



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITOS DA INSULINA, ISOLADA OU ASSOCIADA À  
PIOGLITAZONA, NA CAQUEXIA E PARÂMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS EM RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

---

Londrina  
2021



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITOS DA INSULINA, ISOLADA OU ASSOCIADA À  
PIOGLITAZONA, NA CAQUEXIA E PARÂMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS EM RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

---

Londrina  
2021

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITOS DA INSULINA, ISOLADA OU ASSOCIADA À  
PIOGLITAZONA, NA CAQUEXIA E PARÂMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS EM RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenir Medri de Souza.

Londrina  
2021

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

M636ef Miksza, Daniele Romani.

Efeitos da insulina, isolada ou associada à pioglitazona, na caquexia e parâmetros metabólicos relacionados em ratos portadores de tumor Walker-256 / Daniele Romani Miksza. - Londrina, 2021.  
78 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Drogas - Metabolismo - Tese. 2. Câncer - Tratamento - Tese. 3. Tumor Walker-256 - Tese. 4. Farmacologia experimental - Tese. I. Souza, Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

DANIELE ROMANI MIKSZA

**EFEITOS DA INSULINA, ISOLADA OU ASSOCIADA À  
PIOGLITAZONA, NA CAQUEXIA E PARÂMETROS  
METABÓLICOS RELACIONADOS EM RATOS  
PORTADORES DE TUMOR WALKER-256**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia  
Universidade Estadual de Londrina

---

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

Londrina, 25 de junho de 2021.

*Dedico este trabalho a Deus,  
porque por DELE, por ELE e para  
ELE são todas as coisas.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que pela graça e misericórdia me sustentou em todos os momentos deste trabalho, cuidando de todas as minhas necessidades físicas e emocionais e colocando pessoas maravilhosas ao meu redor que foram essenciais nesta jornada.

Ao meu amor, amigo e companheiro Rodrigo, por ter cuidado com tanto zelo da nossa filhinha Antonella e de mim. Por ter dedicado finais de semana em me acompanhar em tratamentos e experimentos. Seu apoio foi extremamente importante para execução deste trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenir Medri de Souza, pela dedicação e orientação. É um privilégio tê-la por orientadora pois com você aprendi muito mais do que executar uma pesquisa, aprendi o que é ser ético, profissional e responsável. Agradeço sobretudo, a paciência que teve comigo, respeitando minhas dificuldades e me incentivando.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisele Lopes Bertolini, por ter contribuído com este trabalho, co-orientando, auxiliando e ensinando. Também agradeço pelo carinho com que me tratou nestes anos, pelas conversas prazerosas e pelo cuidado “de mãe” que teve comigo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Thaïs B. V. Zaia, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Ayumi Kurauti pela ajuda na realização do Western blotting, pelas explicações e demais contribuições neste trabalho.

Às amigas e parceiras do Laboratório de Fisiologia Metabólica Giuliana, Isabele, Débora, Winny, Priscila, Laura e Brenda pela ajuda, apoio, empatia e momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas de trabalho. Gostaria de agradecer especialmente à Giuliana e Isabele, por terem realizando parte dos experimentos na minha ausência.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas.

À CNPq, pelo apoio financeiro.

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

*"Nele (Cristo) estão ocultos todos os tesouros da  
sabedoria e do conhecimento".*

Colossenses 2:3

MIKSZA, Daniele Romani. **Efeitos da insulina, isolada ou associada à pioglitazona, na caquexia e parâmetros metabólicos relacionados em ratos portadores de tumor Walker-256.** 2021. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A caquexia do câncer é uma síndrome caracterizada por intensa perda de massa adiposa, muscular e corpórea, que afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes, diminui a tolerância e a resposta aos tratamentos convencionais e é responsável por grande parte das mortes. Até o momento não há tratamento eficaz para o combate desta síndrome. Poucos estudos têm avaliado os efeitos da insulina (INS) e de agentes sensibilizadores da INS, como a pioglitazona (PIO), na caquexia do câncer, permanecendo desconhecidos as doses eficazes e os efeitos destes fármacos, particularmente quando associados. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos tratamentos com INS, isolada ou associada à PIO, ambas em várias doses, sobre a síndrome caquética e parâmetros relacionados em ratos portadores de tumor Walker-256. Os tratamentos isolados com INS 9, 18 ou 27 U/kg (sc) ou com a associação INS 18 U/Kg (sc) + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg (oral) foram feitos uma vez ao dia, por 6 ou 12 dias, a partir do dia da inoculação das células tumorais nos ratos. Os tratamentos isolados com INS 9, 18 ou 27 U/kg por 6 dias não promoveram melhora significativa na perda de massa corpórea e adiposa (retroperitoneal e epididimal) dos ratos portadores de tumor. No entanto, os tratamentos por 12 dias com INS 18 ou 27 U/Kg, mas não 9 U/kg, reduziram similarmente a perda de massa corpórea e adiposa (retroperitoneal e epididimal). Os tratamentos associados com INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, por 6 ou 12 dias, preveniram similarmente a perda de massa corpórea dos ratos portadores de tumor. Os efeitos benéficos destas associações foram acompanhados de prevenção da perda de massa adiposa nos ratos tratados por 6 (epididimal e mesentérica) e 12 (retroperitoneal, epididimal, mesentérica e subcutânea inguinal) dias. Ratos tratados por 12 dias com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg apresentaram ganho de massa adiposa (retroperitoneal e epididimal) comparados aos ratos tratados só com INS 18 U/kg. Em acordo, o ganho de massa corporal dos ratos tratados por 12 dias com esta associação foi maior (73,7%) que dos ratos tratados só com INS 18 U/kg (14,7%). O ganho de massa corpórea promovido pela INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg foi associado à melhora da sensibilidade periférica à INS, à redução de fatores circulantes indutores de resistência à INS (triacilgliceróis e ácidos graxos livres) e ao aumento da expressão de proteínas da via de sinalização da INS (p-Akt) no tecido adiposo (epididimal e subcutâneo inguinal). Nenhum dos tratamentos (isolados ou associados) alterou o crescimento tumoral, a perda de massa muscular e a anorexia dos ratos portadores de tumor, exceto a INS 27 U/kg (12 dias) que aumentou a ingestão alimentar. Em conclusão, os tratamentos com associações INS 18 U / kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg foram similarmente mais eficazes do que o tratamento isolados com INS 18 U/kg. A associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg preveniu o aumento de fatores circulantes indutores de resistência à INS (triacilgliceróis e ácidos graxos livres), preveniu a resistência periférica à INS, ativou a Akt, preservou completamente o tecido adiposo e promoveu redução importante da perda de peso dos ratos portadores de tumor, mostrando-se promissora no combate de alterações

metabólicas e da perda de massa adiposa, um preditor de sobrevida, associada à caquexia do câncer.

**Palavras-chave:** câncer; perda de peso; hipoinsulinemia; resistência à insulina; tratamento farmacológico.

MIKSZA, Daniele Romani. **Effects of insulin, alone or associated with pioglitazone, on cachexia and related metabolic parameters in Walker-256 tumor-bearing rats.** 2021. 78 f. Thesis (Doctorate Degree in Physiological Sciences) State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Cancer cachexia is a syndrome characterized by marked loss of fat, muscle and body mass, which negatively affects the quality of life of patients, reduces tolerance and response to conventional treatments, and is responsible for a large proportion of deaths. So far, there is no effective treatment to combat this syndrome. Few studies have evaluated the effects of insulin (INS) and INS sensitizing agents, such as pioglitazone (PIO), on cancer cachexia, and the effective doses and effects of these drugs, particularly when associated, remain unknown. The aim of this study was to investigate the effects of INS treatments, alone or associated with PIO, both at various doses, on cachectic syndrome and related parameters in Walker-256 tumor-bearing rats. The isolated treatments with INS 9, 18 or 27 U/kg (sc) or with the association INS 18 U/kg (sc) + PIO 5, 10, 20 or 40 mg/kg (oral) were performed once a day, for 6 or 12 days, starting from the day of inoculation of the tumor cells in the rats. Isolated treatments with INS 9, 18 or 27 U/kg for 6 days did not significantly improve the loss of body mass and fat (retroperitoneal and epididymal) of tumor-bearing rats. However, 12-day treatments with INS 18 or 27 U/kg, but not 9 U/kg, similarly reduced loss of body mass and fat (retroperitoneal and epididymal). Treatments associated with INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 or 40 mg/kg, for 6 or 12 days, similarly prevented the body mass loss of tumor-bearing rats. The beneficial effects of these associations were accompanied by prevention of fat loss in rats treated for 6 (epididymal and mesenteric) and 12 (retroperitoneal, epididymal, mesenteric and inguinal subcutaneous) days. Rats treated for 12 days with the association INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg showed a gain in adipose mass (retroperitoneal and epididymal) compared to rats treated only with INS 18 U/kg. In agreement, the body mass gain of rats treated for 12 days with this association was greater (73.7%) than rats treated only with INS 18 U/kg (14.7%). The gain in body mass promoted by INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg was associated with improved INS peripheral sensitivity, reduced INS resistance-inducing circulating factors (triacylglycerols and free fatty acids) and increased expression of INS signaling pathway proteins (p-Akt) in adipose tissue (epididymal and inguinal subcutaneous). None of the treatments (alone or associated) changed tumor growth, muscle wasting and anorexia of tumor-bearing rats, except for INS 27 U/kg (12 days) which increased food intake. In conclusion, treatments with the associations INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 or 40 mg/kg were similarly more effective than treatment alone with INS 18 U/kg. The association INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg prevented the increase of INS resistance-inducing circulating factors (triacylglycerols and free fatty acids), prevented INS peripheral resistance, activated Akt, completely preserved adipose tissue and promoted important reduction in weight loss of tumor-bearing rats, showing promise in combating metabolic changes and fat loss, a predictor of survival, associated with cancer cachexia.

**Keywords:** cancer; weight loss; hypoinsulinemia; insulin resistance; pharmacological treatment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Efeitos da insulina e tiazolidinedionas (TZD) no metabolismo de lipídeos e proteínas em células adiposas e/ou musculares..... 19
- Figura 2** - Massa tumoral, ingestão alimentar e alteração de massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg..... 30
- Figura 3** - Massa do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg..... 31
- Figura 4** - Massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg..... 32
- Figura 5** - Massa tumoral, ingestão alimentar e alteração de massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg..... 34
- Figura 6** - Massa do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg..... 35
- Figura 7** - Massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg..... 36
- Figura 8** - Massa tumoral, ingestão alimentar e alteração de massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg..... 38
- Figura 9** - Massa do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d)

	e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg.....	39
<b>Figura 10</b>	- Massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg.....	40
<b>Figura 11</b>	- Massa tumoral, ingestão alimentar e alteração de massa corporal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg+ pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg .....	43
<b>Figura 12</b>	- Massa do tecido adiposo retroperitoneal, epididimal, mesentérico e subcutâneo inguinal de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg .....	44
<b>Figura 13</b>	- Massa dos músculos gastrocnêmio, EDL e sóleo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg .....	45
<b>Figura 14</b>	- Índice de caquexia e alteração de massa corporal de ratos portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d) tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg .....	46
<b>Figura 15</b>	- Glicemia de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg .....	48
<b>Figura 16</b>	- Glicemia e constante de desaparecimento da glicose (kITT), durante o teste de tolerância à insulina (ITT), em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de	

tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg .....	49
<b>Figura 17</b> - Triacilglicerol e ácidos graxos livres plasmáticos de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg.....	50
<b>Figura 18</b> - Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6) nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg.....	51
<b>Figura 19</b> - p-Akt e perilipina nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACL	Citrato-liase
AGL	Ácidos graxos livres
Akt (PKB)	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ATGL	Lipase de triacilglicerol
ATP	Adenosina trifosfato
C/EBP $\alpha$	Proteína de ligação CCAAT/potenciador $\alpha$
CGI-58	Proteína de identificação comparativa de genes 58
DGAT1	Diacilglicerol acetil-transferase-1
EDL	Extensor digital longo
eIF4E	Fator de iniciação 4E eucariótico
EPM	Erro padrão da média
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FATP	Proteína de transporte de ácidos graxos
FAS	Ácido graxo sintetase
FOXO-1	Proteína de caixa Forkhead-1
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GPT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
LHS	Lipase hormônio sensível
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à INS tipo 1
IKKb	Quinase inibitória b
IL1	Interleucina-1
IL6	Interleucina-6
INS	Insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina

KITT	Constante de decaimento da glicose
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LPL	Lipase de lipoproteínas
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MURF-1	Muscle ringe finger 1
NFkB	Fator nuclear kB
p-Akt	Akt fosforilada
PDK-1	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PI3K	Proteína quinase 3
PIF	Fator indutor de proteólise
PIO	Pioglitazona
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PIP2	Fosfatidilinositol-4-5 bisfosfato
PIP3	fosfatidilinositol-3-4-5 trisfosfato
PPAR $\gamma$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
P70SK6	Cinase S6 ribossomal p70
RXR	Receptor do ácido retinóico
SOCS3	Supressor da sinalização de citocina 3
SREBP-1c	Proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TGLs	Triacilgliceróis
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TZDs	Tiazolidinedionas
UA	Unidades arbitrárias
4Ebp1	Proteína de ligação 4E-1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
2.1	Geral .....	23
2.2	Específicos .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	Químicos .....	24
3.2	Animais e implantação do tumor Walker-256 .....	24
3.3	Tratamento .....	24
3.4	Avaliação do crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia .....	25
3.5	Avaliação da glicemia, resposta periférica para INS e dos TGLs e AGLs plasmáticos .....	26
3.6	Análises bioquímicas .....	26
3.7	Western blotting para avaliação da expressão de TNF $\alpha$ , IL6, p-Akt e perilipina .....	26
3.8	Análises estatísticas .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
4.1	Crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia em ratos com 6 e 12 dias de tumor .....	28
4.2	Efeitos do tratamento com INS (9U/kg), por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia .....	29
4.3	Efeitos do tratamento com INS (18 U/kg), por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia .....	33
4.4	Efeitos do tratamento com INS (27 U/kg), por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia .....	37
4.5	Efeitos dos tratamentos com INS (18U/kg) + PIO (5, 10, 20 ou 40 mg/kg), por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia .....	41

4.6	Efeitos dos tratamentos com INS (18 U/kg) e INS (18 U/kg) + PIO (5mg/kg), por 12 dias, sobre a glicemia e sensibilidade periférica à INS.....	47
4.7	Efeitos dos tratamentos com INS (18 U/kg) e INS (18 U/kg) + PIO (5 mg/kg), por 12 dias, sobre os TGLs e AGLs .....	50
4.8	Efeitos dos tratamentos com INS (18 U/kg) e INS (18 U/kg) + PIO (5 mg/kg), por 12 dias, sobre as citocinas TNF $\alpha$ e IL6 nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo .....	51
4.9	Efeitos dos tratamentos com INS (18 U/kg) e INS (18 U/kg) + PIO (5 mg/kg), por 12 dias, sobre a p-Akt e perilipina nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo .....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
	ANEXO A – Comitê de ética no uso de animais .....	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença grave, que se torna ainda mais séria, quando associada a um conjunto de desvios metabólicos que resultam em caquexia (FEARON et al., 2012; DAAS et al., 2018).

A caquexia do câncer é uma síndrome complexa caracterizada por progressiva perda de peso corpóreo, decorrente da acentuada perda de massa adiposa e muscular, causada pelo reduzido anabolismo e hipercatabolismo de lipídeos e proteínas (TISDALE, 2010a; FEARON et al., 2012; ARGILÉS, 2014). Geralmente está associada à anorexia, mas não é revertida pela suplementação nutricional (FEARON et al., 2011).

A caquexia é uma das complicações mais severas e frequentes do câncer avançado, sendo evidente em 60 a 80 % dos pacientes (ALBRECHT; CANADA, 1996). Grande parte das mortes por câncer não é causada diretamente pelos tumores, mas pela caquexia associada a esta doença (TISDALE, 2010b).

A perda de massa adiposa, assim como a de massa muscular, é um componente importante da síndrome caquética. No entanto, tem sido menos estudada, provavelmente pela presunção que a perda de proteína é mais prejudicial que a de gordura (FEARON et al., 2011). A perda de massa adiposa, quando acentuada, como ocorre na caquexia do câncer, merece atenção, visto que o tecido adiposo, considerado durante muito tempo como um órgão passivo, destinado apenas à reserva energética, secreta um conjunto de adipocinas, incluindo a leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6), capazes de regular direta e/ou indiretamente o metabolismo lipídico, proteico e de carboidratos em vários tecidos/órgãos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; RONTI; LUPATTELLI; MANNARINO, 2006; FISCHER-POSOVSZKY et al., 2007). Assim, a perda de massa adiposa pode causar alterações metabólicas e fisiológicas profundas não só no tecido adiposo, mas também em outros tecidos/órgãos.

A perda de gordura na caquexia do câncer está relacionada a mau prognóstico. Frequentemente precede a perda de massa muscular (FOULADIUN et al, 2005; DAHLMAN et al., 2010; DAS et al., 2011), podendo até ser mais pronunciada (FOULADIUN et al., 2005; EBADI; MAZURAK, 2014). Pacientes com câncer de pâncreas apresentaram maior perda de massa adiposa (40%) do que muscular (3,1%) (EBADI; MAZURAK, 2014). Adicionalmente, a acelerada perda de massa adiposa, mas não de massa muscular, foi relacionada à menor sobrevida nos pacientes com câncer de pâncreas (DALAL et al., 2012; DI SEBASTIANO et al., 2013). Além disso, pacientes

com câncer colorretal ou de pulmão apresentaram acelerada perda de gordura 2 a 7 meses antes da morte (MURPHY et al., 2010). Portanto, a perda de massa adiposa parece ser um preditor de sobrevida em pacientes com câncer, destacando a importância da preservação deste tecido.

A etiologia da caquexia do câncer é extremamente complexa, multifatorial e não totalmente conhecida. Fatores produzidos pelo tumor, como o fator mobilizador de lipídeos (LMF) e o fator indutor de proteólise (PIF), e citocinas produzidas pelo sistema imune em resposta à presença do tumor, como o TNF $\alpha$ , interleucina 1 (IL1) e IL6 são reconhecidos como mediadores da caquexia (TISDALE, 2010b; FEARON et al., 2012; ARGILÉS, 2014). Estas moléculas estimulam processos catabólicos e inibem processos anabólicos, promovendo o caos metabólico. O PIF, TNF $\alpha$  e a IL6 aumentam a apoptose de miócitos e a proteólise e reduzem a proteogênese, causando perda de massa muscular (TISDALE 2001; TISDALE, 2010b; ROHM et al., 2019). O LMF, TNF $\alpha$  e as citocinas IL1 $\alpha$  e IL6 estimulam a lipase hormônio sensível (LHS), a enzima que degrada os triacilgliceróis (TGLs) em ácidos graxos livres (AGLs) e glicerol, aumentando a lipólise (ARNER; LANGIN, 2014). O TNF $\alpha$ , a IL1 $\alpha$  e IL6 inibem a lipase de lipoproteínas (LPL) endotelial (BERG et al., 1994), a enzima que degrada os TGLs da circulação, diminuindo a oferta de AGLs para a síntese de lipídeos nos adipócitos (lipogênese). O TNF $\alpha$  também aumenta a apoptose de pré-adipócitos e adipócitos e diminui a adipogênese, contribuindo para a acentuada perda de massa adiposa em portadores de câncer (MARTIGNONI et al., 2003; ARGILÉS et al., 2003, 2005a; ARRUDA et al., 2010; BATISTA et al., 2012; BELUZI et al., 2015).

Além destes mediadores clássicos da caquexia, a hipoinsulinemia, causada pela reduzida secreção de insulina (INS) (FERNANDES et al., 1990; SILVA et al., 2017), assim como a resistência à INS, promovida pelo aumento de TNF $\alpha$ , IL6 e AGLs (WAGNER; PETRUZZELLI, 2015), frequentemente presentes em portadores de câncer (ROFE et al., 1994; ASP et al., 2010; TISDALE, 2010a; HONORS; KINZIG, 2012; DE MORAIS et al., 2017), também poderiam contribuir para a síndrome caquética, uma vez que a INS exerce potentes efeitos anabólicos e anti-catabólicos no metabolismo de lipídeos e proteínas (WILCOX, 2005; DEV et al., 2018).

A maioria dos efeitos da INS no metabolismo lipídico e proteico ocorre por uma via de sinalização (Figura 1) que envolve sua ligação ao receptor tirosina quinase (IR), seguida por fosforilação em tirosina do IR e do substrato do IR (IRS1), ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), conversão do fosfatidilinositol-4-5 bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3-4-5 trisfosfato (PIP3), ativação da proteína quinase dependente de

fosfoinosítídeos (PDK1) e consequente fosforilação/ativação da Akt (proteína quinase B) (CARVALHEIRA et al., 2002). A Akt ativada por fosforilação (p-Akt) induz um número de moléculas à jusante, as quais regulam a atividade e/ou a expressão de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e proteico, resultando na ativação da lipogênese e proteogênese (efeitos anabólicos) (EGERMAN; GLASS, 2014; VISCARRA et al, 2017), na inibição da lipólise e proteólise (efeitos anti-catabólicos) (HONORS; KINZIG, 2012; ZHANG; LIU; LIU, 2017), e também na ativação da adipogênese (KIM et al., 1998; DOWELL et al., 2003; ZHANG et al., 2009; CZECH et al., 2013) (Figura 1).

O aumento de TNF $\alpha$ , IL6 e também de AGLs, resultantes da intensa lipólise em portadores de câncer (ROFE et al., 1994; NOGUCHI et al., 1998), causam resistência insulínica por interferirem negativamente na via de sinalização da INS (PI3K/Akt) (Figura 1). O TNF $\alpha$  e os intermediários do metabolismo dos AGLs (acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas) ativam serina-quinases, enzimas que fosforilam proteínas da via de sinalização da INS (IR e IRS1) em resíduos de serina, diminuindo sua fosforilação em tirosina, e consequentemente a fosforilação da Akt (p-Akt) (KANETY et al., 1995; NOGUCHI et al., 1998; WARNE; 2003; SCHINNER et al., 2005; DELARUE; MAGNAN, 2007). Por sua vez, a IL6 aumenta a expressão de SOCS3, uma proteína que se associa ao IR suprimindo sua fosforilação em tirosina e, consequentemente, a ativação da via PI3K/Akt (SENN et al., 2002).

Assim, a resistência à INS induzida por estes fatores (TNF $\alpha$ , IL6 e AGLs), em conjunto com a hipoinsulinemia presente em portadores de câncer, poderiam exacerbar a perda de massa adiposa e muscular causadas pelos mediadores clássicos da caquexia (LMF, PIF, TNF $\alpha$ , IL1 e IL6) e agravarem ainda mais o quadro caquético.

A síndrome caquética é caracterizada por debilitação, fraqueza generalizada, perda de habilidade motora e fadiga, o que reduz a capacidade física e prejudica a qualidade de vida dos pacientes oncológicos. Esta síndrome também diminui a tolerância e a resposta aos tratamentos oncológicos convencionais e aumenta as complicações cirúrgicas, elevando as taxas de mortalidade, sendo de grande relevância clínica (FEARON et al., 2011; ARGILÉS et al., 2014; PORPORATO, 2016; SCHMIDT et al., 2018; ARGILÉS; BUSQUETS; LOPEZ-SORIANO, 2019). Por tornar os pacientes menos responsivos a quimioterapia e radioterapia, a síndrome caquética é considerada um mau prognóstico durante o tratamento oncológico, sendo de grande relevância que medidas de intervenção sejam tomadas na tentativa de amenizar a gravidade do quadro caquético e auxiliar na evolução do tratamento.

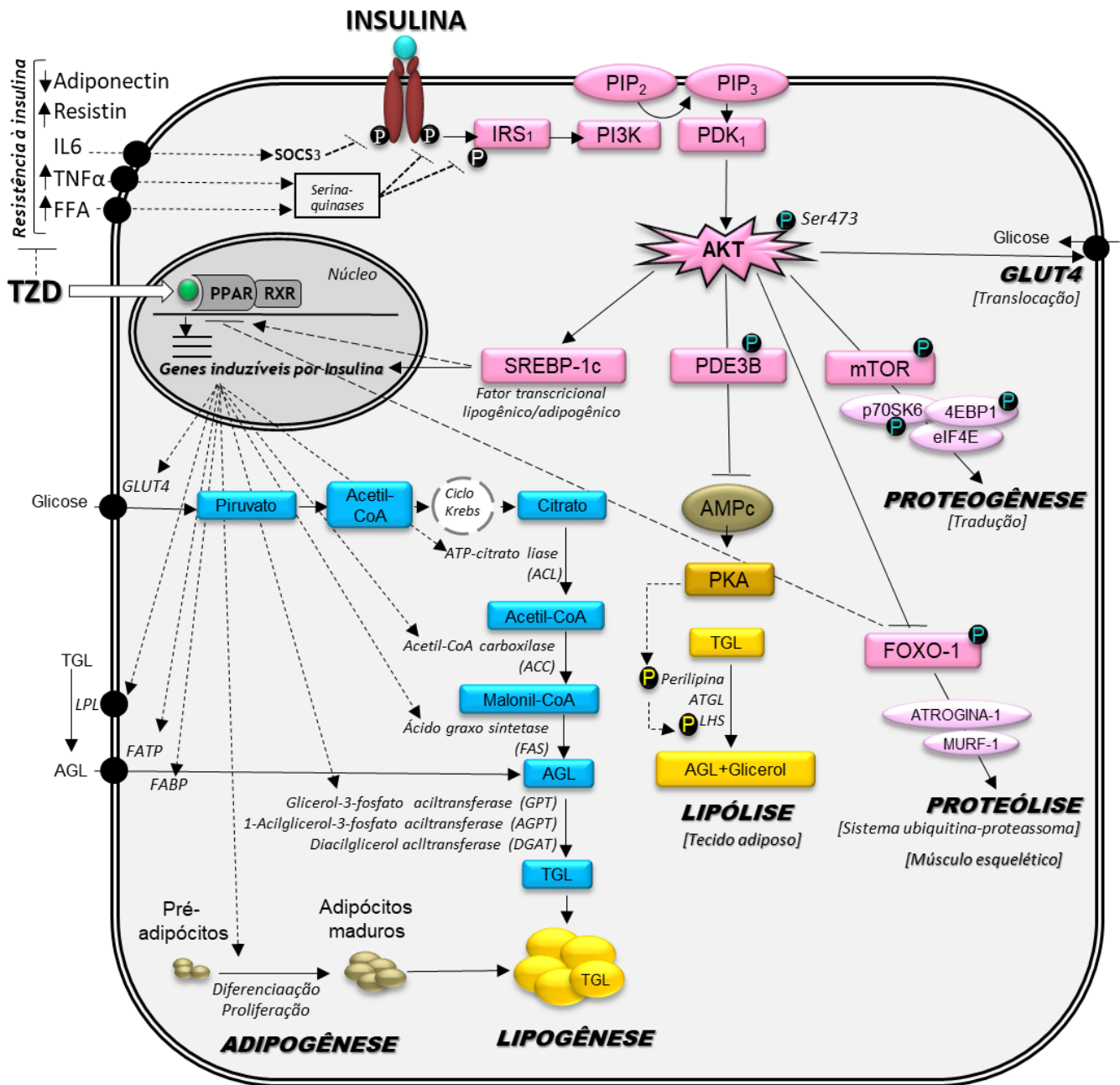


Figura 1. Efeitos da insulina e tiazolidinedionas (TZD) no metabolismo de lipídeos e proteínas em células adiposas e/ou musculares. AGL, ácido graxos livre; AKT, proteína quinase B; AMPc, adenosina monofosfato cíclica; ATGL, lipase de triacilglicerol; 4EBP1, proteína de ligação 4E-1; eIF4E, fator de iniciação eucariótico 4E; FABP, proteína de ligação de ácidos graxos; FATP, proteína transportadora de ácidos graxos; FOXO-1, proteína de caixa *Forkhead-1*; GLUT4, transportador de glicose 4; IL6, interleucina 6; IRS1, substrato do receptor de insulina 1; LHS, lipase hormônio sensível; LPL, lipase de lipoprotéínas; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; PDE3B, fosfodiesterase 3B; PDK1, proteína quinase dependente de fosfoinositídeos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato; PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato; PKA, proteína quinase dependente de AMPc; PPAR, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; P70S6, cinase S6 ribossomal p70; RXR, receptor do ácido retinóico; SOCS3, supressor da sinalização de citocina 3; SREBP-1c, proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis; TGL, triacilglicerol; TNFα, fator de necrose tumoral α. ( ), estimulação; ( ), inibição

Neste sentido, algumas terapias têm sido propostas, tais como tratamentos com INS ou agentes sensibilizadores da INS, com o intuito de atenuar a caquexia do câncer.

Embora ainda escassos, alguns estudos têm mostrado melhora clínica em portadores de câncer tratados com INS. Um estudo clínico mostrou que o tratamento com INS de longa duração em pacientes com caquexia do câncer promoveu ganho de peso, aumento da gordura corporal e melhora na qualidade de vida e sobrevivência (LUNDHOLM et al., 2007). O tratamento com INS também melhorou o peso corporal e a ingestão alimentar em modelos animais de câncer (MOLEY et al., 1985; FERNANDES et al., 1991; CHEN; QIU, 2011). Adicionalmente, estudos do nosso laboratório mostraram que o tratamento com altas doses de INS NPH (40 U/kg) (DE MORAIS et al., 2017), mas não com baixa dose (1 U/kg) (SILVA et al., 2017), aumentou a ingestão alimentar, preveniu a perda de massa adiposa retroperitoneal e de massa corpórea, porém acentuou a perda de massa muscular, em ratos portadores de tumor Walker-256 (DE MORAIS et al., 2017).

Com relação aos agentes sensibilizadores de INS, poucos estudos também têm avaliado seus efeitos na perda de peso associada ao câncer. Estudos do nosso laboratório mostraram que o tratamento com metformina, um fármaco sensibilizador de INS da classe das biguanidas, as quais atuam principalmente por ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), não foi capaz de atenuar a resistência à INS e nem a caquexia em ratos portadores de Walker-256 (SILVA et al., 2018).

No entanto, estudos com outros sensibilizadores de INS, da classe das tiazolidinedionas (TZDs), mostraram resultados positivos sobre a resistência à INS e caquexia do câncer (ASP et al., 2010; TROBEC et al., 2014; BELUZI et al., 2015; SILVA et al., 2017).

As TZDs são agonistas sintéticos (ligantes) do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) (Figura 1), desenvolvidas para o tratamento do diabetes tipo 2. O PPAR $\gamma$  é um fator de transcrição pertencente à família de receptores nucleares, altamente expresso no tecido adiposo (NAJAN et al., 2018). Este fator transcricional (PPAR $\gamma$ ) desempenha papel central na adipogênese (JANANI & KUMARI, 2015), um processo altamente regulado, que engloba a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, seguida por lipogênese para armazenamento dos lipídeos nas células adiposas (EBADI & MAZURAK, 2014) (Figura 1).

A ativação do PPAR $\gamma$  facilitou o processo adipogênico, aumentando o número de novos adipócitos pequenos (heperplasia), os quais produzem mais adiponectina, uma

adipocina sensibilizadora de INS, e menos adipocinas inflamatórias (indutoras de resistência à INS). A ativação do PPAR $\gamma$  também aumentou a apoptose de adipócitos maiores, os quais produzem menos adiponectina e são os principais responsáveis pela liberação de AGLs, TNF $\alpha$  e IL6 (fatores indutores de resistência à INS) (OKUNO et al., 1998; LARSEN; TOUBRO; ASTRUP, 2003; QUEIROZ et al., 2009). Por ativarem o PPAR $\gamma$ , as TZDs aumentam a expressão de genes responsáveis pela captação e armazenamento de lipídeos no tecido adiposo (lipogênese), incluindo a LPL, proteínas transportadoras de AGLs (FATP) e proteínas ligantes de AGLs (FABP), reduzindo as concentrações circulantes de TGLs e AGLs e, assim, a sua lipotoxicidade no músculo e fígado, melhorando a sinalização da INS nestes tecidos (EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008; NANJAN et al., 2018). Além disso, as TZDs são capazes de reduzir a liberação de adipocinas que promovem resistência à INS, como o TNF $\alpha$  (PERALDI; XU; SPIELGELMAN, 1997) e a resistina (STEPPAN et al., 2001) e de aumentar a liberação de adiponectina, a qual melhora a sensibilidade à INS (YAMAUCHI et al., 2001a; LIU et al., 2011) (Figura 1).

Tratamentos com as TZDs, rosiglitazona e pioglitazona (PIO), melhoraram a resistência insulínica e a caquexia em modelos animais de câncer. O tratamento com rosiglitazona melhorou a sensibilidade à INS, restabeleceu a adiponectina, a qual se encontrava diminuída, e preveniu a perda de peso, principalmente pela manutenção dos estoques lipídicos em ratos portadores de adenocarcinoma de cólon-26 (ASP et al., 2010). O tratamento com rosiglitazona também reduziu a perda de peso, por preservar tanto da massa adiposa quanto a muscular, em ratos portadores de hepatoma de Yoshida AH-130 (TROBEC et al., 2014). Da mesma forma, o tratamento com PIO 5 mg/kg preservou a massa de tecido adiposo retroperitoneal, reduziu a anorexia e a massa tumoral, e aumentou a sobrevivência de ratos portadores de tumor Walker-256 (BELUZI et al., 2015). O tratamento também aumentou a expressão gênica da adiponectina, LPL, assim como do PPAR $\gamma$  e da proteína de ligação CCAAT/potenciador  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) (BELUZI et al., 2015), dois fatores adipogênicos que se encontram diminuídos nos ratos portadores de tumor Walker-256 (BATISTA et al., 2012). Resultados do nosso laboratório mostraram que o tratamento com PIO (5 mg/kg) diminuiu os AGLs plasmáticos, melhorou a sensibilidade periférica à INS, preservou a massa de tecido adiposo retroperitoneal e reduziu parcialmente a perda de peso em ratos portadores de tumor Walker-256 (SILVA et al., 2017).

Em suma, observa-se que os tratamentos tanto com INS, como com PIO, mostraram efeitos benéficos sobre a caquexia em ratos portadores de tumor Walker-

256. No entanto, alta dose de INS (40 U/kg), embora tenha diminuído significativamente a perda de massa adiposa e corpórea, acentuou a perda de massa muscular (DE MORAIS et al., 2017), e baixa dose INS (1 U/kg) não apresentou efeitos benéficos (SILVA et al., 2017). Então, considerando que a dose eficaz de INS, que produz efeitos benéficos sem efeitos adversos, ainda não é conhecida, o presente trabalho buscou encontrar a dose eficaz de INS e associá-la a diferentes doses de PIO, com o intuito de encontrar resultados mais promissores para o tratamento da caquexia do câncer.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar os efeitos dos tratamentos com INS, isolada ou associada à PIO, na caquexia e parâmetros metabólicos relacionados em ratos portadores de tumor Walker-256.

### 2.2 Específicos

Avaliar, em ratos portadores de tumor Walker-256, os efeitos dos tratamentos, por 6 e 12 dias, com INS (9, 18 ou 27 U/kg), isolada ou associada à PIO (5, 10, 20 ou 40 mg/kg), sobre:

- a) Crescimento tumoral;
- b) Parâmetros de caquexia-anorexia: massa corpórea, massa adiposa visceral e subcutânea, massa muscular e ingestão alimentar;
- c) Glicemia e sensibilidade periférica à INS;
- d) Fatores plasmáticos indutores de resistência à INS: TGLs e AGLs;
- e) Fatores teciduais indutores de resistência à INS: expressão de TNF $\alpha$  e IL6 nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo;
- f) Proteínas da via de sinalização da INS: expressão da Akt fosforilada (p-Akt) nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo;
- g) Proteínas da via lipolítica: expressão da perilipina nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Químicos

A INS glargina (Lantus®) foi adquirida da Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. (Frankfurt AmMain, Alemanha), a INS regular (Humalog®) da Eli Lilly do Brasil (Rio de Janeiro, Brasil) e a PIO (Actos®) da Abbott Laboratories (Chicago, USA). Os kits enzimáticos para dosagens de glicose foram provenientes da Laborclin (Pinhais/PR, Brasil). Anticorpos primários foram adquiridos da Cell Signalling Technology® (Danvers, USA), Abcam® (Cambridge, USA), Invitrogen (Califórnia, USA) e Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). Os anticorpos secundários foram provenientes da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

### 3.2 Animais e implantação do tumor Walker-256

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, registro nº 10414). Foram utilizados 229 ratos machos Wistar (220-230 g), abastecidos livremente com água e dieta padrão de laboratório (Nuvilab®). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas, a uma temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e com um ciclo claro/escuro de 12 hs.

Para a implantação do tumor, células do carcinossarcoma Walker-256, mantidas no laboratório por passagens intraperitoneais a cada 7 dias em ratos (CASSOLA et al., 2012) foram suspensas em tampão salina fosfato (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e fosfato 16,5 mM, pH 7,4) e sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão de azul de tripan em câmara de Neubauer. As células viáveis, na concentração de  $8 \times 10^7$  células/rato, foram inoculadas subcutaneamente (sc) no flanco direito traseiro dos ratos anestesiados intraperitonealmente (ip) com tiopental (50 mg/kg). Ratos saudáveis receberam PBS no mesmo local.

### 3.3 Tratamentos

Foi utilizada a INS glargina (Lantus®), um análogo da insulina humana, de ação prolongada, com perfil de concentração no sangue relativamente estável ao longo do tempo (18 hs) e com decréscimo lento de sua concentração no período de 20 a 24 hs, o que mantém sua concentração e seus efeitos relativamente constantes, e permite uma única administração ao dia (BOLLI; OWENS, 2000).

Ratos portadores de tumor Walker-256 foram tratados com INS glargina (9,18 ou 27 U/kg, sc), isolada ou associada com PIO (5, 10, 20 ou 40 mg/kg, gavagem), uma vez ao dia (9 hs), durante 6 ou 12 dias, a partir do dia inoculação das células tumorais. As doses de INS e PIO foram baseadas em estudos prévios em ratos diabéticos (SCHASCHKOW et al., 2016; LUIPPOLD et al., 2016) e portadores de tumor (BELUZI et al., 2015; SILVA et al., 2017; DE MORAIS et al., 2017). Ratos controle (portadores de tumor e saudáveis) receberam veículo (água ou salina) no lugar dos fármacos. Os experimentos foram realizados depois de 6 ou 12 dias de tratamentos. Vale ressaltar que ratos portadores de tumor Walker-256 sobrevivem em média 14 dias.

Os tratamentos foram feitos por 6 ou 12 dias porque, nos tratamentos por 6 dias, os ratos apresentam menor grau de caquexia (6 dias de tumor), podendo ser mais responsivos aos tratamentos, porém o tempo de tratamento é menor. Por outro lado, nos tratamentos por 12 dias, os ratos apresentam maior grau de caquexia (12 dias de tumor), podendo ser menos responsivos aos tratamentos, porém o tempo de tratamento é maior, o que pode mostrar melhor a sua eficácia.

### **3.4 Avaliação do crescimento tumoral e de parâmetros de caquexia-anorexia**

Ratos de todos os grupos foram alojados em gaiolas metabólicas individuais para análise da ingestão alimentar, a qual foi calculada pela diferença entre a quantidade ofertada e a sobra de ração em um período de 24 hs. Posteriormente, os ratos foram pesados, anestesiados com tiopental (50 mg/kg/ip) e submetidos ao teste de tolerância à INS (ITT). Ao término do ITT, a veia cava (porção caudal) foi cortada para a eutanásia dos animais, por dessangramento, e os tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico e subcutâneo inguinal, assim como os músculos gastrocnêmio, extensor digital longo (EDL) e sóleo, e também o tumor e as metástases, foram cuidadosamente removidos e pesados. A alteração de massa corporal foi calculada pela diferença entre a massa corporal inicial (dia 0) e final (dia 6 ou 12), descontando a massa tumoral total (tumor no flanco + metástases). O índice de caquexia foi calculado de acordo com a equação adiante, onde: MIT= massa corpórea inicial do animal com tumor; MFT= massa corpórea final do animal com tumor; MT= massa do tumor; GMS= ganho de massa do grupo saudável (controle).

$$\text{Índice de caquexia (\%)} = \frac{[\text{MIT} - \text{MFT} + (\text{MT}) + \text{GMS}]}{(\text{MIT} + \text{GMS})} \times 100$$

### **3.5 Avaliação da glicemia, resposta periférica à INS e dos TGLs e AGLs plasmáticos**

A glicemia foi avaliada em ratos alimentados, 4, 8, 12 e 24 hs pós-últimos tratamentos com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg. Ratos saudáveis e portadores de tumor (controles) receberam veículo (água ou salina) no lugar dos fármacos. Amostras de sangue para determinação da glicemia foram coletadas da veia cava (porção caudal), após laparotomia dos ratos previamente anestesiados com tiopental (50 mg/kg/ip).

A resposta periférica para INS foi avaliada por meio do ITT. Para a realização deste teste, INS regular (0,25 U/kg) foi administrada endovenosamente (veia cava, porção caudal) nos ratos previamente anestesiados com tiopental (50 mg/kg/ip). Amostras de sangue, para avaliação da glicemia, foram coletadas da veia cava (porção caudal) 0 (basal) 5, 10 e 15 min após a injeção de INS. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (kITT), um indicador da resposta periférica para INS, foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 5 e 15 min após a injeção de INS, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA et al., 1989; SERAPHIM et al., 2001). Amostras de sangue, coletadas no tempo 0 min, foram usadas para determinação dos TGLs e AGLs.

### **3.6 Análises bioquímicas**

A concentração de glicose no plasma foi medida pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974), as de TGLs por método enzimático baseado na reação de Trinder (1969) e as de AGLs pelo método de Falholt e colaboradores (1973).

### **3.7 Western blotting para avaliação da expressão de TNF $\alpha$ , IL6, p-Akt e perilipina**

Amostras de tecido adiposo visceral (epididimal) e subcutâneo (inguinal) foram homogeneizadas em tampão contendo 10 mM de EDTA, 100 mM de Tris base, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1% (vol/vol) de Triton X-100 e 1  $\mu$ g/ml de aprotinina. Após incubação de 30 min à 4°C, o homogenato foi centrifugado (12000 g, 20 min, 4°C) para remoção do material insolúvel. As proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) tendo como base uma curva padrão de albumina.

Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão Laemmli e aquecidas a 100°C por 5 min. Alíquotas com concentrações proteicas semelhantes (30  $\mu$ l) foram

aplicadas em gel de poliacrilamida (Tris acrilamida 10 ou 12%), no aparato de eletroforese (Mini-PROTEAN®, Bio-Rad, EUA), em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad, EUA). Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose que foi incubada por 1 h em solução basal (0,15 M de NaCl; 0,01M de Tris base e 0,05% de Tween® 20) contendo 5% de leite em pó desnatado para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. As membranas foram então incubadas, *overnight* à 4°C, com anticorpos primários anti-p-Akt<sup>ser473</sup> (Cell signaling Cat. 9171, diluição 1:1000), anti-perilipina 1 (Invitrogen, Cat. PA5-67907, diluição 1:1000), anti-IL6 (Abcam, Cat. ab6672, diluição 1:500), anti-TNF $\alpha$  (Abcam, Cat. ab1793, diluição 1:500) e anti-tubulina (Sigma-Aldrich, Cat. T5268, diluição 1:30000). Após este procedimento, as membranas foram lavadas em solução basal e incubadas com anticorpos secundários (Thermo Fisher Scientific, Cat. 31430 ou Cat. 31460), por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem em solução basal, as bandas proteicas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente Super Signal West Fento (Thermo Fisher Scientific, EUA) no equipamento AmershamImager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada utilizando o programa *Image J* (National Institutes of Health, EUA). Os valores obtidos foram normalizados pela quantificação da proteína constitutiva tubulina e expressos em unidades arbitrárias (UA).

### **3.8 Análises estatísticas**

A distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown Forsythe) foram analisadas e testes estatísticos apropriados, indicados nas legendas das figuras, foram utilizados para análise dos resultados. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### **4.1 Crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia em ratos com 6 e 12 dias de tumor.**

Ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram massa tumoral total (flanco+metástases) entre 7 a 10 g no dia 6 (Figuras 2A, 5A, 8A e 11A) e entre 20 a 30 g no dia 12 de desenvolvimento tumoral (Figuras 2B, 5B, 8B e 11B).

A ingestão alimentar dos ratos com 6 dias de tumor foi similar (Figuras 2C, 5C, 8C e 11C), enquanto a dos ratos com 12 dias de tumor foi menor (anorexia) ( $p < 0,05$ ) que a dos ratos saudáveis (Figuras 2D, 5D, 8D e 11D).

Ratos com 6 (Figuras 2E, 5E, 8E e 11E) e 12 (Figuras 2F, 5F, 8F e 11F) dias de tumor apresentaram perda ( $p < 0,05$ ) de massa corporal (caquexia) em comparação aos ratos saudáveis, a qual mostrou-se mais acentuada no dia 12, em comparação ao dia 6 de desenvolvimento tumoral.

Ratos com 6 dias de tumor não apresentaram redução significativa das massa dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figuras 3A, 6A, 9A e 12A), epididimal (Figuras 3C, 6C, 9C e 12C), mesentérico (Figura 12E) e subcutâneo inguinal (Figura 12G) em comparação aos saudáveis, enquanto nos ratos com 12 dias de tumor, as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figuras 3B, 6B, 9B e 12B), epididimal (Figuras 3D, 6D, 9D e 12D), mesentérico (Figura 12F) e subcutâneo inguinal (Figura 12H) foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ), em comparação aos saudáveis.

Nos ratos com 6 dias de tumor, as massas dos músculos gastrocnêmio (Figuras 4A, 7A, 10A e 13A), EDL (Figuras 4C, 7C, 10C e 13C) e sóleo (Figuras 4E, 7E, 10E e 13E) foram similares à dos ratos saudáveis, enquanto nos ratos com 12 dias de tumor, as massas dos músculos gastrocnêmio (Figuras 4B, 7B, 10B e 13B) e EDL (Figuras 4D, 7D, 10D e 13D) foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) e as do músculo sóleo (Figuras 4F, 7F, 10F e 13F) foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ), em comparação aos ratos saudáveis.

#### **4.2 Efeitos do tratamento com INS 9U/kg, por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia.**

O tratamento com INS 9 U/kg, por 6 dias, não teve efeito sobre o crescimento do tumor (Figura 2A) e a ingestão alimentar (Figura 2C), não preveniu a perda de massa corpórea (Figura 2E) e nem alterou as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 3A), epididimal (Figura 3C) e dos músculos gastrocnêmico (Figura 4A), EDL (Figura 4C) e sóleo (Figura 4E) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

O tratamento com INS 9 U/kg, por 12 dias, também não afetou significativamente o acelerado crescimento do tumor (Figura 2B), a redução da ingestão alimentar (anorexia) (Figura 2D), a acentuada perda de massa corpórea (caquexia avançada) (Figura 2F) e a perda de massa dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 3B), epididimal (Figura 3D) e dos músculos gastrocnêmico (Figura 4B) e EDL (Figura 4D), e não teve efeito sobre o músculo sóleo (Figura 4F) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

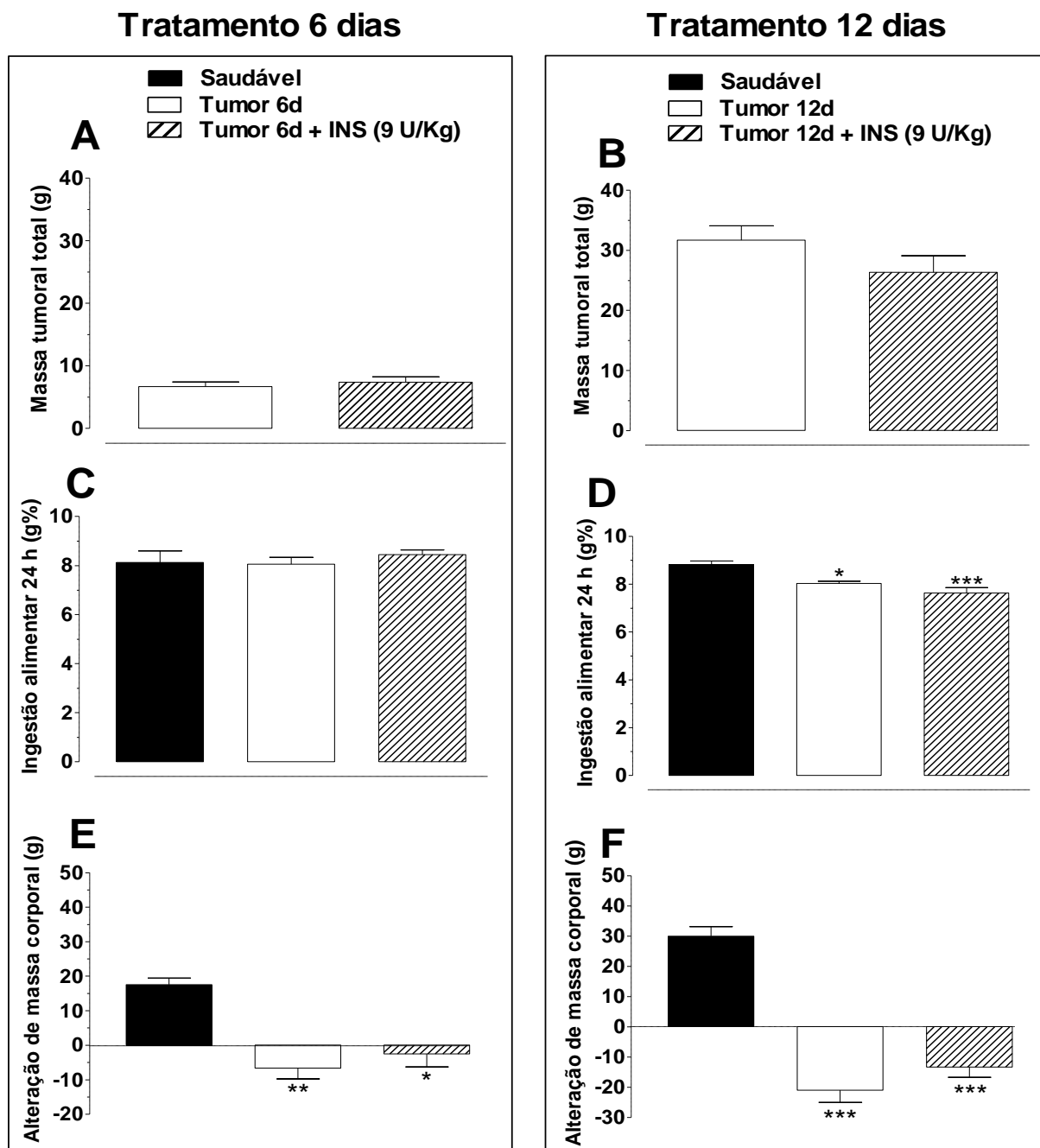


Figura 2. Massa tumoral (A,B), ingestão alimentar (C,D) e alteração de massa corporal (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 19 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

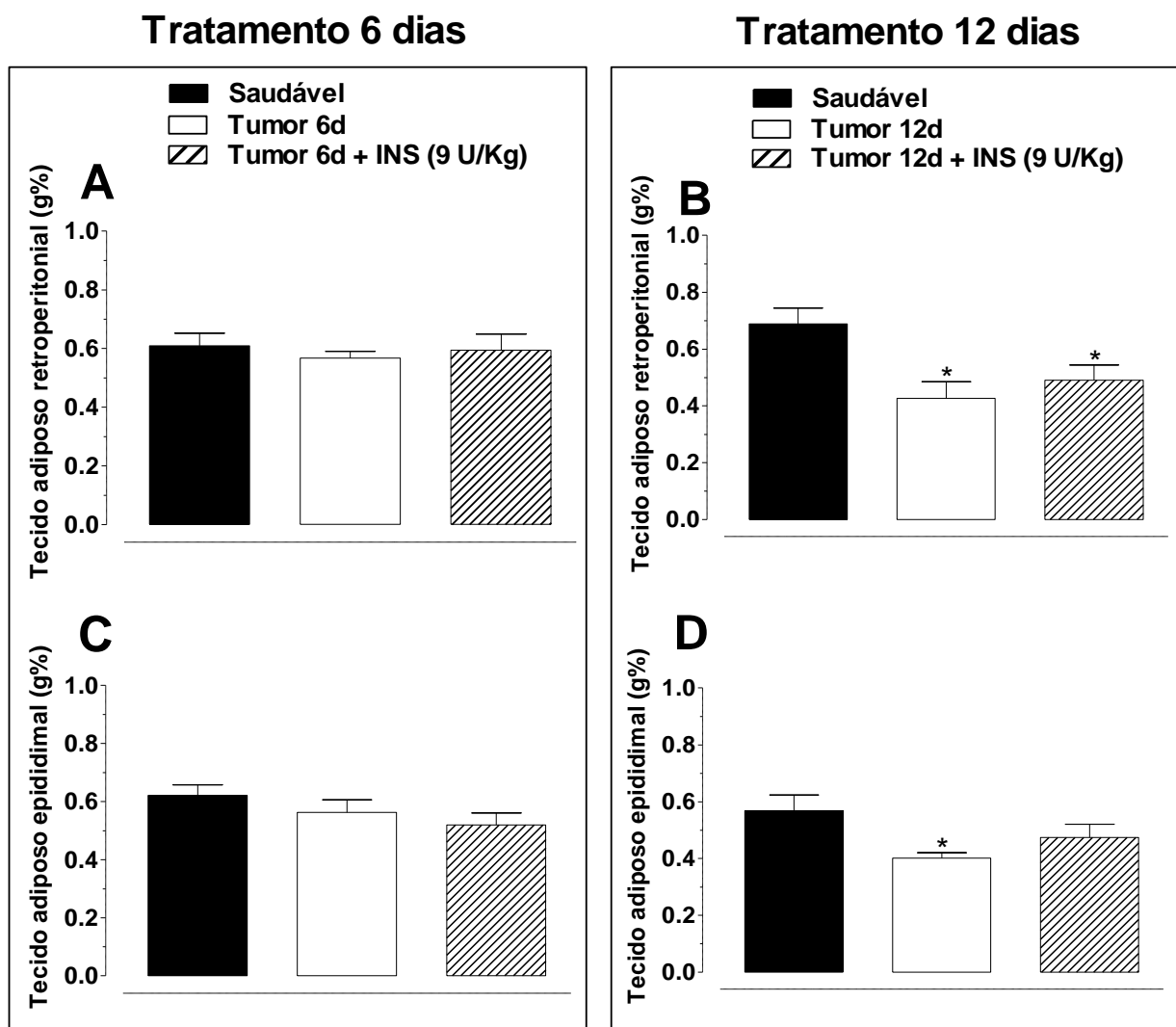


Figura 3. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A,B) e epididimal (C,D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 13 ratos. \* $p < 0,05$  vs Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

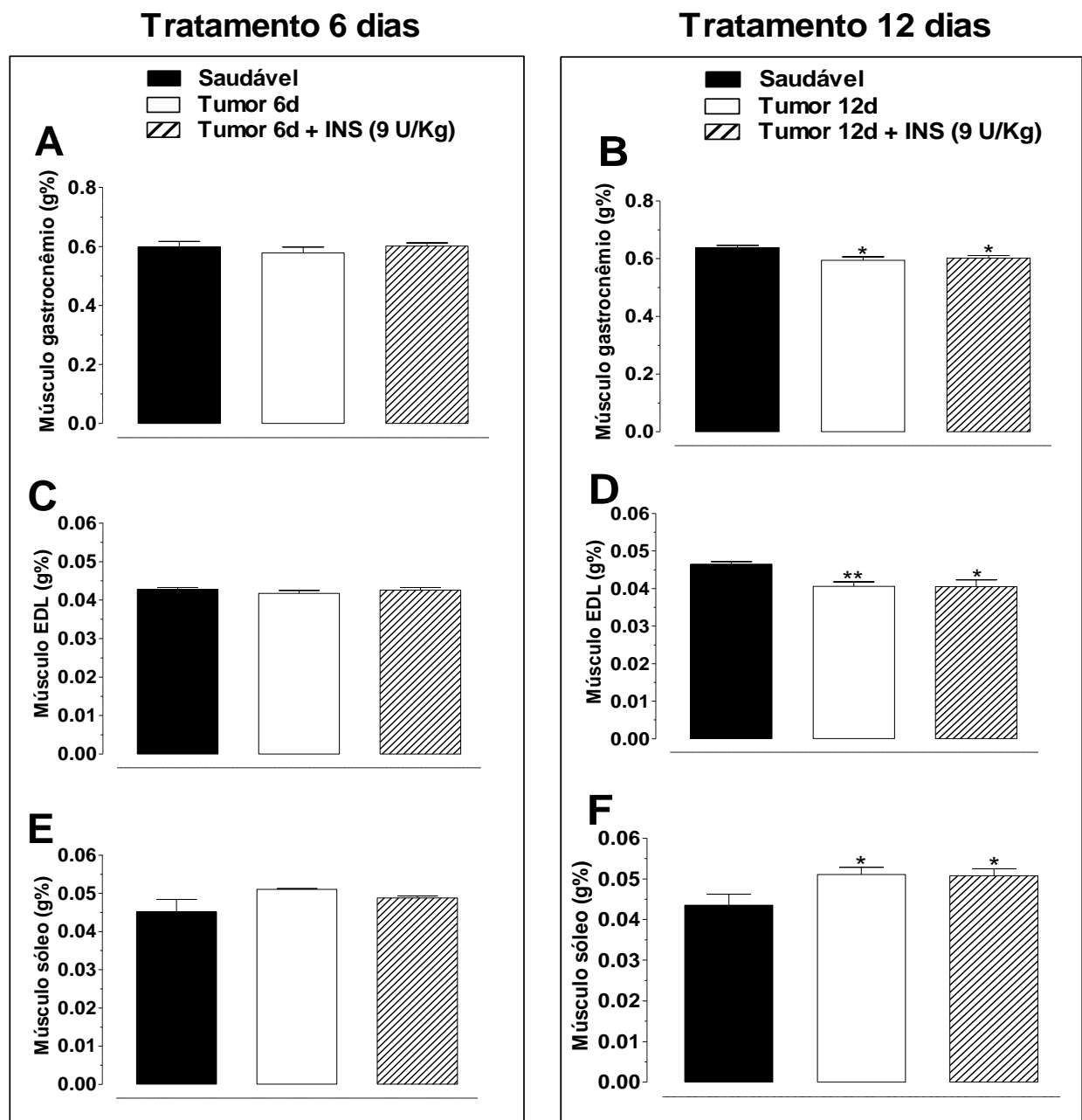


Figura 4. Massa dos músculos gastrocnêmio (A,B), EDL (C,D) e sóleo (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 9 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 13 ratos. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### **4.3 Efeitos do tratamento com INS 18 U/kg, por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia.**

O tratamento com INS 18 U/kg, por 6 dias, também não teve efeito sobre o crescimento do tumor (Figura 5A) e a ingestão alimentar (Figura 5C), não reduziu significativamente a perda de massa corpórea (Figura 5E) e nem alterou as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 6A), epididimal (Figura 6C) e dos músculos gastrocnêmico (Figura 7A), EDL (Figura 7C) e sóleo (Figura 7E) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

O tratamento com INS 18 U/kg, por 12 dias, também não afetou o crescimento do tumor (Figura 5B) e a ingestão alimentar (Figura 5D), mas reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a perda de massa corpórea (Figura 5F) e dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 6B) e epididimal (Figura 6D). Esse tratamento também não alterou as massas dos músculos gastrocnêmico (Figura 7B), EDL (Figura 7D) e sóleo (Figura 7F) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

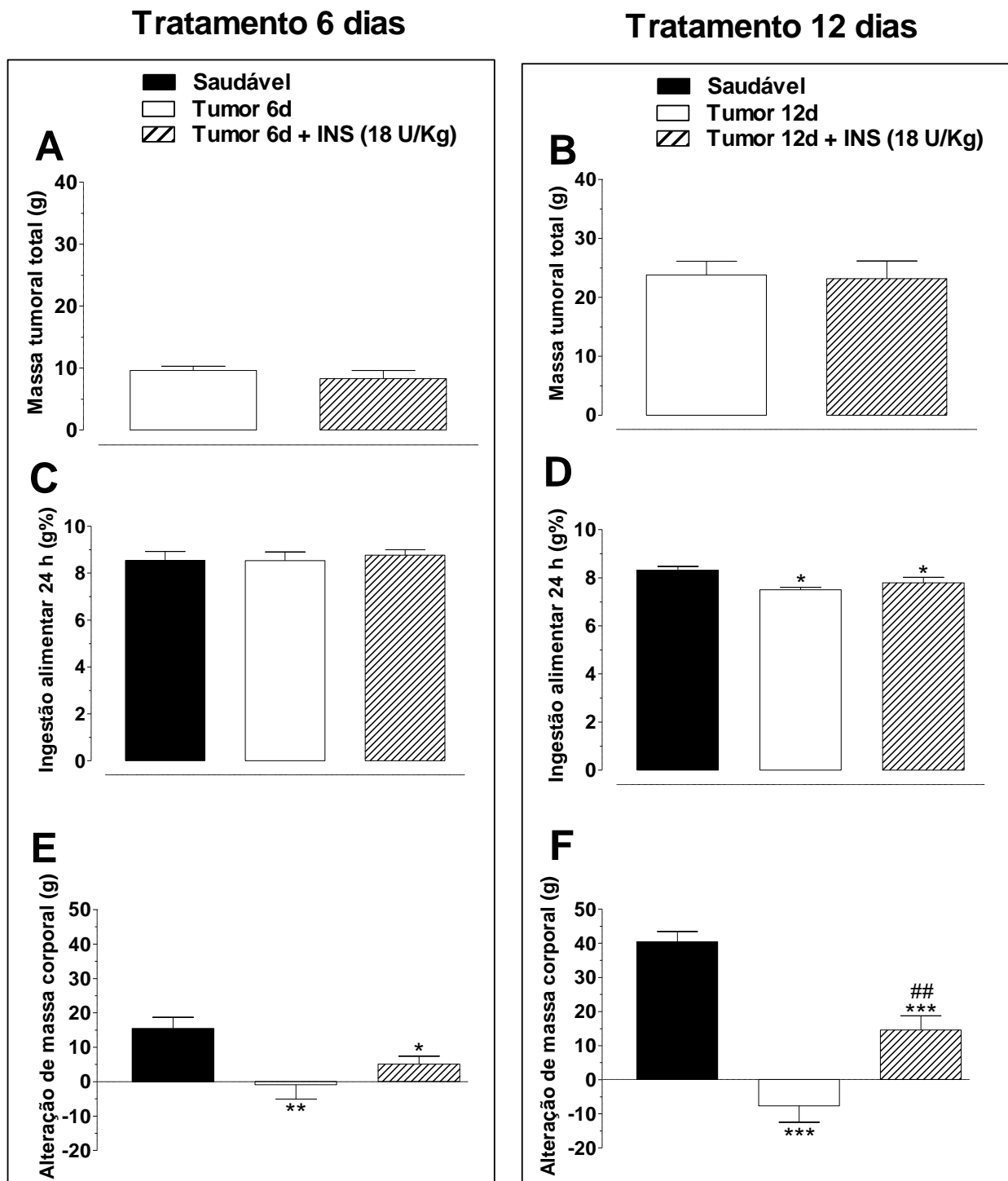


Figura 5. Massa tumoral (A,B), ingestão alimentar (C,D) e alteração de massa corporal (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 6 a 16 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; ### $p < 0,01$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

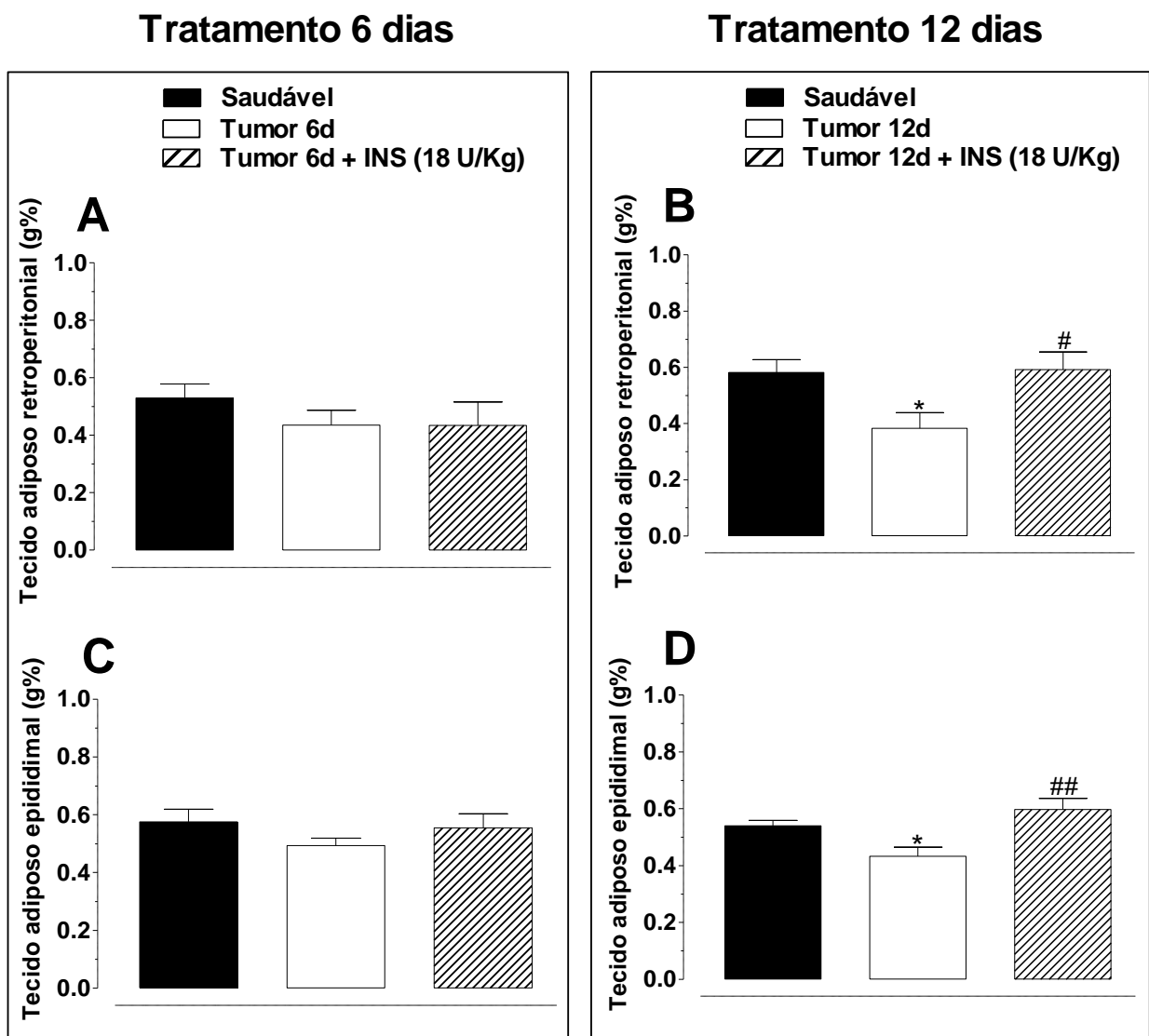


Figura 6. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A,B) e epididimal (C,D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 7 a 16 ratos. \* $p < 0,05$  vs Saudável; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

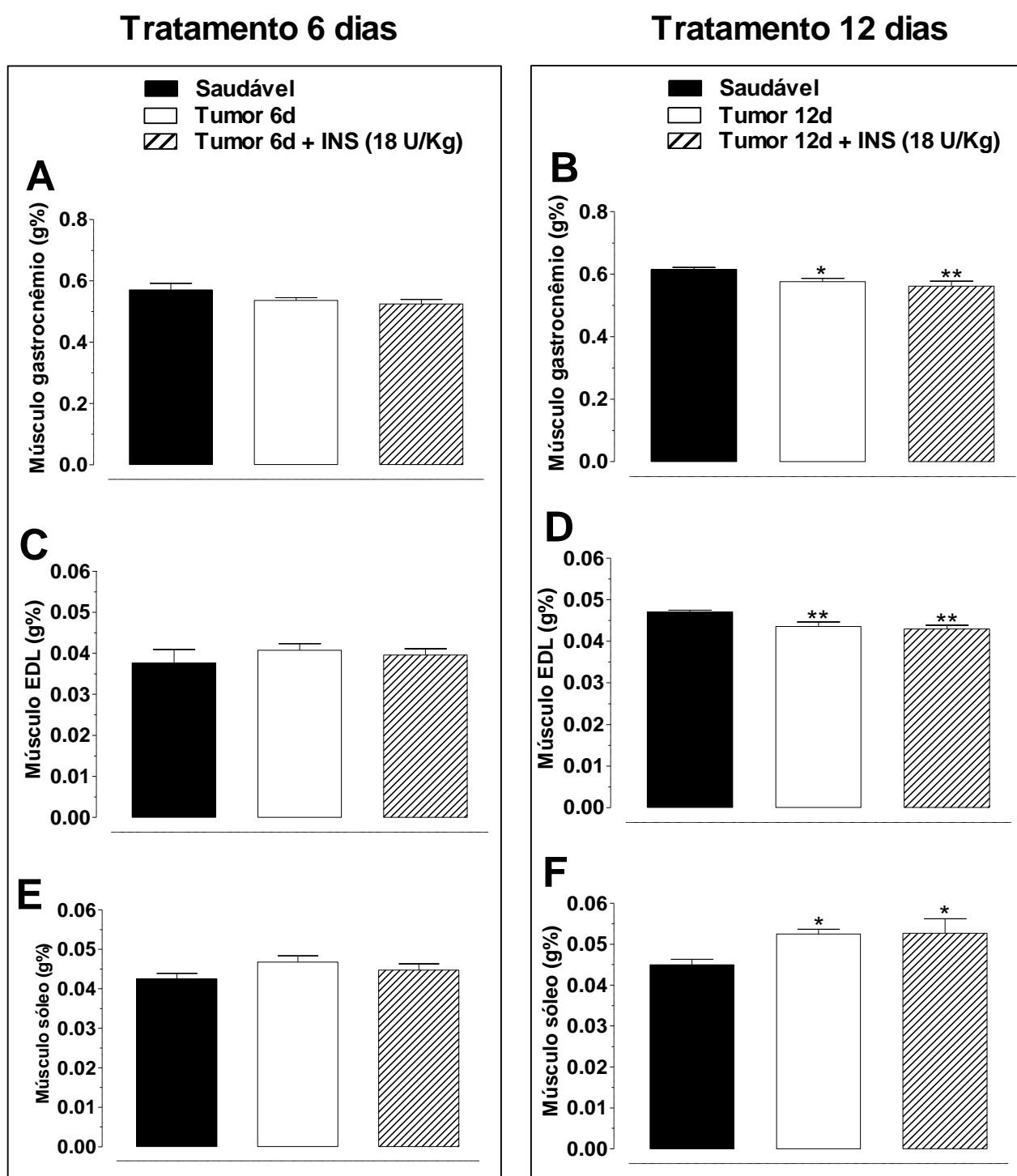


Figura 7. Massa dos músculos gastrocnêmio (A,B), EDL (C,D) e sóleo (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 7 a 17 ratos. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### **4.4 Efeitos do tratamento com INS 27 U/kg, por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia.**

O tratamento com INS 27 U/kg, por 6 dias, também não teve efeito sobre o crescimento do tumor (Figura 8A) e ingestão alimentar (Figura 8C), não reduziu significativamente a perda de massa corpórea (Figura 8E) e nem alterou as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 9A), epididimal (Figura 9C) e dos músculos gastrocnêmico (Figura 10A), EDL (Figura 10C) e sóleo (Figura 10E) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

O tratamento com INS 27 U/kg, por 12 dias, também não afetou o crescimento do tumor (Figura 8B), mas aumentou ( $p < 0,05$ ) a ingestão alimentar (Figura 8F) e reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a perda de massa corpórea (Figura 8D), em comparação aos ratos com tumor não tratados. A ingestão alimentar dos ratos que receberam INS 27 U/kg foi maior ( $p < 0,05$ ) que dos ratos saudáveis.

O tratamento por 12 dias com INS 27 U/kg também preveniu ( $p < 0,05$ ) a perda dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 9B) e epididimal (Figura 9D), mas não preveniu a perda de massa dos músculos gastrocnêmico (Figura 10B) e EDL (Figura 10D) e nem alterou a massa do sóleo (Figura 10F) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

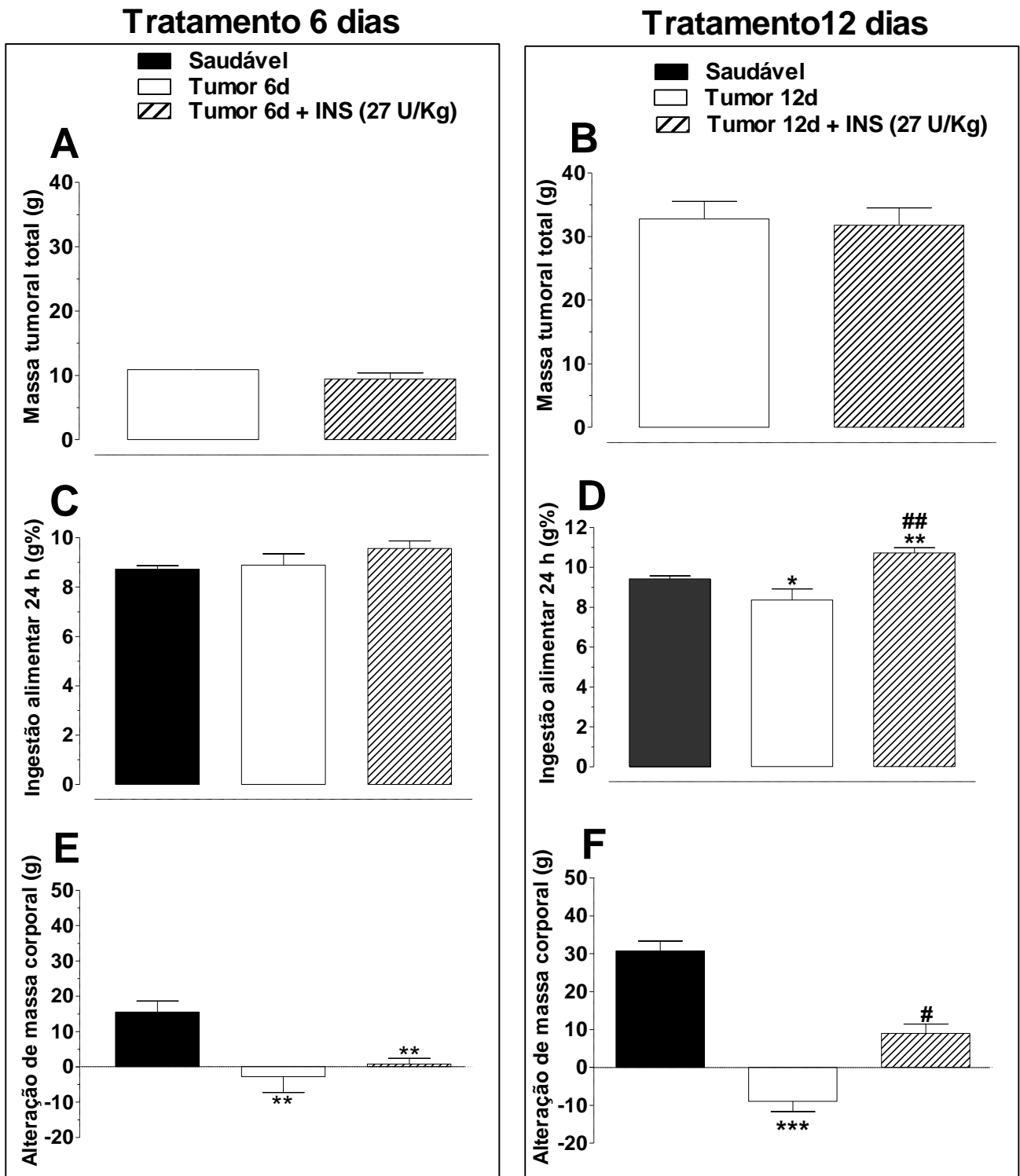


Figura 8. Massa tumoral (A,B), ingestão alimentar (C,D) e alteração de massa corporal (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg, a partir do dia

da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 14 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs saudável; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

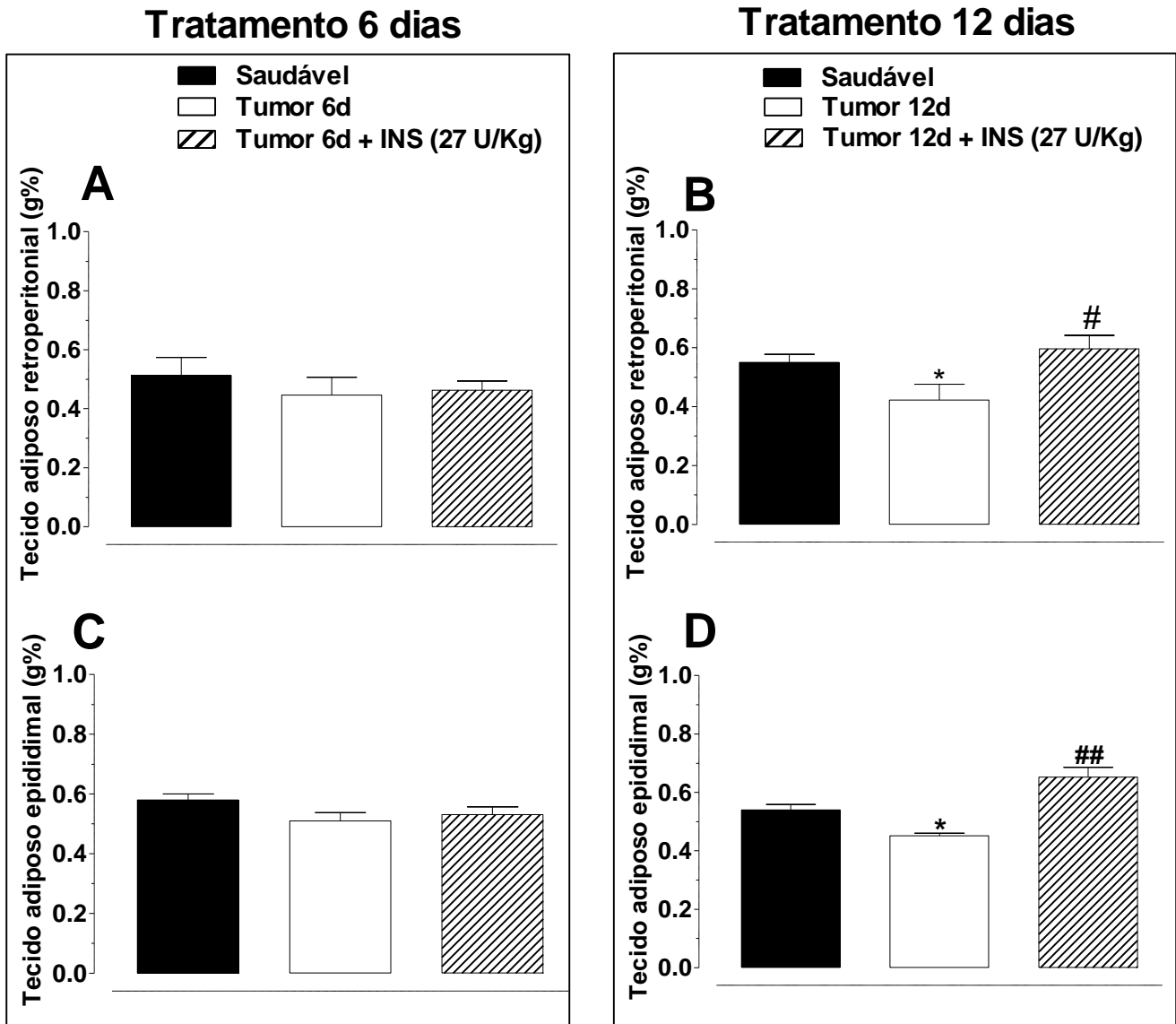


Figura 9. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A,B) e epididimal (C,D) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 8 a 16 ratos. \* $p < 0,05$  vs saudável; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

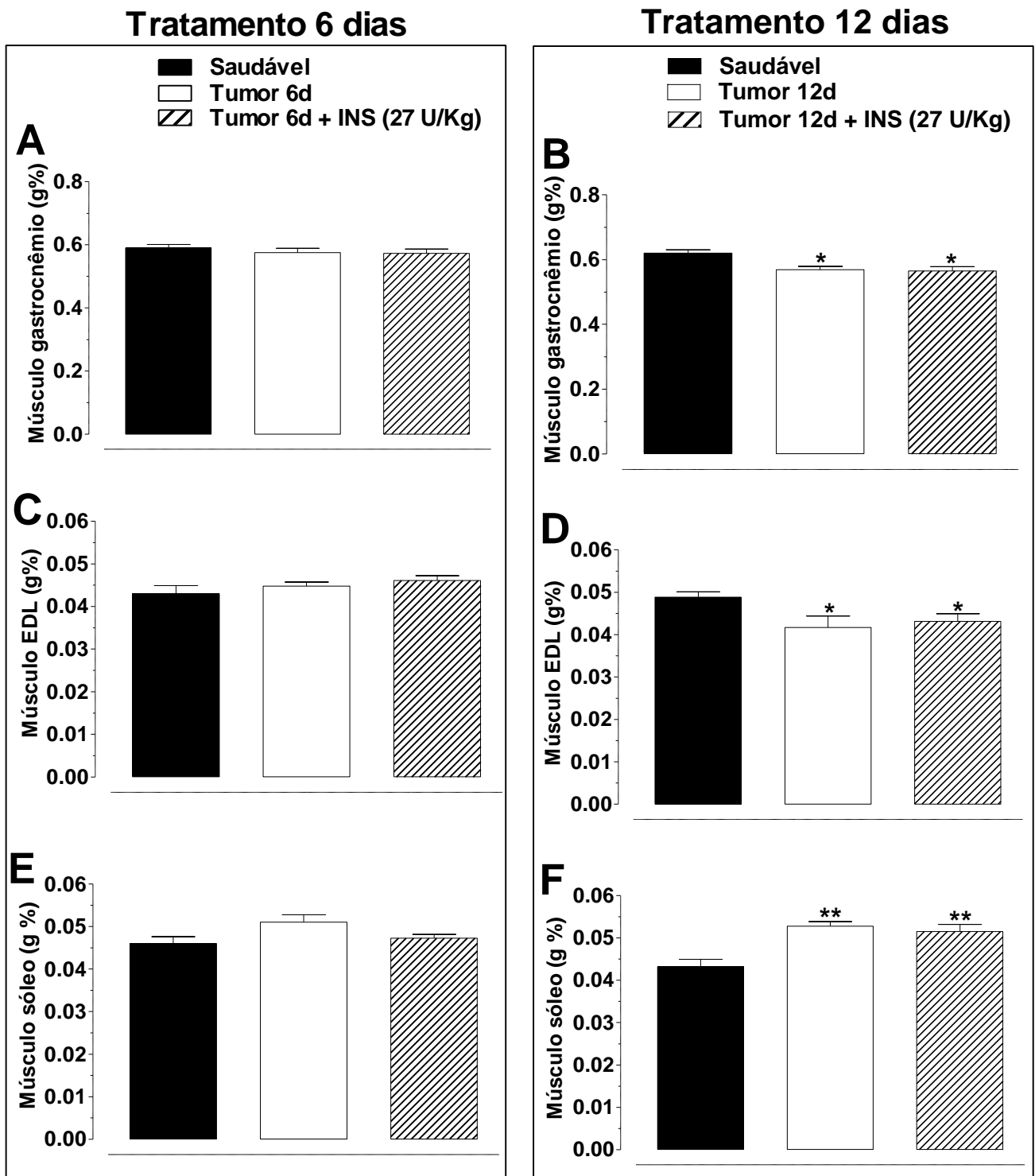


Figura 10. Massa dos músculos gastrocnêmio (A,B), EDL (C,D) e sóleo (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 27 U/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 8 a 14 ratos. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs

Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### **4.5 Efeitos dos tratamentos com INS 18U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, por 6 e 12 dias, sobre o crescimento tumoral e parâmetros de caquexia-anorexia.**

O tratamento, por 6 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg não afetou o crescimento tumoral (Figura 11A) e a ingestão alimentar (Figura 11C). Entretanto, a associação INS 18 U/kg + PIO 10, 20 ou 40 mg/kg reduziu significativamente ( $p<0,05$ ) a perda de massa corpórea dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados (Figura 11E). As associações INS 18 U/kg + PIO 20 ou 40 mg/kg promoveram maior ( $p<0,05$ ) ganho de massa corpórea dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos tratados isoladamente com INS 18 U/kg (Figura 11E). As associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg não alteraram as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (Figura 12A) e subcutâneo inguinal (Figura 12G). Contudo, a INS 18 U/kg + PIO 10, 20 ou 40 mg/kg aumentou ( $p<0,05$ ) a massa adiposa epididimal dos ratos portadores de tumor em comparação aos ratos com tumor não tratados, e a INS 18 U/kg + PIO 40 mg/kg aumentou ( $p<0,05$ ) a massa deste tecido em comparação aos ratos com tumor tratados isoladamente com INS 18 U/kg (Figura 12C). As associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg também aumentaram a massa adiposa mesentérica dos ratos portadores de tumor em comparação aos ratos com tumor não tratados (Figura 12E). O tratamento, por 6 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg não afetou as massas dos músculos gastrocnêmico (Figura 13A), EDL (Figura 13C) e sóleo (Figura 13E) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

Os tratamentos, por 12 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg também não afetaram o crescimento tumoral (Figura 11B) e a ingestão alimentar (Figura 11D). Entretanto, estas associações reduziram significativamente ( $p<0,05$ ) a perda de massa corpórea dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados (Figura 11F). O ganho de massa corporal dos ratos tratados com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg foi similar ( $p>0,05$ ) ao dos ratos saudáveis, enquanto dos ratos tratados só com INS 18 U/kg foi menor ( $p<0,05$ ) (Figura 11F). A associação INS 18 U/kg + PIO 20 mg/kg aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) o ganho de massa corpórea dos ratos portadores de tumor, enquanto as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10 ou 40 mg/kg não promoveram aumento significativo, em comparação aos ratos tratados com INS 18 U/kg (Figura 11F).

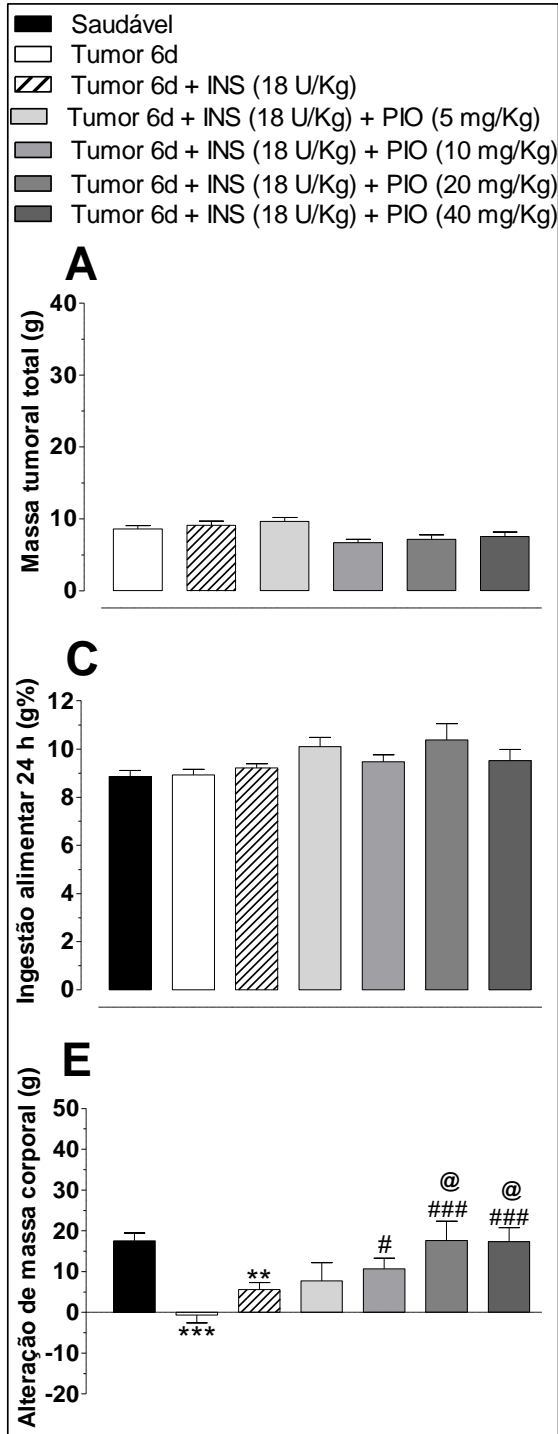
As associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg preveniram ( $p < 0,05$ ) a perda de massa do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 12B), epididimal (Figura 12D), mesentérico (Figura 12F) e subcutâneo inguinal (Figura 12H) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados. O ganho de massa adiposa retroperitoneal (Figura 12B), mesentérica (Figura 12F) e subcutânea inguinal (Figura 12H) dos ratos tratados com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg foi similar, enquanto a do tecido adiposo epididimal (Figura 12D) foi maior ( $p < 0,05$ ) que a dos ratos saudáveis. A associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg aumentou ( $p < 0,05$ ) o ganho de massa adiposa retroperitoneal (Figura 12B), enquanto as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg aumentaram ( $p < 0,05$ ) o ganho de massa adiposa epididimal (Figura 12D), em comparação aos ratos tratados isoladamente com INS 18 U/kg. Os tratamentos, por 12 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg não preveniram a perda de massa dos músculos gastrocnêmico (Figura 13B) e EDL (Figura 13D) e nem alteraram a massa do músculo sóleo (Figura 13F) dos ratos portadores de tumor, em comparação aos ratos com tumor não tratados.

Com relação ao índice de caquexia, o qual corresponde à porcentagem (%) de perda de massa corpórea, nota-se que ratos com 12 dias de tumor perderam aproximadamente 16% da massa corpórea e que os tratamentos com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg diminuíram ( $p < 0,05$ ) o índice de caquexia. Os tratamentos associados com INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg mostraram efeitos benéficos praticamente similares na prevenção da perda de peso (índice de caquexia), os quais foram mais benéficos que o tratamento isolado com INS, para a associação INS 18 U/kg + 20 mg/kg (Figura 14A).

Diante das similaridades de efeitos benéficos das associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, a associação com a menor dose de PIO (INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg) foi selecionada para seguir adiante nas análises (ITT, bioquímicas e moleculares).

Os grupos selecionados para estas análises subsequentes são mostrados na Figura 14B. Um grupo extra, tratado somente com PIO 5 mg/kg, e que não seguiu nas análises posteriores, também foi incluído na Figura 14B. Este grupo foi feito apenas para propósito comparativo da % de alteração de massa corporal. O ganho de massa corporal dos ratos tratados com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg representou 73,7% do ganho dos ratos saudáveis (100%), sendo maior que a soma dos ganhos de massa corporal dos ratos tratados isoladamente com INS 18 U/kg (14,7%) ou PIO 5 mg/kg (13,1%) (Figura 14B).

### Tratamento 6 dias



### Tratamento 12 dias

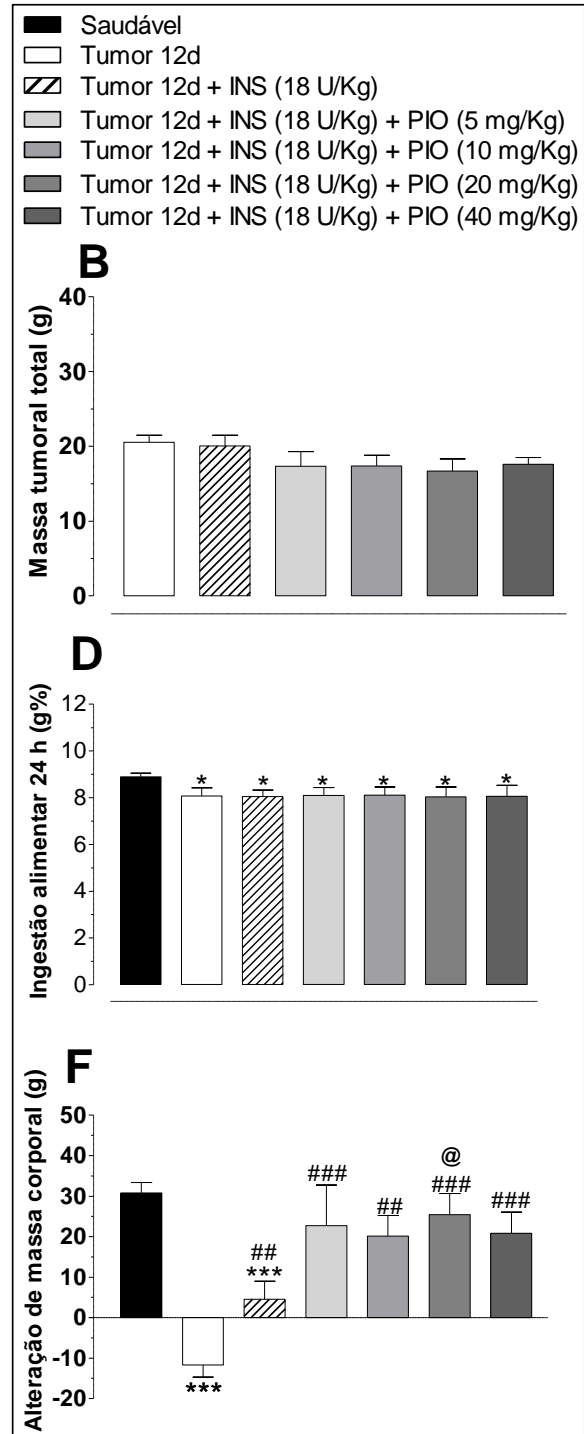
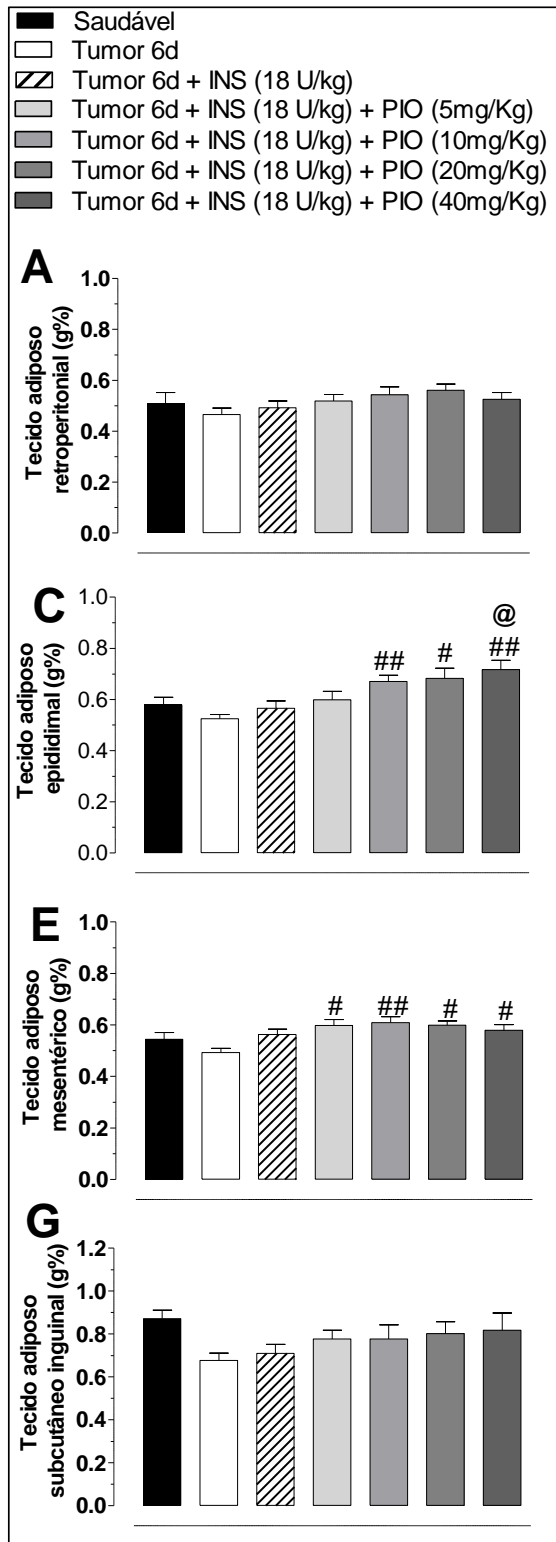


Figura 11. Massa tumoral (A,B), ingestão alimentar (C,D) e alteração de massa corporal (E,F) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg +

pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 19 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  vs Tumor e @ $p < 0,05$  vs INS (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

### Tratamento 6 dias



### Tratamento 12 dias

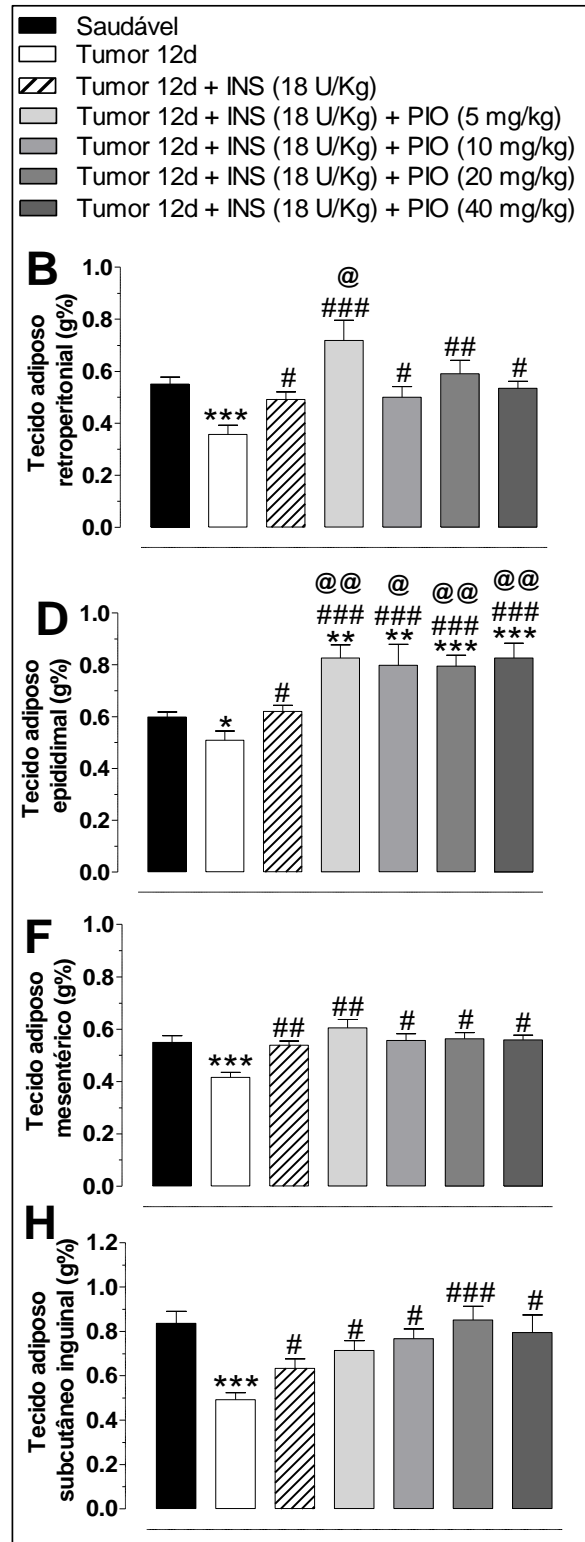


Figura 12. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A,B), epididimal (C,D), mesentérico (E, F) e subcutâneo inguinal (G, H) de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 7 a 19 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  vs Tumor; @ $p < 0,05$  e @@ $p < 0,01$  vs INS (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

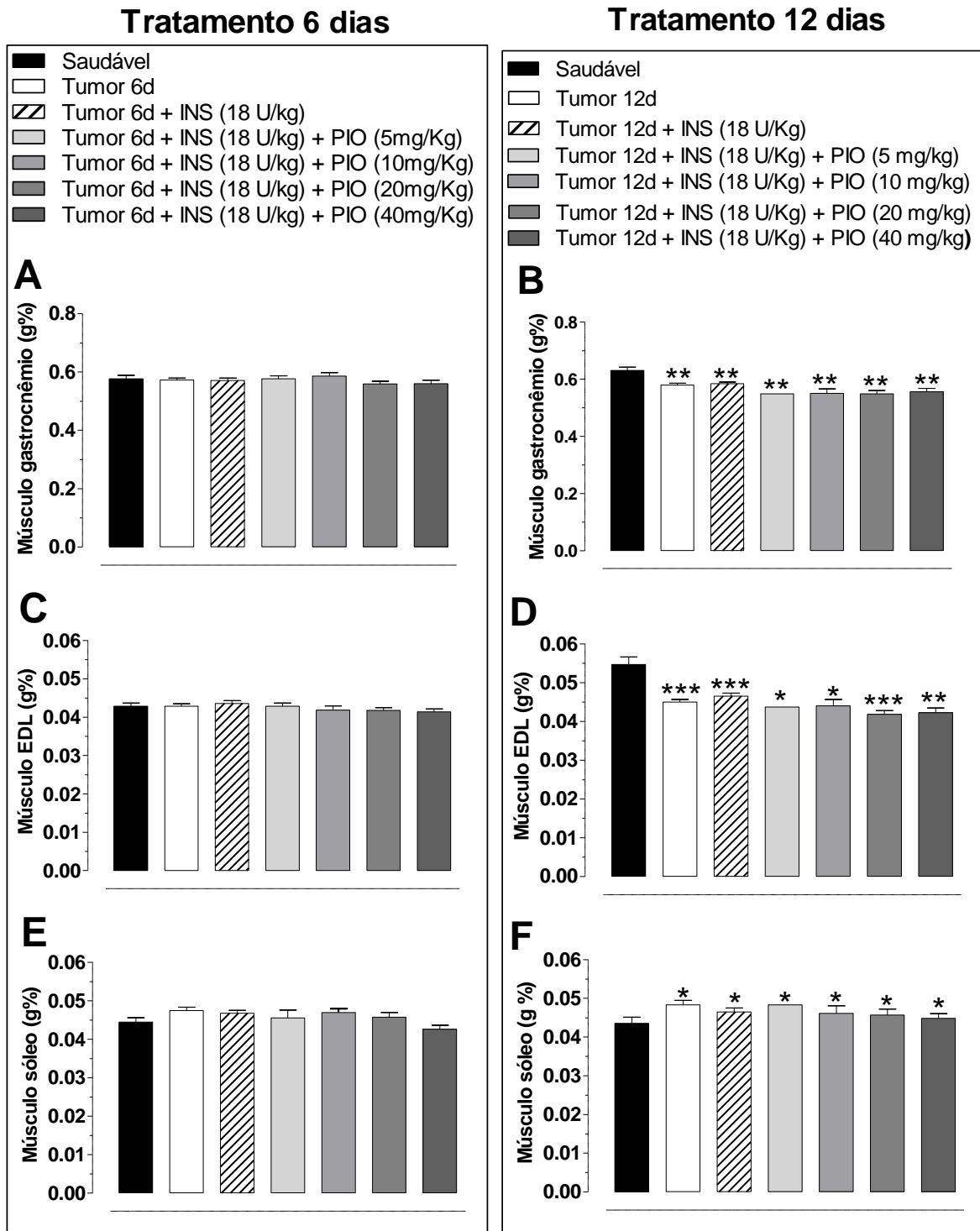


Figura 13. Massa dos músculos gastrocnêmio (A,B), EDL (C,D) e sóleo (E,F) de ratos

saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 6 (Tumor 6d) e 12 (Tumor 12d) dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 7 a 19 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

### Tratamento 12 dias

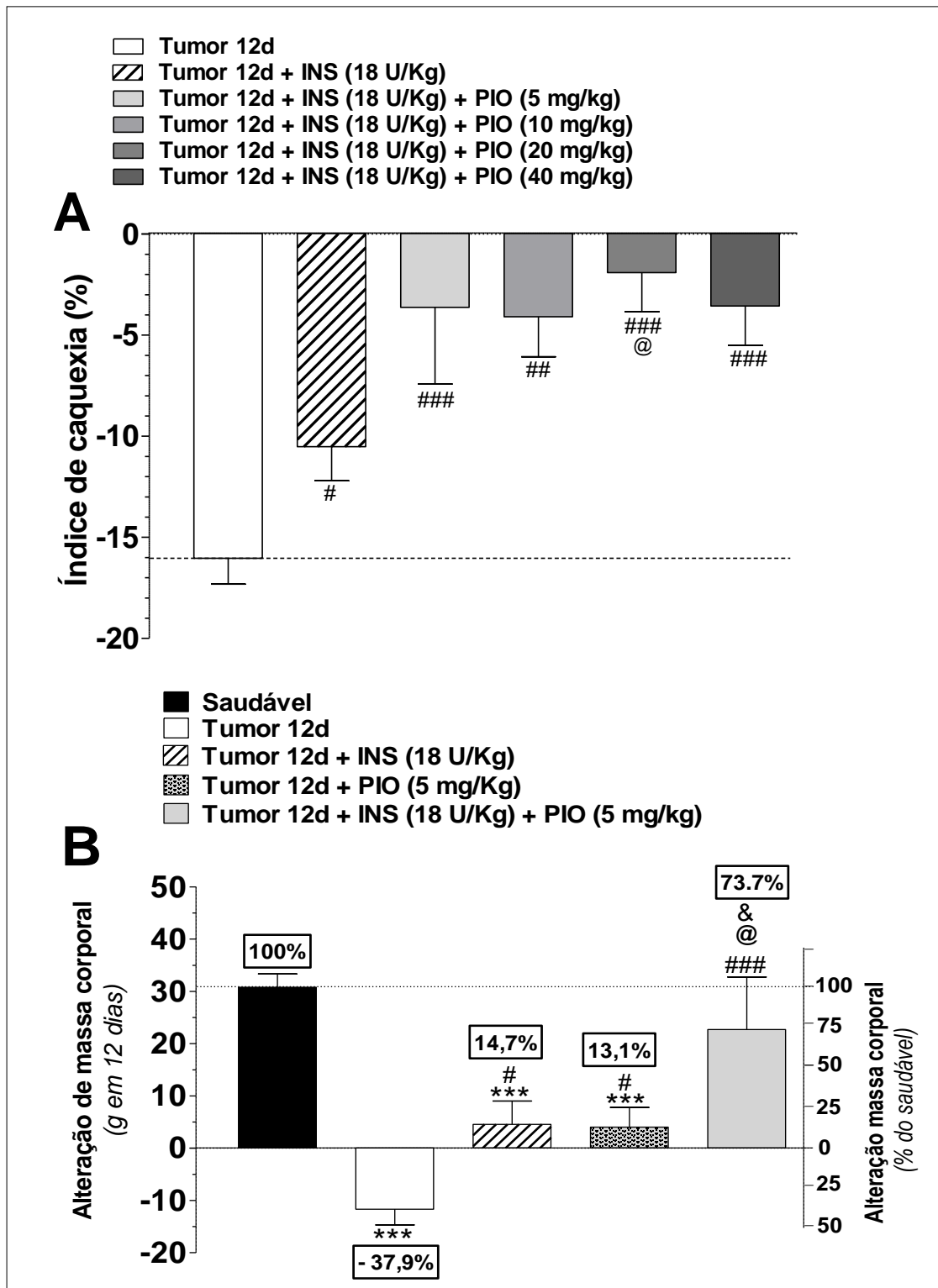


Figura 14. Índice de caquexia e alteração de massa corporal de ratos portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d) tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg, INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5, 10, 20 ou 40 mg/kg ou PIO 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 7 a 19 ratos. \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  vs Tumor; @ $p < 0,05$  vs INS e & $p < 0,05$  vs PIO (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### **4.6 Efeitos dos tratamentos com INS 18 U/kg e INS 18 U/kg + PIO 5mg/kg, por 12 dias, sobre a glicemia e sensibilidade periférica à INS.**

Ratos com 12 dias de tumor apresentaram menor glicemia em comparação aos ratos saudáveis (Figura 15). Ratos portadores de tumor tratados por 12 dias com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg apresentaram menor glicemia ( $p < 0,05$ ), 4 hs após o último tratamento, em comparação aos ratos portadores de tumor não tratados. A glicemia dos ratos portadores de tumor aumentou ( $p < 0,05$ ) gradativamente 8 e 12 hs após os últimos tratamentos, em comparação à 4 hs pós-tratamentos. Ratos com 12 e 24 hs pós-últimos tratamentos apresentaram glicemias similares, as quais foram semelhantes à dos ratos portadores de tumor não tratados (Figura 15).

No ITT, a administração endovenosa de INS regular (0,25 U/kg, veia cava) promoveu decaimento da glicemia nos ratos saudáveis, a qual foi menor aos 15 min ( $p < 0,05$ ), mas praticamente não alterou a glicemia dos ratos com 12 dias de tumor (Figura 16A), como mostrado pela sua menor ( $p < 0,05$ ) kITT, em comparação aos ratos saudáveis (Figura 16B). Entretanto, as kITTs dos ratos tratados por 12 dias com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg, 24 hs após o último tratamento, foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que a dos ratos portadores de tumor não tratados e similares às dos ratos saudáveis (Figura 16B). A kITT dos ratos tratados com INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg não foi significativamente maior que a dos ratos tratados com INS 18 U/kg.

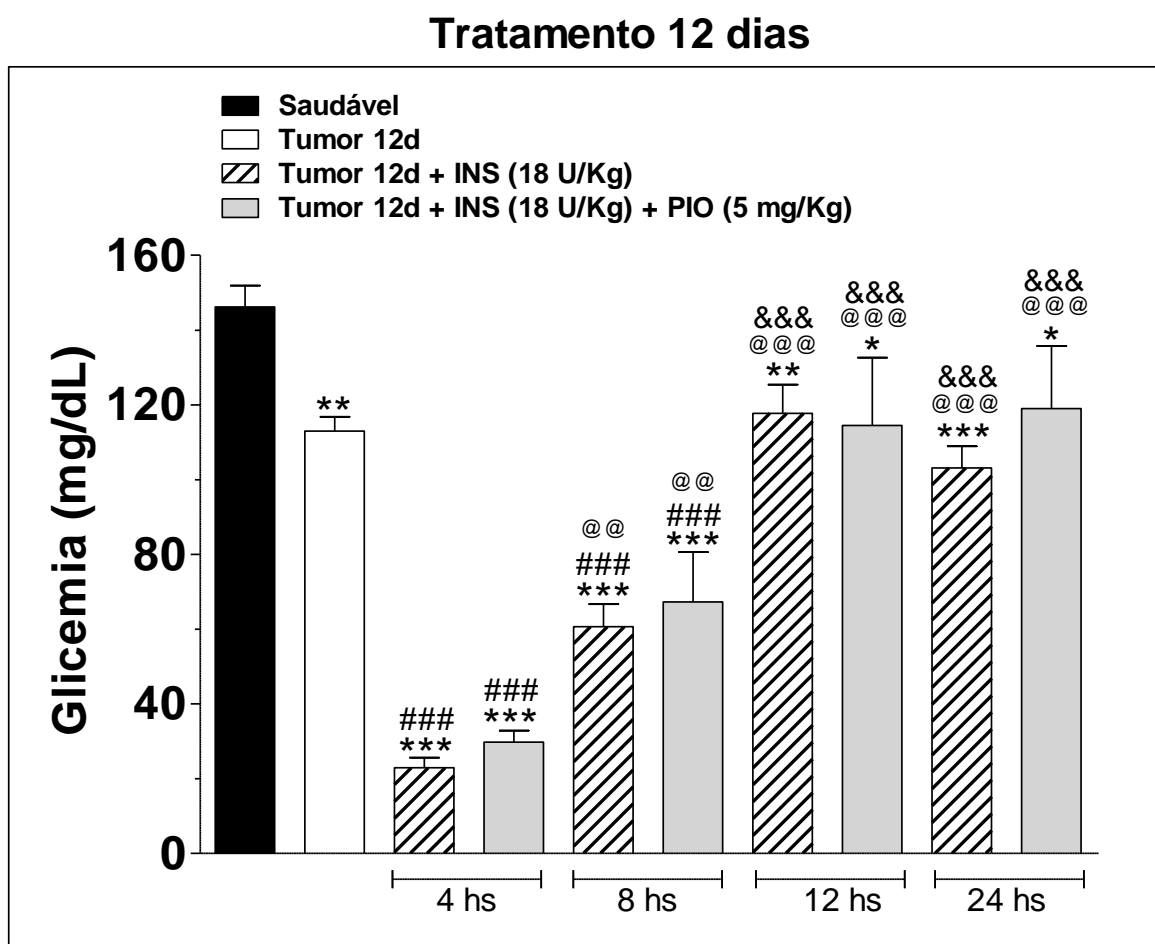


Figura 15. Glicemia de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), alimentados, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. A glicemia foi avaliada 4, 8, 12 e 24 hs após o último tratamento. Dados são a média  $\pm$  EPM de 4 a 12 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; ### $p < 0,001$  vs Tumor; @@ $p < 0,01$  e @@@ $p < 0,001$  vs INS ou INS + PIO 4 hs pós tratamento; &&& $p < 0,001$  vs INS ou INS + PIO 8 hs pós tratamento (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

### Tratamento 12 dias

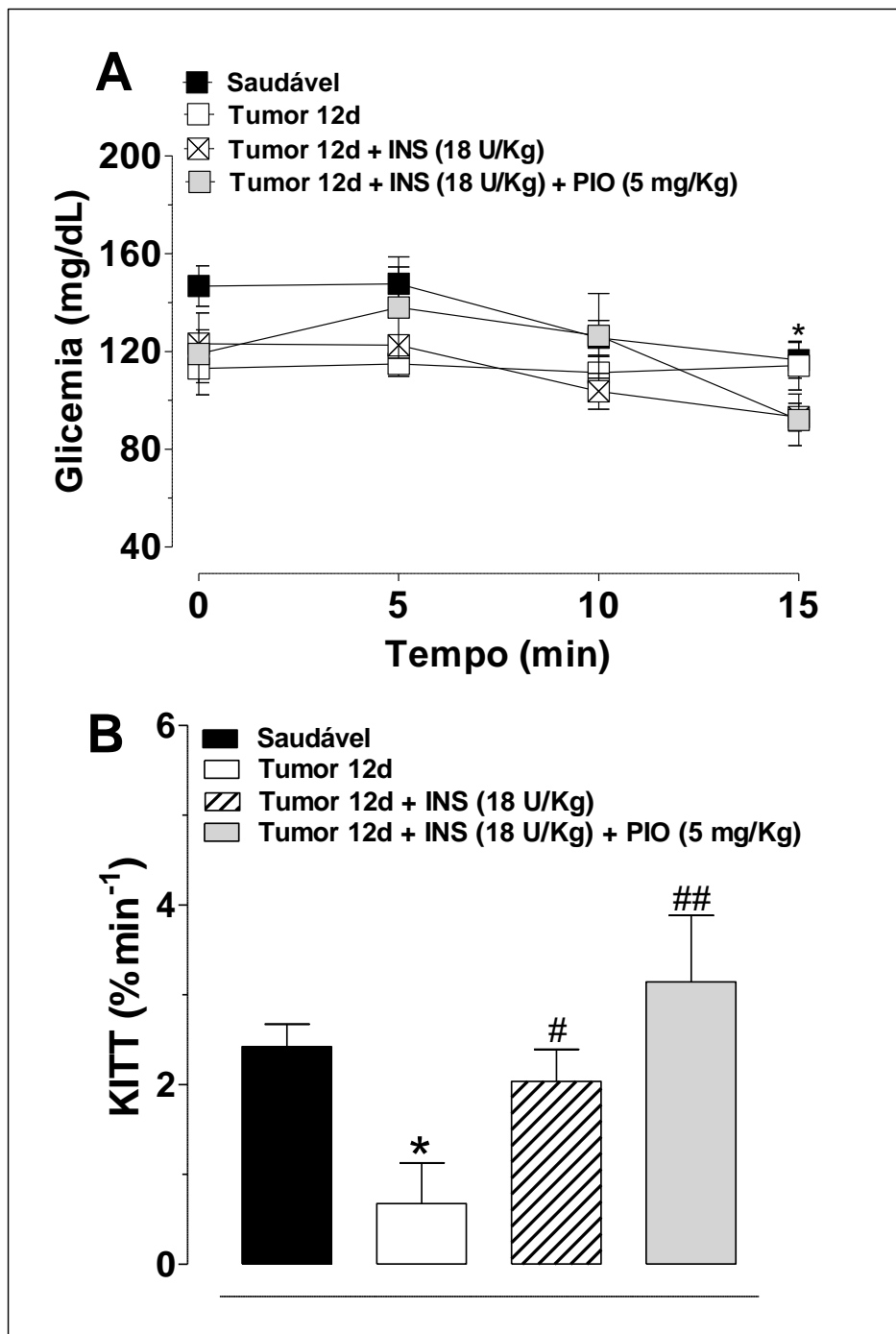


Figura 16. Glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (kITT) (B), durante o teste de tolerância à insulina (ITT), em ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor, tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Os experimentos foram realizados 24 hs após os últimos tratamentos. A glicemia foi avaliada em 0 (basal), 5, 10 e 15 min após a administração endovenosa de INS regular (humalog) (0,25 U/kg). Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 9 ratos. A: \* $p < 0,05$  vs basal (0 min) do mesmo grupo (ANOVA para mensurações repetidas). B: \* $p < 0,05$  vs Saudável; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### 4.7 Efeitos dos tratamentos com INS 18 U/kg e INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg, por 12 dias, sobre os TGLs e AGLs

Ratos portadores de tumor apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) concentração de TGLs (Figura 17A) e AGLs (Figura 17B) no plasma em comparação aos saudáveis. O tratamento, por 12 dias, com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/Kg reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os TGLs e AGLs, em comparação aos ratos portadores de tumor não tratados. A concentração de TGLs e AGLs no plasma dos ratos tratados com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/Kg não foi significativamente menor que a dos ratos tratados só com INS. A concentração de AGLs dos ratos tratados com 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/Kg foi menor ( $p < 0,05$ ) que a dos ratos saudáveis (Figura 17).

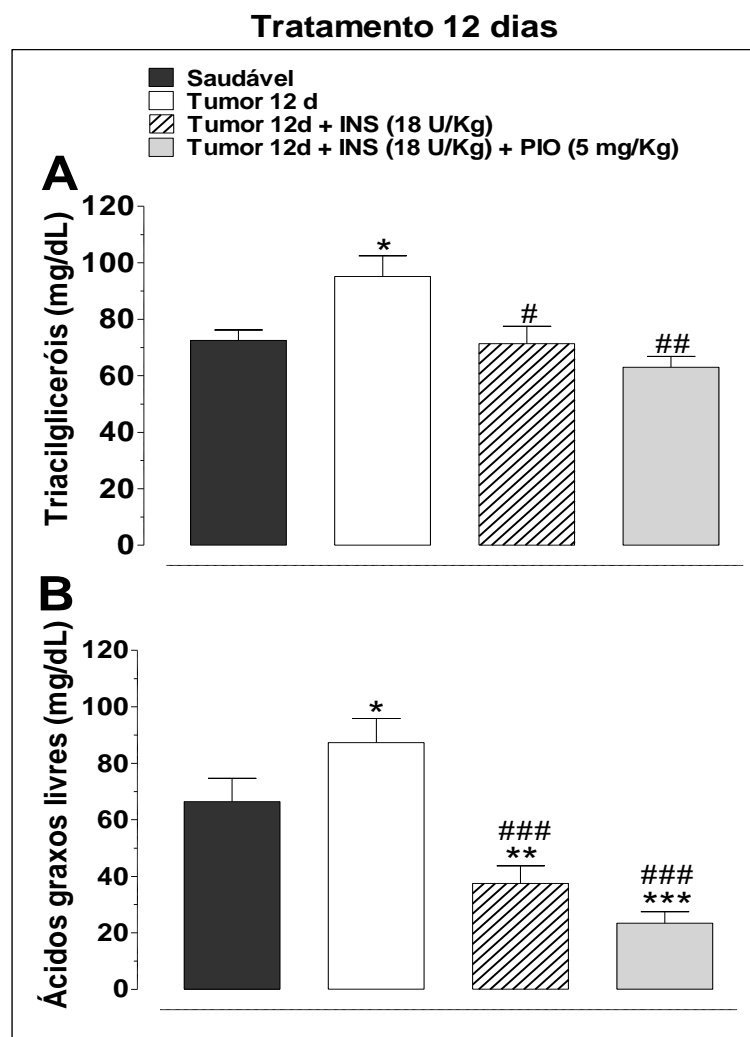


Figura 17. Triacilglicerol e ácidos graxos livres plasmáticos de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 8 a 13 ratos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs Saudável; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Newman-Keuls).

#### 4.8 Efeitos dos tratamentos com INS 18 U/kg e INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg, por 12 dias, sobre as citocinas TNF $\alpha$ e IL6 nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo

Não houve diferença na expressão de TNF $\alpha$  nos tecidos adiposos epididimal (Figura 18A) e subcutâneo (Figura 18B) dos ratos portadores de tumor em comparação aos saudáveis. O tratamento, por 12 dias, com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/Kg não alterou a expressão de TNF $\alpha$  destes tecidos adiposos (Figura 18A e 18B).

Ratos portadores de tumor também não apresentaram diferença na expressão de IL6 dos tecidos adiposos epididimal (Figura 18C) e subcutâneo (Figura 18D) em comparação aos saudáveis. O tratamento, por 12 dias, com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/Kg não afetou a expressão de IL6 do tecido adiposo epididimal (Figura 18C), mas aumentou ( $p < 0,05$ ) no tecido adiposo subcutâneo (Figura 18D), em comparação ao dos ratos portadores de tumor e saudáveis.

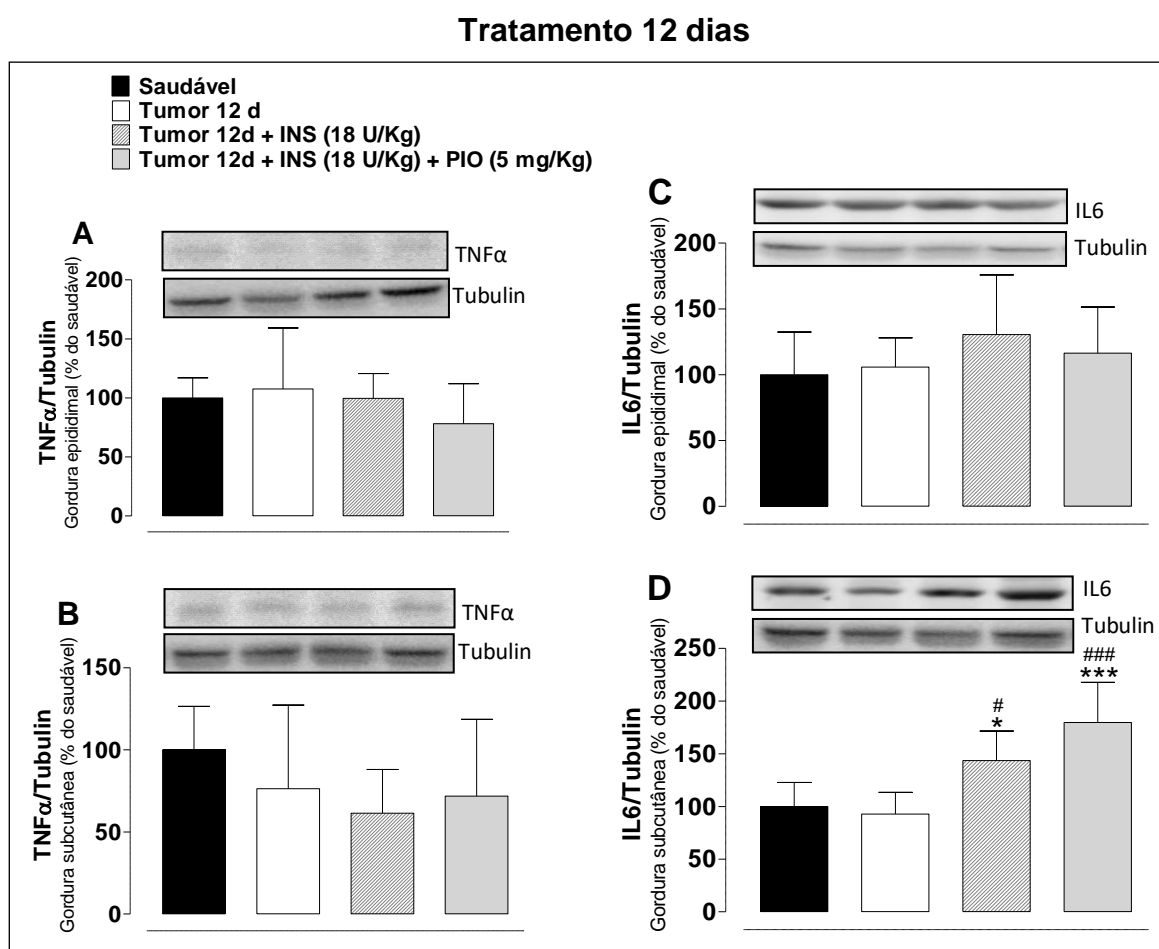


Figura 18. Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6) nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média  $\pm$  EPM de 5 a 7 ratos. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,05$  vs Saudável; # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  vs Tumor (ANOVA One-Way seguido de Tukey).

#### 4.9 Efeitos dos tratamentos com INS 18 U/kg e INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg, por 12 dias, sobre a p-Akt e perilipina nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo

Ratos portadores de tumor apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) expressão da p-Akt no tecido adiposo epididimal (Figura 19A), mas no tecido adiposo subcutâneo a expressão de p-Akt não foi significativamente menor (Figura 19B), em comparação aos saudáveis. A redução da p-Akt no tecido adiposo epididimal dos ratos portadores de tumor não foi afetada pelo tratamento com INS 18 U/kg (Figura 19A), mas foi restaurada ( $p < 0,05$ ) pela associação INS 18 U/kg+ PIO 5 mg/Kg (Figura 19A). A associação da INS 18U/kg + PIO 5 mg/Kg também aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão da p-Akt no tecido adiposo subcutâneo, enquanto o tratamento com INS 18 U/kg não promoveu aumento significativo da p-Akt, quando comparado aos ratos portadores de tumor não tratados (Figura 19B).

Ratos portadores de tumor não apresentaram aumento significativo na expressão de perilipina nos tecidos adiposos epididimal (Figura 19C) e subcutâneo (Figura 19D) em comparação aos ratos saudáveis. Os tratamentos com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg não afetaram este parâmetro (Figuras 19C e 19D).

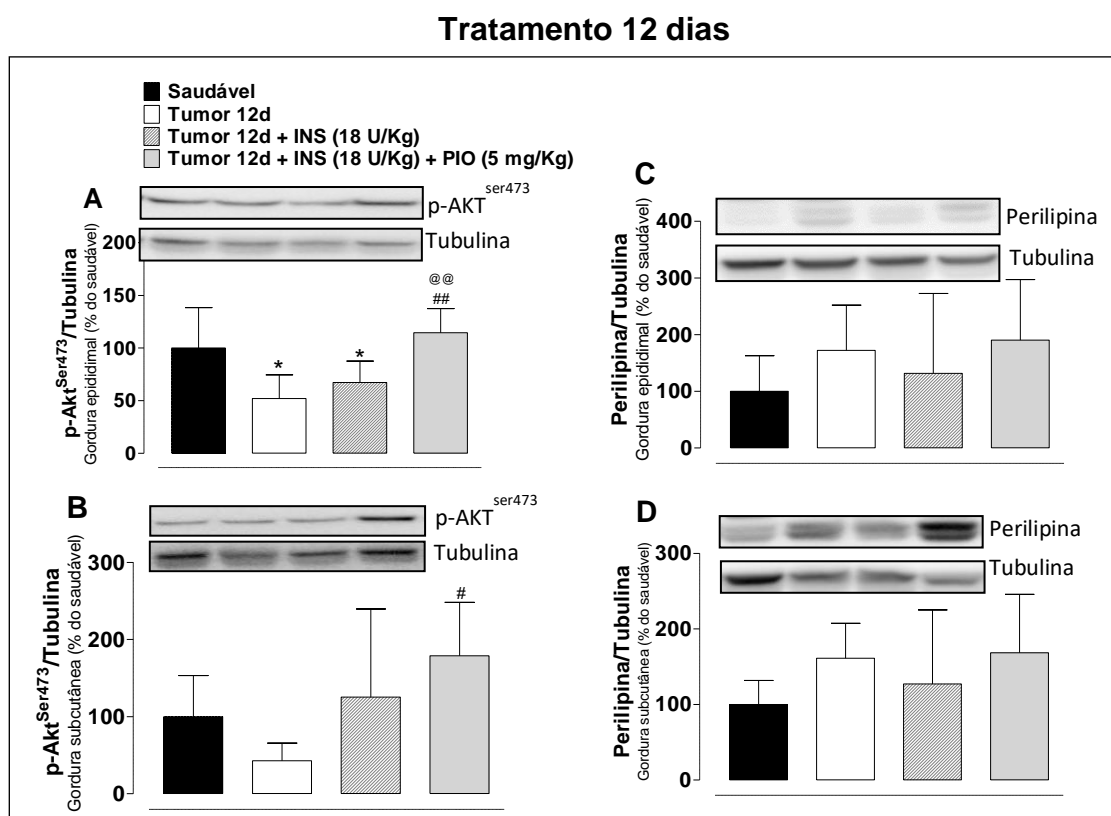


Figura 19. p-Akt<sup>Ser473</sup> e perilipina nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo de ratos saudáveis e portadores de tumor Walker-256 com 12 dias de tumor (Tumor 12d), tratados ou não com insulina (INS) 18 U/kg e INS 18 U/kg + pioglitazona (PIO) 5 mg/kg, a partir do dia da inoculação das células tumorais. Dados são a média ± EPM de 5 a 7 ratos. \*p<0,05 vs Saudável; #p<0,05 e ##p<0,01 vs Tumor; @@@p<0,01 vs INS (ANOVA One-Way seguido de Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

Nós testamos a hipótese de intervenção farmacológica com INS, isolada ou associada à PIO, ambas em várias doses, com o intuito de encontrar resultados promissores para o tratamento da caquexia do câncer. O melhor tratamento encontrado, levando em consideração a menor dose/menor eficácia, foi com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg. O tratamento por 12 dias com esta associação diminuiu a perda de massa corpórea e adiposa dos ratos portadores de tumor, mostrando efeito importante na prevenção da perda de peso, e preservação completa do tecido adiposo, um preditor de sobrevivência.

O desenvolvimento da síndrome da caquexia-anorexia nos ratos portadores de tumor foi validado por meio da observação da redução da ingestão alimentar e da perda de massa corpórea, adiposa e muscular (Figuras 2 a 14). Estas alterações são provocadas por mediadores da caquexia, os quais promovem anorexia (TNF $\alpha$ , IL1 e IL6) (MARTIGNONI et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005b; PATRA; ARORA, 2012), aumentam o catabolismo e reduzem o anabolismo no tecido adiposo (LMF, TNF $\alpha$ , IL1 e IL6) e muscular (PIF, TNF $\alpha$  e IL6) (MANTOVANI et al., 2000; GORDON; GRENN; GOGGIN, 2005; ARGILÉS et al., 2019). A hipoinsulinemia e resistência à INS, presentes nestes animais (FERNANDES et al., 1990; MIKSZA et al., 2013; DE MORAIS et al., 2017), também devem contribuir para estas alterações.

Os tratamentos com INS glargina nas doses de 9, 18 ou 27 U/kg, por 6 ou 12 dias, não alterou o crescimento tumoral (Figuras 2, 5 e 8), corroborando resultado prévio do laboratório com a INS NPH (40 U/kg) (DE MORAIS et al., 2017) e estudos com outros tipos de tumores (MOLEY et al., 1988; COSTELLI et al., 1999; CHEN; QIU, 2011). Esse é um resultado importante, uma vez que a INS glargina (análoga à INS humana) tem alta afinidade pelo receptor do fator de crescimento semelhante à INS tipo 1 (IGF-1), o que poderia aumentar o seu potencial mitogênico, e assim, o crescimento tumoral (KURTZHALS et al., 2000). No entanto, um estudo de toxicidade realizado em ratos e camundongos tratados com INS glargina por 2 anos, não encontrou nenhum achado neoplásico, indicativo de potencial carcinogênico, associado ao uso da INS

glargina (STAMMBERGER ET al., 2002), assim como nenhuma diferença nas características mitogênicas entre a INS glargina e a INS humana foi encontrada em cultura de células musculares humanas (CIARALDI; SASAOKA, 2011).

O tratamento isolado com INS 9 U/kg, por 6 ou 12 dias, também não teve efeito sobre a ingestão alimentar e nem sobre massa corpórea e adiposa (Figuras 2, 3 e 4). Entretanto, os tratamentos com INS 18 U/kg (Figuras 5 e 6) ou 27 U/kg (Figuras 8 e 9) por 12 dias, mas não por 6 dias, promoveram melhora significativa na perda de massa corpórea e adiposa (retroperitoneal e epididimal). O tratamento com a maior dose de INS (27 U/kg), por 12 dias, também aumentou a ingestão alimentar (Figura 8). Estes resultados reproduzem os efeitos benéficos da INS NPH (40 U/kg) na prevenção da anorexia, assim como da perda de peso e tecido adiposo retroperitoneal, obtidos em nosso laboratório com ratos portadores de tumor Walker-256 (DE MORAIS et al., 2017). Além disso, foi mostrado que o tratamento com INS aumentou o peso e a gordura corporal em pacientes com caquexia do câncer (LUNDHOLM et al., 2007) e melhorou o peso corporal e a ingestão alimentar em modelos animais de câncer (MOLEY et al., 1985; FERNANDES et al., 1991; CHEN; QIU, 2011).

O mecanismo envolvido no aumento da ingestão alimentar pela INS nos ratos portadores de tumor é desconhecido, visto que se encontra bem estabelecido que a INS é um hormônio anorexigênico (SCHWARTZ et al., 2000; CARVALHEIRA et al., 2001; FLIER, 2004; VELLOSO, 2006). Trabalhos têm postulado que o tratamento com altas doses de INS aumenta a ingestão alimentar, em parte, por causar hipoglicemia (MOLEY et al., 1988; DE MORAIS et al., 2017). A hipoglicemia por tempo mais prolongado, obtida com maiores doses de INS, levaria a ativação mais prolongada de receptores hipotalâmicos sensíveis à glicose, aumentando a ingestão alimentar (WILLIAMS et al., 2001).

A redução da perda de massa adiposa pelos tratamentos com INS (18 ou 27 U/kg) provavelmente se deveu aos efeitos antilipolíticos e lipogênicos da INS, e também aos seus efeitos adipogênicos, os quais ocorrem por ativação da via PI3K-Akt (Figura 1).

Por estimular a via PI3K/Akt, a INS diminui a atividade das principais lipases (ATGL e LHS) envolvidas na degradação dos TGLs (DAS et al., 2011; ARNER; LANGIN, 2014). A Akt ativada pela INS (p-Akt) estimula a fosfodiesterase-3B (PDE3B), a enzima que degrada a adenosina monofosfato cíclica (AMPc), diminuindo seu efeito estimulatório sobre a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (ZECHNER et al., 2012). Desse modo, por reduzir a atividade da PKA, a INS mantém a LHS

desfosforilada e, portanto, menos ativa, diminuindo seu efeito lipolítico (DAS et al., 2011; ARNER; LANGIN, 2014) (Figura 1). Estudos do nosso laboratório mostraram redução da p-LHS, a qual encontrou-se aumentada em ratos portadores de tumor Walker-256, pelo tratamento com INS NPH (40 U/kg) (DE MORAIS et al., 2017). Por reduzir a atividade da PKA, a INS também mantém as perilipinas (enzimas envolvidas na lipólise) desfosforiladas, o que impede a ação lipolítica da ATGL e LHS na gotícula de gordura, resultando em inibição da lipólise (DALAL, 2019) (Figura 1). As perilipinas, quando desfosforiladas, formam uma barreira protetora na superfície da gotícula de gordura, impedindo a ação dessas lipases (ATGL e LHS), ou seja, prevenindo a degradação dos TGLs (ZECHNER et al., 2012). Além disso, as perilipinas, quando desfosforiladas, encontram-se associadas à proteína coativadora da ATGL, denominada de proteína de identificação comparativa de genes 58 (CGI-58), impedindo a liberação da CGI-58 e conseqüentemente a ativação da ATGL e a degradação dos TGLs (LASS et al., 2011; TSOLI et al., 2016). Para a liberação da CGI-58 e ativação da ATGL é necessário que a perilipina seja fosforilada, o que pode ocorrer pelo aumento do LMF e  $TNF\alpha$ , dois mediadores da caquexia que aumentam o AMPc intracelular (EBADI; MAZURAK, 2015; UVERSKY et al., 2017).

Além de diminuir a atividade das enzimas lipolíticas (ATGL e LHS), a INS também pode diminuir a expressão dessas lipases (CZECH et al., 2013; TSOLI et al., 2016). Estudos do nosso laboratório mostraram que o tratamento com INS NPH (40 U/kg) reduziu a expressão da ATGL e LHS, as quais encontraram-se aumentadas no tecido adiposo retroperitoneal de ratos portadores de tumor Walker-256 (DE MORAIS et al., 2017). A INS também pode inibir a lipólise por ação no sistema nervoso central, via inibição simpática. Um estudo mostrou que concentração aumentada de INS no cérebro inibe a fosforilação da perilipina e da LHS, levando à redução de atividade da LHS e ATGL (SCHERER et al., 2011).

Com relação à lipogênese induzida pela INS, este efeito ocorre por aumento da atividade e/ou expressão de enzimas envolvidas na síntese de AGLs, por ativação da via PI3K-Akt (EGERMAN; GLASS, 2014) (Figura 1). Por meio desta via, a INS aumenta a expressão da proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), a qual promove a transcrição de genes lipogênicos tais como os da ATP-citrato-liase (ACL), acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintetase (FAS), glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPT) e diacilglicerol acetil-transferase-1 (DGAT1), enzimas que catalisam respectivamente a conversão de citrato (gerado no ciclo de Krebs) para acetil-CoA, de acetil-CoA para malonil-CoA, de malonil-CoA para AGLs e de AGLs para TGLs

(CZECH et al., 2013; SANDERS; GRIFFIN, 2016) (Figura 1). A INS também aumenta a lipogênese por aumentar a atividade e/ou expressão da LPL endotelial, por meio da via PI3K-Akt. A LPL degrada os TGLs da circulação, aumentando a disponibilidade de AGLs para a síntese de lipídeos nos adipócitos (CZECH et al., 2013, SAPONARO et al., 2015) (Figura 1).

Os efeitos adipogênicos da INS também ocorrem por aumento da SREBP-1c (KIM et al., 1998; SANDERS; GRIFFIN, 2016), a qual aumenta a produção de ligantes endógenos que ativam o PPAR $\gamma$  e, assim, a diferenciação dos adipócitos (KIM et al., 1998; CZECH et al., 2013). Além do mais, a INS pode promover a adipogênese pela supressão da atividade do fator de transcrição FoxO1, o qual reprime a atividade transcricional do PPAR $\gamma$  (NAKAE et al., 2003; KIM et al., 2009). O tratamento com INS resulta na fosforilação do FoxO1, dependente de Akt, o que impede sua translocação para o núcleo e conseqüentemente a inibição da atividade transcricional do PPAR $\gamma$  (DOWELL et al., 2003) (Figura 1).

Embora o tratamento, por 12 dias, com INS 18 ou 27 U/kg tenha promovido efeitos benéficos sobre a perda de massa adiposa, o mesmo não foi observado na perda de massa dos músculos gastrocnêmio e EDL (Figuras 7 e 10) dos ratos portadores de tumor. Uma vantagem observada é que ambas as doses de INS utilizadas (18 ou 27 U/kg) não acentuaram a perda de massa muscular, previamente observada em nosso laboratório com maior dose de INS NPH (40 U/kg) (DE MORAIS et al., 2017). Diferentemente da perda de massa dos músculos gastrocnêmio e EDL, o músculo sóleo apresentou aumento da sua massa nos ratos com 12 dias de tumor (Figuras 4, 7 e 10), o qual foi provavelmente devido ao trabalho feito por este músculo para apoiar e manter a mobilidade do animal, uma vez que o sóleo avaliado foi o do flanco esquerdo, oposto à localização do tumor. É importante mencionar que o sóleo, ao contrário do gastrocnêmio e EDL, é um músculo postural responsável para atividades prolongadas, como por exemplo a de suporte compensatório (DE MORAIS et al., 2017). O tratamento, por 12 dias, com INS 18 ou 27 U/kg também não alterou a massa do músculo sóleo.

Portanto, embora a INS iniba a proteólise e estimule a síntese proteica, os tratamentos com INS (9, 18 e 27 U/kg) não foram capazes de prevenir a perda de massa muscular provocada pelos mediadores da caquexia.

Diante disto, e também das similaridades dos efeitos benéficos dos tratamentos com INS 18 e 27 U/kg sobre a massa corpórea e adiposa, a menor dose de INS (18 U/kg) foi escolhida para ser associada com a PIO 5, 10, 20 e 40 mg/kg, um

sensibilizador de INS, com o intuito de encontrar resultados mais promissores em relação ao tratamento isolado com INS.

Os estudos mostraram que os tratamentos, por 6 ou 12 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg preveniram, de modo geral e praticamente similar, a perda de massa corpórea dos ratos portadores de tumor, sem afetar o crescimento tumoral e a anorexia (Figura 11). Os efeitos benéficos sobre a massa corpórea foram acompanhados de aumento das massas adiposas nos ratos tratados por 6 (epididimal e mesentérica) ou 12 (retroperitoneal, epididimal, mesentérica e subcutânea inguinal) dias (Figura 12). Vale ressaltar que nos ratos tratados com as associações, por 12 dias, o ganho de massa adiposa foi similar (retroperitoneal, mesentérica e subcutânea inguinal) ou maior (epididimal) que dos ratos saudáveis (Figura 12), evidenciando a preservação dos leitos adiposos com os tratamentos associados. A melhora da massa corpórea foi decorrente apenas da preservação da massa adiposa, uma vez que os tratamentos com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg não preveniram a perda de massa muscular (Figura 13).

O aumento da massa adiposa com o uso da PIO ou de outras TZDs, o qual é descrito como um efeito colateral indesejável no tratamento do diabetes tipo 2 (MORI et al., 1999; MIYAZAKI et al.; 2004) tem também sido descrito em modelos animais de câncer (ASP et al., 2010; TROBEC et al., 2014; BELUZI et al., 2015), nesse caso como um efeito benéfico. Em estudo do nosso laboratório, o tratamento por 12 dias com PIO 5 mg/kg ou PIO 5 mg/kg + INS 1 U/kg preveniu, embora discretamente, a perda de massa corpórea e adiposa retroperitoneal de ratos portadores de tumor Walker-256 (SILVA et al., 2017). Em corroboração, o tratamento com PIO 5 mg/kg aumentou a expressão gênica do PPAR $\gamma$  (fator transcricional adipogênico e lipogênico), a qual estava diminuída nos ratos portadores de tumor Walker-256 (BELUZI et al., 2015).

As TZDs, por ativação do PPAR $\gamma$ , estimulam a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (adipogênese) e aumentam a captação dos AGLs e sua conversão para TGLs (lipogênese), promovendo hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo (YAMAUCHI et al., 2001b) (Figura 1). O PPAR $\gamma$  desempenha papel importante na adipogênese (JANANI & KUMARI, 2015) e na regulação de genes associados às vias lipogogênicas, induzindo a transcrição de genes que codificam proteínas importantes dessa via, como a LPL, FATPs e as FABPs (BING et al., 2006). Desta forma, há um redirecionamento da captação dos AGLs para os adipócitos, resultando em maior formação de TGLs no tecido adiposo (MOLLER, 2001), levando a expansão desse tecido (MIYASAKI et al., 2004) (Figura 1).

Diante da constatação que os tratamentos, por 12 dias, com as associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg promoveram efeitos benéficos semelhantes sobre a massa corporal (Figura 11), reduzindo os índices de caquexia de modo praticamente similar (Figura 14A), a associação com a menor dose de PIO (INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg) foi selecionada para dar seguimento nas análises subsequentes (ITT, bioquímicas e moleculares).

Para propósito comparativo das massas corporais foi feito um grupo extra, tratado somente com PIO 5 mg/kg, por 12 dias (Figura 14B). Este grupo extra (PIO 5 mg/kg) revelou importante sinergismo entre os fármacos INS e PIO no ganho de massa corpórea.

De fato, o ganho de massa corporal dos ratos tratados com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg representou aproximadamente 73,7% do ganho dos ratos saudáveis (100%), sendo maior que a soma dos ganhos de massa corporal dos ratos tratados isoladamente com INS 18 U/kg (14,7%) ou PIO 5 mg/kg (13,1%), evidenciando importante sinergismo entre a INS e a PIO (Figura 14B).

Este sinergismo no ganho de massa corporal pode ter sido causado por ações cooperativas (interações sinérgicas) entre a INS e PIO no tecido adiposo, onde um fármaco pode ter favorecido/intensificado o efeito do outro (Figura 1). A PIO, por exemplo, além dos seus efeitos diretos aumentando a adipogênese e lipogênese, por ser um sensibilizador da INS, poderia favorecer as ações da INS nos ratos portadores de tumor, os quais são resistentes à INS (MIKSZA et al., 2013; DE MORAIS et al., 2017), e assim intensificar os efeitos adipogênicos, lipogênicos e antilipolíticos da INS.

Contudo, embora bem estabelecido no diabetes tipo 2, o efeito da PIO como sensibilizador da INS é pouco conhecido em portadores de câncer. Assim, nós avaliamos os efeitos dos tratamentos com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg sobre a sensibilidade periférica à INS nos ratos portadores de tumor, por meio do ITT.

Para minimizar a interferência da baixa glicemia no ITT, causada pelos tratamentos com INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg, a glicemia foi previamente avaliada 0, 4, 8, 12 e 24 hs após os últimos tratamentos com estes fármacos. Confirmando achados anteriores, ratos portadores de tumor, não tratados, apresentaram menor glicemia que os saudáveis (Figura 15), a qual é devida a alta taxa de consumo de glicose pelas células tumorais (CASSOLLA et al., 2012). Por sua vez, os ratos portadores de tumor que receberam os últimos tratamentos, com altas concentrações de INS (INS 18 U/kg ou INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg), 4 e 8 hs, mas não 12 e 24 hs antes do ITT, apresentaram redução acentuada da glicemia (Figura 15).

Diante destes resultados, o ITT foi realizado 24 hs após os últimos tratamentos, tendo em vista também que as concentrações de INS nos animais que receberam os tratamentos devem ser menores neste momento.

Como mostrado pelo ITT, o tratamento com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg melhorou significativamente a sensibilidade à INS dos ratos portadores de tumor. Interessantemente, o tratamento isolado com INS 18 U/kg também melhorou a sensibilidade insulínica, como evidenciado pela maior kITT em comparação aos ratos portadores de tumor não tratados (Figura 16).

O efeito sensibilizador da INS pelas TZDs, no diabetes tipo 2, está relacionado principalmente à redução das concentrações de TGLs e AGLs no sangue, os quais são indutores de resistência à INS (YAMAUCHI et al., 2001b; EVANS; BARISH; WANG, 2004; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). Intermediários do metabolismo dos AGLs (acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas) ativam serina quinases, como a proteína quinase C (PKC), quinase inibitória b (IKKb) e o fator nuclear kB (NFkB) (SCHULMAN, 2014; DELAURE, MAGNAN, 2007), os quais fosforilam o IR e IRS1 em resíduos de serina, prejudicando sua fosforilação em tirosina e, assim, a transdução do sinal insulínico (PETERSEN, SHULMAN, 2006) (Figura 1).

A melhora da sensibilidade insulínica dos ratos portadores de tumor pelos tratamentos com INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg ou INS 18 U/kg também deve estar relacionada à redução das concentrações de TGLs e AGLs, os quais estão aumentados nestes animais (Figura 17). Ambos os tratamentos (INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg ou INS 18 U/kg) diminuíram estes lipídeos no sangue (Figura 17).

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que o tratamento com PIO 5 mg/kg diminuiu os AGLs plasmáticos e melhorou a sensibilidade periférica à INS dos ratos portadores de tumor Walker-256. Contudo, neste estudo, a INS 1 U/kg + PIO 5 mg/kg não promoveu nenhum efeito adicional neste parâmetro, indicando que essa dose de INS (1 U/kg) é ineficaz para reduzir os AGLs e assim a resistência à INS (SILVA et al., 2017).

A INS diminui os TGLs e AGLs no sangue por apresentar efeitos opostos aos dos mediadores da caquexia (TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  e IL6 e/ou LMF), isto é, por aumentar a atividade e/ou expressão da LPL (ALBALAT et al., 2007), e inibir as enzimas lipolíticas ATGL e LHS (TSOLI et al., 2016) (Figura 1).

Por sua vez, as TZDs reduzem os TGLs e AGLs, em diabéticos tipo 2, por aumentarem a expressão de genes relacionados à captação e armazenamento de lipídeos no tecido adiposo (lipogênese) (TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994;

SCHOONJANS et al., 1995; SCHOONJANS; STAELS; AUWERX, 1996). Além disso, as TZDs reduzem os AGLs do sangue por aumentarem a liberação de adiponectina, uma adipocina que estimula a oxidação de AGLs (YAMAUCHI et al., 2001a, 2001b; MIYAZAKI et al., 2004), e por aumentarem a razão AMP:ATP, via inibição do complexo I da cadeia respiratória (BRUNMAIR et al., 2004), ativando a AMPK e assim as vias geradoras de ATP, como a oxidação de AGLs (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012; VIOLLET et al., 2012).

A melhora significativa da sensibilidade insulínica dos ratos portadores de tumor tratados com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg (Figura 16) também poderia estar relacionada à redução das citocinas indutoras de resistência à INS, tais como o TNF $\alpha$  e a IL6. Foi mostrado que as TZDs podem melhorar a sensibilidade à INS, em diabéticos tipo 2, por diminuírem a liberação de TNF $\alpha$  e resistina, adipocinas indutoras de resistência à INS (PERALDI et al., 1997; STEPPAN et al., 2001) e por aumentarem a liberação de adiponectina, uma adipocina sensibilizadora da INS (YAMAUCHI et al., 2001a; LIU et al., 2011) (Figura 1). Estes efeitos das TZDs, parecem também ocorrer em portadores de câncer. Um estudo mostrou que o tratamento com PIO 5 mg/kg aumentou a expressão da adiponectina nos ratos portadores de tumor Walker-256 (BELUZI et al., 2015), a qual estava diminuída nestes animais (BATISTA et al., 2012).

No entanto, embora as citocinas TNF $\alpha$  e IL6 estejam frequentemente aumentadas em portadores de câncer (MOLDAWER; ROGY; LOWRY, 1992; NOGUCHI et al., 1996) e estudos do nosso laboratório mostraram aumento de TNF $\alpha$  no tecido adiposo retroperitoneal de ratos portadores de tumor Walker-256 (DE MORAIS et al., 2017; SILVA et al., 2017), não houve aumento da expressão de TNF $\alpha$ , e nem da IL6, nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo dos ratos portadores de tumor (Figura 18). Porém, isso não exclui a possibilidade de aumento desta citocina em outros leitos adiposos. Os tratamentos com INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg ou INS 18 U/kg não alteraram a expressão de TNF $\alpha$  nos tecidos adiposos epididimal e subcutâneo e nem a expressão da IL6 no tecido adiposo epididimal. No entanto, ambos os tratamentos, aumentaram a expressão de IL6 no tecido adiposo subcutâneo, sugerindo que o aumento desta citocina neste tecido pode ter sido causado pela INS. Em acordo, foi mostrado que a administração de concentrações suprafisiológicas de INS, como a do presente estudo, estimulou a expressão de IL6 no tecido adiposo subcutâneo (KROGH-MADSEN et al., 2004) e que a INS estimulou a secreção de IL6 em adipócitos (VICENNATI et al., 2002; FASSHAUER et al., 2003).

Corroborando com os efeitos pronunciados dos tratamentos por 12 dias com a

associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg na prevenção da perda de massa corpórea e adiposa, na prevenção do aumento dos TGLs e AGLs e na melhora da sensibilidade periférica à INS, esta associação, mas não o tratamento isolado com INS 18 U/kg, restaurou completamente a reduzida expressão da p-Akt no tecido adiposo epididimal e aumentou significativamente a expressão da p-Akt nos tecido adiposo subcutâneo dos ratos portadores de tumor (Figura 19).

O aumento da p-Akt nos tecidos adiposos dos ratos tratados com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg mostra o importante efeito da PIO na via de sinalização da INS nos animais portadores de tumor. De fato, trabalhos relatam efeitos favoráveis das TZDs na sinalização da INS, aumentando a fosforilação em tirosina do IR e IRS1, ativando a cascata e a fosforilação em serina da Akt, assim como, aumentando a expressão do GLUT4 e a captação de glicose pelos adipócitos (CIARALDI et al., 2002; HAMMARSTEDT et al., 2005) (Figura 1).

Diferente do tratamento isolado com INS 18 U/kg do presente estudo, estudos prévios do laboratório mostraram que o tratamento com maiores doses de INS (40 U/kg) aumentou a expressão da p-Akt no tecido adiposo retroperitoneal (DE MORAIS et al., 2017). Sabe-se que altas concentrações de INS podem sobrepor os efeitos inibitórios dos fatores indutores de resistência à INS nas ações da INS (HOTAMISLIGIL et al., 1994; LIANG et al., 2008).

A resistência à INS presente nos ratos portadores de tumor, caracterizada também pela diminuída expressão da p-Akt, como ocorreu no tecido adiposo epididimal, resulta em aumento da expressão e da fosforilação da perilipina (p-perilipina), uma proteína facilitadora do processo lipolítico. Embora, a expressão da perilipina mostrou-se aumentada no tecido adiposo retroperitoneal, em trabalho anterior do nosso laboratório (DE MORAIS et al., 2017), e também nos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico em outro estudo (BATISTA et al., 2012), não houve aumento significativo da expressão dessa proteína no tecido adiposo epididimal e subcutâneo dos ratos portadores de tumor (Figura 19), sugerindo que possa haver heterogeneidade de respostas dos diferentes tecidos adiposos durante o desenvolvimento da caquexia associada ao tumor Walker. Finalmente, os tratamentos com INS 18 U/kg e INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg não afetaram a expressão de perilipina nos tecidos avaliados.

## **6 CONCLUSÃO**

Em síntese, os tratamentos com associações INS 18 U/kg + PIO 5, 10, 20 ou 40 mg/kg foram similarmente mais eficazes que o tratamento isolado com INS 18 U/kg. O tratamento com a associação INS 18 U/kg + PIO 5 mg/kg foi o melhor encontrado, considerando a menor dose/menor eficácia. Esta associação preveniu o aumento circulante de TGLs e AGLs (fatores indutores de resistência à INS), preveniu a resistência periférica à INS, ativou a Akt no tecido adiposo (proteína importante da via de sinalização da INS), preservou completamente o tecido adiposo (um preditor de sobrevivência) e reduziu a perda de peso dos ratos portadores de tumor, mostrando-se promissora no combate de alterações metabólicas e da perda de massa adiposa associada à caquexia do câncer.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados deste estudo mostram que o efeito colateral de um medicamento, usado para tratar uma doença, pode ser benéfico para o tratamento de outra doença. O ganho de peso produzido pelo tratamento com a PIO, relatado como um efeito adverso indesejável deste medicamento em diabéticos tipo 2, em conjunto com a INS (INS + PIO), beneficiou os ratos portadores de tumor, preservando completamente a massa adiposa e prevenindo a perda de massa corpórea, o que é associado a bom prognóstico em portadores de câncer.

Estudos futuros devem ser conduzidos na tentativa de encontrar fármacos que amenizem a perda de massa muscular nesta doença. A combinação de fármacos (coquetel) que previnam a perda de massa adiposa e muscular poderá ser uma estratégia para o tratamento da caquexia do câncer.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, J. T.; CANADA, T. W. Cachexia and anorexia in malignancy. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 10, n. 4, p. 791-800, 1996.

ALBALAT A, S-V. A.; CAPILLA, E.; GUTIERREZ, J.; PEREZ-SANCHEZ, J.; NAVARRO, I. Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p.151–159, 2007.

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

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2036-2046, 2005b.

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

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: a clinical challenge. **Corrent Opinion of Oncology**, v. 31, n. 4, p. 286-290, 2019.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, J.; ALMENDRO, V.; BUSQUETS, S., LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? **Medicinal Research Reviews**, v.25, p. 49-65, 2005a.

ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 25, p. 255-262, 2014.

ARRUDA, A. P.; MILANSKI, M.; ROMANATTO, T.; SOLON, C.; COOPE, A.; ALBERICI, L. C.; FESTUCCIA, W. T.; HIRABARA, S. M.; ROPELLE, E.; CURI, R.; CARVALHEIRA, J. B.; VERCESI, A. E.; VELLOSO, L. A. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 683-694, 2010.

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

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

BELUZI, M.; PERES, S. B.; HENRIQUES, F. S.; SERTIÉ, R. A.; FRANCO, F. O.; SANTOS, K. B.; KNOBL, P.; ANDREOTTI, S.; SHIDA, C. S.; NEVES, R. X.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M.; LIMA, F. B.; BATISTA, M. L. Jr. Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing animals: possible anti-cachectic effect. **PLoS One**, v.10, n. 3, p. e0122660, 2015.

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. 425-432, 1994.

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

BING, C.; RUSSELL, S.; BECKET, E.; POPE, M.; TISDALE, M. J.; TRAYHURN, P.; JENKINS, J. R. Adipose atrophy in cancer cachexia: Morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 1028-1037, 2006.

BOLLI, G.B.; OWENS, D. R. Insulin glargine. **Lancet**, v. 356, p.443-445, 2000.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNMAIR, B.; STANIEK, K.; GRAS, F.; SCHARF, N.; ALTHAYM, A.; CLARA, R.; RODEN, M.; GNAIGER, E.; NOHL, H.; WALDHAUSL, W.; FURNSINN, C. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1052–1059, 2004.

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

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

CASSOLLA, P.; MOREIRA, C. C.; LIBONI, T. F.; ZAIA, C. T.; BORBA-MURAD G. R.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. **Cell Biochemistry & Function**, v. 30, n. 4, p. 265-270, 2012.

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

CIARALDI, T. P.; SASAOKA, T. Review on the in vitro interaction of insulin glargine with the insulin/insulin-like growth factor system: potential implications for metabolic and mitogenic activities. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2011.

CIARALDI, T. P.; KONG, A. P.; CHU, N. V.; KIM, D. D.; BAXI, S.; LOVISCACH, M.; PLODKOWSKI, R.; REITZ, R.; CAULFIELD, M.; MUDALIAR, S.; HENRY, R. R. Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. **Diabetes**, v.51, n.1, p.30-36, 2002.

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

CZECH, M. P.; TENCEROVA, M.; PEDERSEN, D. J.; AOUADI, M. Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia**, v. 56, p. 949-964, 2013.

DAAS, S. I.; RIZEQ, B. R.; NASRALLAH, G. K. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 1, p. 13-22, 2018.

DAHLMAN, I.; MEJHERT, N.; LINDER, K.; AGUSTSSON, T.; MUTCH, D. M.; KULYTE, A.; ISAKSSON, B.; PERMERT, J.; PETROVIC, N.; NEDERGAARD, J.; SJÖLIN, E.; BRODIN, D.; CLEMENT, K.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; RYDÉN, M.; ARNER, P. Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 1541-1548, 2010.

DALAL, S.; HUI, D.; BIDAUT, L.; LEM, K.; DEL FABBRO, E.; CRANE, C.; REYES-GIBBY, C. C.; BEDI, D.; BRUERA, E. Relationships among body mass index, longitudinal body composition alterations, and survival in patients with locally advanced pancreatic cancer receiving chemoradiation: a pilot study. **Journal of Pain Symptom Manage**, v. 44, p. 181-191, 2012.

DALAL, S. Lipid metabolism in cancer cachexia. **Annals of Palliative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 13-23, 2019.

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

DE MORAIS, H.; DE FATIMA SILVA, F.; DA SILVA, F. G.; SILVA, M. O.; GRACIANO, M. F. R.; MARTINS, M. I. L.; CARPINELLI, Â. R.; MAZUCCO T. L.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, H. M. Insulin, not glutamine dipeptide, reduces lipases expression and prevents fat wasting and weight loss in Walker 256 tumor-bearing rats. **European Journal Pharmacology**, v. 806, p. 67-74, 2017.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 2, p. 142-148, 2007.

DEV, R.; BRUERA, E.; DALAL, S. Insulin resistance and body composition in cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 29, n. suppl2, p. ii18-ii26, 2018.

DI SEBASTIANO, K. M.; YANG, L.; ZBUK, K.; WONG, R. K.; CHOW, T.; KOFF, D.; MORAN, G. R.; MOURTZAKIS, M. Accelerated muscle and adipose tissue loss may predict survival in pancreatic cancer patients: the relationship with diabetes and anaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 302-312, 2013.

DOWELL, P.; OTTO, T. C.; ADI, S.; LANE, M. D. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45485-45491, 2003.

EBADI, M.; MAZURAK, V. C. Evidence and mechanisms of fat depletion in cancer. **Nutrients**, v. 6, p. 5280-5297, 2014.

EBADI, M.; MAZURAK, V. C. Potential biomarkers of fat loss as a feature of cancer cachexia. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 2015–2018, 2015.

EGERMAN, M.A.; GLASS, D. J. Signaling pathways controlling muscle mass. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n, 1, p. 59-68, 2014.

EVANS R.M.; BARISH G.D.; WANG Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004.

FALHOLT, K.; LUND, D.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fat acids in plasma. **Clinical Chimica Acta**, v. 46, p. 105-111, 1973.

FASSHAUER, M.; KLEIN, J.; LOSSNER, U.; PASCHKE, R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, p.147–152, 2003.

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

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

FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, p.1335-1347, 2002.

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

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 258, n. 6, p. 1033-1036, 1990.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; WABITSCH, M.; HOCHBERG, Z. Endocrinology of adipose tissue – an update. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 5, p. 314-321, 2007.

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

- FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 5, p. 2016-2229, 2006.
- FOULADIUN, M.; KÖRNER, U.; BOSAEUS, I.; DANERYD, P.; HYL TANDER, A.; LUNDHOLM, K. G. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care-correlations with food intake, metabolism and exercise capacity. **Cancer**, v. 103, n. 10, p. 2189-2198, 2005.
- GORDON, J. N.; GRENN, S. R.; GOGGIN, P. M. Cancer cachexia. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 98, p. 779-788, 2005.
- HAMMARSTEDT, A.; ROTTER SOPASAKIS, V.; GOGG, S.; JANSSON, P.-A.; SMITH, U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. **Diabetologia**, v.48, n. 1, p. 96–104, 2005.
- HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 251-262, 2012.
- HONORS, M. A.; KINZIG, K. P. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 2012.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.
- JANANI, C.; RANJITHA KUMARI, B. D. PPAR gamma gene – A review. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2015.
- KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M. Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. 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.
- KIM, J. B.; WRIGHT, H. M.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPAR gamma through the production of endogenous ligand. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. A95, p. 4333-4337, 1998.
- KIM, J. J.; LI, P.; HUNTLEY, J.; CHANG, J. P.; ARDEN, K. C.; OLEFSKY, J. M. FoxO1 haplo insufficiency protects against high-fat diet-induced insulin resistance with enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in adipose tissue. **Diabetes**, v. 58, p. 1275-1282, 2009.
- KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; KELLER, P.; KELLER, C.; PEDERSEN, B. K. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in human

subcutaneous adipose tissue. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 2, p. E234–E238, 2004.

KURTZHALS, P.; SCHÄFFER, L.; SØRENSEN, A.; JONASSEN, I.; SCHMID, C.; TRÜB, T. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. **Diabetes**, v. 49, p. 999-1005, 2000.

LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. PPAR $\gamma$  agonists in the treatment of type II diabetes is increased fatness commensurate with long-term efficacy? **International Journal of Obesity**, v. 27, p. 147-161, 2003.

LASS, A.; ZIMMERMANN, R.; OBERER, M.; ZECHNER, R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 14-27, 2011.

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

LIU, S.; WU, H. J.; ZHANG, Z. Q.; CHEN, Q.; LIU, B.; WU, J. P.; ZHU, L. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, p. 384-389, 2011.

LUIPPOLD, G.; BEDENIK, J.; VOIGT, A.; GREMLER, R. Short and long term glycemic control of streptozotocin induced diabetic rats using different insulin preparations. **PloS One**, v. 11, n. 6, p. e0156346, 2016.

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

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

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

MIYAZAKI, Y1.; MAHANKALI, A.; WAJCBERG, E.; BAJAJ, M.; MANDARINO, L. J.; DEFRONZO, R. A. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4312-4319, 2004.

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

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

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

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

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v. 414, p. 821-827, 2001.

MORI, Y.; MURAKAWA, Y.; OKADA, K.; HORIKOSHI H, YOKOYAMA J, TAJIMA N, IKEDA Y. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 22, n. 6, p. 908-912, 1999.

MURPHY, R. A.; WILKE, M. S.; PERRINE, M.; PAWLOWICZ, M.; MOURTZAKIS, M.; LIEFFERS, J. R.; MANESHGAR, M.; BRUERA, E.; CLANDININ, M. T.; BARACOS, V. E.; MAZURAK, V. C. Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 482-487, 2010.

NAKAE, J.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; BIGGS, W. H.; ARDEN, K. C.; ACCILI, D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. **Developmental Cell**, v.4, p. 119-129, 2003.

NANJAN, M. J.; MOHAMMED, M.; PRASHANTHA KUMAR, B. R.; CHANDRASEKAR, M. J. N. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 548-567, 2018.

NOGUCHI, Y; YOSHIKAWA, T.; MATSUMOTO, A.; SVANINGER, G. S.; GELIN, J. Are cytokines possible mediators of cancer cachexia? **Surgery Today**, v. 26, n. 7, p. 467-475, 1996.

NOGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; MARAT, D.; DOI, C.; MAKINO, T.; FUKUZAWA, K.; TSUBURAYA, A.; SATOH, S.; ITO, T.; MITSUSE, S. Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 887-892, 1998.

OKUNO, A.; TAMEMOTO, H.; TOBE, K.; UEKI, K.; MORI, Y.; IWAMOTO, K.; UMESONO, K.; AKANUMA, Y.; FUJIWARA, T.; HORIKOSHI, H.; YAZAKI,

Y.; KADOWAKI, T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 1354-1361, 1998.

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

PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1863-1869, 1997.

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

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. **Oncogenesis**, v. 5, p. e200, 2016.

QUEIROZ, J. C.; ALONSO-VALE, M. I.; CURI, R.; LIMA, F. B. Control of adipogenesis by fatty acids. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 581-894, 2009.

ROFE, A. M.; BOURGEOIS, C. S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, E. A. Altered insulin response to glucose in weight-losing cancer patients. **Anticancer Research**, v. 14, n. 2B, p. 647-650, 1994.

ROHM, M.; ZEIGERER, A.; MACHADO, J.; HERZIG, S. Energy metabolism in cachexia. **EMBO Reports**, v. 20, n. 4, p. e47258, 2019.

RONTI, T.; LUPATTELLI, G.; MANNARINO, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clinical Endocrinology**, v. 64, n. 4, p. 355-365, 2006.

SANDERS, F. W.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 91, n. 2, p. 452-468, 2016.

SAPONARO, C.; GAGGINI, M.; CARLI, F.; GASTALDELLI, A. The Subtle balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9453-9474, 2015.

SCHASCHKOW, A.; MURA, C.; DAL, S.; LANGLOIS, A.; SEYFRITZ, E.; SOOKHAREEA, C.; BIETGER, W.; PERONT, C.; JEANDIDIER, N.; PINGET, M.; SIGRIST, S.; MAILLARD, E. Impact of the type continuous insulin administration on metabolism in diabetic rat model. **Journal of Diabetes Research**, p. 1-10, 2016.

SCHERER, T.; O'HARE, J.; DIGGS-ANDREWS, K.; SCHWEIGER, M.; CHENG, B.; LINDTNER, C.; ZIELINSKI, E.; VEMPATI, P.; SU, K.; DIGHE, S.; MILSOM, T.; PUCHOWICZ, M.; SCHEJA, L.; ZECHNER, R.; FISHER, S. J.; PREVIS, SF.;

BUETTNER, C. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. **Cell Metabolism**, v. 13, p. 183-194, 2011.

SCHIMIDT, S. F.; ROHM, M.; BERRIEL DIAZ, M. Cancer cachexia: more than skeletal muscle wasting. **Trends Cancer**, v. 4, n. 12, p. 849-860, 2018.

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

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H.; MAHFOUDI, A.; KREY, G.; WAHLI, W.; GRIMALDI, P.; STAELS, B.; YAMAMOTO, T.; AUWERX, J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 33, p. 9269-9276, 1995.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1302, n. 2, p. 93-109, 1996.

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

SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; MOONEY, R. A. 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. 1353-1362, 2001.

SHULMAN, G. I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 1131-1141, 2014.

SILVA, F.; ORTIZ-SILVA, M.; DE SOUZA GALIA, W. B.; CASSOLLA, P.; GRACIANO, M. F.; ZAIA, C. T.; ZAIA, D.; CARPINELLI, A. R.; DA SILVA, F. G.; DE SOUZA, H. M. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. **Life Science**, v. 171, p. 68-74, 2017.

SILVA, F.; ORTIZ-SILVA, M.; GALIA, W. B. S.; CASSOLLA, P.; DA SILVA, F.G.; GRACIANO, M. F. R.; CARPINELLI, A. R.; DE SOUZA, H.M. Effects of metformin on insulin resistance and metabolic disorders in tumor-bearing rats with advanced cachexia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 5, p. 498-505, 2018.

STAMMBERGER, I.; BUBE, A.; DURCHFELD-MEYER, B.; TROSCHAU, G. Evaluation of the carcinogenic potential of insulin glargine (LANTUS) in rats and mice. **International Journal of Toxicology**, v. 21, p. 171-179, 2002.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307–312, 2001.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.26, p. 146-151, 2010a.

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

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438-442, 2001.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, p.1147-1156,1994.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ . **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 289-312, 2008.

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

TROBEC, K.; PALUS, S.; TSCHIRNER, A.; VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; LAINSCAK, M.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. Rosiglitazone reduces body wasting and improves survival in a rat model of cancer cachexia. **Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 1069–1075, 2014.

TSOLI, M.; SWARBRICK, M. M.; ROBERTSON, G. R. Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 54, p. 68-81, 2016.

UVERSKY, V. N.; EL-BAKY, N. A.; EL-FAKHARANY, E. M.; SABRY, A.; MATTAR, E. H.; UVERSKY, A. V.; REDWAN, E. M. Functionality of intrinsic disorder in tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 21, p. 3589–3618, 2017.

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

VICENNATI, V.; VOTTERO, A.; FRIEDMAN, C.; PAPANICOLAOU D. A. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 905–911, 2002

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; SANZ GARCIA, N.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v. 122, n. 6, p. 253-270, 2012.

VISCARRA, J. A.; WANG, Y.; HONG, I-H.; SUL, H. S. Transcriptional activation of lipogenesis by insulin requires phosphorylation of MED17 by CK2. **Science Signaling**, v. 10, n. 467, p. 1-11, 2017.

WAGNER, E. F.; PETRUZZELLI, M. Cancer metabolism: a waste of insulin interference. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 430-431, 2015.

WARNE, J. P. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key regulator of adipose tissue mass. **Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 351-355, 2003.

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

WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X. H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 683-701, 2001.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; HARA, K.; MORI, Y.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; AKANUMA, Y.; GAVRILOVA, O.; VINSON, C.; REITMAN, M. L.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K.; YODA, M.; NAKANO, Y. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001a.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; MURAKAMI, K.; MOTOJIMA, K.; KOMEDA, K.; IDE, T.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; MIKI, H.; TSUCHIDA, A.; AKANUMA, Y.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; KADOWAKI, T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) deficiency and PPAR agonist improve insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41245–41254, 2001b.

ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R.; EICHMANN, T. O.; KOHLWEIN, S. D.; HAEMMERLE, G.; LASS, A.; MADEO, F. FAT SIGNALS - lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279-291, 2012.

ZHANG, Z.; LIU, H.; LIU, J. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. S0168-8227, n. 17, p. 30315-30317, 2017.

ZHANG, H. H.; HUANG, J.; DÜVEL, K.; BOBACK, B.; WU, S.; SQUILACE, R.M.; CHIN-LEE, W.; BRENDAN, D. M. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6189, 2009.



## **ANEXOS**

### **ANEXO A**

#### **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 213/2016

Londrina, 30 de Setembro de 2016.

Prezada Pesquisadora,

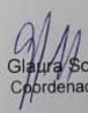
Solicitamos que o projeto intitulado "**Avaliação dos efeitos combinados de acetato de megestrol, ácido graxo ômega-3, celecoxibe, metformina, pioglitazona e insulina sobre os distúrbios metabólicos induzidos pelo tumor Walker-256 em ratos**", protocolo CEUA nº 16906.2016.54, sob a responsabilidade de **Helenir Medri de Souza**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **20/09/2016**.

O objetivo do projeto é investigar em ratos portadores de tumor Walker-256 o efeito da administração combinada de acetato de megestrol, ácido graxo ômega-3, celecoxibe, pioglitazona, metformina e insulina sobre: 1) Crescimento tumoral; 2) Ingestão alimentar; 3) Parâmetros de caquexia (massa corpórea, muscular e adiposa); 4) Parâmetros plasmáticos (glicose, ácidos graxos livres, triacilgliceróis, lactato e uréia); 5) Resposta periférica à insulina; 6) Parâmetros teciduais (TNF $\alpha$ , IL6, lipase hormônio sensível - LHS, perilipina fosforilada, lipase de triacilgliceróis - ATGL); 7) Proteínas da via de sinalização da insulina. Em todos os experimentos, animais portadores de tumor Walker-256 receberão, sempre no mesmo horário, 1 vez ao dia, durante 6 ou 12 dias de experimento, iniciando no dia da inoculação das células tumorais, à administração concomitante dos fármacos. Os experimentos serão avaliados no 6º e 12º dias de desenvolvimento tumoral. Após o término de todos os experimentos (ITT e outros), a veia cava inferior dos animais, anestesiados com tiopental (50 mg/Kg), será cortada para a morte por dessangramento. GI 2.

Vigência do Projeto	01/02/2017 a 01/10/2019
Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	480
Peso/Idade	220-230 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	-----

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Profa. Dra.  Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Helenir Medri de Souza**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação do Biotério Central/UEL; Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e

Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas