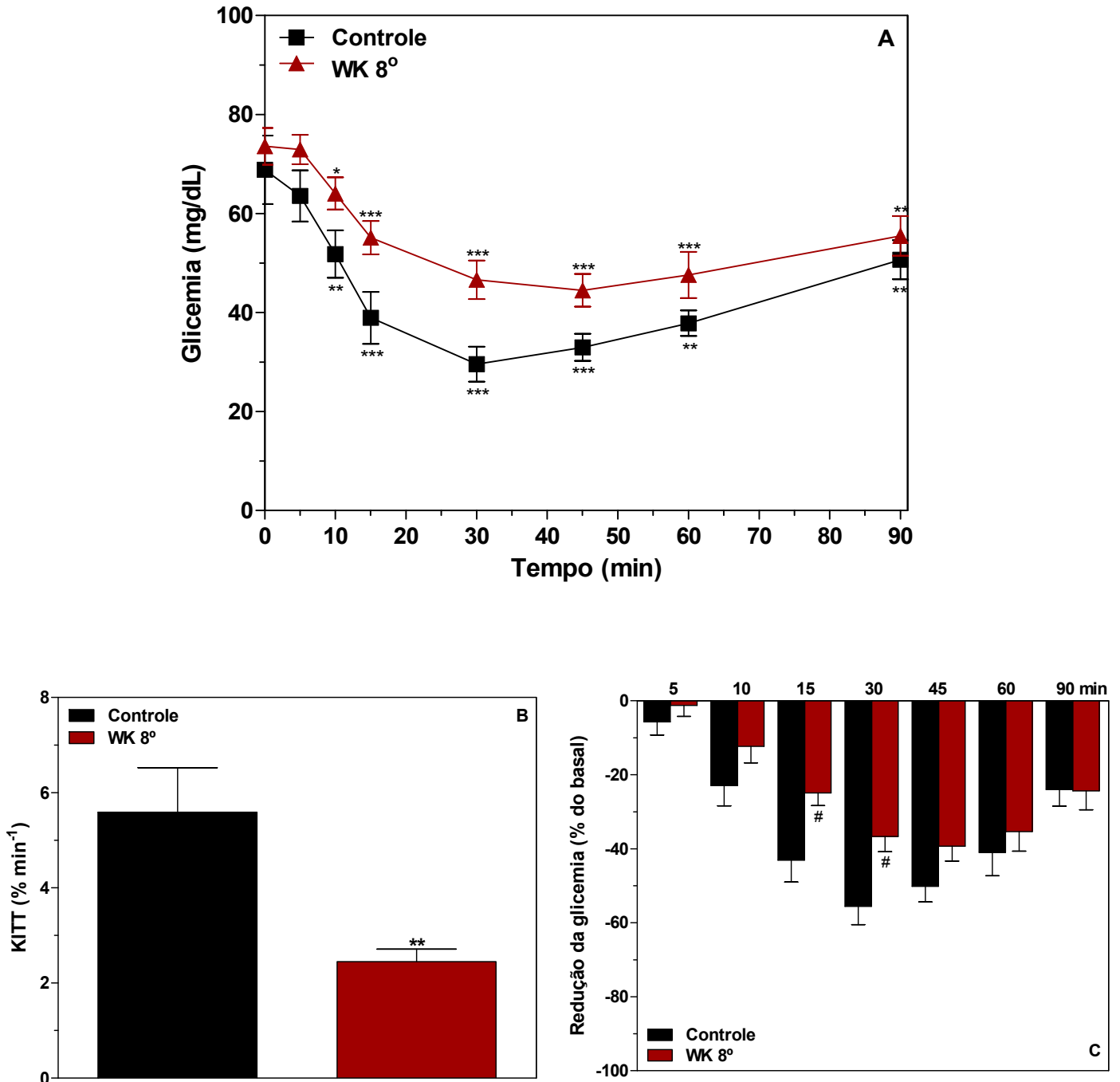
A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 10 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A), em relação ao tempo 0 minuto, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras dependentes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (B) foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes. Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (C), dentro do tempo fixado, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

**Figura 2 –** Glicemia (A), constante de decaimento da glicose (KITT) (B) e porcentagem de redução da glicemia (C) após administração de insulina em ratos controles e no 5º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 5º), submetidos a 24 horas de privação alimentar



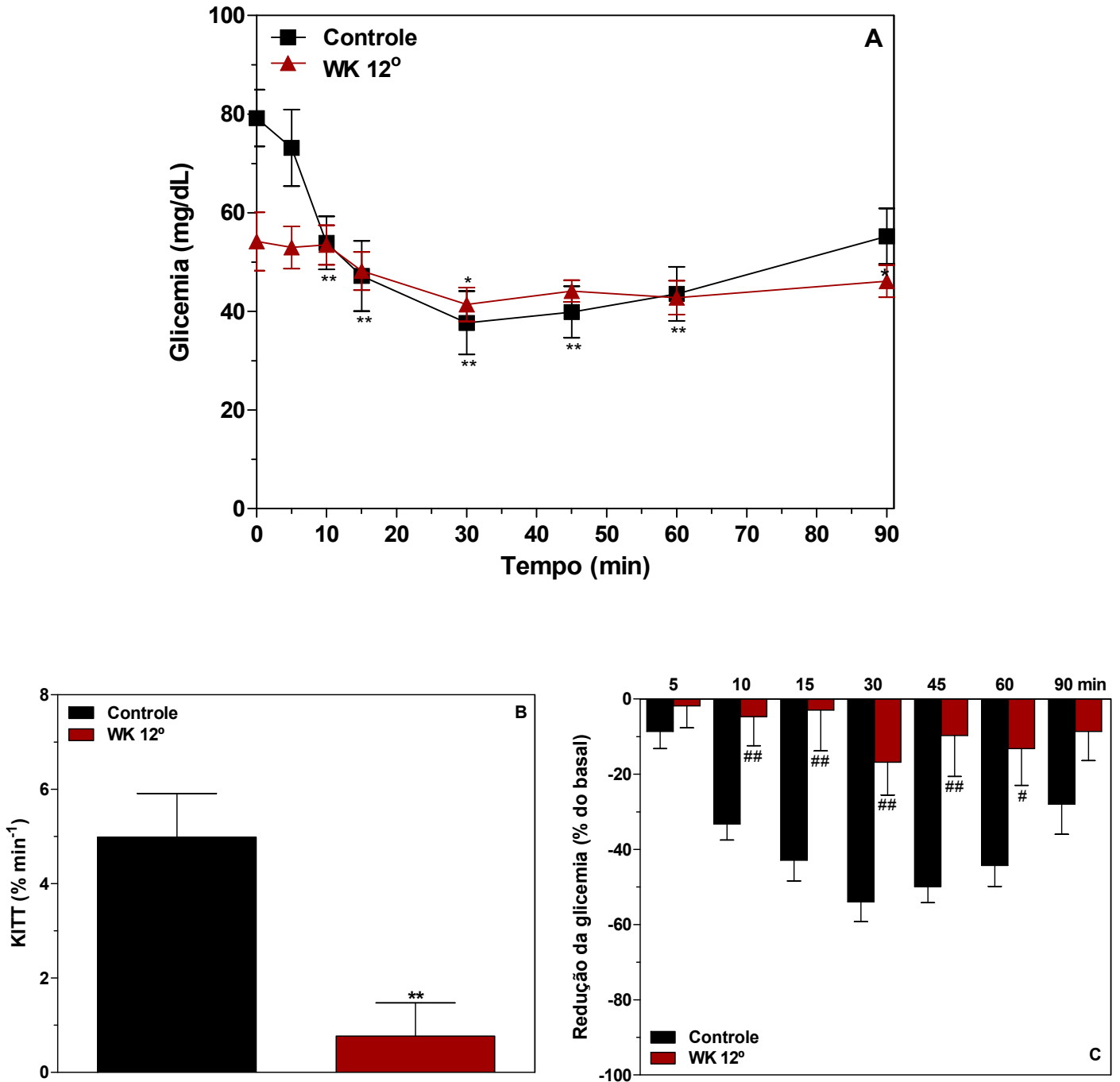
A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A), em relação ao tempo 0 minuto, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras dependentes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (B) foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (C), dentro do tempo fixado, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$ .

**Figura 3 –** Glicemia (A), constante de decaimento da glicose (KITT) (B) e porcentagem de redução da glicemia (C) após administração de insulina em ratos controles e no 8º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 8º), submetidos a 24 horas de privação alimentar



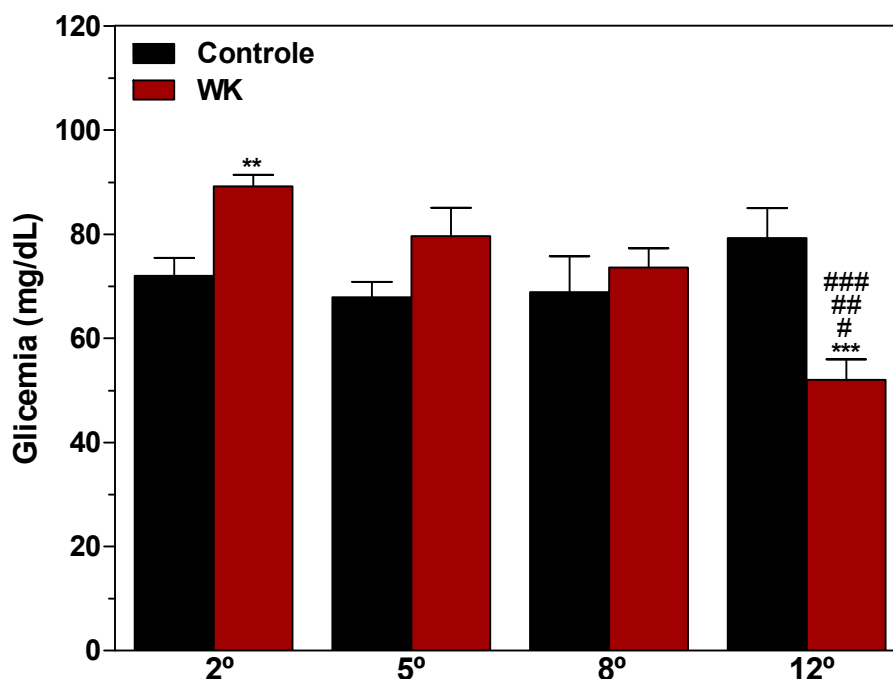
A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 8 a 9 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A), em relação ao tempo 0 minuto, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras dependentes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (B) foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\* $p < 0,01$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (C), dentro do tempo fixado, foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, # $p < 0,05$ .

**Figura 4 –** Glicemia (A), constante de decaimento da glicose (KITT) (B) e porcentagem de redução da glicemia (C) após administração de insulina em ratos controles e no 12º dia de desenvolvimento do tumor Walker-256 (WK 12º), submetidos a 24 horas de privação alimentar.



A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/Kg). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 9 a 10 experimentos. Diferenças dentro do mesmo grupo (A), em relação ao tempo 0 minuto, foram analisadas pelo teste Wilcoxon para amostras dependentes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (B) foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\* $p < 0,01$ . Diferenças entre os grupos controle e tumor Walker-256 (C), dentro do tempo fixado, foram analisadas pelo teste Mann-Whitney para amostras independentes, # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$ .

**Figura 5** – Glicemia de ratos controles e portadores de tumor Walker-256 no 2º, 5º, 8º e 12º dia de desenvolvimento tumoral, submetidos a 24 horas de privação alimentar.



Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 9 a 10 experimentos. Diferenças entre os grupos Walker-256 e respectivos controles foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças entre os grupos Walker-256 foram analisadas pelo teste ANOVA One Way para amostras independentes seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, # $p < 0,05$  versus WK 8º, ## $p < 0,01$  versus WK 5º e ### $p < 0,001$  versus WK 2º.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA À INSULINA NO CATABOLISMO DO GLICOGÊNIO ESTIMULADO PELO AMPc

A resposta hepática à insulina na produção de glicose, lactato e piruvato e na glicogenólise estimuladas por AMPc (3  $\mu$ M), avaliadas em perfusão de fígado de ratos no 2º (WK 2º) e 5º (WK 5º) dia de desenvolvimento tumoral e nos controles *pair fed* estão representadas nas figuras 6 a 13.

No grupo controle *pair fed*, referente ao 2º dia de tumor, a produção de glicose, proveniente da glicogenólise hepática, foi estimulada após a infusão de AMPc, no tempo 10 minutos, e se manteve com uma leve redução até o término do experimento (figura 6A). A infusão de insulina, no tempo 24 minutos, junto com o AMPc, promoveu redução acentuada na produção de glicose, a qual retornou aos valores próximos aos basais, ou seja, antes da infusão do AMPc, aos 50 minutos de perfusão (figura 6A). Este efeito inibitório da insulina sobre a produção de glicose

estimulada pelo AMPc pode ser observado pela análise das áreas sob as curvas (AUCs) (figura 6B). Resultados semelhantes foram encontrados no 2º dia de desenvolvimento tumoral, onde a infusão de AMPc estimulou a produção hepática de glicose (figura 6C) e a infusão de insulina, junto com AMPc, reduziu este efeito estimulatório do AMPc, como ilustrado pelas AUCs (figura 6D).

A infusão de AMPc também aumentou a produção hepática de lactato e piruvato nos grupos controles *pair fed* (figuras 7A e 8A) e WK 2º (figuras 7C e 8C). Porém, a infusão hepática de insulina não promoveu alteração significativa sobre estes efeitos do AMPc em ambos os grupos, como pode ser observado pelas AUCs (figuras 7B, 7D, 8B e 8D).

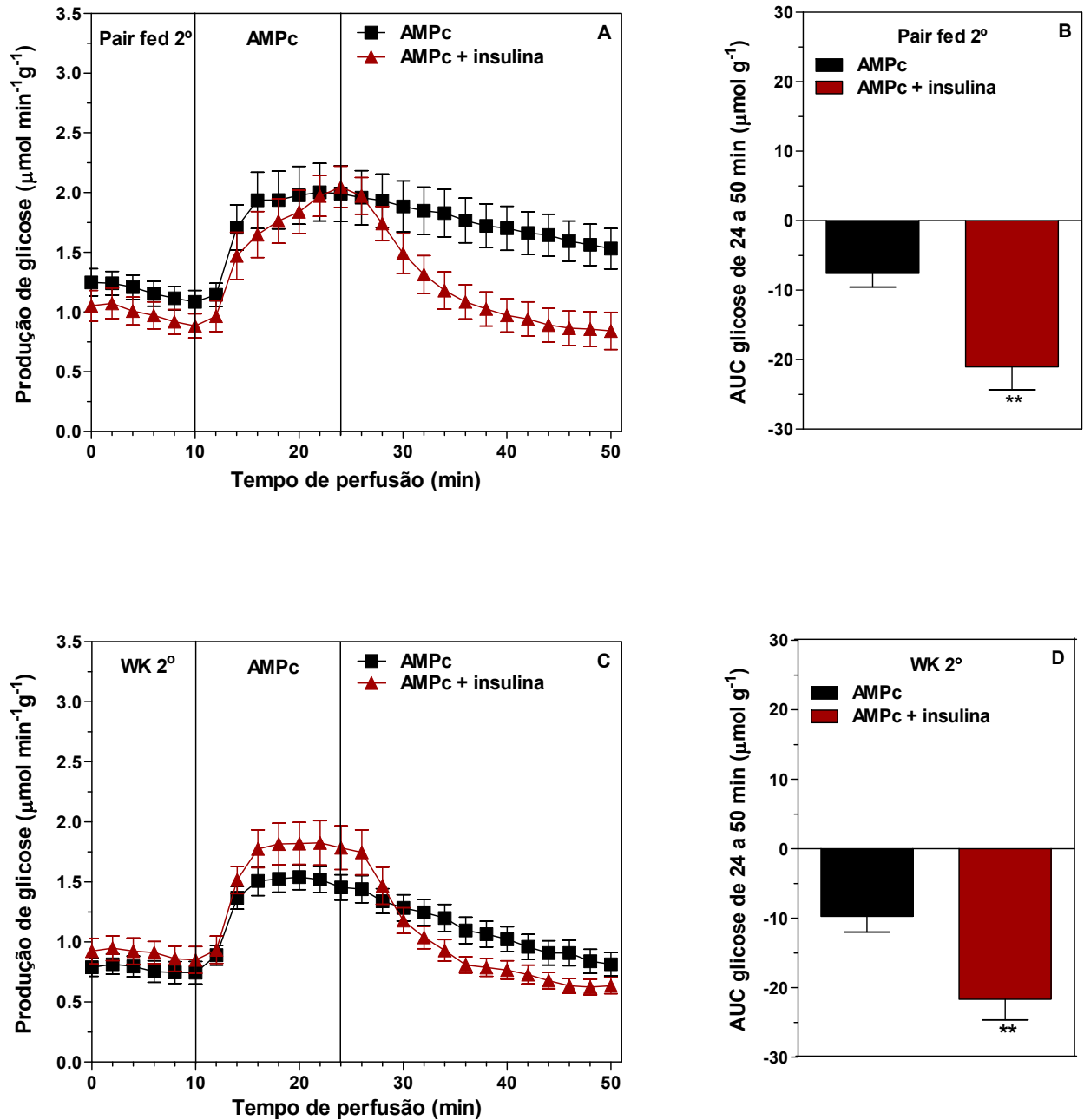
De modo similar ao ocorrido com a produção hepática de glicose, o AMPc estimulou a glicogenólise nos grupos controle *pair fed* (figura 9A) e WK 2º (figura 9C) e a infusão de insulina reduziu este efeito estimulatório do AMPc em ambos os grupos, como indicado pelas AUCs (figuras 9B e 9D).

No grupo controle *pair fed* referente ao 5º dia de desenvolvimento tumoral, o AMPc aumentou a produção hepática de glicose (figura 10A) e a infusão de insulina diminuiu este efeito do AMPc, como pode ser visto pelas AUCs (figura 10B). Diferentemente do grupo controle *pair fed*, no grupo WK 5º, a infusão de AMPc promoveu apenas discreto aumento na produção hepática de glicose (figura 10C). Entretanto, como nos animais *pair fed* a insulina na presença de AMPc reduziu a produção hepática de glicose, como evidenciado pelas AUCs (figura 10D).

A produção hepática de lactato e piruvato nos grupos controle *pair fed* e WK 5º estimulada por AMPc (figuras 11A, 11C, 12A e 12C) não apresentou alteração significativa após a infusão de insulina, como mostram as AUCs (figuras 11B, 11D, 12B e 12D).

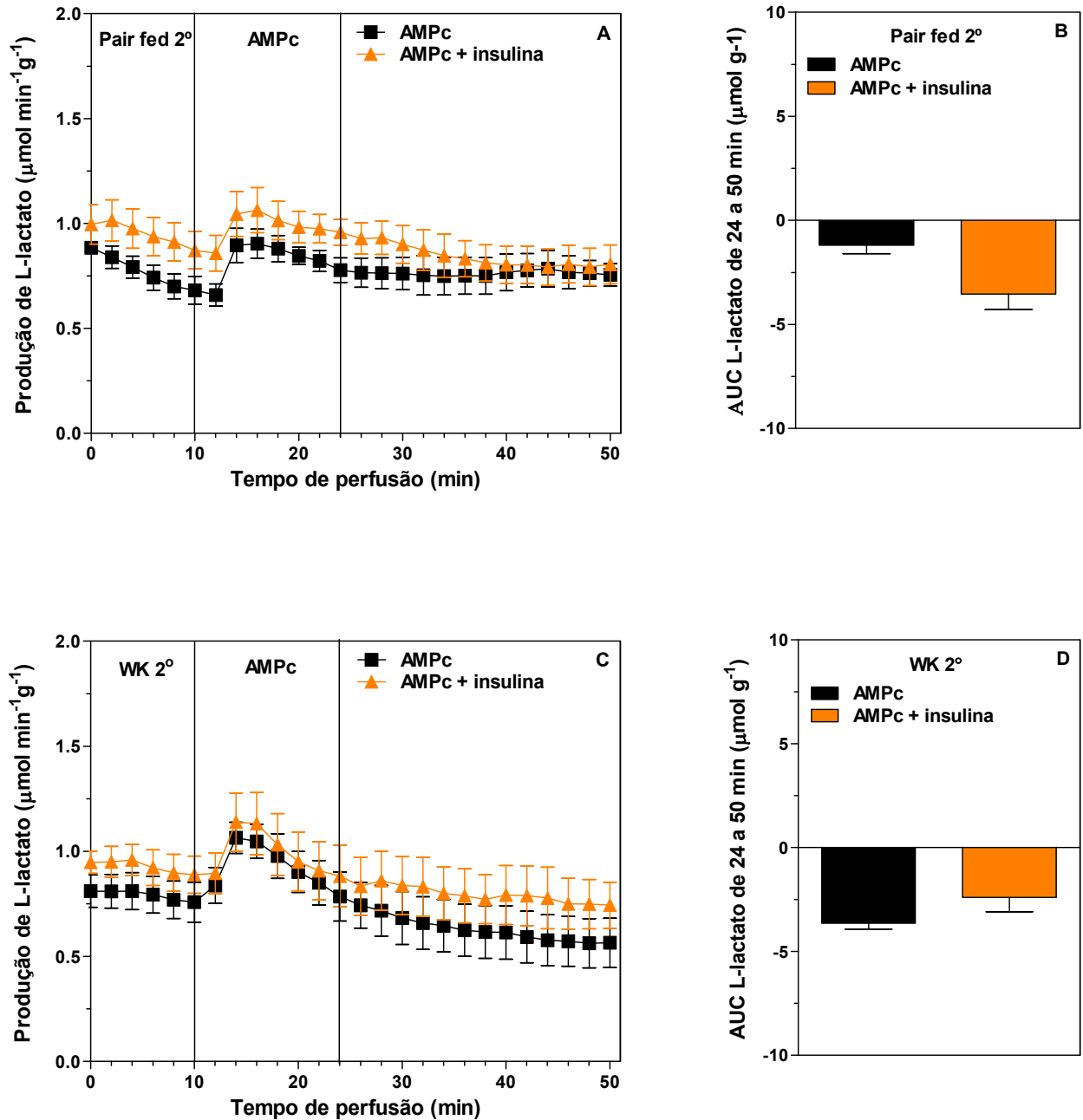
Em concordância com a produção de glicose, o AMPc promoveu aumento discreto da glicogenólise no grupo WK 5º (figura 13C) em relação ao *pair fed* (figura 13A). Porém, como nos animais *pair fed*, a infusão de insulina reduziu a glicogenólise estimulada pelo AMPc no grupo WK 5º (figuras 13B e 13D).

**Figura 6** – Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



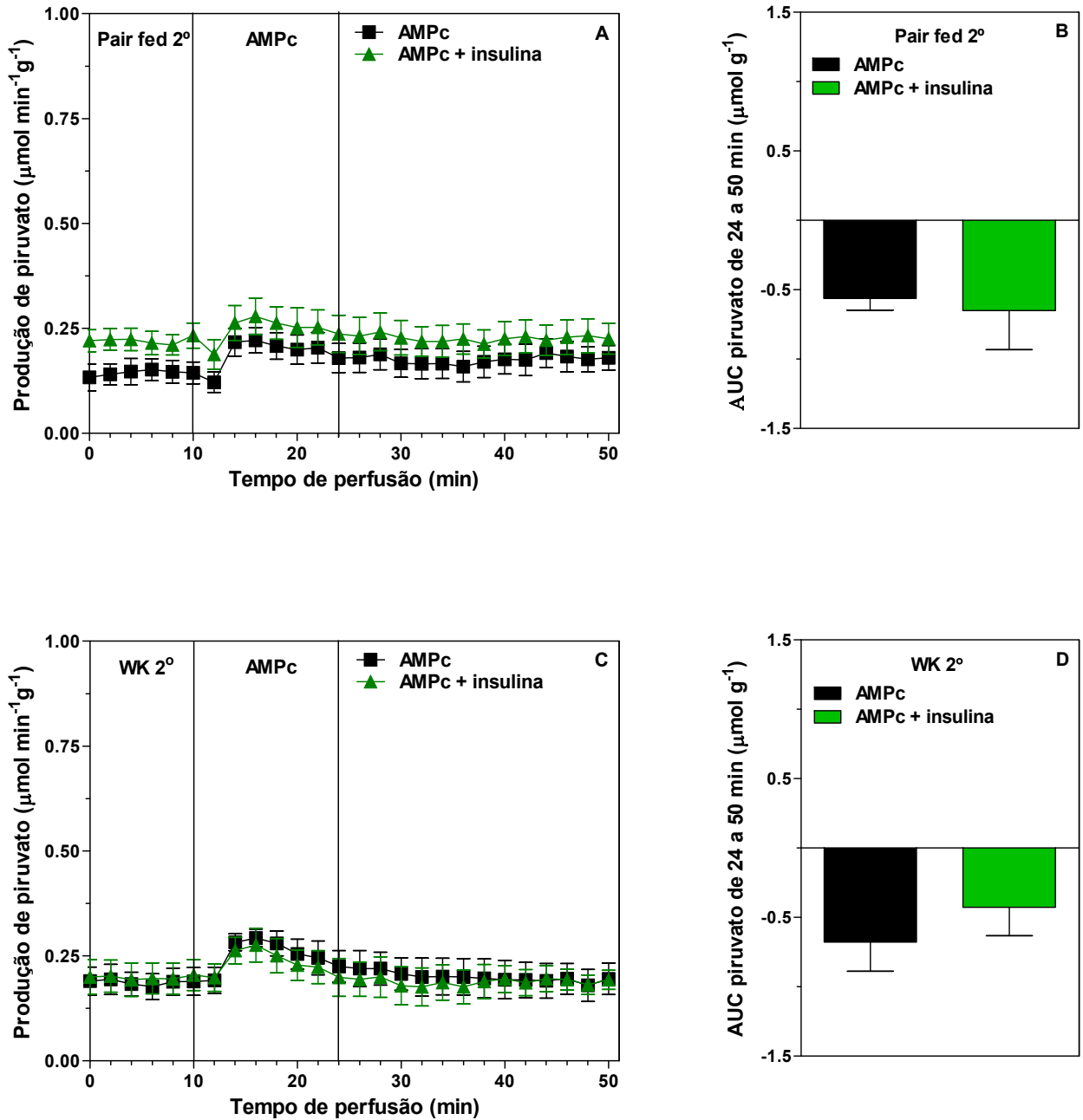
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) ou AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) + insulina (500  $\mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 7** – Efeito da insulina sobre a produção de L-lactato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



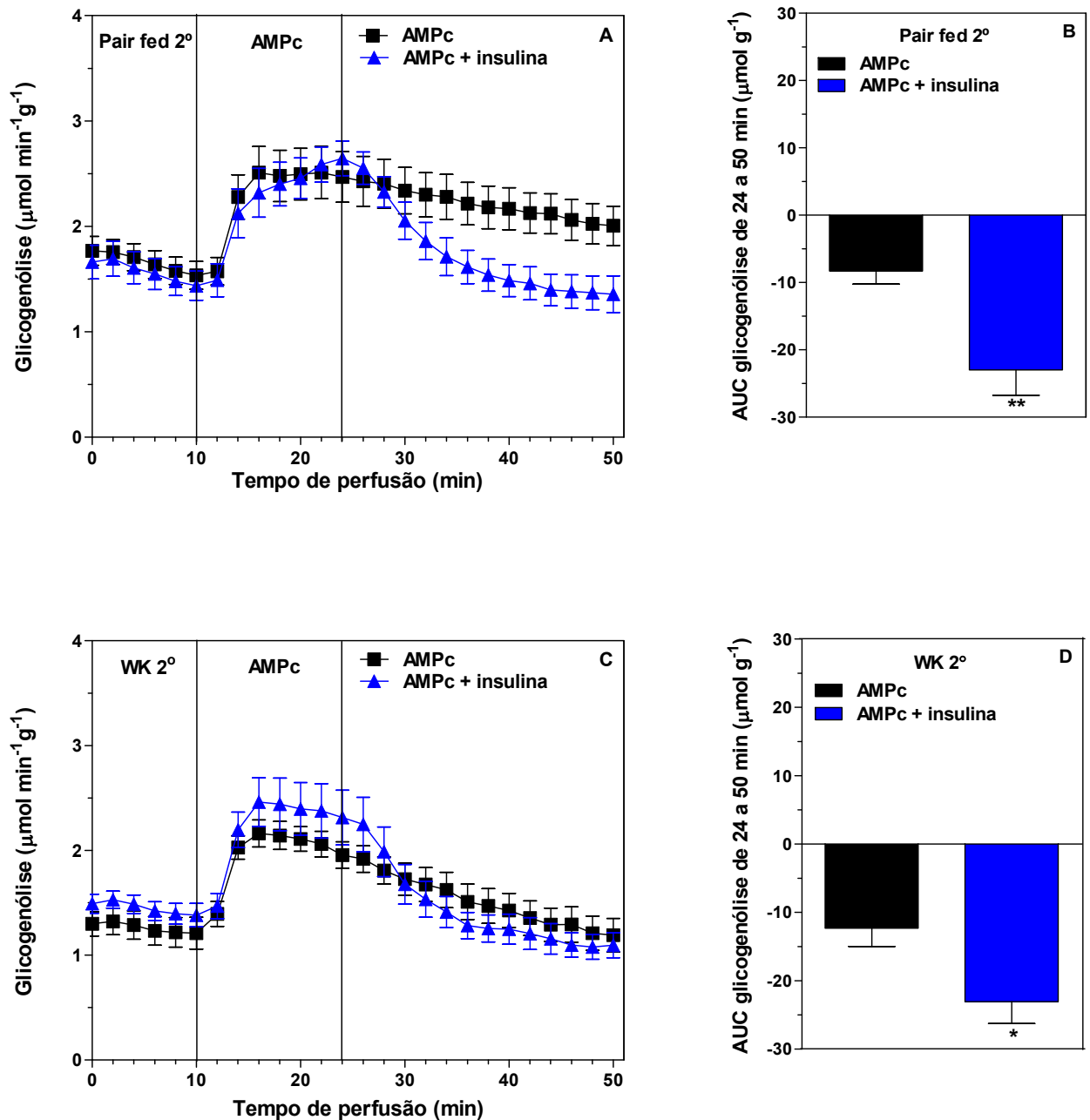
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) ou AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) + insulina ( $500 \mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

**Figura 8** – Efeito da insulina sobre a produção de piruvato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



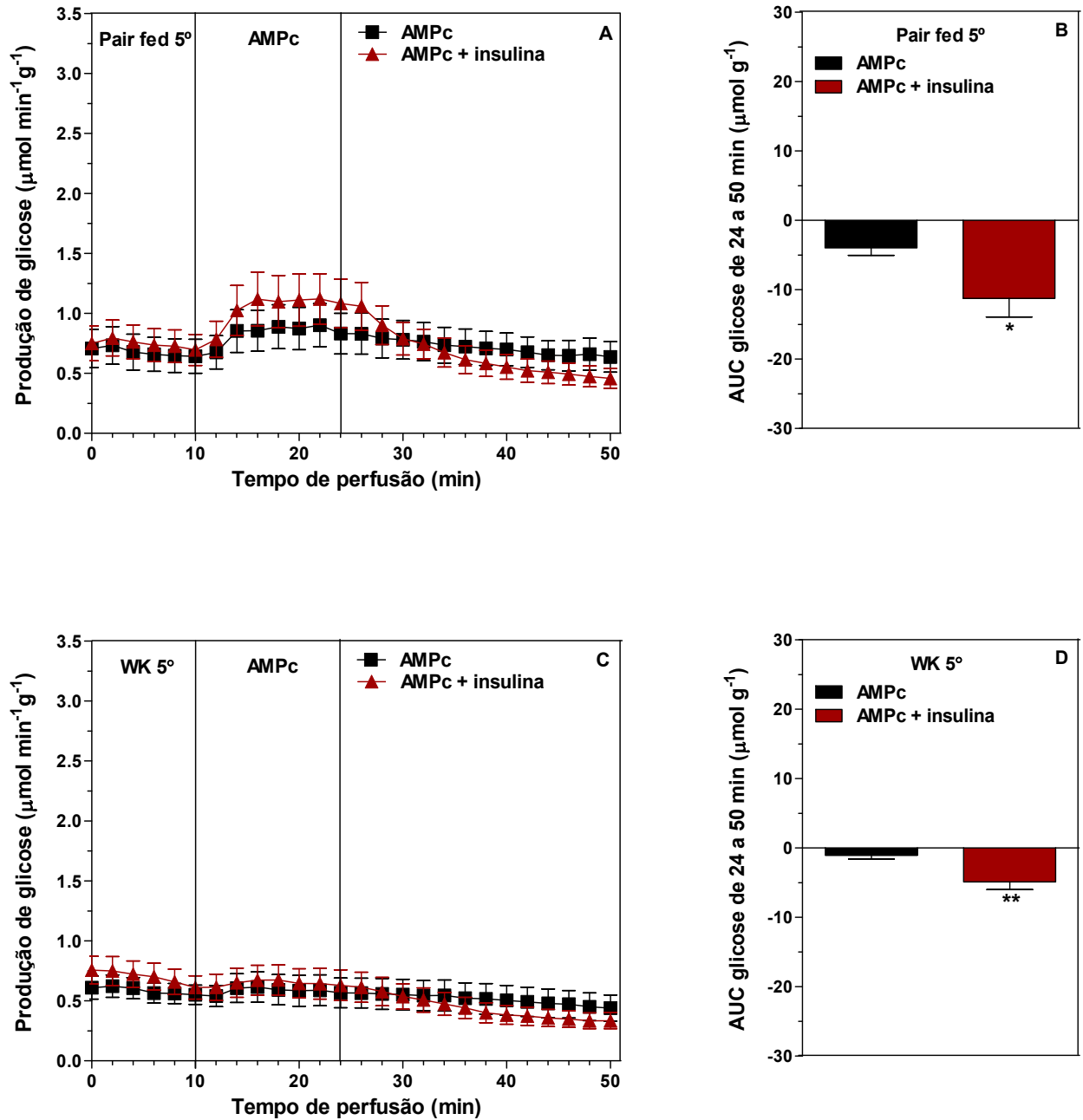
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) ou AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) + insulina ( $500 \mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste Mann-Whitney para amostras independentes no grupo controle *pair fed* e pelo teste t de Student para amostras independentes no grupo Walker-256.

**Figura 9** – Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc em fígados de ratos no 2º dia de desenvolvimento tumoral (WK 2º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



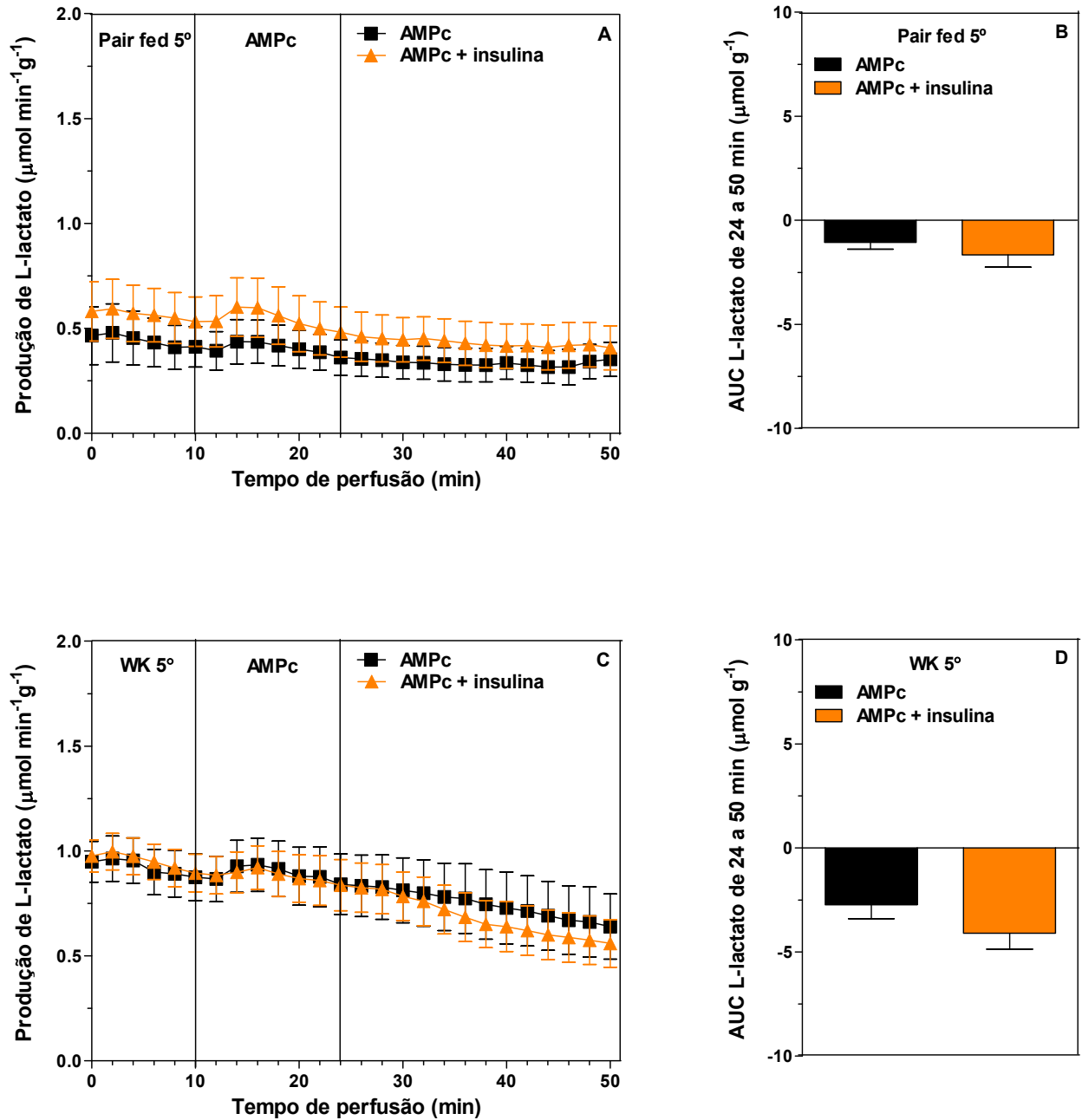
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc (3 µM) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc (3 µM) ou AMPc (3 µM) + insulina (500 µU/mL) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 7 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 10** – Efeito da insulina sobre a produção de glicose estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



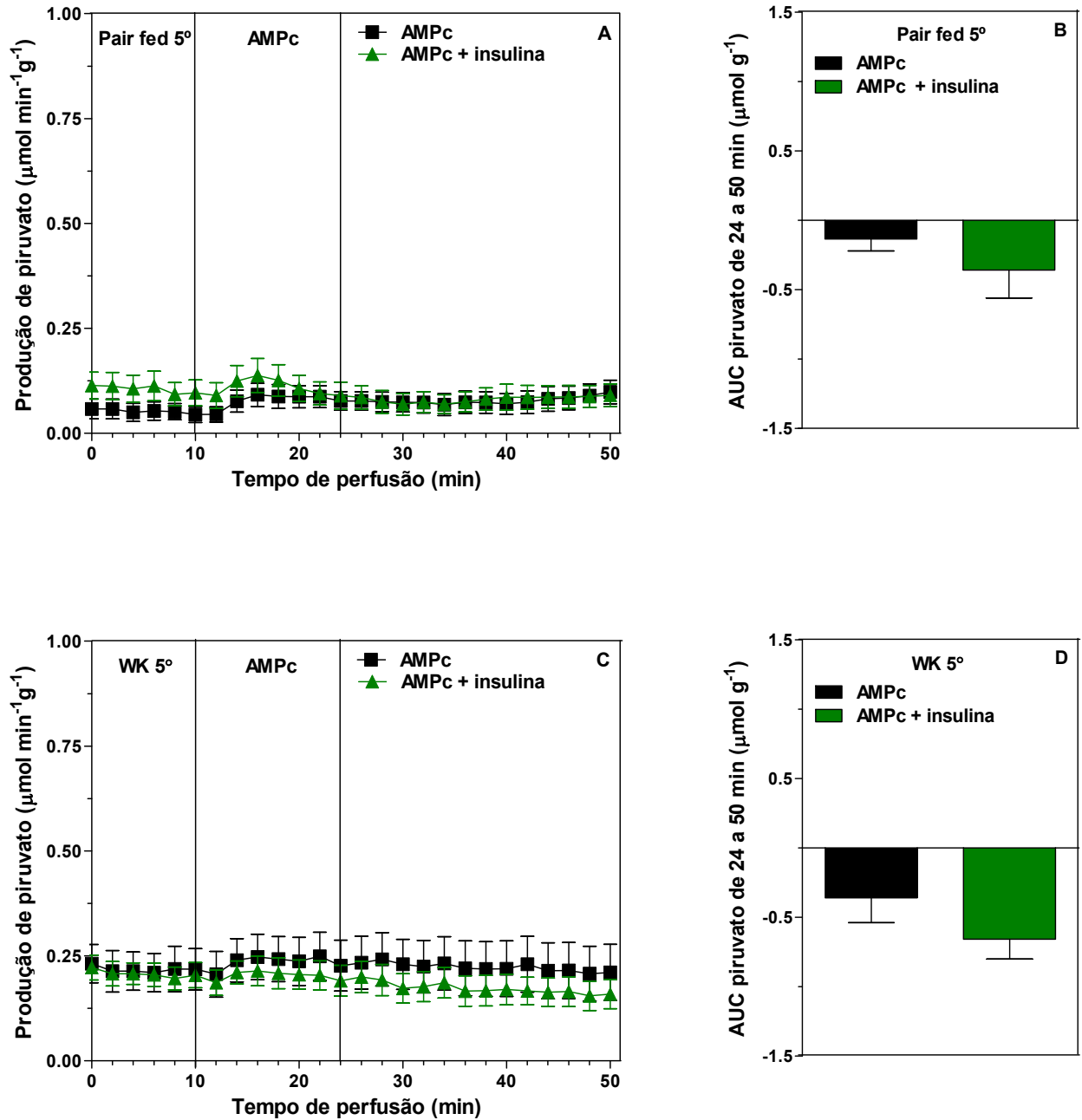
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc ( $3\ \mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc ( $3\ \mu\text{M}$ ) ou AMPc ( $3\ \mu\text{M}$ ) + insulina ( $500\ \mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 11 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 11** – Efeito da insulina sobre a produção de L-lactato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



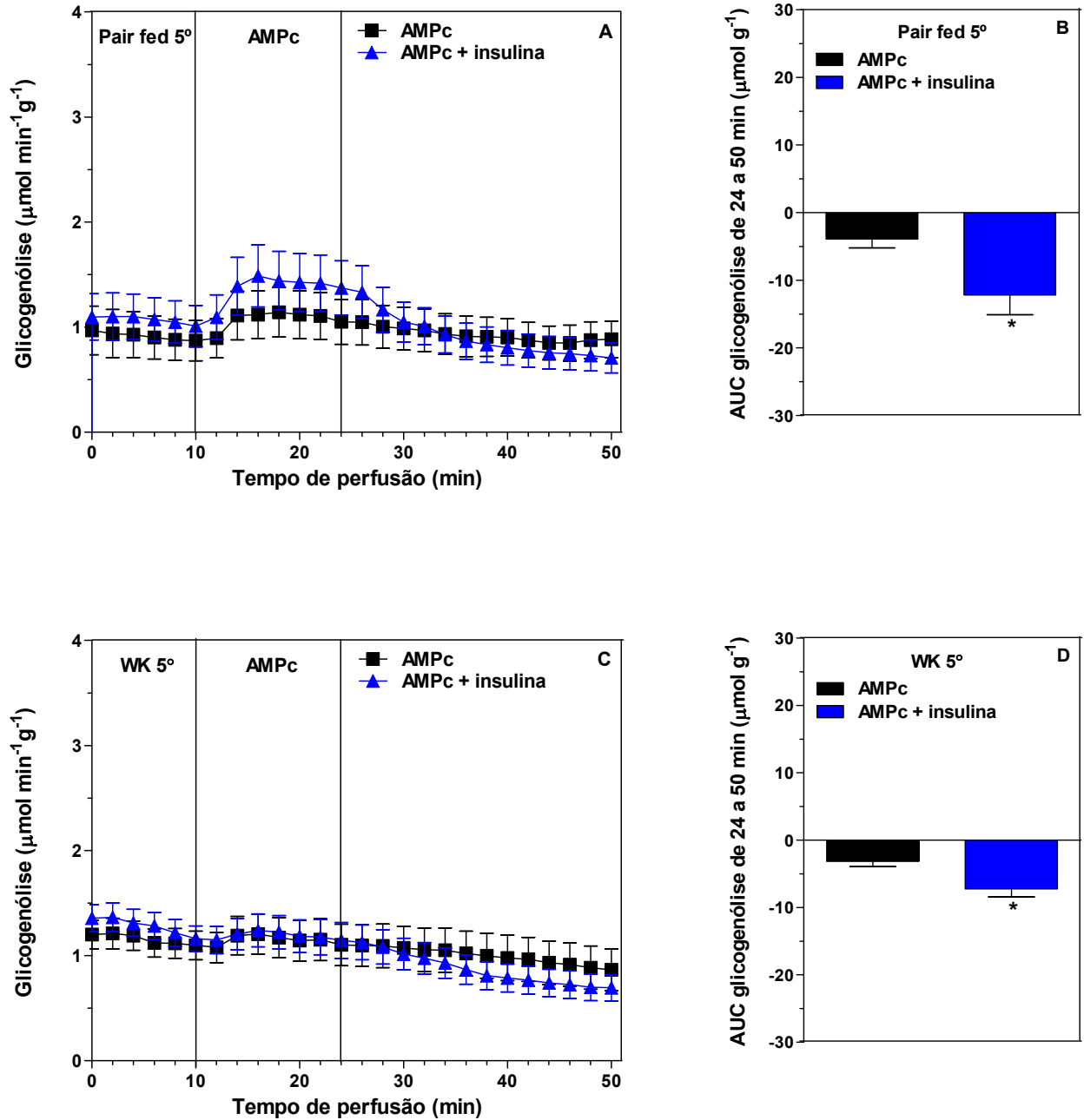
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) ou AMPc (3  $\mu\text{M}$ ) + insulina (500  $\mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 11 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

**Figura 12** – Efeito da insulina sobre a produção de piruvato estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) ou AMPc ( $3 \mu\text{M}$ ) + insulina ( $500 \mu\text{U/mL}$ ) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 7 a 11 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

**Figura 13** – Efeito da insulina sobre a glicogenólise estimulada por AMPc em fígados de ratos no 5º dia de desenvolvimento tumoral (WK 5º) (C) e *pair fed* correspondente (A), e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B, D).



Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. AMPc (3 µM) foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos e AMPc (3 µM) ou AMPc (3 µM) + insulina (500 µU/mL) foram infundidos dos 24 aos 50 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 7 a 11 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*p<0,05.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO AMPc NO CATABOLISMO DO GLICOGÊNIO

A resposta hepática ao AMPc 3  $\mu$ M e 9  $\mu$ M sobre a produção de glicose, lactato e piruvato e sobre a glicogenólise, avaliadas em perfusão de fígado de ratos no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) e 8<sup>o</sup> (WK 8<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento tumoral, e nos controles e controles *pair fed* estão demonstradas nas figuras 14 a 17.

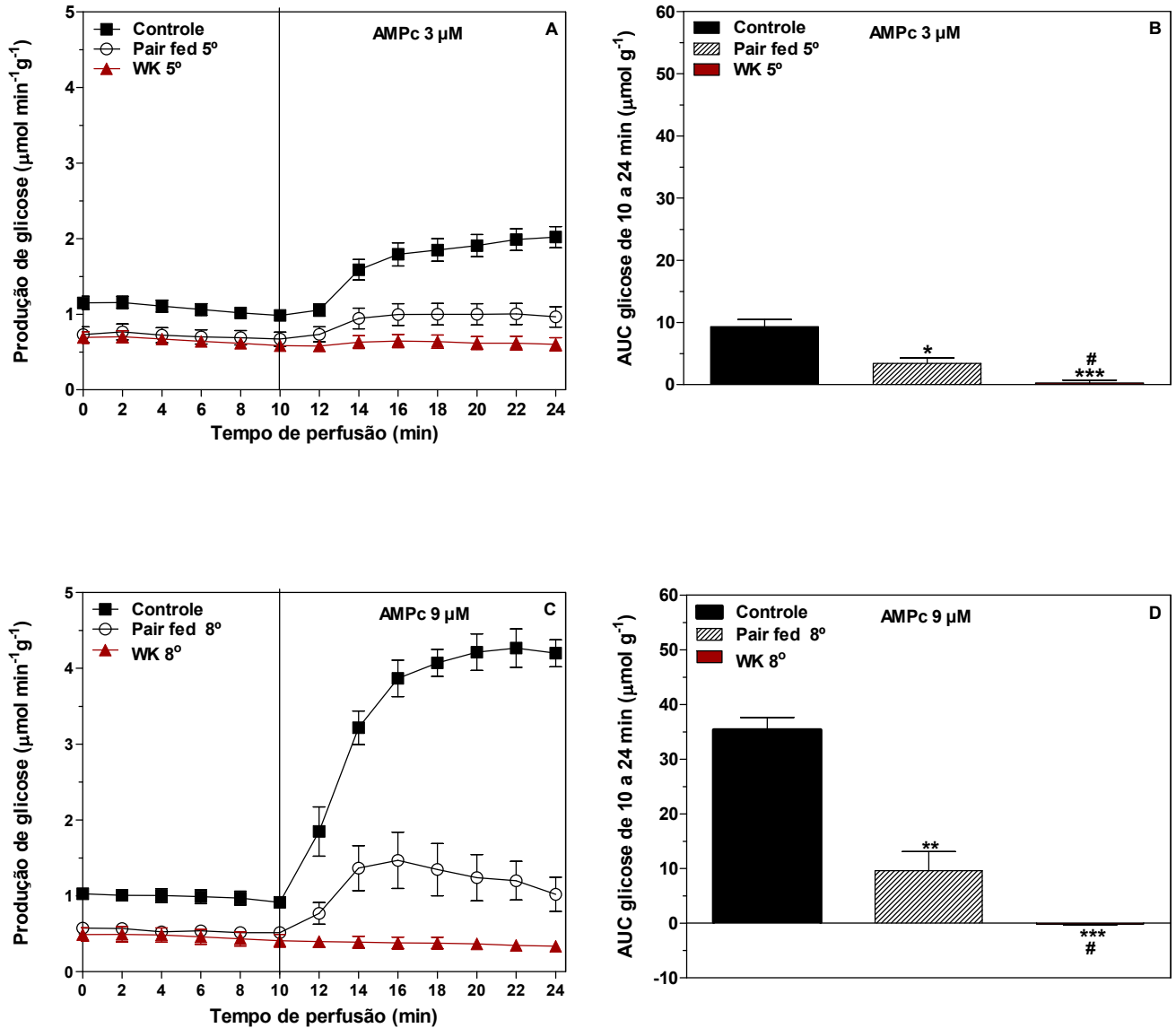
A infusão hepática de AMPc 3  $\mu$ M, aos 10 minutos de perfusão, aumentou a produção hepática de glicose nos animais controle e controle *pair fed*, sendo o aumento menor nos animais *pair fed* (figuras 14A e 14B). Porém, no grupo WK 5<sup>o</sup> o AMPc 3  $\mu$ M praticamente não alterou a produção hepática de glicose, a qual foi menor em relação aos grupos controle e controle *pair fed* (figura 14A), como indicado pelas AUCs (figura 14B).

A infusão de AMPc 9  $\mu$ M promoveu maior aumento sobre a produção hepática de glicose do que o AMPc 3  $\mu$ M, tanto no grupo controle quanto no controle *pair fed*, contudo, não estimulou a produção hepática de glicose nos animais no 8<sup>o</sup> dia de tumor (figura 14C), como demonstrado pelas AUCs (figura 14D).

Quanto a produção hepática de lactato e piruvato no grupo controle, o AMPc 3  $\mu$ M produziu pequeno aumento na produção de lactato (figuras 15A e 15B) e piruvato (figuras 16A e 16B), enquanto o AMPc 9  $\mu$ M reduziu a produção de lactato (figuras 15C e 15D) e piruvato (figuras 16C e 16D). Entretanto, nos grupos controle *pair fed*, WK 5<sup>o</sup> e WK 8<sup>o</sup> o AMPc 3  $\mu$ M ou 9  $\mu$ M tenderam a produzir alterações mais discretas na produção de lactato e piruvato.

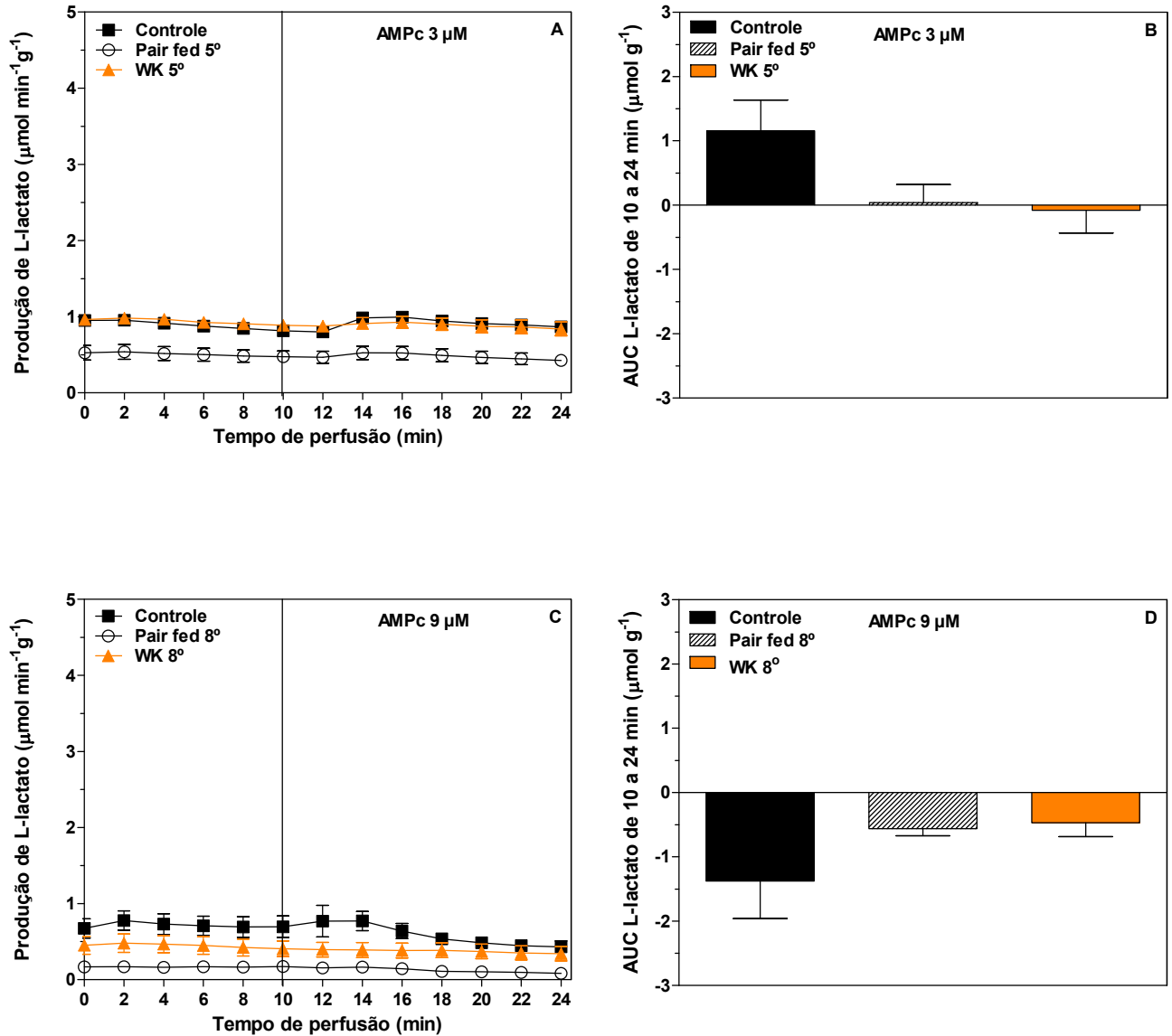
A infusão de AMPc 3  $\mu$ M estimulou a glicogenólise nos animais controle e controle *pair fed*, sendo o aumento menor nos animais *pair fed* (figuras 17A e 17B). No entanto, no grupo WK 5<sup>o</sup> o AMPc 3  $\mu$ M praticamente não aumentou a glicogenólise, a qual foi significativamente menor que dos animais controle e controle *pair fed* (figuras 17A e 17B). A infusão de AMPc 9  $\mu$ M promoveu aumento mais acentuado na glicogenólise nos grupos controle e controle *pair fed*, sendo o aumento menor nos animais *pair fed*, entretanto, não estimulou a glicogenólise no grupo WK 8<sup>o</sup> (figuras 17C e 17D).

**Figura 14** – Efeito do AMPc 3  $\mu\text{M}$  (A) e 9  $\mu\text{M}$  (B) sobre a produção de glicose e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos controles, controles *pair fed* e no 5 $^{\circ}$  (WK 5 $^{\circ}$ ) e 8 $^{\circ}$  (WK 8 $^{\circ}$ ) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256



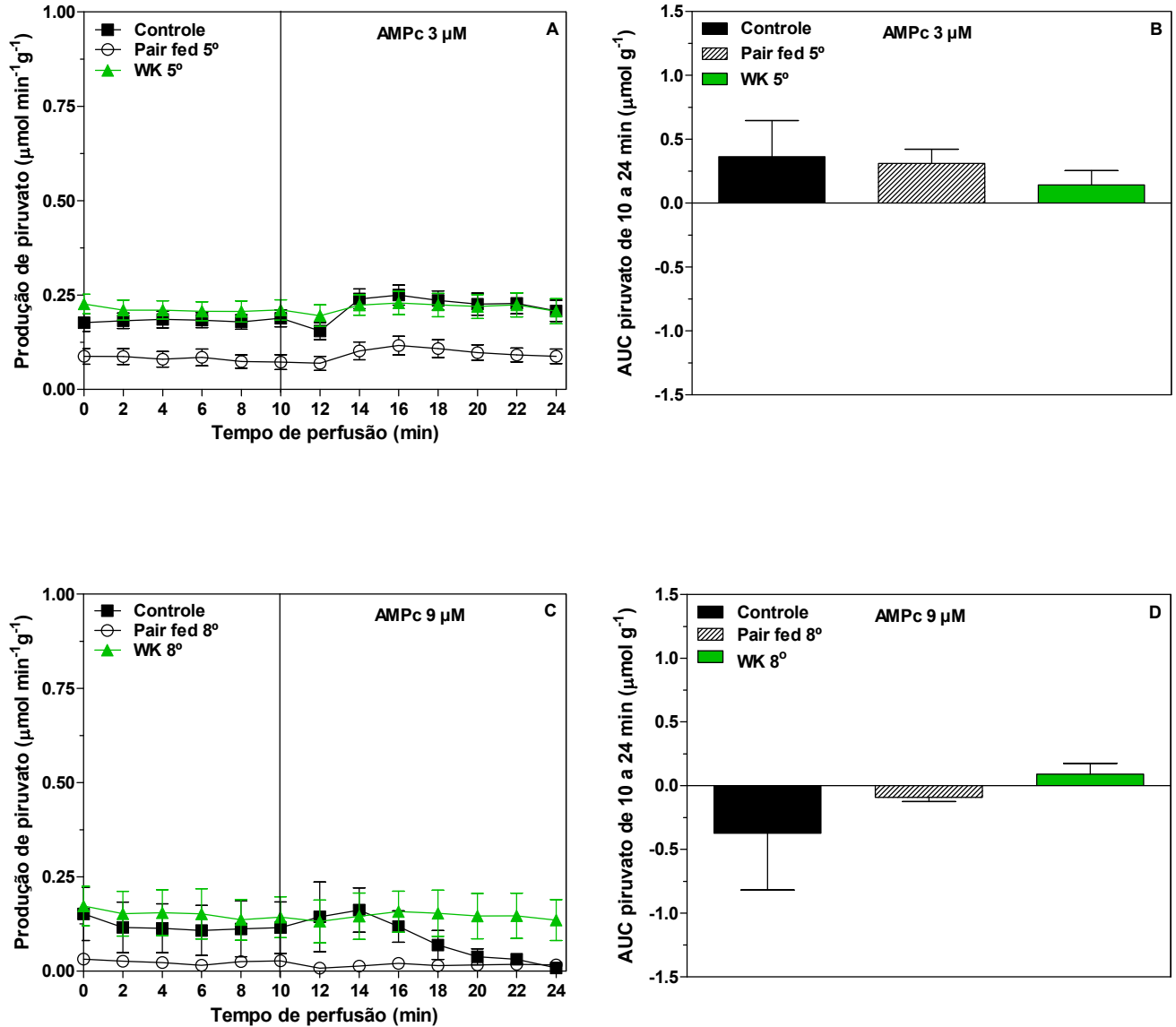
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Materiais e Métodos. AMPc 3  $\mu\text{M}$  ou 9  $\mu\text{M}$  foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 15 a 20 experimentos utilizando AMPc 3  $\mu\text{M}$  e 3 a 5 experimentos utilizando AMPc 9  $\mu\text{M}$ . Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns para múltiplas comparações para o AMPc 3  $\mu\text{M}$  e pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações para o AMPc 9  $\mu\text{M}$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus controle; # $p < 0,05$  versus controle *pair fed*.

**Figura 15** – Efeito do AMPc 3  $\mu\text{M}$  (A) e 9  $\mu\text{M}$  (B) sobre a produção de L-lactato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos controles, controles *pair fed* e no 5 $^{\circ}$  (WK 5 $^{\circ}$ ) e 8 $^{\circ}$  (WK 8 $^{\circ}$ ) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256



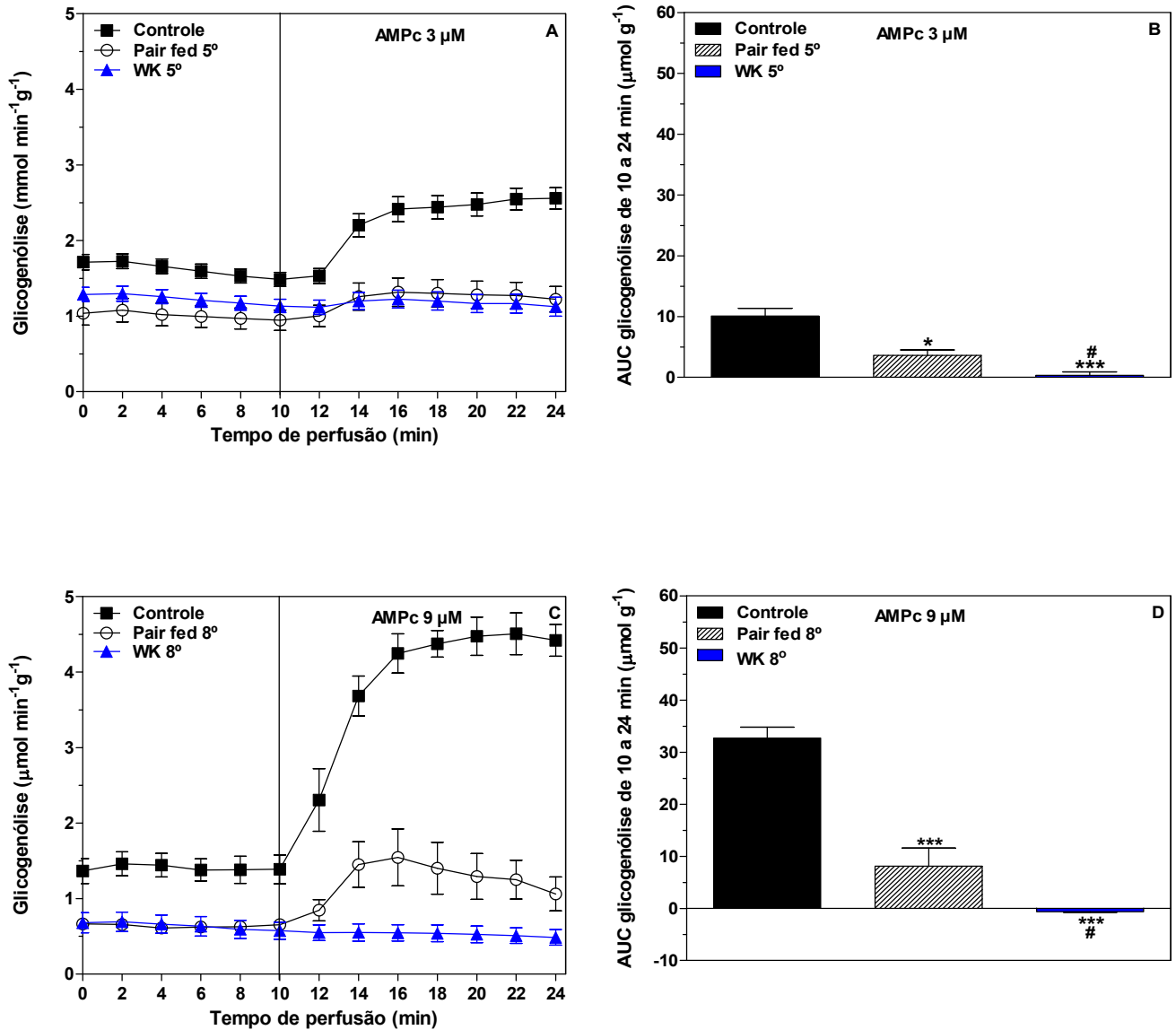
Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Materiais e Métodos. AMPc 3  $\mu\text{M}$  ou 9  $\mu\text{M}$  foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 15 a 20 experimentos utilizando AMPc 3  $\mu\text{M}$  e 3 a 5 experimentos utilizando AMPc 9  $\mu\text{M}$ . Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

**Figura 16** – Efeito do AMPc 3  $\mu\text{M}$  (A) e 9  $\mu\text{M}$  (B) sobre a produção de piruvato e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos controles, controles *pair fed* e no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) e 8<sup>o</sup> (WK 8<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256



Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Materiais e Métodos. AMPc 3  $\mu\text{M}$  ou 9  $\mu\text{M}$  foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 15 a 20 experimentos utilizando AMPc 3  $\mu\text{M}$  e 3 a 5 experimentos utilizando AMPc 9  $\mu\text{M}$ . Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns para múltiplas comparações para o AMPc 3  $\mu\text{M}$  e pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações para o AMPc 9  $\mu\text{M}$ .

**Figura 17 –** Efeito do AMPc 3  $\mu\text{M}$  (A) e 9  $\mu\text{M}$  (B) sobre a glicogenólise e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) (B e D) em fígados de ratos controles, controles *pair fed* e no 5 $^{\circ}$  (WK 5 $^{\circ}$ ) e 8 $^{\circ}$  (WK 8 $^{\circ}$ ) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Materiais e Métodos. AMPc 3  $\mu\text{M}$  ou 9  $\mu\text{M}$  foi infundido no intervalo entre 10 e 24 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 15 a 20 experimentos utilizando AMPc 3  $\mu\text{M}$  e 3 a 5 experimentos utilizando AMPc 9  $\mu\text{M}$ . Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns para múltiplas comparações para o AMPc 3  $\mu\text{M}$  e pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações para o AMPc 9  $\mu\text{M}$ , \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus controle; # $p < 0,05$  versus controle *pair fed*.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO AMPc NO CATABOLISMO DA GLICOSE

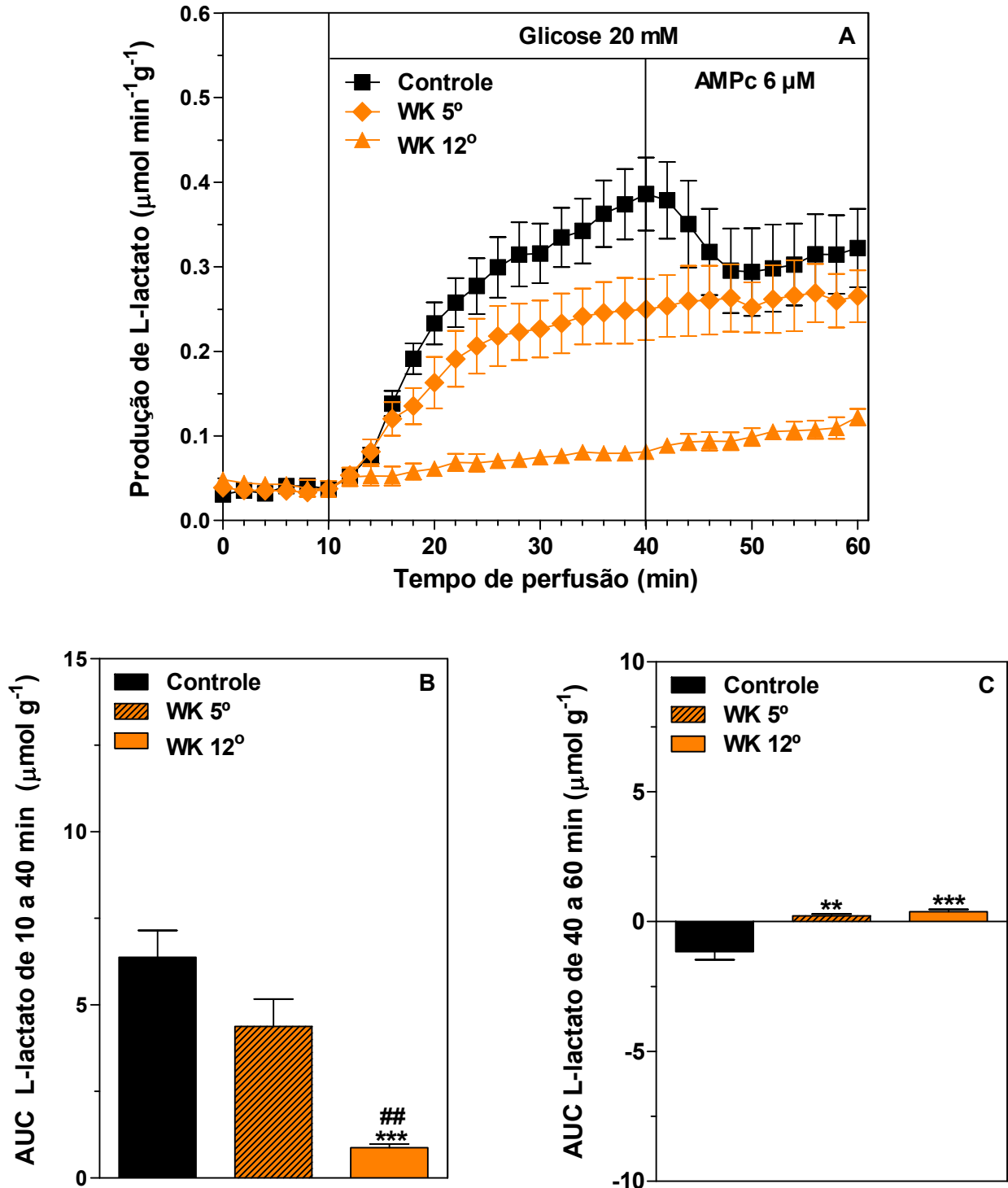
A resposta hepática ao AMPc (6  $\mu$ M) na produção de lactato e piruvato e na glicólise, avaliadas em perfusão de fígado de ratos controle e Walker-256 no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) e 12<sup>o</sup> (WK 12<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento tumoral, encontram-se ilustradas nas figuras 18 a 20.

A infusão hepática de glicose (20 mM), aos 10 minutos de perfusão, aumentou a produção de lactato nos grupos controle, WK 5<sup>o</sup> e WK 12<sup>o</sup>, porém, o aumento foi menor no grupo WK 12<sup>o</sup> (figura 18A), como evidenciado pelas AUCs (figura 18B). A infusão de AMPc aos 40 minutos de perfusão, reduziu a produção hepática de lactato a partir da glicose exógena, nos animais controle, mas, não nos animais no 5<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia de tumor (figura 18A), como demonstrado pelas AUCs (figura 18C).

O mesmo ocorreu em relação à produção hepática de piruvato, onde, a infusão de glicose aumentou a produção de piruvato nos grupos controle e WK 5<sup>o</sup>, sendo este aumento maior do que no grupo WK 12<sup>o</sup> (figura 19A), como demonstram as AUCs (figura 19B). A infusão de AMPc reduziu a produção de piruvato no grupo controle, mas, não nos animais no 5<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia de tumor, como pode ser visto pelas AUCs (figura 19C).

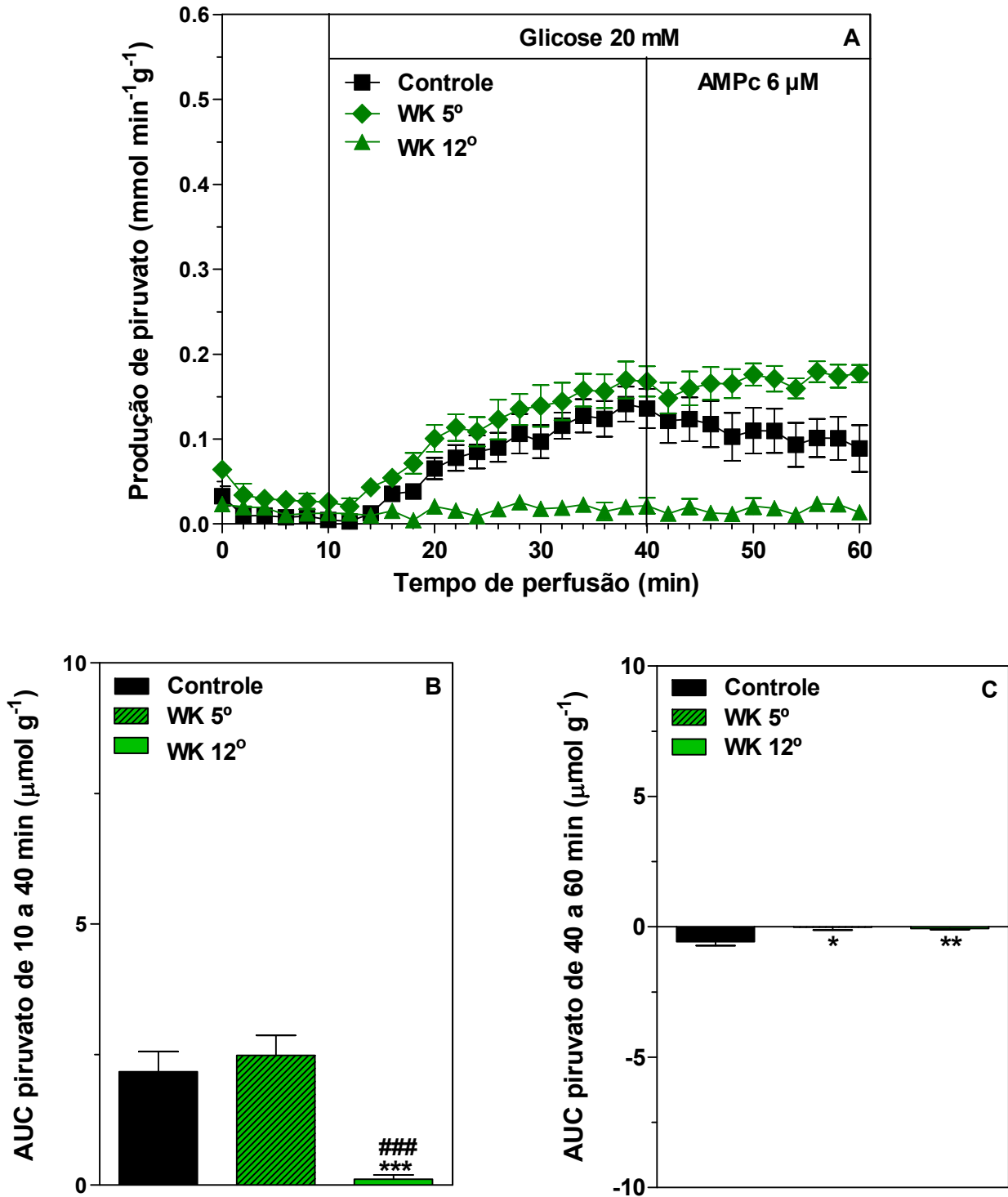
A infusão de glicose também aumentou a glicólise nos grupos controle, WK 5<sup>o</sup> e WK 12<sup>o</sup>, sendo este aumento menos acentuado no grupo WK 12<sup>o</sup> (figura 20A), como poder ser verificado pelas AUCs (figura 20B). A infusão de AMPc reduziu a glicólise, a partir da glicose exógena, no grupo controle, mas, não nos grupos WK 5<sup>o</sup> e WK 12<sup>o</sup> (figura 20A), como ilustrado pelas AUCs (figura 20C).

**Figura 18** – Efeito do AMPc sobre a produção de L-lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



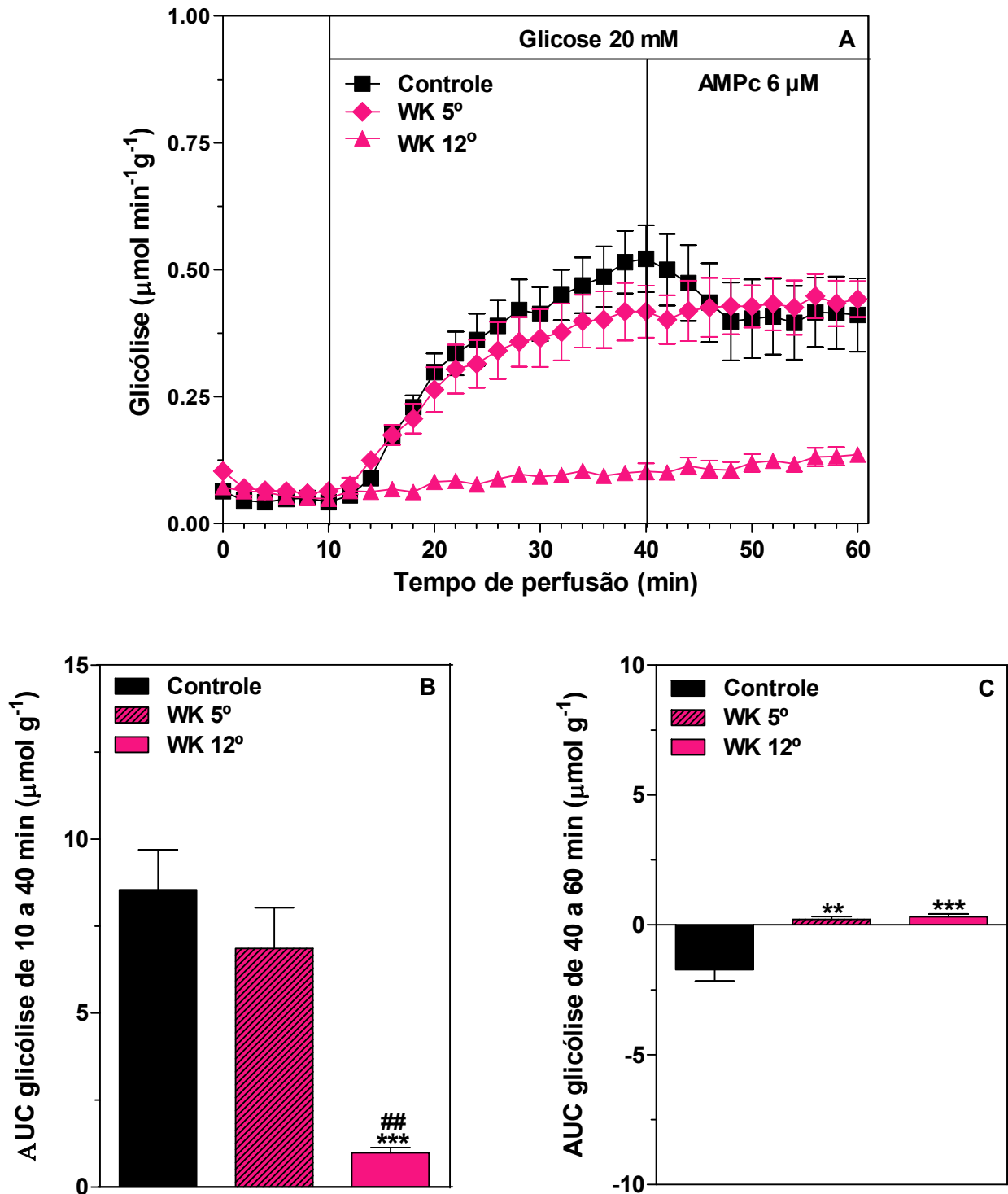
Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. AMPc (6 µM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 versus controle; ##p<0,01 versus WK 5º.

**Figura 19** – Efeito do AMPc sobre a produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256



Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. AMPc (6 µM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 versus controle; ###p<0,001 versus WK 5º.

**Figura 20** – Efeito do AMPc sobre a glicólise (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5º (WK 5º) e 12º (WK 12º) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



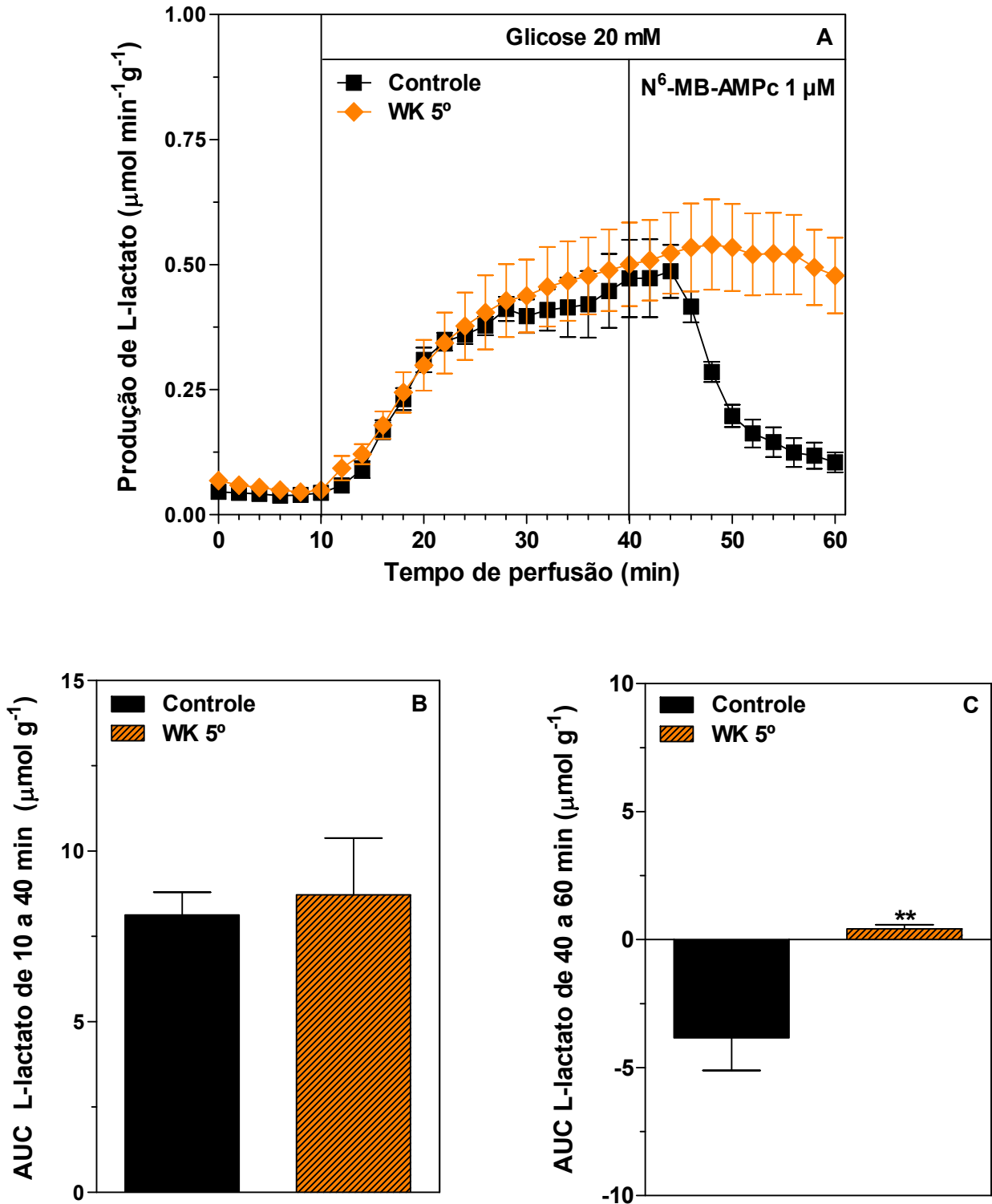
Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. AMPc (6 µM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 8 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste ANOVA One Way seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 versus controle; ###p<0,01 versus WK 5°.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HEPÁTICA AO N<sup>6</sup>-MB-AMPC NO CATABOLISMO DA GLICOSE

O efeito do análogo sintético do AMPc, o N<sup>6</sup>-MB-AMPC (1  $\mu$ M), na produção hepática de lactato e piruvato e na glicólise, em estudos de perfusão de fígado de animais controle e portador de tumor Walker-256 no 5<sup>o</sup> dia (WK 5<sup>o</sup>) está ilustrado nas figuras 21 a 23.

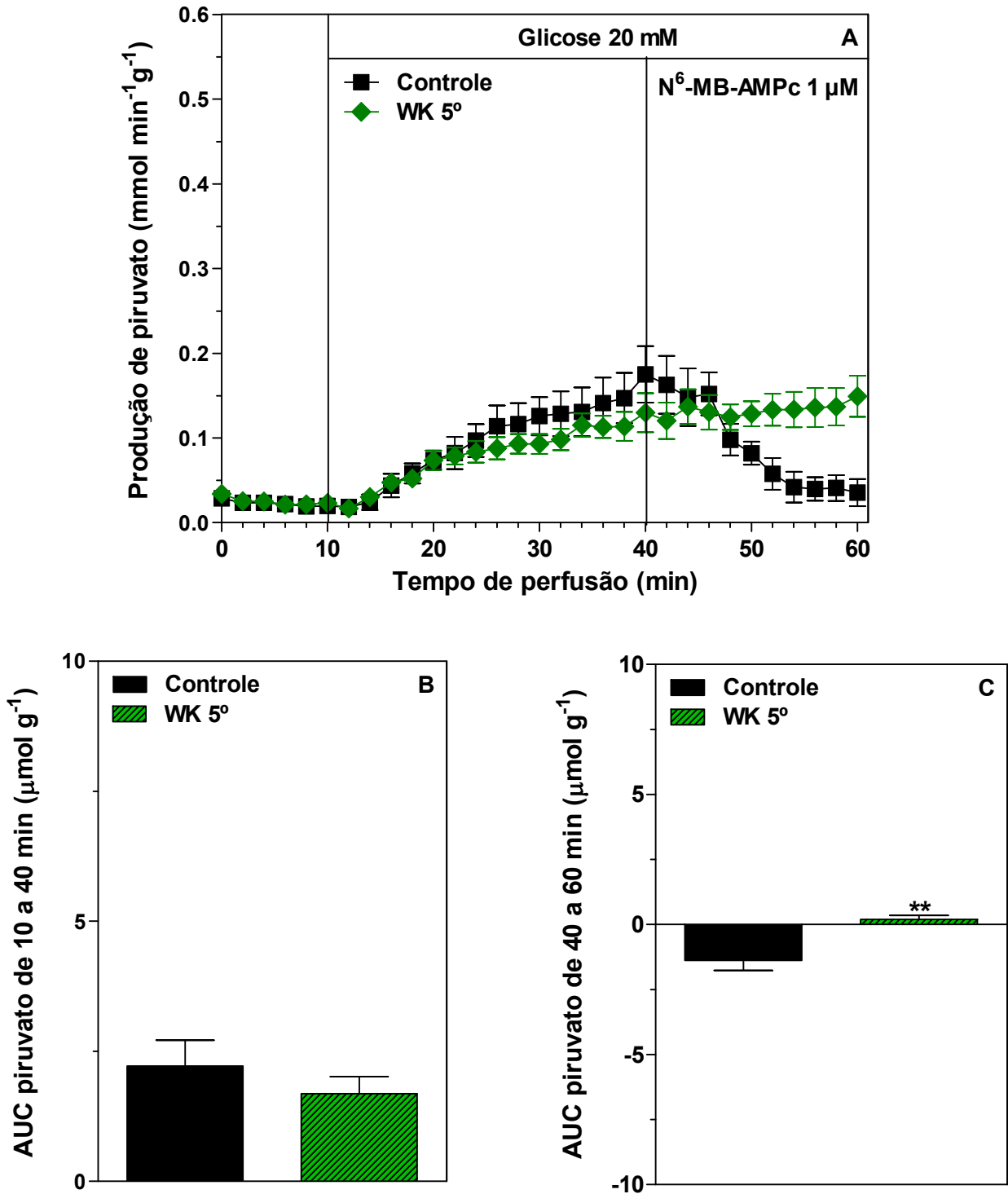
A infusão de glicose (20 mM), aos 10 minutos de perfusão, aumentou a produção hepática de lactato (figuras 21A e 21B), piruvato (figuras 22A e 22B) e a glicólise (figuras 23A e 23B), como visto anteriormente (figuras 18, 19 e 20), nos grupos controle e WK 5<sup>o</sup>. A infusão do N<sup>6</sup>-MB-AMPC, aos 40 minutos de perfusão, reduziu a produção hepática de lactato (figura 21A), piruvato (figura 22A) e a glicólise (figura 23A), a partir da glicose exógena, no grupo controle, mas, não no grupo WK 5<sup>o</sup>, como evidenciado pelas AUCs (figuras 21C, 22C e 23C).

**Figura 21** – Efeito do N<sup>6</sup>-MB-AMPc sobre a produção de L-lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



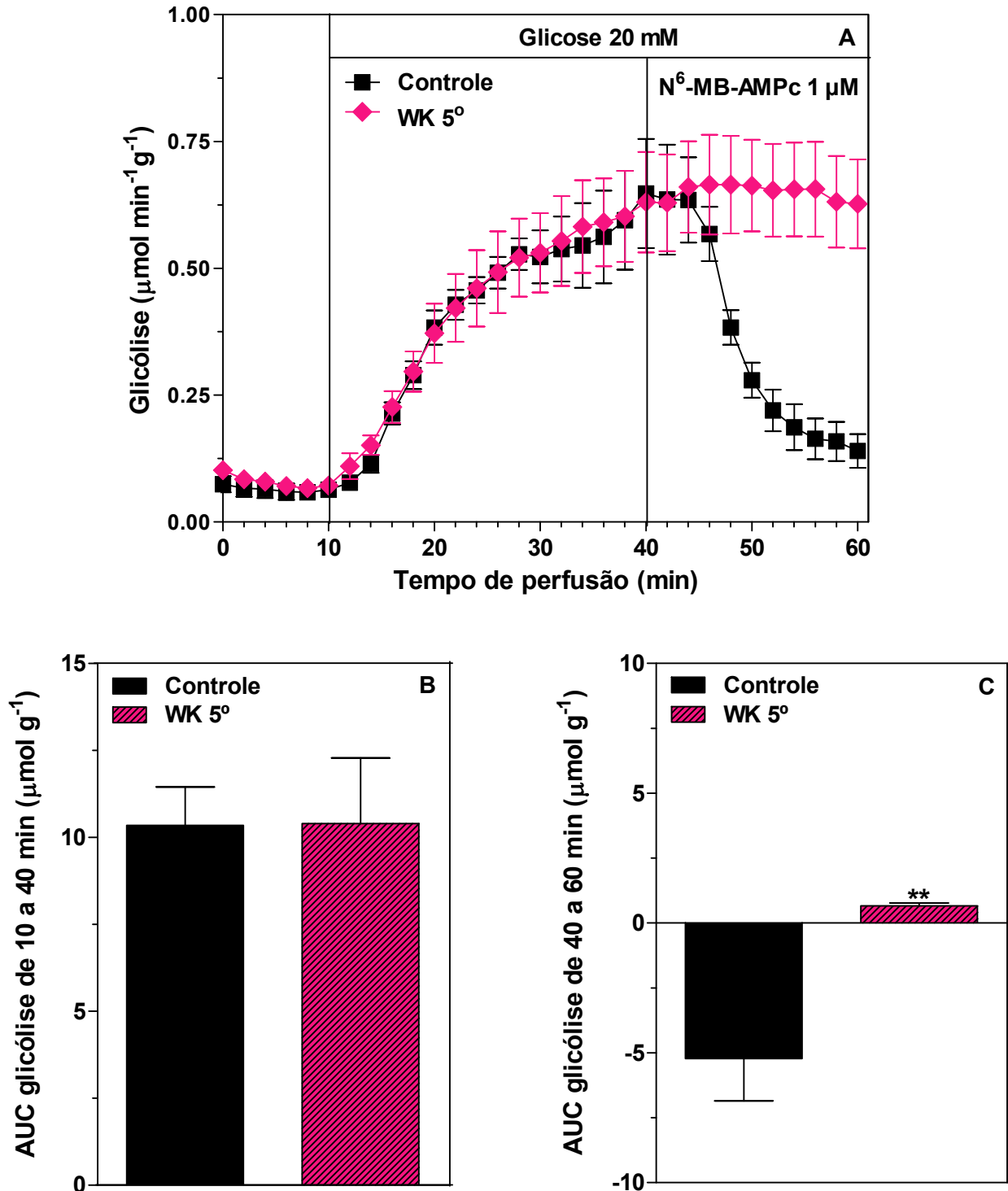
Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. N<sup>6</sup>-MB-AMPc (1 µM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\*p<0,01.

**Figura 22** – Efeito do N<sup>6</sup>-MB-AMPc sobre a produção de piruvato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. N<sup>6</sup>-MB-AMPc (1 μM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\*p<0,01.

**Figura 23** – Efeito do N<sup>6</sup>-MB-AMPc sobre a glicólise (A) e as respectivas áreas sob as curvas (AUCs) de 10 a 40 minutos (B) e de 40 a 60 minutos (C), em fígados de ratos controles e no 5<sup>o</sup> (WK 5<sup>o</sup>) dia de desenvolvimento do tumor Walker-256.



Fígados de ratos em privação alimentar de 24 horas foram submetidos à perfusão *in situ* como descrito em Material e Métodos. Glicose (20 mM) foi infundida de 10 a 60 minutos. N<sup>6</sup>-MB-AMPc (1 µM) foi infundido de 40 a 60 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM de 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs foram analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes, \*\*p<0,01.

## 5 DISCUSSÃO

Dentre os efeitos provocados pelo câncer no organismo, a caquexia representa um dos mais sérios, uma vez que leva à debilitação do paciente, resultando em perda acentuada de peso e fraqueza generalizada. Em vista disso, estudos com o objetivo de entender as alterações metabólicas envolvidas no desenvolvimento da caquexia associada ao câncer tornam-se extremamente importantes para o possível desenvolvimento de terapias que contribuam ao aumento da qualidade de vida dos doentes.

Uma das alterações metabólicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da caquexia é a resposta anormal à insulina, um hormônio anti-catabólico.

Assim, questões relevantes do presente estudo, ainda não caracterizadas, são como está a resposta periférica e hepática à insulina em ratos com caquexia induzida por tumor Walker-256, ao longo do desenvolvimento tumoral.

Neste modelo experimental de caquexia, induzida por tumor Walker-256, a perda de massa corpórea ocorre rapidamente e de forma progressiva, acompanhando o rápido crescimento tumoral (tabela 1) e a morte dos animais ocorre em torno do 14º dia após a inoculação das células tumorais.

No presente estudo, todos os animais utilizados nos experimentos foram avaliados quanto ao estado caquético e desenvolvimento tumoral e apresentaram estes parâmetros dentro dos valores médios demonstrados na tabela 1, confirmando o estado catabólico dos animais.

Para responder a primeira questão, ou seja, como está a resposta periférica à insulina ao longo do desenvolvimento do tumor Walker-256, animais no 2º, 5º, 8º e 12º dia de desenvolvimento tumoral, com 24 horas de privação alimentar, para retirar a interferência do menor conteúdo de glicogênio hepático destes animais (CASSOLLA, 2008), foram submetidos ao ITT.

Os animais no 2º dia de desenvolvimento tumoral (figura 1B) apresentaram redução da glicemia similar a do controle após a administração de insulina, porém, nos animais portadores de tumor no 5º, 8º e 12º dia (figuras 2B, 3B e 4B) esta redução foi menor. Isso demonstra que animais portadores de tumor Walker-256 apresentaram redução da resposta periférica à insulina no 5º, 8º e 12º dia de tumor, mas não no 2º dia.

Estes resultados corroboram dados da literatura de que a redução da glicemia após infusão de insulina é menor em pacientes com câncer quando comparados a pacientes saudáveis (LUNDHOLM & HOLM, 1978). Efeitos semelhantes também foram observados em camundongos inoculados no flanco com células de adenocarcinoma de cólon-26 (MAC26) submetidos ao ITT. Nesse estudo, os camundongos após 8 e 12 dias de inoculação, apresentaram gradativa diminuição da captação periférica de glicose após a administração de insulina (ASP *et al.*, 2010).

A redução da resposta periférica à insulina pode ter sido responsável, pelo menos em parte, pelas alterações metabólicas observadas previamente em nosso laboratório nos animais com tumor Walker-256, como diminuição da massa muscular, aumento dos triacilgliceróis e ácidos graxos livres plasmáticos (CASSOLLA, 2008).

A resposta periférica anormal à insulina pode também ter contribuído para a exacerbação dos processos catabólicos e conseqüentemente para o desenvolvimento da caquexia acentuada nos animais com tumor Walker-256 (tabela 1).

Estudos têm relacionado o desenvolvimento de resistência à insulina à citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 liberadas pelo sistema imunológico em resposta ao câncer (NOGUCHI *et al.*, 1998), as quais atuam diminuindo a sinalização da insulina.

O TNF- $\alpha$  interfere negativamente na sinalização da insulina por inibir a fosforilação da cadeia  $\beta$  do IR e do IRS-1 em resíduos de tirosina, via aumento da fosforilação de resíduos de serina, interferindo na ativação da PI3K (KANETY *et al.*, 1995; WARNE, 2003). O TNF- $\alpha$  também diminuiu a translocação de GLUT-4 estimulado pela insulina e GLUT-4 no estado basal em adipócitos de ratos portadores do sarcoma MCA (methylcholanthrene-induced sarcoma) (YOSHIKAWA *et al.*, 1999), além de promover diminuição do número do IR, IRS-1 e GLUT-4 (MOLLER, 2000).

A IL-6 também tem sido relacionada à diminuição da sensibilidade muscular e hepática à insulina. Ratos pré-tratados por 2 horas com IL-6, submetidos à técnica de “clamp” normoglicêmico e hiperinsulinêmico, apresentaram redução na ação e sinalização da insulina no músculo esquelético, o que pode ser devido, pelo

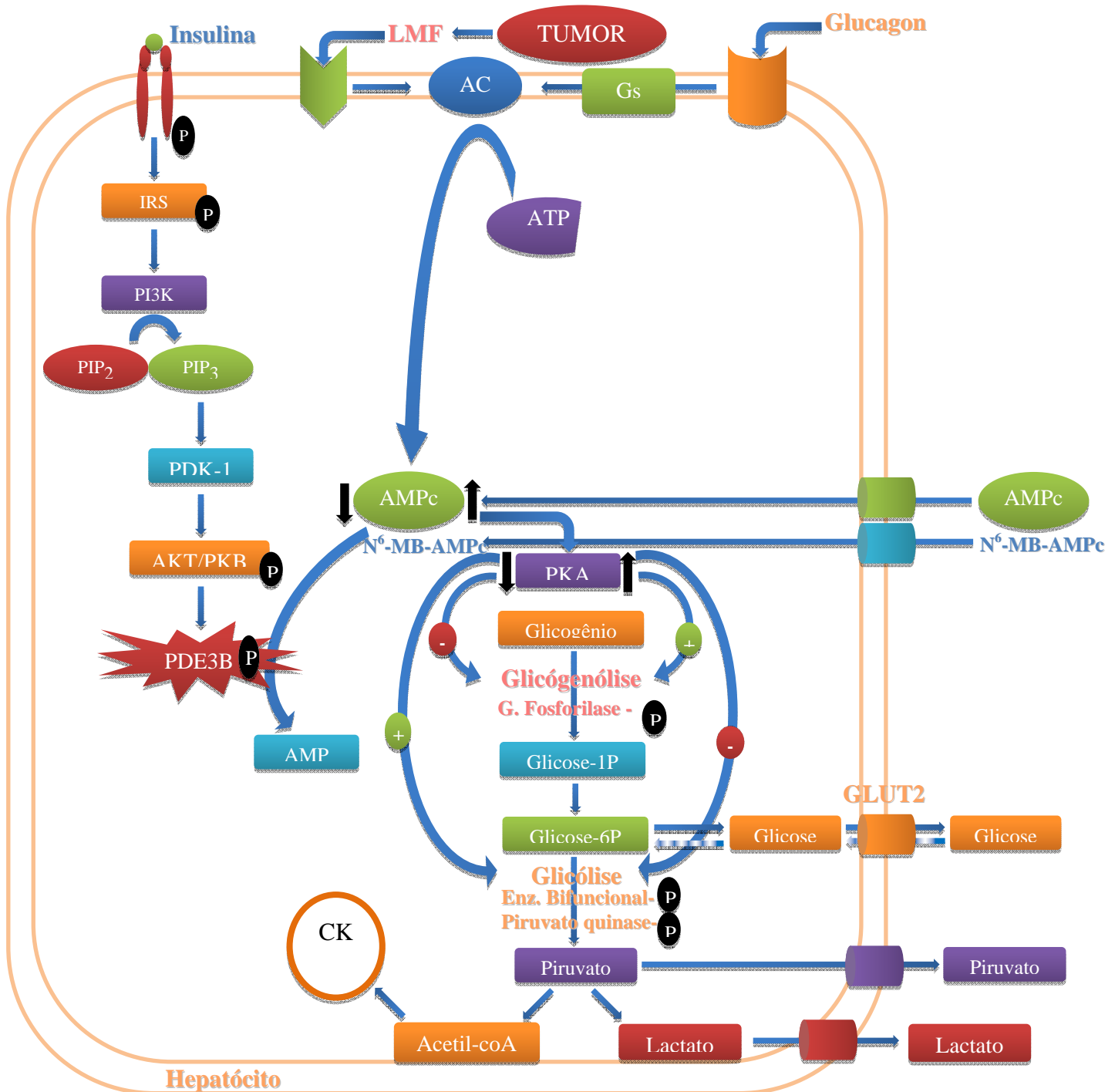
menos em parte, pela redução da associação do IRS-1 com a PI3K, reduzindo o transporte de glicose estimulado pela insulina para o músculo (KIM *et al.*, 2004).

O aumento de ácidos graxos livres circulantes, resultante do intenso catabolismo observado na caquexia, também pode prejudicar a atuação da insulina. O acúmulo intracelular de intermediários do metabolismo dos ácidos graxos (acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas) e, conseqüentemente, de ROS, interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina (SHULMAN, 2000; BODEN, 2002; SCHINNER *et al.*, 2005; PETERSEN & SHULMAN, 2006; DELARUE & MAGNAN, 2007), via ativação de serina/treonina quinases, que fosforilam o IR e IRS-1 em serina e treonina, ao invés de tirosina, reduzindo a captação e oxidação da glicose estimulada pela insulina.

Em relação à recuperação da glicemia, após os 30 minutos de administração de insulina, não houve diferença entre os portadores de tumor e os controles (figuras 1C, 2C, 3C e 4C), apesar dos relatos da literatura de que a concentração de hormônios contra-reguladores, como o glucagon, está aumentada em portadores de câncer (FERNANDES *et al.*, 1990; BONGAERTS *et al.*, 2006).

Os animais portadores de tumor apresentaram maior glicemia no 2º dia e menor glicemia no 12º dia de desenvolvimento tumoral (figura 5). O valor aumentado da glicemia no 2º dia de tumor pode ser devido ao aumento da neoglicogênese hepática em decorrência do fornecimento aumentado de substratos para esta via, tais como alanina, glicerol e lactato provenientes respectivamente da estimulação da proteólise (WATERHOUSE *et al.*, 1979; YOUNES & NOGUCHI, 2000), lipólise (LUNDHOLM *et al.*, 1982; TISDALE, 2000) e do tecido tumoral (SHAPOT & BLINOV, 1974; PIFFAR, 2003). Vale ressaltar que no 2º dia de tumor os animais já apresentavam quase 6% de perda de massa corpórea (tabela 1), indicando aumento do estado catabólico logo no início do desenvolvimento tumoral. Outra possibilidade para o aumento da glicemia é por estimulação da glicogenólise pelo LMF liberado pelo tumor. O LMF estimula a glicogenólise hepática por aumentar a concentração intracelular de AMPc (HIRAI *et al.*, 1997) (figura 24). Estudos prévios do laboratório demonstraram que ratos no 5º dia de tumor Walker-256 apresentam baixo conteúdo de glicogênio hepático (CASSOLLA, 2008).

Figura 24 - Vias de sinalização da insulina, LMF, glucagon e AMPc



Adenilato ciclase (AC); adenosina monofosfato (AMP); adenosina monofosfato cíclica (AMPc); adenosina trifosfato (ATP); ciclo de Krebs (CK); fator mobilizador de lipídeos (LMF); fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K); fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>); fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>); fosfodiesterase 3B (PDE3B); N<sup>6</sup>-monobutil-AMPc (N<sup>6</sup>-MB-AMPc); proteína G estimulatória (Gs); proteína quinase A dependente de AMPc (PKA); proteína quinase B (PKB/AKT); proteína quinase dependente de fosfoinosítido-1 (PDK-1); substrato do receptor de insulina (IRS).

O menor valor glicêmico dos animais no 12º dia de tumor provavelmente foi resultante do aumento do consumo de glicose pelo tumor, devido ao seu estágio avançado de desenvolvimento. Grandes tumores sólidos de crescimento rápido, como o Walker-256 (39 g no 12º dia), apresentam pobre suprimento sanguíneo porque a neovascularização não acompanha o crescimento tumoral e, conseqüentemente, se tornam hipóxicos (VICENTINO *et al.*, 2002b).

A alta atividade metabólica das células tumorais em um ambiente hipóxico implica na utilização da glicólise anaeróbica como principal via para produção de ATP (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007), o que aumenta grandemente o consumo de glicose. A quantidade de glicose requerida pelas células tumorais é cerca de quatro a cinco vezes a das células normais (TIJERINA, 2004). Sob condições de hipóxia ocorre ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) o qual desvia o fluxo metabólico da célula tumoral para a via glicolítica anaeróbica por induzir a expressão de enzimas desta via (TISDALE, 2002), além de também promover aumento na expressão de transportadores de glicose do tipo GLUT-1 e GLUT-3, o que aumenta a captação de glicose pelas células tumorais (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007). Este aumento do consumo de glicose pelo tumor é apontado como um dos responsáveis, junto com a anorexia e depleção do glicogênio hepático, pela hipoglicemia característica da síndrome caquética associada ao câncer.

A outra questão relevante do presente estudo já descrita anteriormente é como está a resposta para a insulina no fígado de animais portadores de tumor Walker-256 no decorrer do desenvolvimento tumoral.

Não existem relatos na literatura relacionando a ordem de desenvolvimento de resistência à insulina nos tecidos muscular, adiposo e hepático em portadores de câncer, especificamente em ratos com tumor Walker-256. Há estudos (KIM *et al.*, 2003) demonstrando que na síndrome metabólica, associada ao aumento de adiposidade visceral, a resistência insulínica é estabelecida primeiramente no fígado. Diante disto, embora não se tenha observado diminuição da resposta periférica à insulina no 2º dia de tumor, avaliou-se a resposta hepática à insulina no catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc, neste dia de desenvolvimento tumoral e também no 5º dia.

O AMPc infundido no fígado estimulou a glicogenólise (figuras 9 e 13) e conseqüentemente a produção de glicose (figuras 6 e 10), lactato (figuras 7 e

11) e piruvato (figuras 8 e 12) nos animais controle *pair fed*, WK 2° e WK 5°. Porém, os efeitos do AMPc foram menos pronunciados nos animais no 5° dia de tumor.

Vale ressaltar que a glicose proveniente da degradação do glicogênio hepático é convertida em lactato e piruvato pela via glicolítica. Isto implica que a estimulação da glicogenólise pelo AMPc aumenta a produção hepática de glicose, lactato e piruvato.

O AMPc estimula a glicogenólise por iniciar uma cascata de reações (figura 24) que conduzem a ativação da proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) (SUDILOVSKY, 1974; KEPPENS & WULF, 1975) e a subsequente fosforilação e ativação da fosforilase-quinase e glicogênio-fosforilase (enzima chave da glicogenólise) (KREBS *et al.*, 1966; KEPPENS & WULF, 1975).

A infusão hepática de insulina reduziu o efeito estimulatório do AMPc sobre a glicogenólise (figuras 9 e 13) e produção hepática de glicose (figuras 6 e 10) e não alterou o efeito do AMPc sobre a produção de lactato (figuras 7 e 11) e piruvato (figuras 8 e 12) nos animais controle *pair fed* e também nos animais no 2° e 5° dia de tumor. A falta de efeito inibitório da insulina sobre a produção hepática de lactato e piruvato provavelmente se deve ao fato de que a insulina inibe a glicogenólise, diminuindo a oferta de glicose para ser convertida em lactato e piruvato, mas ao mesmo tempo estimula a glicólise, aumentando a conversão de glicose em lactato e piruvato.

A insulina diminuiu o efeito do AMPc sobre a glicogenólise, provavelmente por reduzir sua concentração intracelular (VARDANEGA-PEICHER *et al.*, 2003a), por meio da ativação da fosfodiesterase 3B (PDE3B) (KITAMURA *et al.*, 1999), a enzima que promove hidrólise e consequente inativação do AMPc (PILKIS & GRANNER, 1992; KITAMURA *et al.*, 1999) (figura 24). Resultados semelhantes do efeito inibitório da insulina sobre o catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc foram observados em outros estudos de perfusão de fígado (BORBA-MURAD *et al.*, 2004; VARDANEGA-PEICHER *et al.*, 2003a).

Os resultados anteriores demonstrando efeito inibitório da insulina no catabolismo do glicogênio hepático indicam que a resposta hepática à insulina não está diminuída no 2° e 5° dia de desenvolvimento tumoral. Porém, isto não exclui a possibilidade de redução da resposta hepática à insulina após o 5° dia de tumor, a qual não pode ser avaliada, visto que os animais com tumor não

responderam ao AMPc, mesmo para altas concentrações, em fases mais tardias do desenvolvimento tumoral.

De fato, maior concentração de AMPc (9  $\mu$ M) foi incapaz de estimular o catabolismo do glicogênio nos animais no 8º dia de tumor, enquanto aumentou a glicogenólise e produção hepática de glicose nos animais controle e controle *pair fed* (figuras 14 e 17).

Conforme esperado, nos animais controle o aumento na produção de glicose e glicogenólise foi mais acentuado após infusão de AMPc 9  $\mu$ M do que 3  $\mu$ M (figuras 14 e 17). O grupo controle *pair fed* apresentou menor resposta na produção hepática de glicose e glicogenólise, em relação ao controle, tanto para o AMPc 3  $\mu$ M quanto para o AMPc 9  $\mu$ M (figuras 14 e 17), a qual pode ser devida ao menor conteúdo de glicogênio hepático (CASSOLLA, 2008), visto que estes animais tiveram alimentação reduzida, similar a dos animais com tumor portadores de anorexia. Estudos prévios do laboratório demonstraram que animais *pair fed* possuem menor conteúdo de glicogênio hepático do que os animais com ingesta alimentar normal (CASSOLLA, 2008).

Os animais do grupo WK 5º apresentaram menor resposta ao AMPc 3  $\mu$ M na produção hepática de glicose e glicogenólise em relação ao controle e controle *pair fed* (figuras 14 e 17). O mesmo ocorreu com os animais WK 8º, nos quais o AMPc 9  $\mu$ M não estimulou a produção hepática de glicose e glicogenólise (figuras 14 e 17). A menor resposta ao AMPc nos animais portadores de tumor em relação aos controles *pair fed*, provavelmente não foi devida ao menor conteúdo de glicogênio hepático, visto que estes animais apresentaram quantidades similares de glicogênio no fígado (CASSOLLA, 2008).

Em relação à produção hepática de lactato e piruvato nos grupos controle o AMPc 3  $\mu$ M promoveu pequeno aumento (figuras 15 e 16), enquanto o AMPc 9  $\mu$ M promoveu redução, provavelmente por inibir a glicólise (figuras 15 e 16). Esses resultados concordam com dados da literatura acerca do efeito dose dependente do AMPc, o qual em pequenas concentrações estimula a glicogenólise mas não altera a glicólise e, em altas concentrações além de estimular a glicogenólise também inibe a glicólise (VARDANEGA-PEICHER *et al.*, 2003b). O AMPc inibe a glicólise por diminuir a atividade de enzimas chave desta via como a fosfofrutoquinase e piruvato quinase (PILKIS e GRANNER, 1992).

Para descartar a interferência do menor conteúdo de glicogênio hepático na menor resposta ao AMPc nos animais com tumor, avaliou-se a resposta ao AMPc no catabolismo da glicose em perfusão de fígado de animais controle, WK 5º e WK 12º submetidos a 24 horas de privação alimentar para depletar o estoque de glicogênio hepático.

A infusão hepática de glicose aumentou a produção de lactato, piruvato e a glicólise nos animais controle, WK 5º e WK 12º, porém, esse aumento foi menor nos animais no 12º dia de tumor (figuras 18B, 19B e 20B) e pode ser atribuído a menor atividade da glicoquinase nos animais portadores de tumor Walker-256, como previamente evidenciado (VICENTINO *et al.*, 2002b). A menor atividade da glicoquinase, enzima que converte a glicose em glicose-6-fosfato, resulta em menor captação hepática de glicose devido à redução do gradiente de concentração para a entrada de glicose e, conseqüentemente, em menor taxa glicolítica o que acarreta menor produção de lactato e piruvato.

A infusão hepática de AMPc (6  $\mu$ M), junto com a glicose, reduziu a produção de lactato, piruvato e a glicólise no grupo controle, entretanto não alterou a glicólise no 5º e 12º dia de tumor (figuras 18C, 19C e 20C), demonstrando também diminuição da resposta ao AMPc nos animais com tumor, reforçando a sugestão de que a redução da resposta ao AMPc na glicogenólise não foi devida ao menor conteúdo de glicogênio hepático.

A menor resposta ao AMPc nos animais portadores de tumor poderia, em hipótese, ter sido decorrente da maior atividade da PDE3B, a enzima que degrada o AMPc (PILKIS & GRANER, 1992; KITAMURA *et al.*, 1999; VARDANEGA-PEICHER *et al.*, 2003a) (figura 24). Para investigar esta possibilidade foram realizados experimentos de perfusão de fígado de animais controle e WK 5º, submetidos a 24 horas de privação alimentar, utilizando um análogo do AMPc, o N<sup>6</sup>-MB-AMPc. O N<sup>6</sup>-MB-AMPc é resistente à hidrólise pela PDE3B devido a uma modificação covalente na posição N<sup>6</sup> (HERMSDORF & DETTMER, 1998).

O N<sup>6</sup>-MB-AMPc 1  $\mu$ M inibiu o catabolismo da glicose nos ratos controles (figura 23) de forma mais acentuada que o AMPc 6  $\mu$ M (figura 20) demonstrando que possui atuação similar, porém mais intensa que a do AMPc. Contudo, assim como o AMPc, o N<sup>6</sup>-MB-AMPc não foi capaz de inibir o catabolismo da glicose nos ratos portadores de tumor (figura 23). Este resultado sugere que a diminuição da resposta hepática ao AMPc não foi devida a maior atuação da

PDE3B, já que o análogo do AMPc também não inibiu a glicólise, mesmo não sendo hidrolisado por esta enzima.

A diminuição da resposta ao AMPc provavelmente não envolveu a sua menor taxa de captação pelos hepatócitos uma vez que a resposta ao glucagon na glicólise, o qual aumenta o AMPc intracelular (figura 24), também foi menor em estudo de perfusão de fígado de animais portadores de tumor Walker-256 (VICENTINO *et al.*, 2002b).

É possível que a diminuição da resposta hepática ao AMPc, já no 5º dia de desenvolvimento tumoral, seja decorrente da menor resposta da proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) a qual poderia, em hipótese, ser devida ao aumento crônico do AMPc intracelular, resultante da ação do LMF produzido pelo tumor (figura 24).

Em síntese, os resultados do presente estudo demonstram que ratos portadores do tumor Walker-256 apresentaram menor resposta periférica à insulina e menor resposta hepática ao AMPc. A resposta anormal à insulina pode ter contribuído para o desenvolvimento de caquexia acentuada nestes animais.

Estudos com tratamentos que melhorem a resposta insulínica poderão contribuir para a compreensão da participação da resistência insulínica no desenvolvimento da caquexia associada ao câncer.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que ratos portadores de tumor Walker-256:

- ✓ Apresentaram diminuição da resposta periférica à insulina no 5º, 8º e 12º dia de tumor, mas não no 2º dia, sugerindo resistência periférica a este hormônio já no 5º dia de desenvolvimento tumoral;
- ✓ Não apresentaram redução da resposta hepática à insulina no catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc no 2º e 5º dia de tumor, sugerindo ausência de resistência hepática à insulina nestes estágios do desenvolvimento tumoral;
- ✓ Apresentaram diminuição da resposta hepática ao AMPc, tanto no catabolismo do glicogênio quanto na glicólise no 5º, 8º e 12º dia de desenvolvimento tumoral, a qual provavelmente não foi decorrente do menor conteúdo de glicogênio hepático, da menor taxa de captação de AMPc pelos hepatócitos e nem do aumento de atuação da PDE3B.

## 7 REFERÊNCIAS

- ACHARYYA, S. et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 3, p. 370-378, 2004.
- AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E. E. The growth and transplantability of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. **Experientia**, v. 24, n. 2, p. 166-7, 1968.
- ALESSI, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Current Biology**, v. 7, n. 4, p. 261-9, 1997.
- ALVAREZ, B. et al. Tumor necrosis factor-K exerts interleukin-6-dependent and -independent effects on cultured skeletal muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1542, p. 66-72, 2002.
- ARGILÉS, J. M.; AZCÓN-BIETO, J. The metabolic environment of cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 3-17, 1988.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 4, p. 401-6, 2003.
- ARGILÉS, J. M. Cancer-associated malnutrition. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 9, p. S39-50, 2005a.
- ARGILÉS, J. M. et al. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**, v. 21, n. 9, p. 977-85, 2005b.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 435-8, 1995.
- ASP, M. L. et al. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 756-763, 2010.
- BARTON, B. E. IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation. **Immunologic Research**, v. 23, n. 1, p. 41-58, 2001.
- BERG, M.; FRAKER, D. L.; ALEXANDER, H. R. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**, v. 6, n. 4, p. 425-32, 1994.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Editor), **Methods of Enzymatic Analysis**, New York: Academic Press, p. 1205-1215, 1974.
- BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BODEN, G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 5, p. 545-9, 2002.

BODEN, G. et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3458-65, 2005.

BONGAERTS, G. P. A. et al. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 5, p. 1213-1222, 2006.

BONORA, E. et al. 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. 374-8, 1989.

BORBA-MURAD, G. R. et al. Central role of cAMP in the inhibition of glycogen breakdown and gluconeogenesis promoted by leptin and insulin in perfused rat liver. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 223-31, 2004.

BRADY, M. J.; NAIRN, A. C.; SALTIEL, A. R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 47, p. 29698-703, 1997.

BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 223-9, 2007.

BRUERA, E. ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition. **British Medical Journal**, v. 315, p. 1219-1222, 1997.

BURT, M. E. et al. Peripheral tissue metabolism in cancer-bearing man. **Annals of Surgery**, v. 198, n. 6, p. 685-91, 1983.

CALDAROLA, L. et al. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Panminerva Medica**, v. 10, n. 6, p. 246-9, 1968.

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

CASSOLLA, P. **Alterações metabólicas na caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos: anormalidades de parâmetros plasmáticos e hepáticos.** Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

COPELAND, G. P. et al. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 74, n. 11, p. 1031-5, 1987.

CROSS, D. A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-9, 1995.

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

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

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

FEARON, K. C. et al. Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute-phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer. **Annals of Surgery**, v. 213, n. 1, p. 26-31, 1991.

FERNANDES, L. C. et al. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **The American Journal of Physiology**, v. 258, p. E1033-6, 1990.

GELIN, J. et al. Role of Endogenous Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin 1 for Experimental Tumor Growth and the Development of Cancer Cachexia. **Cancer Research**, v. 15, p. 415-421, 1991.

GLICKSMAN, A. S.; RAWSON, R. W. Diabetes and altered carbohydrate metabolism in patients with cancer. **Cancer**, v. 9, n. 6, p. 1127-34, 1956.

GOLDBERG, N. D.; DIETZ, S. B.; O'TOOLE, A. G. Cyclic Guanosine 3,5-Monophosphate in Mammalian Tissues and Urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4458-4466, 1969.

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

HARING, H. et al. Abnormality of insulin binding and receptor phosphorylation in an insulin-resistant melanoma cell line. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 3, p. 900-8, 1984.

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

HERMSDORF, T.; DETTMER, D. Combined effects of insulin and dexamethasone on cyclic AMP phosphodiesterase 3 and glycogen metabolism in cultured rat hepatocytes. **Cellular Signalling**, v. 10, n. 9, p. 629-35, 1998.

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

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 4, p. 1543-9, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **Journal of Internal Medicine**, p. 621-625, 1999.

INCA. Instituto Nacional De Câncer. **Estimativa 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2007.

INCA. Instituto Nacional De Câncer. **Estimativa 2010**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2009.

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

KANETY, H. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 40, p. 23780 -23784, 1995.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. C. L. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell and Tissue Research**, v. 321, n. 3, p. 419-27, 2005.

KEPPENS, S.; WULF, H. The activation of liver glycogen phosphorylase by vasopressin. **FEBS Letters**, v. 51, n. 1, p. 29-32, 1975.

KERLMER-BRACHT, A. M. et al. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.

KERLMER-BRACHT, A. M. **Efeitos metabólicos e transporte do ácido niflúmico no fígado de rato**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

KHOLODENKO, B. N. Cell signalling dynamics in time and space. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 3, p. 165–176, 2006.

KIM, H.-J. et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1060-7, 2004.

KIM, S. P. et al. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. **Diabetes**, v. 52, n. 10, p. 2453-60, 2003.

KITAMURA, T. et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 9, p. 6286-96, 1999.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 8, p. 622-34, 2000.

KREBS, E. G. et al. Activation of skeletal muscle phosphorylase. **Pharmacological Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163-71, 1966.

KRETT, N. L.; HEATON, J. H.; GELEHRTER, T. D. Insulin resistance in H-35 rat hepatoma cells is mediated by post-receptor mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 32, n. 1, p. 91-100, 1983.

LANGSTEIN, H. N.; NORTON, J. A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 5, n. 1, p. 103-23, 1991.

LELBACH, A.; MUZES, G.; FEHER, J. Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 9, p. 168-173, 2007.

LIETZKE, S. E. et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Molecular Cell**, v. 6, p. 385-394, 2000.

LOBERG, R. et al. The Lethal Phenotype of Cancer: The Molecular Basis of Death Due to Malignancy. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n. 4, p. 225-241, 2007.

LUNDHOLM, K; HOLM, G. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, n. 26, p. 4665-4670, 1978.

LUNDHOLM, K. et al. Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer**, v. 50, n. 6, p. 1142-50, 1982.

MANTOVANI, G. et al. 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. 554-61, 2000.

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

MCCALL, J. L.; TUCKEY, J. A.; PARRY, B. R. Serum tumour necrosis factor alpha and insulin resistance in gastrointestinal cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 79, n. 12, p. 1361-3, 1992.

MLINAR, B. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 20-35, 2007.

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

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, n. 6, p. 212-7, 2000.

MORAES, M. O. et al. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 3, p. 235-239, 1997.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 735-743, 2006.

NOGUCHI, Y. et al. Are cytokines possible mediators of cancer cachexia?. **Surgery Today**, v. 26, n. 7, p. 467-75, 1996.

NOGUCHI, Y. et al. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 887-92, 1998.

OFEI, F. et al. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 45, n. 7, p. 881-5, 1996.

OJAMAA, K. et al. Defects in human insulin receptor gene expression. **Molecular Endocrinology**, v. 2, n. 3, p. 242-7, 1988.

OLIVEIRA, P. F. DE M. et al. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 1998.

PAQUOT, N. No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1316-1319, 2000.

PATIAG, D. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha and inhibition of protein kinase C on glucose uptake in L6 myoblasts. **Clinical Science**, v. 99, n. 4, p. 303-7, 2000.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor-a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

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

PIFFAR, P. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Letters**, v. 201, n. 2, p. 139-148, 2003.

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.

PLATA-SALAMÁN, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 1009-12, 2000.

PLOMGAARD, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-45, 2005.

RANDLE, P. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 7285, p. 785-9, 1963.

RANDLE, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 14, n. 4, p. 263-83, 1998.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RASK-MADSEN, C. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans. **Circulation**, v. 108, n. 15, p. 1815-21, 2003.

RODEN, M. How Free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 92-96, 2004.

ROFE, A. M. et al. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Research**, v. 14, n. 2B, p. 647-50, 1994.

ROSSI-FANELLI, F.; CASCINO, A.; MUSCARITOLI, M. Abnormal substrate metabolism and nutritional strategies in cancer management. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 15, n. 6, p. 680-3, 1991.

RUBIN, H. Cancer cachexia: its correlations and causes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5384-5389, 2003.

SAINI, A. et al. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 6, p. 475-86, 2006.

SALTIEL, A. R. Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 3, p. E375-85, 1996.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SCHINNER, S. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 6, p. 674-82, 2005.

SENN, J. J. et al. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3391-3399, 2002.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 10, p. 1353-62, 2001.

SHAO, C. W. et al. Electrochemotherapy for rat implanted liver tumour. **Chinese Medical Journal**, v. 119, n. 8, p. 696-700, 2006.

SHAPOT, V. S.; BLINOV, V. A. Blood glucose levels and gluconeogenesis in animals bearing transplantable tumors. **Cancer Research**, v. 34, p. 1827-1832, 1974.

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

SUDILOVSKY, O. In vivo regulation of hepatic protein kinase by adenosine 3',5'-monophosphate mediated glucagon stimulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, n. 1, p. 85-91, 1974.

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. 445-56, 1992.

TIJERINA, A. J. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. **Dimensions of Critical Care Nursing**, v. 23, n. 6, p. 237-243, 2004.

TISDALE, M. J.; BECK, S. A. Inhibition of tumour-induced lipolysis in vitro and cachexia and tumour growth in vivo by eicosapentaenoic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 103-7, 1991.

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

\_\_\_\_\_. Cancer Cachexia: Metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1997b.

\_\_\_\_\_. Wasting in Cancer. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 243-246, 1999.

\_\_\_\_\_. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 1013-4, 2000.

\_\_\_\_\_. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438-42, 2001.

\_\_\_\_\_. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 862-871, 2002.

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

\_\_\_\_\_. Tumor-host interactions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93, n. 5, p. 871-7, 2004.

TODOROV, P. T. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 739-42, 1996.

TODOROV, P. T.; DEACON, M.; TISDALE, M. J. Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 19, p. 12279-88, 1997.

TORISU, T. et al. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. **Genes to Cells**, v. 12, n. 2, p. 143-54, 2007.

TREDGET, E. E. et al. Role of interleukin 1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. **The American Journal of Physiology**, v. 255, p. E760-8, 1988.

VARDANEGA-PEICHER, M. et al. Responsiveness of glycogen breakdown to cyclic AMP in perfused liver from rats with insulin-induced hypoglycemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 1, p. 45-51, 2003a.

VARDANEGA-PEICHER, M. et al. Comparative effect of glucagon and isoproterenol on hepatic glycogenolysis and glycolysis in isolated perfused liver. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. December, p. 563-568, 2003b.

VICENTINO, C. et al. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, v. 22, n. 4, p. 341-9, 2002a.

VICENTINO, C. et al. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. **Pathophysiology**, v. 8, n. 3, p. 175-182, 2002b.

VOORZANGER, N. et al. Interleukin ( IL )-10 and IL-6 are produced in vivo by non-hodgkin ' s lymphoma cells and act as cooperative growth factors. **Cancer Research**, v. 56, p. 5499-5505, 1996.

WAKI, Y. et al. Walker 256/S carcinosarcoma causes osteoporosis-like changes through ectopical secretion of luteinizing hormone-releasing hormone. **Cancer Research**, v. 59, p. 1219-1224, 1999.

WARNE, J. P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **The Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 351-5, 2003.

WATERHOUSE, C.; JEANPRETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Research**, v. 39, p. 1968-1972, 1979.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system : A network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 3-11, 1998.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19-39, 2005.

WOLFE, R. R. Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 519S-526S, 1998.

YANAGAWA, H. et al. Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 71, n. 5, p. 1095-8, 1995.

YOSHIKAWA, T.; NOGUCHI, Y.; MATSUMOTO, A. Effects of tumor removal and body weight loss on insulin resistance in patients with cancer. **Surgery**, v. 116, n. 1, p. 62-6, 1994.

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, n. 3, p. 676-81, 1999.

YOUNES, R. N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 181-193, 2000.